

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BEATRIZ ISABELLA CESTARO

AVALIAÇÃO DE DISPOSITIVOS DE EXTRAÇÃO COM MEMBRANAS
MICROPOROSAS DE POLIPROPILENO PARA DETERMINAÇÃO DE
COMPOSTOS CARCINOGÊNICOS EM URINA DE FUMANTE

CURITIBA

2023

BEATRIZ ISABELLA CESTARO

AVALIAÇÃO DE DISPOSITIVOS DE EXTRAÇÃO COM MEMBRANAS
MICROPOROSAS DE POLIPROPILENO PARA DETERMINAÇÃO DE
COMPOSTOS CARCINOGENÉTICOS EM URINA DE FUMANTE

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Química, no Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Exatas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Cestaro, Beatriz Isabella

Avaliação de dispositivos de extração com membranas microporosas de polipropileno para determinação de compostos carcinogênicos em urina de fumante / Beatriz Isabella Cestaro. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Bruno José Gonçalves da Silva

1. Urina – Análise. 2. Fumantes. 3. Aminas. 4. Cromatografia gasosa. 5. Espectrometria de massas. 6. Câncer. 7. Polipropileno. 8. Membranas microporosas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Silva, Bruno José Gonçalves da. IV. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **BEATRIZ ISABELLA CESTARO** intitulada: **Avaliação de Dispositivos de Extração com Membranas Microporosas de Polipropileno para Determinação de Compostos Carcinogênicos em Urina de Fumante**, sob orientação do Prof. Dr. BRUNO JOSÉ GONÇALVES DA SILVA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 21 de Agosto de 2023.

Assinatura Eletrônica

23/08/2023 09:26:10.0

BRUNO JOSÉ GONÇALVES DA SILVA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

23/08/2023 11:00:25.0

LUCIA REGINA ROCHA MARTINS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/08/2023 10:54:05.0

NOEMI NAGATA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/08/2023 13:18:00.0

GILBERTO ABATE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/08/2023 11:20:25.0

SANDRO XAVIER DE CAMPOS

Avaliador Externo (null)

CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-3006 - E-mail: cpgquim@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 308990

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 308990

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva, pela orientação, sempre com muita paciência e bom humor, por toda a ajuda e compreensão durante esse processo, principalmente durante o período de pandemia. Agradeço por sempre cultivar uma comunicação aberta, leve e tranquila, por me assegurar nos momentos de estresse e pelo impacto positivo na minha formação acadêmica e profissional. Eu não poderia pedir um melhor orientador, e pelo qual serei sempre grata.

À Prof^a. Dr^a. Noemi Nagata, parecerista deste projeto, pelo auxílio em diversas etapas deste estudo, sendo sempre solícita e acolhedora com as minhas dúvidas, e pelas inúmeras contribuições.

Aos demais membros das bancas avaliadoras dos exames de Qualificação e Defesa, Prof. Dr. Gilberto Abate, Prof. Dr. Dênio Emanuel Pires Souto, Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos e Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Rocha Martins, pelas contribuições valiosas a este trabalho.

Ao meu grupo de pesquisa, CroMe, pelo companheirismo, colaboração e acolhimento em diversos momentos nesses seis anos e meio, em especial aos meus amigos Rayta, Andressa, Letícia, Naiara, Renata, Ana e João. Agradeço pelo ambiente de trabalho agradável e divertido proporcionado por vocês, que tornam o dia a dia na bancada muito mais fácil.

À minha "frente de batalha", Rayta e Sheisa, que foram sempre as primeiras a me ajudar a lidar com os percalços do Doutorado, e foram um apoio essencial para a finalização desse projeto. Vocês estiveram do meu lado sem falta nos momentos bons e nos difíceis, tanto no aspecto acadêmico quanto pessoal. Todos sabem que a pós-graduação não é fácil, mas sem vocês teria sido infinitamente mais difícil.

À minha companheira matutina de laboratório, Mayara, a qual sempre me deu apoio, e que, apesar de nossas pesquisas não terem quase nenhuma sobreposição, estava sempre disponível para me ouvir, me aconselhar, e com quem eu dividi muitas risadas nos últimos anos, sejam essas de alegria ou de desespero.

Ao Leonardo e ao Luigy, cuja companhia nesses últimos meses ajudou infinitamente na etapa de escrita. Agradeço o carinho, o apoio, as distrações e as muitas risadas que aliviaram a tensão num período de alto estresse.

À Jéssica, Renata, Amanda e Priscila, que participaram de muitas reflexões, conversas filosóficas e sessões de terapia em diversos momentos no Doutorado, sejam eles presencialmente ou à distância.

Ao meu "bando", Ana, Rafael, Kelly e Simone, que me acompanharam desde os primeiros dias de iniciação científica e permanecem amigos muito especiais. Agradeço pela amizade, apoio e bons vinhos. Agradeço especialmente a Ana e Rafael, que durante o período de escrita me ajudaram a me distrair e dissipar o peso dessa reta final tantas vezes.

À Ana e à Jéssica, que mesmo com as vidas atribuladas e distância física permaneceram ao meu lado, pelo acolhimento e apoio inabalável após áudios chorosos, e por me ajudarem a acreditar em mim quando precisei.

À minha eterna dupla, Raquel, a qual estive do meu lado em todos os momentos desde a graduação, cujo carinho e palavras acolhedoras foram muito importantes durante os anos de pós-graduação.

Aos demais amigos que fiz durante os dez anos e meio na UFPR, pelos papos, distrações, comilanças e risadas: Carmen, Carolina, Cintia, Francielle, Grazielle, Monize, Luana, Shelden, Tathiane, Alecsandra, Eduardo, Larissa e Marcos.

Às minhas meninas de São José, Ana, Andreza e Karin, que me acompanharam em absolutamente toda a minha trajetória acadêmica, escutando meus desabafos detalhados e minhas comemorações tantas vezes. Agradeço por estarem sempre presentes na minha vida, e sei que estarão do meu lado para tudo que há por vir.

A toda minha família, cujo amor e amparo me permitiram chegar até aqui, e que compreenderam minha ausência no decorrer dos últimos anos.

Às minhas irmãs, Débora e Luciana, que sempre foram meus exemplos e minha rede de segurança, por ouvirem tantas vezes os mesmos desabafos e sempre me ajudarem a superar as crises nesses últimos anos.

Aos meus pais, Noeli e Valdomiro, cujo incentivo e apoio foi essencial para eu começar essa jornada da pós-graduação, e que me ajudaram a me manter firme com seu carinho e dedicação em toda a minha vida.

A todos os participantes voluntários desta pesquisa.

A todos que contribuíram com a minha formação até aqui.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES.

RESUMO

A queima do tabaco leva a produção de diversos compostos carcinogênicos, como as aminas aromáticas, as quais podem atuar como biomarcadores urinários de exposição à fumaça de cigarro. Devido às baixas concentrações destes compostos na urina e à complexidade de matrizes biológicas, o desenvolvimento de métodos bioanalíticos seletivos e com alta detectabilidade para sua determinação em urina é de grande importância. Desse modo, no presente estudo teve-se como objetivo desenvolver um método para determinação de o-toluidina (o-TOL), 1-naftilamina (1-NA) e 2-naftilamina (2-NA) em amostras de urina de fumantes ativos e passivos empregando extração em fase sólida com membrana microporosa assistida por ultrassom, derivatização em micro-ondas e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas sequencial. As análises em sistema cromatográfico foram conduzidas empregando injeção *splitless* com pulso de pressão, totalizando 14 min de análise, enquanto as aquisições espectrométricas foram realizadas empregando monitoramento de reações múltiplas. Em relação ao preparo de amostras, alíquotas de urina de 7,5 mL foram submetidas a uma etapa de hidrólise ácida a 80 °C por 1 hora, seguido de ajuste a pH 10 e adição de metanol (10,0% (v/v)). O procedimento de extração assistida por ultrassom foi realizado utilizando quatro dispositivos com sete segmentos de 0,2 cm de membrana microporosa de polipropileno por 60 min, seguido de uma etapa de dessorção em banho ultrassônico por 30 min empregando 400 µL de hexano como solvente de dessorção. Os extratos foram submetidos à derivatização com 10,0 µL de anidrido pentafluoropropiônico por 3 min em forno micro-ondas doméstico a 400 W. O método desenvolvido demonstrou-se adequado para a determinação de ambas as naftilaminas na faixa de concentração de 25,0 a 500,0 µg L⁻¹, fornecendo linearidade com coeficiente de correlação r superior a 0,99663, precisão em termos de desvio padrão relativo na faixa de 7,52 a 14,36% para 1-NA e 0,80 a 9,82% para 2-NA, exatidão na faixa de 94,38 a 116,71% para 1-NA e 98,00 a 118,77% para 2-NA. Ensaios de recuperação realizados na concentração de 120 µg L⁻¹ forneceram taxas de recuperação 91,86 e 58,43% para 1-NA e 2-NA, respectivamente. Para a o-TOL não foi possível verificar uma curva analítica satisfatória na faixa de concentração avaliada, de forma que o método bioanalítico não poderia ser aplicado de forma quantitativa para este analito. Porém o método proposto forneceu seletividade e especificidade adequadas para todos os analitos, indicando sua aplicabilidade em caráter qualitativo na identificação dos mesmos. O método foi aplicado de forma satisfatória para amostras de urina de fumantes passivos e ativos, sendo a 1-NA determinada na faixa de 20,98 a 89,09 µg 24 h⁻¹ em amostras de fumantes ativos, enquanto o-TOL e 2-NA foram detectados nestas amostras. Já nas amostras de urina de fumantes passivos todos os analitos foram detectados.

Palavras-chave: urina de fumantes, aminas aromáticas, derivatização em micro-ondas, MMSPE, GC-MS/MS.

ABSTRACT

Tobacco burning leads to the formation of various carcinogenic compounds, such as aromatic amines, which can be evaluated as urinary biomarkers of exposure for tobacco smoke. Due to the low concentrations of such compounds in urine and the high complexity of biological matrices, the development of selective bioanalytical methods with high detectability for its determination is of great importance. The present study focuses on the development of a bioanalytical method for the determination of *o*-toluidine (*o*-TOL), 1-naphthylamine (1-NA) and 2-naphthylamine (2-NA) in first and secondhand smoker urine by microporous membrane solid phase extraction, microwave derivatization and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Chromatographic analysis was conducted using splitless pressure-pulse injection, totalizing 14 min of analysis time, while spectrometric acquisitions were conducted in multiple reaction monitoring mode. Sample preparation was conducted using 7.5 mL aliquots of urine, which were subjected to acid hydrolysis for 1 hour at 80 °C, followed by pH adjustment to pH 10 and methanol addition (10.0% (v/v)). Ultrasound-assisted extraction procedure was conducted using four devices equipped with seven 0.2 cm polypropylene microporous membrane segments for 60 min, followed by an ultrasound-assisted desorption step using 400 µL of hexane for 30 min. The resulting extracts were microwave derivatized with 10.0 µL of pentafluoropropionic anhydride for 3 min at 400 W. The developed method was considered satisfactory for the determination of 1-NA and 2-NA in a concentration range from 25.0 to 500.0 µg L⁻¹, providing a linearity with Pearson's *r* higher than 0.99663, precision as relative standard deviation in the range of 7.52 to 14.36% for 1-NA and 0.80 to 9.82% for 2-NA, accuracy in the range of 94.38 to 116.71% for 1-NA and 98.00 to 118.77% for 2-NA. Recovery assays conducted at a concentration of 120 µg L⁻¹ provided recovery rates of 91.86 and 58.43% for 1-NA and 2-NA, respectively. For *o*-TOL it was not possible to obtain a satisfactory analytical curve in the concentration range evaluated, so that the bioanalytical method is not applicable for the quantification of such analyte, however, the method provided satisfactory selectivity and specificity for all analytes, indicating the potential as a qualitative method for its identification. The bioanalytical method was applied satisfactorily to first and secondhand smoker urine samples, and 1-NA was found in a concentration range of 20.98 to 89.09 µg 24 h⁻¹ in firsthand smoker urine samples, while *o*-TOL and 2-NA were detected in these samples. As for the secondhand smoker urine samples, all analytes were detected.

Key-words: smoker's urine, aromatic amines, microwave derivatization, MMSPE, GC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ATIVAÇÃO METABÓLICA DE AMINAS AROMÁTICAS (EXEMPLO: 2-NAFTILAMINA)	6
FIGURA 2 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ANALITOS SELECIONADOS	7
FIGURA 3 – MODOS DE AQUISIÇÃO EM UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS TIPO TRIPLO QUADRUPOLO.....	13
FIGURA 4 – TENDÊNCIA DE ADSORÇÃO DE AMINAS ATRAVÉS DA INTERAÇÃO COM GRUPOS SILANÓIS	14
FIGURA 5 – REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DE AMINAS COM ANIDRIDO PENTAFLUOROPROPIÔNICO.....	15
FIGURA 6 – ESQUEMAS DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO BASEADAS EM FASE SÓLIDA	19
FIGURA 7 – MEMBRANAS MICROPOROSAS/FIBRAS OCAS DE POLIPROPILENO (A), ONDE (B) MICROGRAFIA ÓPTICA COM MAGNIFICAÇÃO DE 47X, (C) MICROGRAFIA DE VARREDURA ELETRÔNICA COM MAGNIFICAÇÃO DE 50X E (D) 300X.....	20
FIGURA 8 – ESQUEMA GERAL DE EXTRAÇÕES BASEADAS EM DISPOSITIVOS COM MEMBRANAS MICROPOROSAS/FIBRAS OCAS POLIMÉRICAS.....	22
FIGURA 9 – ESQUEMA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM MEMBRANA MICROPOROSA NOS MODOS DE IMERSÃO DIRETA E <i>HEADSPACE</i>	23
FIGURA 10 – DISPOSITIVO DE MMSPE (EXEMPLO: 7 x 0,2 cm).....	37
FIGURA 11 – EFEITO DA RAMPA DE AQUECIMENTO (n=3) NA RESPOSTA DOS ANALITOS (A) NÃO DERIVATIZADOS (o-TOL – 10,0 mg L ⁻¹ , 1-NA E 2-NA – 2,5 mg L ⁻¹) E (B) DERIVATIZADOS (o-TOL – 2,0 mg L ⁻¹ , 1-NA E 2-NA – 1,0 mg L ⁻¹).....	47
FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO OBTIDO PARA A RAMPA DE AQUECIMENTO F – 10,0 mg L ⁻¹	49
FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO OBTIDO PARA A RAMPA DE AQUECIMENTO C' – 2,0 mg L ⁻¹ (o-TOL) E 1,0 mg L ⁻¹ (1-NA E 2-NA)	49
FIGURA 14 – EFEITO DA TEMPERATURA DO INJETOR (n=3) NA RESPOSTA DOS ANALITOS.....	50
FIGURA 15 – EFEITO DA TEMPERATURA DA LINHA DE TRANSFERÊNCIA (n=3) NA RESPOSTA DOS ANALITOS (A) NÃO DERIVATIZADOS (o-TOL – 10,0 mg L ⁻¹ ,	

1-NA E 2-NA – 2,5 mg L ⁻¹) E (B) DERIVATIZADOS (o-TOL – 2,0 mg L ⁻¹ , 1-NA E 2-NA – 1,0 mg L ⁻¹)	52
FIGURA 16 - EFEITO DA PRESSÃO DO PULSO DE PRESSÃO (n=3) NA RESPOSTA DOS ANALITOS (A) NÃO DERIVATIZADOS (o-TOL – 10,0 mg L ⁻¹ , 1-NA E 2-NA – 2,5 mg L ⁻¹) E (B) DERIVATIZADOS (o-TOL – 2,0 mg L ⁻¹ , 1-NA E 2-NA – 1,0 mg L ⁻¹)	53
FIGURA 17 - EFEITO DA DURAÇÃO DO PULSO DE PRESSÃO (n=3) NA RESPOSTA DOS ANALITOS (A) NÃO DERIVATIZADOS (o-TOL – 10,0 mg L ⁻¹ , 1-NA E 2-NA – 2,5 mg L ⁻¹) E (B) DERIVATIZADOS (o-TOL – 2,0 mg L ⁻¹ , 1-NA E 2-NA – 1,0 mg L ⁻¹)	54
FIGURA 18 - EFEITO DA DURAÇÃO DO PULSO DE PRESSÃO NA ALTURA DO PICO DA o-TOLUIDINA NÃO DERIVATIZADA – CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO	55
FIGURA 19 - EFEITO DO MODO DE INJEÇÃO (n=3) NA RESPOSTA DOS ANALITOS (A) NÃO DERIVATIZADOS (o-TOL – 10,0 mg L ⁻¹ , 1-NA E 2-NA – 2,5 mg L ⁻¹) E (B) DERIVATIZADOS (o-TOL – 2,0 mg L ⁻¹ , 1-NA E 2-NA – 1,0 mg L ⁻¹)	56
FIGURA 20 - EFEITO DO DO TEMPO DE AMOSTRAGEM DO MODO DE INJEÇÃO <i>SPLITLESS</i> (n=3) NA RESPOSTA DOS ANALITOS (A) NÃO DERIVATIZADOS (o-TOL – 10,0 mg L ⁻¹ , 1-NA E 2-NA – 2,5 mg L ⁻¹) E (B) DERIVATIZADOS (o-TOL – 2,0 mg L ⁻¹ , 1-NA E 2-NA – 1,0 mg L ⁻¹)	58
FIGURA 21 - CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS OTIMIZADOS PARA ANALITOS NÃO DERIVATIZADOS E DERIVATIZADOS – 10,0 mg L ⁻¹ (o-TOL) e 1,0 mg L ⁻¹ (1-NA e 2-NA)	61
FIGURA 22 – GRÁFICOS OBTIDOS NA OTIMIZAÇÃO DAS ENERGIAS DE COLISÃO E SUAS RESPECTIVAS TRANSIÇÕES PARA (A) o-TOLUIDINA, (B) 1-NAFTILAMINA E (C) 2-NAFTILAMINA DERIVATIZADAS	63
FIGURA 23 – GRÁFICOS OBTIDOS NA OTIMIZAÇÃO DAS ENERGIAS DE COLISÃO E SUAS RESPECTIVAS TRANSIÇÕES PARA O ALACLORO	65
FIGURA 24 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS ESPÉCIES ENVOLVIDAS NA TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DO ALACLORO	65
FIGURA 25 - RESPOSTAS OBTIDAS PARA A AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DERIVATIZAÇÃO COM PFPA (n = 3)	67

FIGURA 26 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ⁴ DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO EMPREGANDO PIRIDINA COMO SEQUESTRANTE DE ÁCIDO – 1-NAFTILAMINA	69
FIGURA 27 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ⁴ DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO EMPREGANDO PIRIDINA COMO SEQUESTRANTE DE ÁCIDO – 2-NAFTILAMINA	70
FIGURA 28 – PROCEDIMENTOS DE DERIVATIZAÇÃO E <i>CLEAN-UP</i> NA PRESENÇA DE PIRIDINA	72
FIGURA 29 – EFEITO DA ADIÇÃO DE PIRIDINA NA DERIVATIZAÇÃO – <i>o</i> -TOL (10,0 mg L ⁻¹) e 1-NA e 2-NA (1,0 mg L ⁻¹) (n=3).....	72
FIGURA 30 – EFEITO DA REPETIÇÃO DA ETAPA DE <i>CLEAN-UP</i> APÓS A DERIVATIZAÇÃO– <i>o</i> -TOL (10,0 mg L ⁻¹) e 1-NA e 2-NA (1,0 mg L ⁻¹) (n=3).....	74
FIGURA 31 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO NA AUSÊNCIA DE SEQUESTRANTE DE ÁCIDO – <i>o</i> -TOLUIDINA	75
FIGURA 32 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO NA AUSÊNCIA DE SEQUESTRANTE DE ÁCIDO – 1-NAFTILAMINA	76
FIGURA 33 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO NA AUSÊNCIA DE SEQUESTRANTE DE ÁCIDO – 2-NAFTILAMINA	76
FIGURA 34 – EFEITO DE INTERAÇÃO ENTRE POTÊNCIA DE SAÍDA E TEMPO DE DERIVATIZAÇÃO – <i>o</i> -TOLUIDINA, PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ PARA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO NA AUSÊNCIA DE SEQUESTRANTE DE ÁCIDO	77
FIGURA 35 – CROMATOGRAMA OBTIDO EMPREGANDO AS CONDIÇÕES DE COMPROMISSO DE DERIVATIZAÇÃO COM PFPA – MODO SIM, 10,0 (<i>o</i> -TOL) E 1,0 mg L ⁻¹ (1-NA e 2-NA).....	79
FIGURA 36 – ESQUEMA DO PROCEDIMENTO DE DERIVATIZAÇÃO COM PFPA OTIMIZADO	79
FIGURA 37 – EFEITO DOS DISPOSITIVOS DE EXTRAÇÃO BASEADOS EM MEMBRANAS MICROPOROSAS DE POLIPROPILENO.....	81
FIGURA 38 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ A – <i>o</i> -TOLUIDINA	82

FIGURA 39 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ A – 1-NAFTILAMINA.....	83
FIGURA 40 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ A - 2-NAFTILAMINA.....	83
FIGURA 41 – EFEITO DE INTERAÇÃO ENTRE ETAPA DE EVAPORAÇÃO E TIPO DE SOLVENTE - o-TOLUIDINA E 1-NAFTILAMINA, PLANEJAMENTO 2 ³ A	84
FIGURA 42 – DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES NEUTRAS E PROTONADAS DOS ANALITOS DE ACORDO COM O pH	85
FIGURA 43 – EFEITO DO pH NA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO POR MMSPE – 5,0 (o-TOL) e 0,5 mg L ⁻¹ (1-NA E 2-NA) (n = 5)	86
FIGURA 44 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ B – o-TOLUIDINA	87
FIGURA 45 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ B – 1-NAFTILAMINA.....	88
FIGURA 46 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ B - 2-NAFTILAMINA.....	88
FIGURA 47 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ C – o-TOLUIDINA	91
FIGURA 48 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ C – 1-NAFTILAMINA.....	91
FIGURA 49 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ C - 2-NAFTILAMINA.....	92
FIGURA 50 – EFEITO DE INTERAÇÃO QUANTIDADE DE FASE SORTIVA, TEMPO DE DESSORÇÃO E TEMPO DE EXTRAÇÃO - o-TOLUIDINA, 1-NAFTILAMINA E 2-NAFTILAMINA, PLANEJAMENTO 2 ³ C	92
FIGURA 51 – ESQUEMA DOS PROCEDIMENTOS DE HIDRÓLISE E MMSPE OTIMIZADO	94
FIGURA 52 – CURVAS ANALÍTICAS PARA 1-NAFTILAMINA E 2-NAFTILAMINA NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE 0 A 500 µg L ⁻¹ (n = 5).....	96
FIGURA 53 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA o-TOLUIDINA NOS ENSAIOS DE SELETIVIDADE, ESPECIFICIDADE E FORTIFICAÇÃO A 200 µg L ⁻¹	100
FIGURA 54 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA 1-NAFTILAMINA E 2-NAFTILAMINA NOS ENSAIOS DE SELETIVIDADE, ESPECIFICIDADE E FORTIFICAÇÃO A 25 µg L ⁻¹	101

FIGURA 55 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA ALACLORO NOS ENSAIOS DE SELETIVIDADE, ESPECIFICIDADE E FORTIFICAÇÃO A 60 µg L ⁻¹	101
FIGURA 56 – ENSAIOS DE ESTABILIDADE EM <i>FREEZER</i> - 5,0 (o-TOL) e 0,5 mg L ⁻¹ (1-NA E 2-NA) (n = 4).....	103
FIGURA 57 – ENSAIOS DE ESTABILIDADE EM BANCADA - 5,0 (o-TOL) e 0,5 mg L ⁻¹ (1-NA E 2-NA) (n = 4).....	104
FIGURA 58 – ENSAIOS DE ESTABILIDADE EM CICLOS DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO - 5,0 (o-TOL) e 0,5 mg L ⁻¹ (1-NA E 2-NA) (n = 4).....	105
FIGURA 59 – ENSAIOS DE ESTABILIDADE EM AUTOAMOSTRADOR - 5,0 (o-TOL) e 0,5 mg L ⁻¹ (1-NA E 2-NA) (n = 4).....	106

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANALITOS.....	7
TABELA 2 – PARÂMETROS AVALIADOS NA OTIMIZAÇÃO UNIVARIADA DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	27
TABELA 3 – PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO NO MODO VARREDURA DE ÍONS PRODUTO (PIS).....	29
TABELA 4 – PARÂMETROS DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO AVALIADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ⁴	31
TABELA 5 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE COMPOSTOS AVALIADOS COMO PADRÃO INTERNO E DE DERIVADOS PERFLUOROACILADOS DAS AMINAS AROMÁTICAS.....	31
TABELA 6 – PARÂMETROS DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO AVALIADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³	33
TABELA 7 – PARÂMETROS QUANTITATIVOS DA MMSPE.....	36
TABELA 8 – PARÂMETROS DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO/DESSORÇÃO AVALIADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ A.....	39
TABELA 9 – PARÂMETROS DA EXTRAÇÃO AVALIADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ B.....	40
TABELA 10 – PARÂMETROS DA EXTRAÇÃO/DESSORÇÃO AVALIADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ C.....	41
TABELA 11 – ENSAIOS DE ESTABILIDADE	44
TABELA 12 – EFEITO DA RAMPA DE AQUECIMENTO (n=3) NA RESOLUÇÃO ENTRE OS PICOS DE 1-NA E 2-NA NAS FORMAS NÃO DERIVATIZADAS E DERIVATIZADAS.....	47
TABELA 13 – EFEITO DO MODO DE INJEÇÃO (n=3) NA RAZÃO SINAL/RUÍDO ..	57
TABELA 14 – PARÂMETROS OTIMIZADOS DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DESENVOLVIDOS.....	60
TABELA 15 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DOS MÉTODOS OTIMIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS NÃO DERIVATIZADOS E DERIVATIZADOS	61
TABELA 16 – TRANSIÇÕES CARACTERÍSTICAS DOS ANALITOS DERIVATIZADOS A SEREM MONITORADAS NO MÉTODO MRM	66

TABELA 17 – CONDIÇÕES DE COMPROMISSO PARA O PROCEDIMENTO DE DERIVATIZAÇÃO EMPREGANDO PIRIDINA COMO SEQUESTRANTE DE ÁCIDO	71
TABELA 18 – CONDIÇÕES DE COMPROMISSO PARA O PROCEDIMENTO DE DERIVATIZAÇÃO SEM A ADIÇÃO DE SEQUESTRANTE DE ÁCIDO	78
TABELA 19 – CONDIÇÕES DE COMPROMISSO PARA MMSPE.....	93
TABELA 20 – PARÂMETROS DE MÉRITO OBTIDOS COM BASE NAS CURVAS ANALÍTICAS	96
TABELA 21 – COMPARAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO DESENVOLVIDO COM OS MÉTODOS DA LITERATURA	97
TABELA 22 – DADOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRA-DIA (n = 6) E INTER-DIA (n = 5).....	99
TABELA 23 – COMPARAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO DESENVOLVIDO COM OS MÉTODOS DA LITERATURA	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ SPE	- microextração em fase sólida protegida por membrana microporosa
1-NA	- 1-naftilamina
2-NA	- 2-naftilamina
AcOEt	- acetato de etila
ALC	- alacloro
AMPA	- ácido aminometilfosfônico
ANOVA	- análise de variância
CA-125	- antígeno de câncer 125
CAS	- Chemical Abstracts Service
CoViD-19	- doença por coronavírus 2019
DI	- imersão direta
DLLME	- microextração líquido-líquido dispersiva
DNA	- ácido desoxirribonucleico
ECD	- detecção por captura de elétrons
FDA	- Administração Federal de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos da América
FID	- detecção por ionização em chama
GC	- cromatografia gasosa
GC-MS	- cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GC-MS/MS	- cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas sequencial
HBM4EU	- Iniciativa Europeia em Biomonitorização Humana
HDL	- lipoproteínas de alta densidade
HF μ E	- microextração com fibra oca
HFBA	- anidrido heptafluorobutírico
HF-LPME	- microextração líquida com fibra oca
HPA	- hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HS	- <i>headspace</i>
HX	- hexano
IARC	- Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
LC	- cromatografia líquida
LC-MS	- cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LDL	- lipoproteínas de baixa densidade
LLE	- extração líquido-líquido
LLOQ	- limite inferior de quantificação
Log P	- logaritmo da constante de partição
m/z	- razão massa/carga
MMLLE	- extração líquido-líquido com membrana microporosa
MMSPE	- extração em fase sólida com membrana microporosa
MRM	- monitoramento de reações múltiplas
MS	- espectrometria de massas
N	- número de pratos teóricos
NPD	- detecção por nitrogênio e fósforo
o-TOL	- o-toluidina
PEG	- polietilenoglicol
PFPA	- anidrido pentafluoropropiônico
PI	- padrão interno
PIS	- varredura de íons produto
pKa	- logaritmo da constante de dissociação ácida
PP	- polipropileno
PSA	- antígeno prostático específico
Py	- piridina
Q e q	- quadrupolo
QqQ	- triplo quadrupolo
Rs	- resolução entre dois picos cromatográficos
RSD	- desvio padrão relativo
SBSE	- extração sortiva em barra de agitação
SDME	- microextração de gota única
SIM	- monitoramento seletivo de íons
SPE	- extração em fase sólida
SPME	- microextração em fase sólida
TEA	- trietilamina
TFME	- microextração em filme fino
TMA	- trimetilamina
t _r	- tempo de retenção
W	- largura do pico

LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	BIOMONITORAMENTO E FLUIDOS BIOLÓGICOS	1
1.2	CIGARRO E O RISCO DE CÂNCER	4
1.3	TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	9
1.4	PREPARO DE AMOSTRAS	17
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS	26
3.2	PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS.....	27
3.2.1	Desenvolvimento do método cromatográfico.....	27
3.2.2	Estudo do modo de aquisição Monitoramento de Reações Múltiplas.....	29
3.3	DERIVATIZAÇÃO COM ANIDRIDO PENTAFLUOROPROPIÔNICO (PFPA) 30	
3.3.1	Avaliação da reação de derivatização com PFPA	30
3.3.2	Otimização da reação de derivatização.....	30
3.4	AMOSTRAS DE URINA	33
3.5	HIDRÓLISE DAS AMOSTRAS DE URINA.....	34
3.6	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM MEMBRANA MICROPOROSA (MMSPE).....	35
3.6.1	Confecção dos dispositivos de MMSPE	36
3.6.2	Procedimento de MMSPE assistida por ultrassom geral	37
3.6.3	Avaliação preliminar de dispositivos de extração empregando membranas microporosas de PP	37
3.6.4	Otimização do procedimento de MMSPE	38
3.7	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO DO MÉTODO BIOANALÍTICO DESENVOLVIDO	41
3.7.1	Curvas analíticas	42
3.7.2	Precisão e exatidão	42
3.7.3	Ensaio de recuperação	42
3.7.4	Seletividade e especificidade	43

3.7.5	Ensaio de estabilidade.....	43
3.8	APLICAÇÃO A AMOSTRAS DE URINA DE FUMANTES PASSIVOS E ATIVOS.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS.....	46
4.1.1	Desenvolvimento do método cromatográfico.....	46
4.1.2	Estudo do modo de aquisição Monitoramento de Reações Múltiplas.....	62
4.2	DERIVATIZAÇÃO COM ANIDRIDO PENTAFLUOROPROPIÔNICO (PFPA) 66	
4.2.1	Avaliação de métodos de derivatização com PFPA	66
4.2.2	Otimização da reação de derivatização	68
4.3	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM MEMBRANA MICROPOROSA (MMSPE).....	80
4.3.1	Avaliação preliminar de dispositivos de extração empregando membranas microporosas de PP	80
4.3.2	Planejamento fatorial 2 ³ A - configuração, etapa de evaporação, solvente de dessorção.....	81
4.3.3	Otimização univariada do pH.....	85
4.3.4	Planejamento fatorial 2 ³ B - teor de NaCl adicionado, teor de metanol e tempo de extração.....	87
4.3.5	Planejamento fatorial 2 ³ C - quantidade de fase sortiva, tempo de dessorção e tempo de extração.....	90
4.4	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO DO MÉTODO BIOANALÍTICO DESENVOLVIDO	95
4.4.1	Curvas analíticas	95
4.4.2	Precisão e exatidão	98
4.4.3	Ensaio de recuperação	99
4.4.4	Seletividade e especificidade	100
4.4.5	Ensaio de estabilidade.....	102
4.5	APLICAÇÃO A AMOSTRAS DE URINA DE FUMANTES PASSIVOS E ATIVOS.....	107
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....	110
	REFERÊNCIAS.....	112
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	120

APÊNDICE B – MODELO DE REGISTRO DE AMOSTRA DE URINA.....	124
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR DA SAÚDE DA UFPR.....	125

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOMONITORAMENTO E FLUIDOS BIOLÓGICOS

Estudos de biomonitoramento podem ser definidos como aqueles que monitoram substâncias cujo nível encontra-se alterado em decorrência de uma condição fisiológica, patogênica ou ambiental. Tais substâncias de interesse são denominadas biomarcadores, e podem abranger diferentes classes, como mutações genéticas presentes em um indivíduo, macromoléculas como ácidos nucleicos e proteínas, moléculas pequenas e espécies inorgânicas (Food and Drug Administration; National Institute of Health, 2021). Biomarcadores podem ser divididos de modo geral em substâncias endógenas, exógenas ou seus metabólitos.

Substâncias endógenas são aquelas produzidas pelo próprio organismo, como proteínas cuja expressão foi alterada devido a um quadro clínico específico. Dentre os biomarcadores que se encaixam nesta definição podem-se citar as proteínas CA-125 e o PSA, ou antígeno prostático específico, cujo monitoramento pode ser realizado em amostras de soro humano para verificar a ocorrência de câncer de ovário e próstata, respectivamente, através da sua superexpressão proteica (AZAD et al., 2006).

Já as substâncias exógenas são aquelas que não são produzidas pelo organismo que está sendo monitorado, mas são provenientes de um agente externo. Dentre exemplos, é possível citar o biomonitoramento do herbicida glifosato e seu metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), sendo que ambos são excretados via renal, podendo ser detectados na urina humana (ZOLLER et al., 2020).

Outro tipo de classificação que pode ser aplicada a biomarcadores é a distinção entre biomarcadores de exposição, de efeito e de suscetibilidade, sendo estes três tipos frequentemente associados ao biomonitoramento devido à exposição ambiental e ocupacional.

Biomarcadores de exposição são aqueles cuja presença é monitorada visando avaliar a exposição de um indivíduo a uma substância, podendo estabelecer uma relação entre o teor da exposição e o teor do biomarcador no organismo (AMORIM, 2003). Um exemplo é a determinação de ácido trans,trans-mucônico em urina para avaliar a exposição de um indivíduo ao benzeno. O benzeno é um composto aromático com conhecida atividade carcinogênica, e o ácido trans,trans-

mucônico é um dos seus principais metabólitos, sendo proposto por Karim et al. (1985) como biomarcador urinário. No Brasil, atualmente este biomarcador é empregado na avaliação de exposição ocupacional a benzeno, conforme estabelecido pela Portaria nº 34/2001 do então Ministério do Trabalho e Emprego (Ministério do Trabalho e Emprego, 2001).

Já biomarcadores de efeito estão relacionados a alterações no organismo em decorrência a exposição a uma substância exógena, ou seja, estes dependem da interação desta com receptores biológicos, e o desenvolvimento posterior de um quadro clínico ou de efeitos adversos (AMORIM, 2003). Um exemplo de biomarcador de efeito são lipídeos séricos, como colesterol total e as lipoproteínas de baixa e alta densidade (LDL e HDL), as quais estão relacionadas à arteroesclerose, e cujas alterações podem ser decorrentes da exposição a diferentes substâncias químicas, como arsênio inorgânico, bisfenóis e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, entre outros (JEDDI et al., 2021).

Por sua vez, biomarcadores de suscetibilidade são aqueles correlacionados a fatores genéticos ou adquiridos que favorecem que um indivíduo desenvolva um quadro clínico ou um efeito adverso em decorrência da exposição a uma substância exógena (AMORIM, 2003). Dentre possíveis biomarcadores de suscetibilidade é possível citar o polimorfismo do gene que regula a expressão do receptor de aril hidrocarbonetos (AHR), que por sua vez afeta o risco referente à exposição a compostos organoclorados e o desenvolvimento de linfoma não Hodgkin (NG et al. (2010).

Estudos de biomonitoramento podem ser realizados empregando diferentes tipos de matrizes biológicas, desde tecidos a fluidos biológicos, como sangue, soro, plasma, saliva, urina e leite materno. No entanto, a grande maioria desses apresenta enfoque no estudo de biomarcadores sorológicos e urinários.

No organismo humano, toda substância absorvida via oral, dérmica, intravenosa, intramuscular ou respiratória estará presente no plasma sanguíneo, juntamente com substâncias endógenas. Parte destas substâncias será então metabolizada pelo fígado, cujo principal sistema é composto pelas enzimas do citocromo P450, e os metabólitos gerados são liberados novamente no sangue ou no intestino, onde a maioria é reabsorvida. Por sua vez, a urina é o fluido biológico produzido pela filtração de plasma pelos rins, contendo uma mistura das substâncias não metabolizadas e dos produtos do metabolismo hepático (RANG et al., 2016).

Dessa forma, tanto a urina quanto o plasma podem prover um quadro geral dos compostos presentes no organismo de um indivíduo, sendo matrizes ideais para estudos metabólicos e de biomonitoramento. A seleção da matriz de biomonitoramento depende de vantagens específicas que esta pode fornecer e da disponibilidade biomarcadores previamente estabelecidos na mesma.

O sangue, e conseqüentemente o plasma e o soro sanguíneo, apresentam a vantagem de estar em equilíbrio com órgãos e tecidos de forma contínua, permitindo um monitoramento em tempo real dos níveis de biomarcadores. Adicionalmente, a coleta de sangue apresenta procedimentos padrão bem estabelecidos, porém, esta é invasiva, o que pode dificultar o recrutamento de voluntários. Já a urina é uma matriz de alta disponibilidade, cuja coleta é simples, podendo ser realizada pelo próprio indivíduo, e é não invasiva. Além disso, a urina é uma matriz ideal para o estudo de metabólitos. A principal desvantagem da urina é a variabilidade na sua composição entre indivíduos e para um mesmo indivíduo com o decorrer do tempo (WHO, 2015).

Do ponto de vista do desenvolvimento de métodos de biomonitoramento, a urina é uma matriz com teor proteico reduzido, o qual se encontra na faixa de 0,5 a 1,0 g L⁻¹, de forma que sua análise usualmente dispensa uma etapa de precipitação de proteínas, que por sua vez é frequentemente realizada em análises de plasma (FERNÁNDEZ-PERALBO; CASTRO, 2012).

Um grande número de biomarcadores de exposição urinários já é bem estabelecido, englobando um grande número de xenobióticos, que são substâncias estranhas a um determinado organismo. Dentre estes, é possível citar o 3,5,6-tricloro-2-piridinol, um metabólito do clorpirifós que age como um biomarcador de exposição ao inseticida, o 1-hidroxipireno, utilizado para se avaliar a exposição à exaustão de motores a diesel, e o 2-aminotiazolina-4-ácido carboxílico, que atua como biomarcador de exposição a cianeto (DALMOLIN et al., 2020; DU et al., 2019; KONKLE et al., 2020).

Em relação aos demais biomarcadores de exposição bem estabelecidos, Steckling et al. (2018) realizou um levantamento de biomarcadores para estressores ambientais, englobando diferentes classes de substâncias e fatores ambientais com potencial prejudicial a um indivíduo. Constatou-se que, para 64 estressores ambientais, a exposição a 35 destes fatores pode ser avaliada por biomarcadores em urina. Dentre estes fatores externos, podem ser citadas diversas substâncias

carcinogênicas, como componentes do gás de exaustão proveniente da combustão de diesel além de compostos gerados na queima do tabaco.

1.2 CIGARRO E O RISCO DE CÂNCER

O tabagismo é uma doença crônica desenvolvida em decorrência da dependência física e psicológica de nicotina, substância presente no tabaco (NUTT et al., 2007). Por sua vez, o tabaco pode ser consumido nas suas diferentes formas, seja na forma de fumo para mascar, charutos, cigarros convencionais e eletrônicos, entre outros.

No ano de 2016 aproximadamente 5,7 trilhões de cigarros foram consumidos mundialmente, sendo a China o país com maior número de fumantes, responsável pelo consumo de 49,1% destes cigarros (American Cancer Society Inc.; Vital Strategies, 2019). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, os índices de fumantes foram reduzidos em 36% de 2006 a 2017, sendo indicadas como principal fator para esta queda as novas regulamentações implementadas pelo governo neste período, como a legislação antifumo de dezembro de 2011, por exemplo. Porém, a parcela de 10,7% da população que consome cigarros regularmente ainda é significativa (Ministério da Saúde, 2018), tanto em termos econômicos quanto de saúde pública.

No entanto, o estudo multicêntrico realizado por Malta et al. (2021) indica que o consumo de tabaco no Brasil aumentou cerca de 34% durante o período de distanciamento social realizado devido à pandemia de CoViD-19. Este aumento pode ser decorrente da correlação entre tabagismo e comorbidades psiquiátricas, e os índices crescentes de ansiedade e depressão relacionados à pandemia (MALBERGIER; OLIVEIRA, 2005; SILVA et al., 2020). O aumento no consumo de cigarros observado neste período pode resultar em alterações duradouras nos índices de tabagismo e consequentes danos à saúde.

Quanto à distribuição regional do tabagismo no Brasil, a região Sul apresenta o maior percentual de fumantes diários quando comparada às demais regiões do país, englobando 17,4% da população (BARROS et al., 2011). Recentemente, tal prevalência na região Sul foi corroborada na Pesquisa Nacional de Saúde de 2019, sendo novamente a região com maior percentual de fumantes no país, de 14,7% (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2020).

A fumaça produzida na queima de cigarros convencional é composta por uma fase gasosa e uma fase particulada. A fase gasosa contém nitrogênio, oxigênio, dióxido e monóxido de carbono, acetaldeído, metanol, ácidos cianídrico, nítrico e sulfídrico, acetona, acroleína, amônia, metanol, hidrocarbonetos, nitrosaminas voláteis e compostos carbonilados, entre outros. Já a fase particulada é composta por ácidos carboxílicos, fenóis, humectantes, nicotina, terpenoides, ceras parafínicas, nitrosaminas específicas de tabaco, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e catecóis (U.S. Department of Health and Human Services, 2010).

A exposição à fumaça de cigarro pode ser relacionada à ocorrência de diversas doenças cardiovasculares, pulmonares e efeitos adversos atrelados a desenvolvimento e reprodução humana. Adicionalmente, o uso de cigarros convencionais é conhecidamente um fator de risco para o desenvolvimento de câncer, sendo que a fumaça proveniente de sua queima produz cerca de 60 compostos carcinogênicos (U.S. Department of Health and Human Services, 2010). Seu uso pode ser correlacionado com a incidência de câncer em 18 diferentes órgãos humanos, afligindo os sistemas respiratório, digestivo, reprodutor, excretor e hematopoiético (VISWANATH et al., 2010).

Dentre todos os compostos que podem ser considerados prejudiciais à saúde humana, o 1,3-butadieno é a substância com maior potencial carcinogênico, acroléina e acetaldeído estão correlacionados com irritações respiratórias, enquanto cianeto, arsênio e cresóis são riscos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (U.S. Department of Health and Human Services, 2010).

Dentre os compostos carcinogênicos gerados na fumaça do cigarro, podem ser citados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), N-nitrosaminas, aminas aromáticas, aldeídos, hidrocarbonetos voláteis e algumas espécies inorgânicas, como arsênio, níquel, cromo, cádmio e chumbo. Parte destes agentes carcinogênicos depende de ativação metabólica pela ação das enzimas P450, que geram espécies capazes de se ligar covalentemente à estrutura do DNA. A partir da formação destes adutos, é possível ocorrer uma série de mutações no DNA durante a sua replicação, dando origem a células cancerígenas (U.S. Department of Health and Human Services, 2010).

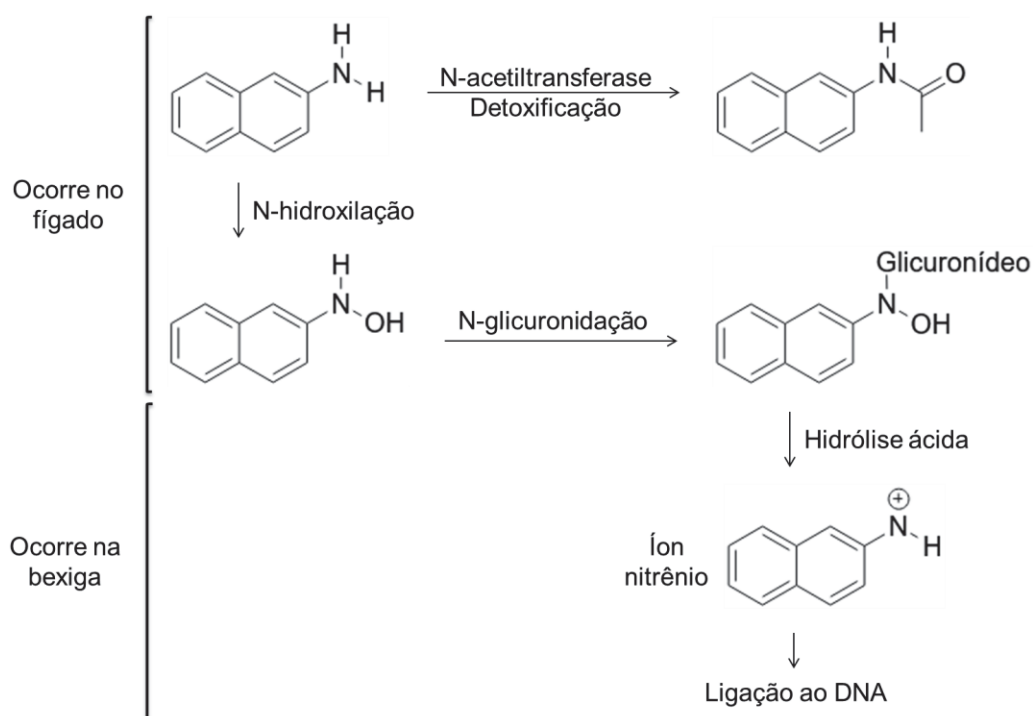
De acordo com o levantamento apresentado em 2010 pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças ("*Centers for Disease Control and Prevention*" – CDC), as principais aminas aromáticas que possuem atividade carcinogênica são a

o-toluidina (o-TOL), 2,6-dimetilanilina, 2-naftilamina (2-NA) e 4-aminobifenil (U.S. Department of Health and Human Services, 2010).

Com base em avaliações realizadas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (“*International Agency for Research on Cancer*” – IARC), a 2-NA e a o-TOL apresentam classificação de carcinogênica a humanos (grupo 1) e provavelmente carcinogênica a humanos (grupo 2A), respectivamente (International Agency for Research on Cancer, 2012). Além destas, a Administração Federal de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos da América (“*Food and Drug Administration*” – FDA) também reconhece o potencial carcinogênico, porém, não estabelecido pela IARC, da 1-naftilamina (1-NA) (Food and Drug Administration, 2012).

Em relação ao seu potencial carcinogênico, a exposição às aminas o-TOL, a 2-NA e 4-aminobifenil são fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento de câncer de bexiga em seres humanos, com base nos resultados observados em estudos *in vivo* (International Agency for Research on Cancer, 2012; VINEIS; FECHT, 2018). O mecanismo de ativação metabólica das aminas aromáticas que levam à formação das espécies com potencial carcinogênico é representado na FIGURA 1, usando 2-NA como molécula modelo.

FIGURA 1 – ATIVAÇÃO METABÓLICA DE AMINAS AROMÁTICAS (EXEMPLO: 2-NAFTILAMINA)



FONTE: Adaptado de Freudenthal et al. (1999).

Diferentes biomarcadores urinários de exposição a produtos carcinogênicos decorrentes da fumaça gerada pela queima do tabaco já são bem estabelecidos. Para algumas classes de compostos, como os HPA, geralmente são monitorados os produtos do metabolismo hepático, que correspondem às espécies bioativas. Já para outras classes, como as aminas aromáticas, usualmente tal exposição é avaliada com base na concentração das próprias aminas na urina de um indivíduo (U.S. Department of Health and Human Services, 2010).

Dessa forma, a o-TOL, a 1-NA e a 2-NA são frequentemente observadas em estudos que avaliam a presença de biomarcadores em urina de fumantes e demais indivíduos expostos à fumaça de cigarro, conhecidos como fumantes passivos. As estruturas destes compostos estão representadas na FIGURA 2, enquanto suas propriedades físico-químicas são apresentadas na TABELA 1.

FIGURA 2 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ANALITOS SELECIONADOS

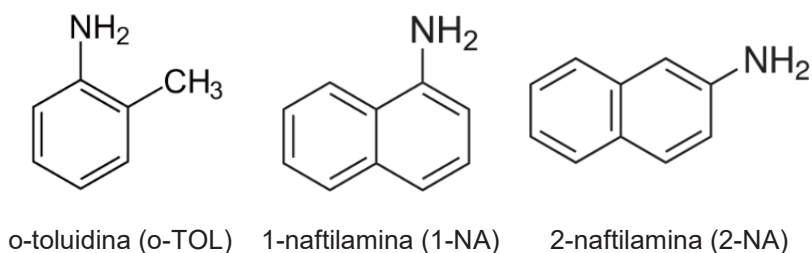


TABELA 1 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANALITOS

Analito	Número CAS	Fórmula molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	Log P ^a	pKa do sítio mais básico	Ponto de ebulição (°C)
o-toluidina (o-TOL)	95-53-4	C ₇ H ₉ N	107,153	1,66	4,45	200,3
1-naftilamina (1-NA)	134-32-7	C ₁₀ H ₉ N	143,185	2,13	3,92	300,7
2-naftilamina (2-NA)	91-59-8	C ₁₀ H ₉ N	143,185	2,13	4,16	306,2

CAS: número de registro no banco de dados de Chemical Abstracts Service; Log P: logaritmo da constante de partição; pKa: logaritmo da constante de dissociação ácida.

FONTE: **CRC Handbook of Chemistry and Physics** (2009), exceto: a – Chemicalize.

O mecanismo da formação das aminas aromáticas na queima do tabaco ainda é incerto. No entanto, há uma correlação direta entre o teor de alcatrão e de aminas aromáticas na fumaça gerada pela queima. Além disso, o teor de nitrogênio encontrado em folhas de tabaco afeta diretamente o teor de aminas aromáticas geradas. Por sua vez, o nitrogênio pode ser proveniente de proteínas no tabaco ou do uso de fertilizantes nitrogenados, que resultam em plantas de tabaco ricas em

nitrato. Além dos teores de certos compostos nas folhas de tabaco, baixas temperaturas de queima resultam na geração de uma menor quantidade de aminas aromáticas (U.S. Department of Health and Human Services, 2010).

De modo geral, aminas aromáticas são importantes objetos de estudos de biomonitoramento. O projeto Iniciativa Europeia em Biomonitorização Humana ("*European Human Biomonitoring Initiative*"), mais conhecido pelo seu acrônimo HBM4EU, foi iniciado em 2017 envolvendo pesquisadores de 30 países europeus. Tal projeto apresenta o intuito de desenvolver uma lista de biomarcadores de maior interesse baseando-se em necessidades de pesquisa relacionadas a desenvolvimento de políticas, evidências de exposição, preocupação com a saúde humana, viabilidades técnica e financeira.

Quatro anos após o início do projeto, a lista foi divulgada contendo sete principais classes de substâncias orgânicas e dois metais que devem ser priorizadas nos esforços de biomonitoramento, dentre essas podem ser citadas as aminas aromáticas, ressaltando a importância do desenvolvimento de métodos analíticos para o monitoramento das mesmas (VORKAMP et al., 2021).

Diferentes estudos envolvem estes biomarcadores urinários de exposição à fumaça de cigarro. No estudo de Theophilus et al. (2015), foram monitorados os níveis de diversos biomarcadores de exposição à fumaça de cigarro frente à redução de uma quantidade definida de cigarros consumidos por dia. Os teores de tais biomarcadores, dentre estes a o-TOL e a 2-NA, foram avaliados em amostras de urina provenientes dos voluntários. Inicialmente, os voluntários consumiam, em média, 20 cigarros por dia. Comparando-se as concentrações iniciais e as concentrações observadas no sétimo dia em que os voluntários se abstiveram do consumo de cigarros, foi constatada uma redução de 53 e 90% nas concentrações de o-TOL e 2-NA em urina, respectivamente.

No Japão, Yuki et al. (2018) conduziram um estudo envolvendo 15 biomarcadores urinários de exposição aos compostos potencialmente carcinogênicos derivados do tabaco, dentre eles, 1-NA, 2-NA e o-TOL. Tais biomarcadores foram monitorados com o intuito de avaliar a sua concentração na urina de fumantes que usualmente consumiam cigarros convencionais e passaram a fazer uso de cigarros eletrônicos. Após o período de cinco dias, foi observada uma redução na concentração dos 15 biomarcadores, sendo que para os compostos destacados esta redução variou de 67% (o-TOL) a 94% (1-NA). Tais teores são

comparáveis aos observados na urina de fumantes que se abstiveram de cigarros durante o período do estudo, indicando que a substituição do cigarro convencional pelo cigarro eletrônico é uma alternativa eficaz para, ao menos, minimizar a exposição de um indivíduo a tais compostos carcinogênicos.

Já no estudo de Fuller et al. (2018) foram avaliados os teores de o-TOL e 2-NA, e outros três biomarcadores derivados de HPA na urina de 13 usuários de cigarro eletrônico em comparação a não fumantes e não usuários de cigarro eletrônico, que atuariam como controle. As amostras de urina provenientes dos usuários de cigarro eletrônico apresentaram teores significativamente superiores de o-TOL e 2-NA, sendo as concentrações encontradas 2,3 e 1,3 vezes, respectivamente, aquelas que foram encontradas nas amostras controle. Tais resultados indicam que, mesmo que demais estudos indiquem uma redução no teor destes biomarcadores de exposição com o uso de cigarros eletrônicos, tais produtos ainda devem ser regulados devido à produção destes carcinogênicos, mesmo que inferior à quantidade gerada por cigarros convencionais.

No estudo de Yu et al. (2020) os teores de quatro aminas aromáticas foram avaliados em amostras de urina de 20 fumantes e 7 não fumantes. As concentrações médias de 1-NA e 2-NA encontradas foram 189,60 e 416,21 pg mg^{-1} de creatinina na urina de fumantes, enquanto para a urina dos não-fumantes as concentrações médias de 1-NA e 2-NA foram 39,56 e 66,22 pg mg^{-1} de creatinina. Devido à diferença significativa observada entre tais concentrações, a aplicabilidade destes compostos como biomarcadores urinários de exposição à fumaça gerada na queima de cigarro pode ser constatada.

1.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS

Para realizar a determinação de biomarcadores em fluidos biológicos, idealmente deve ser utilizada uma técnica analítica com alta sensibilidade e que possa realizar a determinação de diversos compostos simultaneamente, com a menor incidência de interferência possível, uma vez que estas matrizes apresentam alta complexidade e os biomarcadores podem ser observados em concentrações em nível ultratraço, de poucos ng L^{-1} (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2018).

Com este intuito, dentre as técnicas mais aplicadas à avaliação de biomarcadores de exposição, destacam-se a cromatografia líquida (*Liquid*

chromatography” – LC) e a cromatografia gasosa (“*Gas chromatography*” – GC), ambas acopladas à espectrometria de massas (“*Mass spectrometry*” – MS) como sistemas de detecção (GAO et al., 2018; SABBIONI et al., 2022; TREVIÑO et al., 2023; VORKAMP et al., 2023).

A seleção entre as técnicas cromatográficas é realizada de acordo com as características do próprio biomarcador, como polaridade, volatilidade e estabilidade térmica (YUSA et al., 2012). A técnica de GC-MS é frequentemente empregada em estudos de biomarcadores voláteis em diferentes matrizes, uma vez que, ao utilizar-se esta técnica é observado um menor efeito matriz quando comparado à técnica de LC-MS. Tal técnica também exhibe alta eficiência, alta resolução e, devido ao acoplamento com a espectrometria de massas, a identificação do biomarcador é feita de forma seletiva, confiável e com alta exatidão (MASTRANGELO et al., 2015).

Em relação à determinação de aminas, além da seleção da GC, outros fatores são importantes para uma análise de alta eficiência e detectabilidade. Historicamente, colunas de vidro empacotadas com fase estacionária foram utilizadas para a determinação de aminas por GC. No entanto, aminas alifáticas e aromáticas apresentam interação com grupos silanóis, sejam estes provenientes do corpo das colunas ou da fase estacionária selecionada. Dessa forma, as colunas de vidro deviam passar por um tratamento com hidróxido de potássio, visando minimizar a adsorção das aminas e obter picos mais proeminentes e simétricos (KATAOKA, 2014).

Com o desenvolvimento de colunas capilares de sílica fundida em que a fase estacionária se encontra nas paredes da coluna, análises por GC se tornaram mais eficientes, devido à redução do diâmetro das colunas e ausência de efeito de múltiplos caminhos, além do efeito de adsorção de aminas minimizado, devido ao caráter mais inerte das mesmas quando comparadas às colunas de vidro. Quanto ao tipo de fase estacionária, colunas baseadas em polietilenoglicol (PEG) são amplamente utilizadas. No entanto, colunas com fase estacionária baseada em fenil-dimetilpolisiloxano, tanto com 5% como 35% de fenil, podem ser empregadas de forma satisfatória (KATAOKA, 2014).

No estudo de Jurado-Sanchez et al. (2010), determinação de 27 aminas foi conduzida empregando GC com detecção por ionização em chama (“*Flame-ionization Detection*” – FID) e quatro colunas capilares de fases estacionárias diferentes: 100% dimetilpolisiloxano, (5% difenil)-dimetilpolisiloxano, ambas de baixa

polaridade, (50% difenil)-dimetilpolisiloxano, com média polaridade, e PEG, com alta polaridade. Os autores observaram que a coluna de (5% difenil)-dimetilpolisiloxano foi capaz de fornecer resolução satisfatória, ao contrário das colunas de fase de menor polaridade. Em relação às colunas de fase estacionária de média e alta polaridade, apesar destas fornecerem resolução adequada, a retenção das aminas de maior polaridade resultou em tempos de análise muito elevados. Dessa forma, as colunas de fase (5% difenil)-dimetilpolisiloxano foram consideradas as mais adequadas para a análise de aminas alifáticas, aromáticas e nitrosaminas.

Além da GC, que seria a técnica analítica para separar os compostos de uma amostra, o detector empregado afeta a seletividade e conseqüentemente a detectabilidade da análise. Diferentes detectores podem ser acoplados a GC, alguns que fornecem maior seletividade para a determinação de aminas. O uso de detectores FID, de nitrogênio e fósforo ("*Nitrogen-Phosphorus Detector*" – NPD), de captura de elétrons ("*Electron Capture Detector*" - ECD) é bem estabelecido para tal fim. Além destes detectores, o acoplamento com MS é de grande interesse, uma vez que este atuará como detector, mas também como técnica analítica hifenada, capaz de fornecer informações complementares além de diferentes modos de aquisição que podem favorecer seletividade e detectabilidade (KATAOKA, 2014).

No estudo de Jurado-Sanchez et al. (2010), além de serem avaliadas diferentes fases estacionárias, foram avaliados diferentes tipos de detectores acoplados a GC visando à determinação de aminas. Em relação à sensibilidade obtida, em termos da inclinação das curvas analíticas obtidas, foi de 10,5, 0,27 e 0,015 resposta/ng L⁻¹ para MS, NPD e FID, respectivamente. Quanto à detectabilidade, o uso do MS foi capaz de fornecer limites de detecção aproximadamente 20 e 1500 vezes menor que aqueles observados para NPD e FID, respectivamente. Em termos de precisão, não foi observada uma diferença no desempenho dos detectores.

Quando comparando os detectores frente a uma matriz real, foi realizada a análise de uma amostra de água residual, na qual o uso do FID, um detector de baixa seletividade, não permitiu a detecção das aminas avaliadas, enquanto o uso do NPD permitiu a detecção de sete aminas e o MS de oito aminas dentre as 27 avaliadas, sendo que este último foi capaz de fornecer respostas mais proeminentes devido ao uso de um modo de aquisição mais seletivo (JURADO-SANCHEZ et al., 2010).

Em relação a MS, a seletividade será dependente do tipo de analisador de massas e o tipo de aquisição dos espectros de massas. Dentre os analisadores de massas disponíveis, métodos bioanalíticos são desenvolvidos com maior frequência empregando tempo de voo, quadrupolo único e triplo quadrupolo (GARG, 2016).

Analisadores do tipo triplo quadrupolo (QqQ) são amplamente empregados tanto para análises qualitativas quanto para quantitativas, e estes analisadores apresentam diferentes modos de aquisição que permitem a obtenção de métodos com seletividade variada, de acordo com o objetivo do estudo. Devido à atuação do quadrupolo como um filtro de massas, quanto mais restrita a faixa de razão massa/carga (m/z), maior a seletividade do modo de aquisição e, conseqüentemente, maior tende a ser a detectabilidade do método.

Aquisições no modo *full scan* realizam uma varredura de todos os íons gerados na fonte de ionização que estejam dentro da faixa de razão massa/carga selecionada. Tais métodos podem ser aplicados para fins qualitativos, fazendo uso de bibliotecas de apoio, e para fins quantitativos. No entanto, comparado aos demais modos de aquisição disponíveis ao se empregar um espectrômetro de massas do tipo QqQ, tal modo de aquisição fornece baixa seletividade (HÜBSCHMANN, 2015).

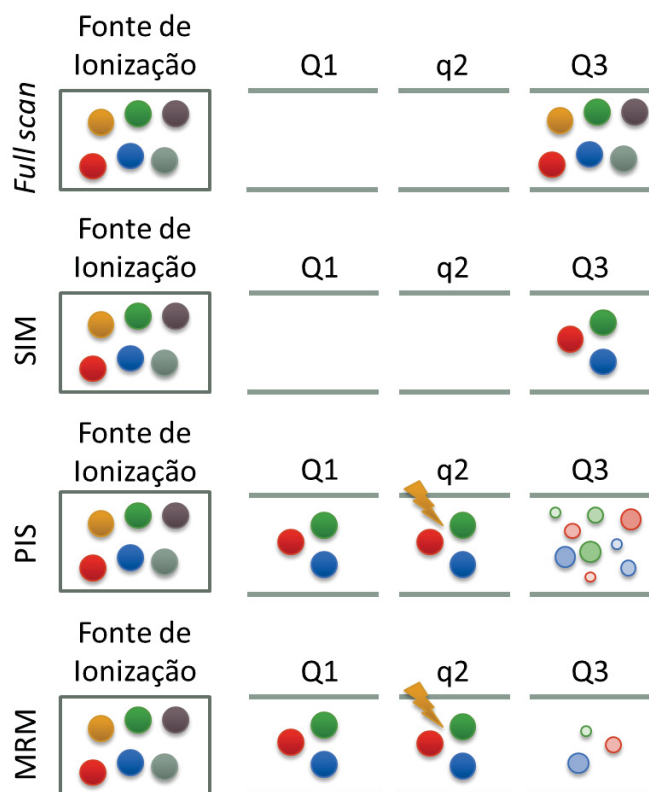
No modo de aquisição monitoramento seletivo de íons ("*Selected Ion Monitoring*" – SIM), num espectrômetro QqQ o terceiro quadrupolo (Q3) realiza a seleção de íons específicos do analito, sendo usual o monitoramento de um íon de quantificação e pelo menos dois íons de confirmação, os quais teriam caráter qualitativo. De modo geral, estes íons tendem a serem os três íons de maior intensidade obtidos no espectro do analito a partir de uma aquisição *full scan*. Na prática, comparando aquisições nos modos *full scan* e SIM, o segundo fornece um aumento na detectabilidade de 30 a 50 vezes (HÜBSCHMANN, 2015).

Já no modo de aquisição varredura de íons produto ("*Product Ion Scan*" – PIS) o primeiro quadrupolo (Q1) faz a seleção dos íons precursores de modo similar ao modo SIM, e o segundo quadrupolo (q2) age como uma cela de colisão, onde os íons selecionados são fragmentados pela colisão com um gás inerte. Após a fragmentação, o Q3 realiza a varredura dos íons produto (BOŽOVIĆ; KULASINGAM, 2013; HÜBSCHMANN, 2015). Este modo de aquisição pode ser empregado de forma qualitativa, uma vez que permite a elucidação de moléculas orgânicas através de padrões de fragmentação (DUNN, 2011).

Dentre os modos de aquisição de um espectrômetro QqQ, o modo de aquisição que fornece a maior seletividade é o monitoramento de reações múltiplas (“*Multiple Reaction Monitoring*” – MRM). Neste modo, o Q1 realiza a seleção dos íons precursores, o q2 realiza a fragmentação dos mesmos, e o Q3 realiza a seleção de íons produto. Dessa forma, o modo MRM permite o monitoramento de transições íon precursor > íon produto, e similarmente ao modo SIM, usualmente são monitoradas as transições de maior intensidade, sendo uma transição de quantificação e duas transições de confirmação (BO; KULASINGAM, 2013; HÜBSCHMANN, 2015). Devido à seleção de íons tanto no Q1 quanto no Q3, o modo MRM é capaz de fornecer razões sinal/ruído mais elevadas que os demais modos de aquisição, resultando em métodos com alta detectabilidade (DUNN, 2011).

Na FIGURA 3 é apresentado um esquema geral dos modos de aquisição de um espectrômetro QqQ descritos acima.

FIGURA 3 – MODOS DE AQUISIÇÃO EM UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS TIPO TRIPLO QUADRUPOLO



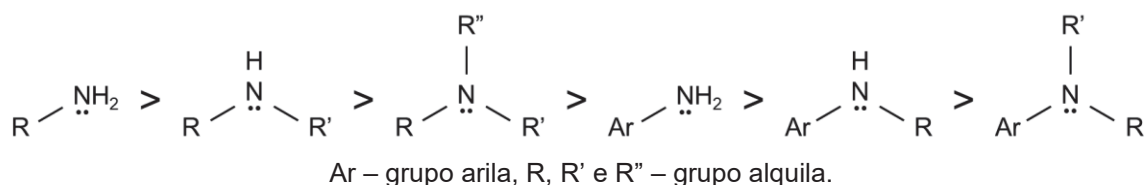
MRM – monitoramento de reações múltiplas, PIS – varredura dos íons produto, Q e q – quadrupolo, SIM – monitoramento seletivo de íons.

FONTE: A autora (2023).

Apesar da menor adsorção das aminas observada com o uso de colunas capilares de sílica fundida, métodos analíticos empregando GC-MS voltados para a determinação de aminas aromáticas foram relatados sem e com uma etapa adicional de derivatização. Essa etapa adicional pode ser justificada pela obtenção de picos mais simétricos e limites de detecção e quantificação mais baixos, uma vez que as aminas não derivatizadas podem sofrer perdas por adsorção em demais partes do sistema analítico, como o *liner* de injeção ou lâ de vidro utilizada no mesmo.

Usualmente, aminas primárias apresentam uma tendência mais elevada a sofrer adsorção do que aminas secundárias, e estas, por sua vez, apresentam maior tendência a sofrer adsorção do que aminas terciárias. Adicionalmente, aminas alifáticas representam uma maior dificuldade na determinação por GC-MS devido à adsorção quando comparadas às aminas aromáticas (KATAOKA, 1996). Esta tendência é representada na FIGURA 4.

FIGURA 4 – TENDÊNCIA DE ADSORÇÃO DE AMINAS ATRAVÉS DA INTERAÇÃO COM GRUPOS SILANÓIS



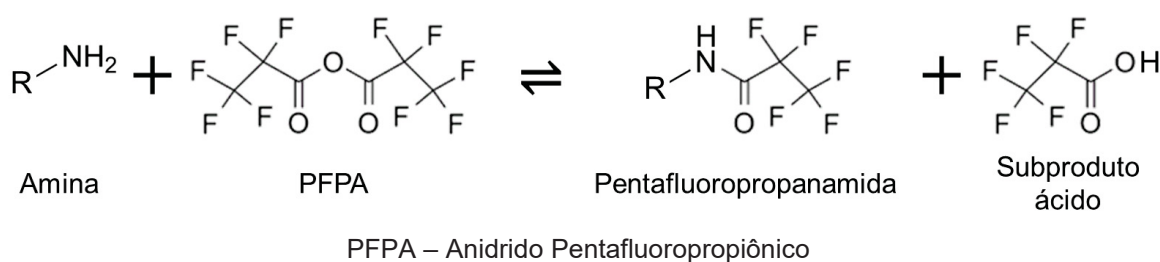
FONTE: A autora (2023).

As três aminas selecionadas para este estudo (o-TOL, 1-NA e 2-NA) são aminas aromáticas primárias, de modo que as perdas por adsorção podem ser consideradas baixas quando comparadas a aminas alifáticas primárias. Por este motivo, estudos indicam a possibilidade realizar a determinação destas aminas por GC-MS sem a etapa adicional de derivatização (NIU et al., 2018; RAMÍREZ et al., 2015). No entanto, a grande maioria de estudos envolvendo a determinação destes analitos envolve uma etapa de derivatização (GRIMMER et al., 2000; Health Canada, 1999; HYODO, 2007; LESS et al., 1998; LUCERI et al., 1993; MAZUMDER et al., 2019; RIEDEL et al., 2006; WEISS, 2002).

Esta etapa de derivatização das aminas frequentemente é realizada por acilação a partir de derivatizantes como anidridos de perfluoroácidos, como os anidridos trifluoroacético, pentafluoropropiônico e heptafluorobutírico, e haletos de acila. Um dos reagentes mais empregados com este intuito é o anidrido

pentafluoropropiônico (“*Pentafluoropropionic anhydride*” – PFPA). Este derivatizante reage com aminas formando produtos de maior estabilidade, menor polaridade e, conseqüentemente, menor tendência à adsorção no sistema analítico (FARAJZADEH et al., 2014; MOLNÁR-PERL, 2005). A reação de derivatização descrita é apresentada na FIGURA 5.

FIGURA 5 – REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DE AMINAS COM ANIDRIDO PENTAFLUOROPROPIÔNICO



A utilização de PFPA como derivatizante, assim como outros reagentes perfluoroacilantes, pode tornar necessária a utilização de sequestrantes de ácido, uma vez que os subprodutos ácidos da reação de derivatização podem ocasionar danos às colunas de GC. Dentre os sequestrantes mais empregados podem ser citados a piridina e aminas terciárias, como trimetilamina (TMA) e trietilamina (TEA). Além de consumir produtos que podem danificar a coluna, estes sequestrantes favorecem a reação de derivatização ao consumir um dos seus produtos, tornando esta etapa mais rápida (FARAJZADEH et al., 2014; MOLNÁR-PERL, 2005).

De acordo com Vorkamp et al. (2021), métodos baseados em GC-MS, derivatização com PFPA e ionização química são os mais comumente utilizados na determinação de aminas aromáticas, mas métodos empregando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas sequencial (“*Gas chromatography-tandem mass spectrometry*” - GC-MS/MS) com ionização por elétrons também foram aplicados com sucesso e obtendo detectabilidade adequada para o monitoramento destes biomarcadores.

Apesar da aplicabilidade de métodos baseados em GC-MS e GC-MS/MS para a determinação de aminas aromáticas, estudos recentes são escassos na literatura.

Weiss; Angerer (2002) realizaram um estudo avaliando o teor de 14 aminas aromáticas, dentre estas a o-TOL, 1-NA e 2-NA, e quatro metabólitos de substâncias nitroaromáticas em amostras de urina de voluntários sem exposição conhecida a tais

substâncias. Para tal, o autor realizou a extração líquido-líquido (*Liquid-liquid extraction* – LLE) com hexano e 5,0 mL de amostras de urina após hidrólise ácida, e em seguida, foi realizada a derivatização dos analitos empregando 50 µL de PFPA e 25 µL de piridina. A derivatização foi conduzida por 1 h em banho termostático a 80 °C. Em seguida, o excesso de derivatizante e piridina foram removidos com uma extração líquido-líquido empregando tampão fosfato (pH 8,0). A fase orgânica foi coletada, concentrada e injetada em GC-MS equipado com uma coluna de fase estacionária (35% fenil)metilpolisiloxano e ionização por elétrons. Os limites de detecção obtidos para as aminas citadas foram de 50 ng L⁻¹ (o-TOL), 75 ng L⁻¹ (2-NA) e 150 ng L⁻¹ (1-NA). Neste caso, em cerca de 75% das amostras de urina a o-TOL foi encontrada em concentrações acima do limite de quantificação, sendo a maior concentração relatada de 3,1 µg L⁻¹, enquanto a 1-NA e 2-NA não foram detectadas nas amostras avaliadas.

Posteriormente, Riedel et al. (2006) aplicaram o mesmo método de derivatização relatado por Weiss; Angerer (2002) em amostras de urina de fumantes e não fumantes para realizar a determinação de três aminas aromáticas, incluindo a o-TOL e 2-NA. Neste estudo, as determinações foram realizadas em GC-MS equipado com coluna de fase estacionária (5% fenil)metilpolisiloxano e empregando ionização química no modo negativo, condições que forneceram limites de detecção de 4 ng L⁻¹ (o-TOL) e 1 ng L⁻¹ (2-NA), ambos inferiores aos relatados no trabalho de Weiss; Angerer (2002). As três aminas aromáticas estudadas foram detectadas nas amostras de urina avaliadas, tanto nas amostras provenientes de não fumantes quanto nas de fumantes, porém, os autores observaram que as concentrações para todos analitos nas amostras de urina de fumantes foram aproximadamente o dobro das concentrações encontradas na urina de não fumantes.

No estudo de Mazumder et al. (2019), amostras de urina humana foram analisadas por GC-MS/MS empregando uma coluna de fase estacionária PEG e um preparo de amostra automatizado que consiste em hidrólise com hidróxido de sódio, extração líquida suportada e derivatização com PFPA, visando à determinação de oito aminas aromáticas, incluindo o-TOL, 1-NA e 2-NA. Foram observados limites de detecção na faixa de 1,5 (1-NA) a 111,2 ng L⁻¹ (o-TOL), os quais são adequados para a determinação destes biomarcadores em urina humana.

Adicionalmente, nos métodos padrão de análise de fumaça de cigarro do governo canadense, a determinação de 1-NA e 2-NA é realizada por GC-MS,

empregando coluna de fase estacionária (5% fenil)-metilpolisiloxano e ionização por elétrons após a derivatização das aminas com PFPA empregando TMA como sequestrante de ácido. Neste método, após a extração dos constituintes da fumaça por um filtro, as aminas foram dessorvidas do filtro em meio ácido, a fase aquosa foi submetida à extração líquido-líquido com hexano, e à fase orgânica resultante foram adicionados 50 µL de PFPA e 50 µL de solução de TMA 40% (v/v) em hexano. A derivatização foi conduzida em temperatura ambiente por um período mínimo de 30 min e período máximo de 24 h. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma etapa de *clean-up* que consiste na percolação através de cartuchos de Florisil[®], para realizar a remoção do derivatizante em excesso (Health Canada, 1999).

1.4 PREPARO DE AMOSTRAS

O preparo de amostras corresponde a maior parcela de tempo dedicado ao emprego de um método analítico, assim como está sujeito a uma maior incidência de erros quando comparado às outras etapas deste. Dessa forma, a precisão e a exatidão de um método analítico estão altamente correlacionadas com esta etapa (CALDAS et al., 2011; MERIB; CARASEK, 2014).

Para amostras de alta complexidade, como fluidos biológicos, a etapa de preparo de amostra adquire maior importância devido ao grande número de interferentes que devem ser eliminados da amostra, tornando-se crucial para um bom desempenho do método analítico. No caso da urina, em que os biomarcadores de exposição podem estar presentes em baixíssimas concentrações, de poucos ng L⁻¹, além de realizar o *clean-up* da amostra, o preparo de amostra idealmente deve englobar a pré-concentração dos analitos (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2018; FERNÁNDEZ-PERALBO; CASTRO, 2012).

As técnicas clássicas de extração são a LLE, que se baseia no coeficiente de partição do analito entre duas fases líquidas imiscíveis, e a extração em fase sólida ("*Solid phase extraction*" – SPE), cujo princípio de extração se baseia na sorção do analito numa fase extratora sólida a partir de uma amostra líquida (ANDRADE-EIROA et al., 2016a).

Para realizar a extração por SPE, uma amostra líquida é percolada através de um material sólido, geralmente um disco ou um cartucho, no qual os analitos serão sorvidos. Em seguida, os interferentes podem ser removidos numa etapa de

clean-up, e por fim, os analitos são eluídos com um solvente adequado (SIMPSON, 2000). A SPE apresenta as vantagens de altas taxas de recuperação, assim como altos fatores de enriquecimento para analitos de polaridade intermediária (COLLINS et al., 2006; FARRÉ et al., 2012).

Adicionalmente, a SPE clássica, similarmente a LLE, pode acarretar no uso de grandes volumes de solvente orgânico, assim como se trata de uma técnica que envolve várias etapas no procedimento usual e que pode consumir longas parcelas do tempo dedicado ao método analítico (ANDRADE-EIROA et al., 2016b; PŁOTKA-WASYLKA et al., 2015). Visando eliminar algumas dessas desvantagens, deu-se início a tentativa de miniaturizar a técnica de SPE. Assim, em 1989, Belardi e Pawliszyn propuseram a microextração em fase sólida (“*Solid phase microextraction*” – SPME) (BELARDI; PAWLISZYN, 1989).

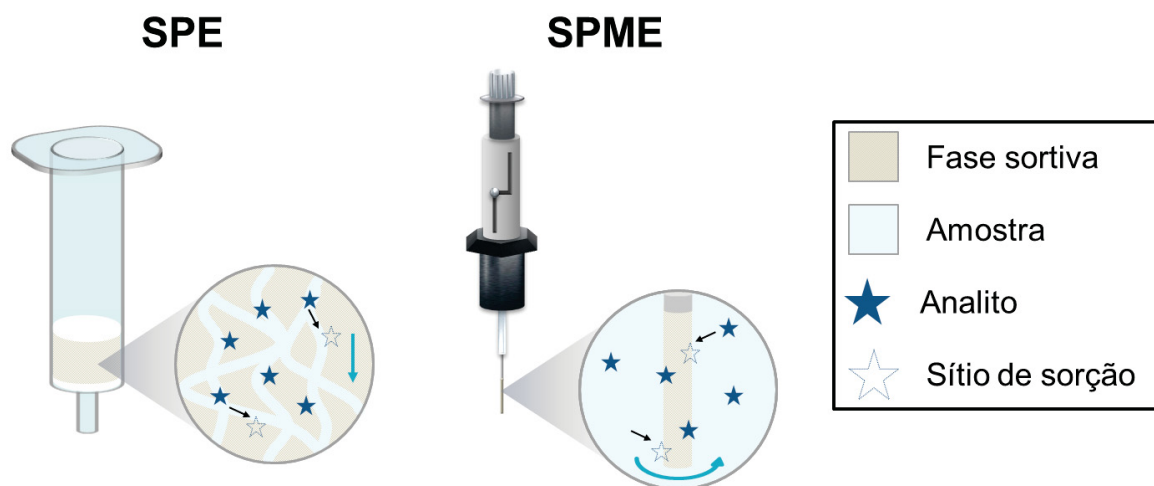
Nesta técnica baseada em equilíbrio de sorção, uma fibra de sílica fundida é recoberta por uma fase extratora capaz de extrair os analitos de uma amostra por sorção, similarmente a SPE. O emprego da SPME se baseia em dois modos principais, modo *headspace* e modo de imersão direta. No modo *headspace*, a fibra de sílica recoberta pela fase extratora é exposta à fase gasosa de uma amostra contida num frasco, extraíndo os analitos voláteis da amostra. Já no modo de imersão direta, a fibra é mergulhada na amostra líquida, possibilitando a extração dos analitos independentemente de sua volatilidade (PŁOTKA-WASYLKA et al., 2015).

Desde a introdução da SPME empregando uma fibra extratora, foi desenvolvida uma série de técnicas de extração que são consideradas técnicas de SPME, como a *in-tube* SPME, extração sortiva em barra de agitação (“*Stir Bar Sorptive Extraction*” – SBSE), microextração em filme fino (“*Thin Film Microextraction*” – TFME) e *in-tip* SPME (LASHGARI; YAMINI, 2019).

A técnica de SPME apresenta as vantagens de um baixo consumo de solventes orgânicos, ou até mesmo a eliminação completa do seu emprego durante o preparo de amostras, uma alta sensibilidade que permite a determinação de analitos em concentrações tão baixas quanto ng L^{-1} , baixo consumo de amostra, fator importante quando um estudo envolve matrizes com baixa disponibilidade, procedimento rápido e simples, disponibilidade de fibras reutilizáveis, além da possibilidade de automação e acoplamento a diversos equipamentos de análise (PŁOTKA-WASYLKA et al., 2015).

Esquemas dos dispositivos empregados nas técnicas SPE e SPME são apresentados na FIGURA 6.

FIGURA 6 – ESQUEMAS DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO BASEADAS EM FASE SÓLIDA



SPE – Extração em fase sólida; SPME – Microextração em fase sólida.

FONTE: A autora (2020).

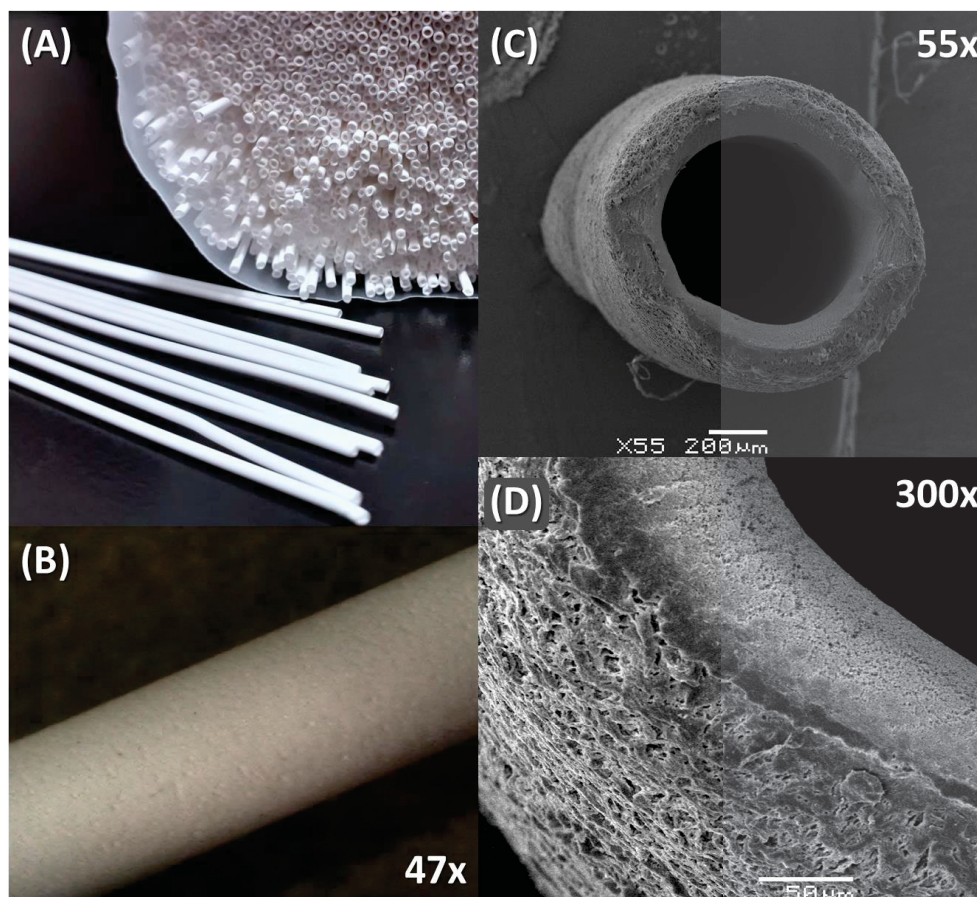
No estudo de Niu et al. (2018), a aplicação da SPME no modo *headspace* pode ser demonstrada para a determinação de aminas aromáticas. Os autores desenvolveram um método analítico para determinação de 1-NA e 2-NA em urina de fumantes empregando GC-MS/MS. Os limites de detecção obtidos para o método proposto foram de 0,010 e 0,012 ng L⁻¹ para 1-NA e 2-NA, respectivamente. Quando aplicado às amostras de urina, foram observadas concentrações de 1-NA e 2-NA na faixa de 72,8 a 123,1 ng L⁻¹ e 68,4 a 93,0 ng L⁻¹, respectivamente. Já para a amostra de urina de não fumante, as aminas não foram detectadas.

Paralelamente ao desenvolvimento de técnicas miniaturizadas de extração em fase sólida, a LLE passou por um processo similar de miniaturização, sendo desenvolvidas as técnicas de microextração de gota única (“*Single Drop Microextraction*” - SDME), microextração líquido-líquido dispersiva (“*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*” - DLLME) e microextração líquida com fibra oca (“*Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction*” - HF-LPME) (FILIPPOU et al., 2017).

A HF-LPME foi a primeira técnica de várias desenvolvidas que faz uso de fibras ocas ou membranas microporosas poliméricas, representadas na FIGURA 7, sendo a primeira denominação frequentemente empregada para técnicas de

extração em fase líquida, enquanto a segunda denominação é mais frequente para as técnicas de extração em fase sólida.

FIGURA 7 – MEMBRANAS MICROPOROSAS/FIBRAS OCAS DE POLIPROPILENO (A), ONDE (B) MICROGRAFIA ÓPTICA COM MAGNIFICAÇÃO DE 47X, (C) MICROGRAFIA DE VARREDURA ELETRÔNICA COM MAGNIFICAÇÃO DE 50X E (D) 300X.



FONTE: (A) e (B) A autora (2022), (C) e (D) Acervo CroME.

A HF-LPME foi desenvolvida em 1999 por Pedersen-Bjergaard; Rasmussen (1999). Nesta técnica de extração, a fibra oca atua como um suporte para uma membrana líquida suportada, que consiste em um solvente imiscível em água. O lúmen, que corresponde à cavidade interna da fibra, é preenchido por uma fase aceptora, a qual pode ser uma fase aquosa ou o mesmo solvente orgânico que compõe a membrana líquida suportada. A extração nesta técnica ocorre por equilíbrio de partição entre a amostra, ou fase doadora, e a membrana líquida suportada, assim como entre a membrana líquida suportada e a fase aceptora. Devido à porosidade característica das fibras, estas atuam como barreiras físicas,

garantindo que macromoléculas não sejam extraídas pela fase aceptora e não ocorra interferência de material particulado que possa estar presente na amostra.

Similares à HF-LPME foram desenvolvidas as técnicas de extração líquido-líquido com membrana microporosa ("*Microporous membrane liquid-liquid extraction*" - MMLLE) e microextração com fibra oca ("*Hollow fiber microextraction*" - HF μ E), sendo que ambas as técnicas se baseiam na extração dos analitos pelo solvente imobilizado nos poros da membrana/fibra, sem que este ocupe o lúmen das mesmas (IDE; NOGUEIRA, 2018; ZORITA et al., 2007). Deste modo, ambas as técnicas se baseiam em equilíbrio de partição entre a amostra e o solvente orgânico. Após a etapa de extração, as membranas devem ser submetidas a uma etapa de retroextração com alíquotas reduzidas de um solvente orgânico, o qual será o extrato final de ambas as técnicas. De modo geral, a diferença principal entre as técnicas de extração é a configuração em que a membrana é apresentada, sendo que na MMLLE esta tende a ser disposta em uma haste que atravessa o seu lúmen, enquanto na HF μ E a membrana se encontra livre dentro da amostra. No entanto, recentemente, estudos empregando MMLLE foram realizados em placas de 96 poços, sendo que as membranas foram utilizadas de forma livre nas amostras (LOPES et al., 2022).

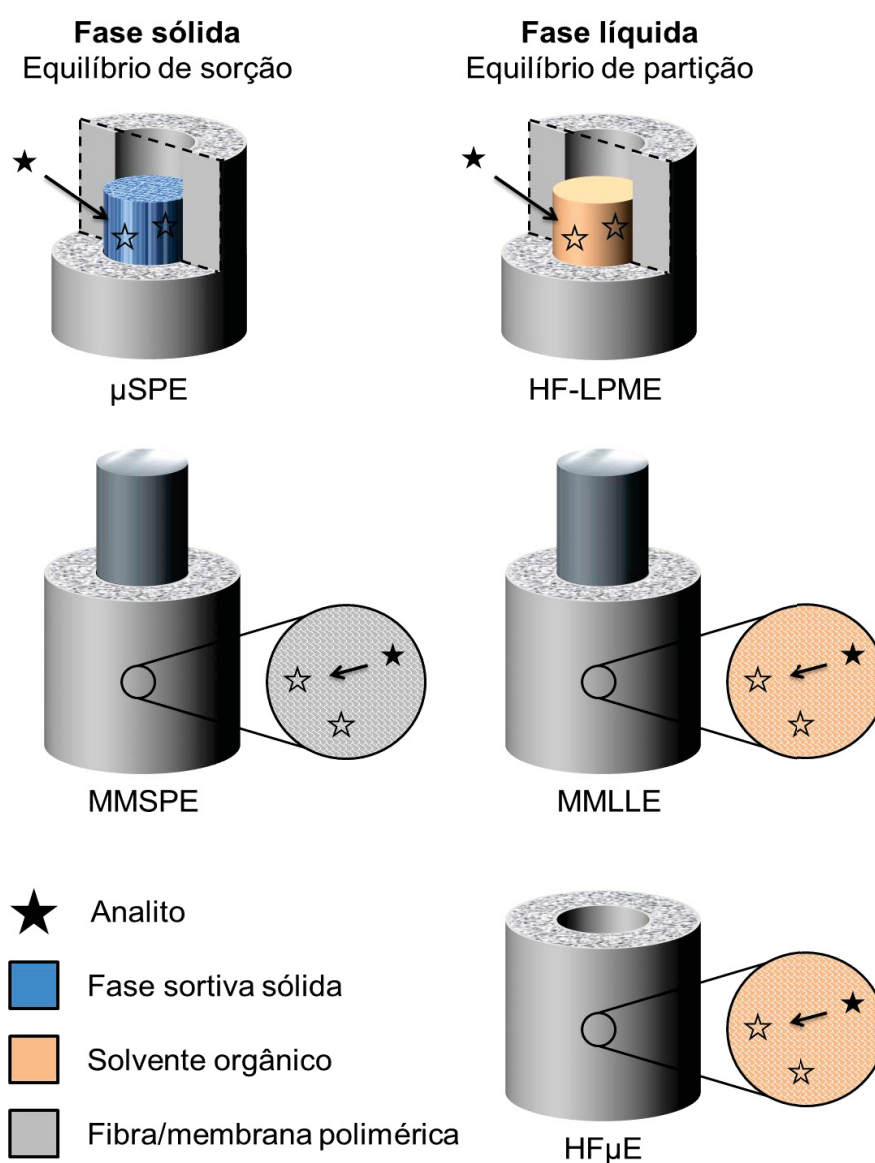
As membranas microporosas de polipropileno apresentam potencial sortivo para compostos de baixa polaridade, como foi demonstrado inicialmente por Müller et al. (2003). Desta forma, foi desenvolvida a técnica de extração em fase sólida com membrana microporosa ("*Microporous membrane solid phase extraction*" – MMSPE), a qual pode ser considerada uma variação da SPME que faz uso de uma membrana polimérica microporosa como fase extratora ao invés de uma fibra de sílica fundida recoberta com fase extratora, dispensando o uso de um solvente extrator imobilizado em seus poros quando comparada à MMLLE (MONTES et al., 2008). Nesta técnica, a extração dos compostos se dá por um equilíbrio de sorção entre a amostra e a membrana microporosa, e após a etapa da extração as membranas são submetidas a uma etapa de dessorção com um solvente orgânico, sendo este o extrato resultante da MMSPE.

Outra técnica de extração em fase sólida desenvolvida empregando membranas microporosas é a microextração em fase sólida protegida por membrana microporosa ("*Membrane Protected Micro-Solid Phase Extraction*" - μ SPE) (BASHEER et al., 2006; BASHEER; LEE, 2004). Nesta técnica uma fase sortiva

sólida é imobilizada no interior das membranas microporosas, que por sua vez novamente atuam como uma barreira física para macromoléculas e material particulado, e o dispositivo resultante é adicionado à amostra de forma livre. Similarmente à MMSPE, o dispositivo de extração é submetido a uma etapa de dessorção com solvente orgânico.

Um esquema geral das técnicas de extração que empregam membrana microporosa ou fibra oca é apresentado na FIGURA 8.

FIGURA 8 – ESQUEMA GERAL DE EXTRAÇÕES BASEADAS EM DISPOSITIVOS COM MEMBRANAS MICROPOROSAS/FIBRAS OCAS POLIMÉRICAS

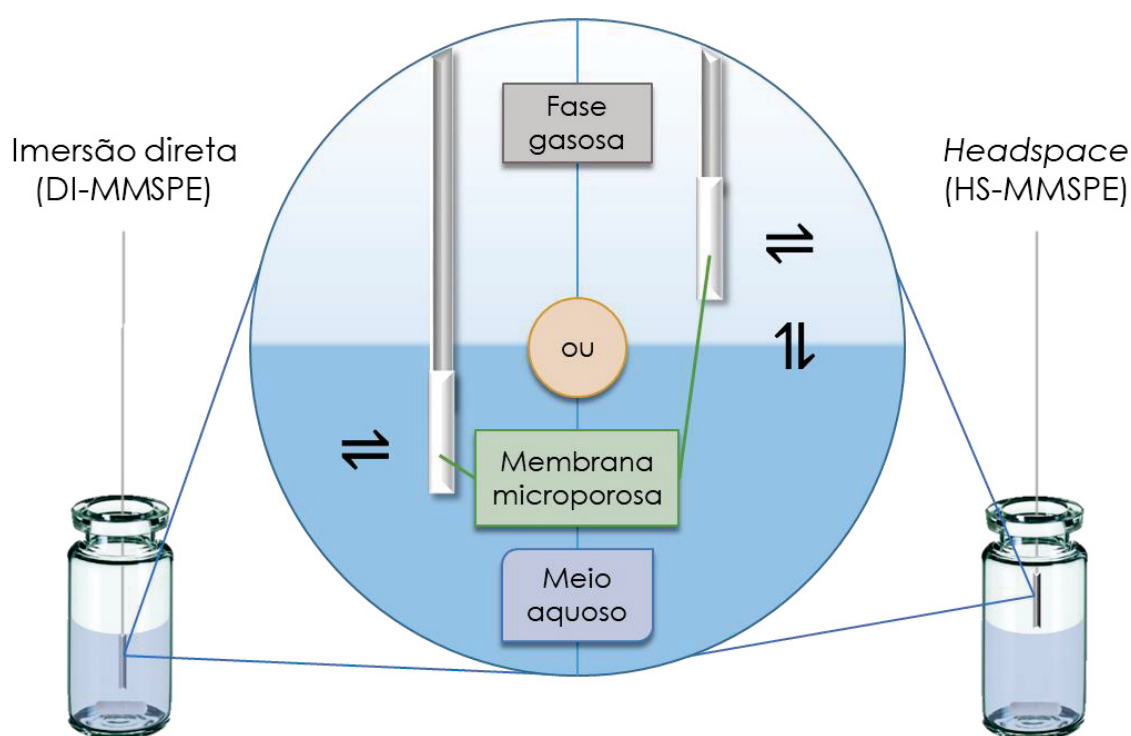


μSPE - microextração em fase sólida protegida por membrana microporosa, HFμE – microextração com fibra oca, HF-LPME – microextração em fase líquida com fibra oca, MMLLE - extração líquido-líquido com membrana microporosa, MMSPE – extração em fase sólida com membrana microporosa.

FONTE: A autora (2023).

Adicionalmente, da mesma forma que a SPME, as técnicas de HF-LPME e MMSPE foram relatadas na configuração de *headspace* (CARPINTEIRO et al., 2009; MOGADDAM et al., 2019). Nesta configuração os dispositivos de extração são expostos à fase gasosa de uma amostra ao invés de submergidos nas amostras líquidas, de forma que os equilíbrios de partição e sorção ocorrem entre a amostra gasosa e o solvente extrator ou fase sortiva, além de um equilíbrio adicional de partição entre a amostra líquida e a fase gasosa. Tais configurações são empregadas quando os compostos de interesse apresentam alta volatilidade. A FIGURA 9 apresenta um esquema dos modos de imersão direta e *headspace* para a MMSPE.

FIGURA 9 – ESQUEMA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM MEMBRANA MICROPOROSA NOS MODOS DE IMERSÃO DIRETA E *HEADSPACE*



FONTE: A autora (2022).

Diferentes estudos empregaram membranas comerciais de polipropileno (PP) como fase extratora visando à determinação de compostos aromáticos. No estudo de Montes et al. (2008), a técnica de MMSPE na configuração de *headspace* foi utilizada na extração de anisóis halogenados em amostras de água de superficial e esgoto, empregando análise por GC-ECD. Para tal, segmentos de 2,0 cm de membranas de PP foram expostas à fase gasosa em frascos fechados contendo as

amostras aquosas por 2 horas sem agitação. Em seguida, as membranas foram submetidas a um procedimento de dessorção com hexano. Foram obtidos limites de quantificação na faixa de 0,4 a 10 ng L⁻¹, indicando a aplicabilidade da técnica para extração de compostos em concentrações na faixa de ultra-traço.

Por sua vez, Carpinteiro et al. (2009) desenvolveram um método analítico visando à determinação de toluenos halogenados empregando MMSPE na configuração *headspace* e as técnicas de análise GC-ECD e GC-MS em diferentes tipos de matrizes aquosas. Similarmente ao estudo citado anteriormente, o método desenvolvido fez uso de segmentos de 2,0 cm de membranas de PP, sendo o procedimento de extração realizado por 1 hora sob agitação magnética, seguido de dessorção com hexano. Os limites de quantificação obtidos para GC-ECD variaram entre 0,08 e 10 ng L⁻¹, enquanto para GC-MS estes se encontraram na faixa de 7 a 12,5 ng L⁻¹. Ao aplicar o método às amostras de água de abastecimento, água superficial, esgoto bruto e tratado não foi possível identificar os analitos nas amostras, porém, realizando a fortificação da mesma foi possível observar que a determinação dos toluenos halogenados foi afetada por efeito matriz apenas nas amostras de esgoto bruto devido a um maior teor de matéria orgânica.

Como exposto nos exemplos supracitados, as membranas de PP apresentam o potencial como fase sortiva para determinação de compostos aromáticos. No entanto, a aplicabilidade de membranas de PP como fase sortiva para extração de aminas aromáticas ainda não foi estabelecida, uma vez que não há estudos na literatura que envolvem tal classe de compostos visando sua determinação em qualquer tipo de matriz.

Além disso, a grande maioria dos estudos empregando MMSPE com membranas de PP foi realizada em estudos envolvendo matrizes ambientais, as quais apresentam complexidade variada, porém não trazem os desafios característicos de matrizes biológicas. Destaca-se que a MMSPE ainda não foi aplicada no desenvolvimento de métodos bioanalíticos com qualquer finalidade.

Assim, unindo as vantagens das técnicas de extração baseadas em fase sólida à potencialidade do uso de membranas de PP para extração de compostos aromáticos, tais dispositivos foram avaliados neste trabalho visando à extração de compostos carcinogênicos que atuam como biomarcadores de exposição à fumaça de cigarro em amostras de urina humana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar dispositivos baseados em membranas microporosas de polipropileno para extração e determinação dos compostos biomarcadores carcinogênicos o-TOL, 1-NA e 2-NA em amostras de urina de fumantes ativos e passivos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver método cromatográfico (GC-MS/MS) para a determinação de o-TOL, 1-NA e 2-NA, avaliando a aplicabilidade de uma etapa de derivatização;
- Otimizar procedimento de derivatização com PFPA;
- Avaliar dispositivos de extração baseados em membranas de polipropileno;
- Otimizar o procedimento de extração e dessorção empregando o dispositivo de maior eficiência de extração;
- Avaliar preliminarmente os parâmetros de mérito do método analítico proposto;
- Aplicar o método analítico desenvolvido em amostras de urina provenientes de fumantes ativos e passivos voluntários.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

Os padrões com pureza de $\geq 99\%$ dos analitos o-TOL, 1-NA e 2-NA foram adquiridos da Sigma Aldrich[®] (São Paulo, Brasil), assim como os padrões dos compostos avaliados como padrão interno (PI), fenantreno-d10 (FEN-d10), alacloro (ALC) e clorpirifós (CPF). Os solventes necessários para o preparo de soluções e de amostras (acetona, metanol, acetato de etila e hexano) e utilizados na cromatografia a gás (acetato de etila e hexano) foram de alta pureza (grau HPLC).

As soluções padrão dos analitos foram preparadas em metanol (grau HPLC), a partir da dissolução de padrões de alta pureza. Tais soluções foram armazenadas em tubos de ensaio com tampa envoltos em papel alumínio, visando à proteção da luz, em *freezer* com temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O reagente derivatizante, anidrido pentafluoropropiônico (99 %) (PFPA), foi adquirido da Sigma Aldrich[®] (São Paulo, Brasil). O sequestrante de ácido empregado nas reações de derivatização piridina ($\geq 99,5\%$) foi adquirido da Neon[®] (São Paulo, Brasil). A água utilizada nos ensaios foi purificada por sistema Milli-Q, Millipore[®] (São Paulo, Brasil), apresentando resistividade de $18,2\text{ M}\Omega\text{ cm}$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para preparar as soluções de neutralização empregadas na derivatização com PFPA, foram utilizados dihidrogenofosfato de potássio e hidrogenofosfato de potássio de grau analítico.

Os dispositivos de MMSPE foram confeccionados utilizando segmentos de membrana microporosa e oca de PP (Q3/2 Accurel) com diâmetro interno de $600\text{ }\mu\text{m}$, espessura de parede de $200\text{ }\mu\text{m}$ e tamanho de poros de $0,2\text{ }\mu\text{m}$, a qual foi adquirida do fornecedor Membrana[®] (Wuppertal, Alemanha). Após o corte, estes segmentos foram sonicados em acetona por 5 min para a etapa de limpeza. As membranas de PP foram deixadas em repouso para que a acetona evaporasse em temperatura ambiente.

3.2 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

3.2.1 Desenvolvimento do método cromatográfico

O método cromatográfico foi desenvolvido empregando um cromatógrafo a gás GCMS2010 Plus acoplado a um espectrômetro de massas sequencial do tipo triplo quadrupolo TQ8040, autoamostrador AC 5000 (Shimadzu[®], Japão) e software GCMS Solution[®]. O cromatógrafo é equipado com uma coluna capilar ZB-5MS (Phenomenex[®]), de dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. O gás hélio 5.0 analítico foi utilizado como gás de arraste. O volume de injeção empregado foi de 1,0 µL.

Para otimização de ambos os métodos cromatográficos, visando a determinação dos analitos na sua forma não derivatizada e derivatizada, foram avaliados univariadamente os parâmetros rampa de aquecimento, temperatura do injetor, temperatura da linha de transferência, pressão de pulso de pressão, duração do pulso de pressão, modo de injeção e tempo de amostragem, como apresentado na TABELA 2.

TABELA 2 – PARÂMETROS AVALIADOS NA OTIMIZAÇÃO UNIVARIADA DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

		(continua)
Parâmetro	Nível Avaliado	
Rampa de aquecimento para os analitos não derivatizados	Rampa A	a. 75 °C por 3 min b. 75 a 250 °C em 7 min (taxa: 25 °C min ⁻¹) c. 250 °C por 5 min Tempo de análise: 15 min
	Rampa B	a. 75 °C por 3 min b. 75 a 215 °C em 5,6 min (taxa: 25 °C min ⁻¹) c. 215 °C por 2 min d. 215 a 250 °C em 1,4 min (taxa: 25 °C min ⁻¹) e. 250 °C por 4 min Tempo de análise: 16 min
	Rampa C	a. 75 °C por 3 min b. 75 a 255 °C em 9 min (taxa: 20 °C min ⁻¹) c. 255 °C por 4 min Tempo de análise: 16 min
	Rampa D	a. 75 °C por 3 min b. 75 a 200 °C em 5 min (taxa: 25 °C min ⁻¹) c. 200 °C por 2 min d. 200 a 250 °C em 2 min (taxa: 25 °C min ⁻¹) e. 250 °C por 4 min Tempo de análise: 16 min
	Rampa E	a. 75 °C por 3 min b. 75 a 190 °C em 4,6 min (taxa: 25 °C min ⁻¹) c. 190 °C por 2 min d. 200 a 250 °C em 2,4 min (taxa: 25 °C min ⁻¹) e. 250 °C por 4 min Tempo de análise: 16 min

(continuação e conclusão)		
	Rampa F	a. 75 °C por 3 min b. 75 a 205 °C em 6,5 min (taxa: 20 °C min ⁻¹) c. 205 a 250 °C em 1,5 min (taxa: 30 °C min ⁻¹) d. 250 °C por 4 min Tempo de análise: 15 min
Rampa de aquecimento para os analitos derivatizados	Rampa A'	a. 75 °C por 3 min b. 75 a 275 °C em 10 min (taxa: 20 °C min ⁻¹) c. 275 °C por 4 min Tempo de análise: 17 min
	Rampa B'	a. 75 °C por 3 min b. 75 a 275 °C em 8 min (taxa: 25 °C min ⁻¹) c. 275 °C por 4 min Tempo de análise: 15 min
	Rampa C'	a. 75 °C por 3 min b. 75 a 275 °C em 6,67 min (taxa: 30 °C min ⁻¹) c. 275 °C por 4,33 min Tempo de análise: 14 min
Temperatura do injetor (°C)	250, 275, 300	
Temperatura da linha de transferência (°C)	250, 275, 300	
Pressão de pulso de pressão (kPa)	63,3, 132, 184, 228	
Duração do pulso de pressão (min)	1, 2, 3	
Modo de injeção	<i>Split</i> – razão 1:10 <i>Splitless</i>	
Tempo de amostragem (min)	1, 2, 3	

Nestes ensaios foram realizadas injeções em triplicata dos padrões em concentrações de 10,0 mg L⁻¹ e de 2,5 mg L⁻¹ em acetato de etila na forma não derivatizada e a concentrações de 1,0 mg L⁻¹ (1-NA e 2-NA) e 2,0 mg L⁻¹ (o-TOL) em hexano na forma derivatizada. Os demais parâmetros temperatura da fonte de íons, volume de injeção e energia de ionização foram fixados em 250 °C, 1,0 µL e 70 eV, respectivamente. Tais ensaios foram realizados em triplicata, sendo as aquisições dos dados espectrométricos realizadas no modo *full scan*.

Após o desenvolvimento do método cromatográfico, foram calculados os parâmetros de número de pratos teóricos e resolução cromatográfica, empregando-se as fórmulas definidas a seguir (COLLINS et al., 2006).

$$R_s = \frac{2(t_{rB} - t_{rA})}{W_A + W_B} \quad [1]$$

onde: R_s – resolução entre dois picos cromatográficos

t_r – tempo de retenção

W – largura de base do pico

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2 \quad [2]$$

onde: N – número de pratos teóricos

t_r – tempo de retenção

W – largura de base do pico

3.2.2 Estudo do modo de aquisição Monitoramento de Reações Múltiplas

Com base no método *full scan* otimizado foi realizada uma série de aquisições no modo PIS, empregando argônio 4.8 como gás de colisão. Para tais estudos foram realizadas injeções dos padrões em concentrações de 100,0 mg L⁻¹ de o-TOL e ALC, e 10,0 mg L⁻¹ de 1-NA e 2-NA em hexano na forma derivatizada. As energias de colisão avaliadas variaram de 1 a 58 eV, realizando aquisições em acréscimos de 3 eV. Para realizar tais aquisições, foram definidos íons a serem monitorados em faixas de tempo distintas, como relatado na TABELA 3.

TABELA 3 – PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO NO MODO VARREDURA DE ÍONS PRODUTO (PIS)

Composto	Íons Monitorados (m/z)	Faixa de Monitoramento (min)
o-toluidina	134 253 106	5,000 – 8,000
1-naftilamina	289 115 142	8,000 – 9,500
2-naftilamina	289 115 142	8,000 – 9,500
Alacloro	160 188 146	10,000 – 10,500

Notas: íons monitorados listados para cada analito em ordem decrescente de intensidade; **negrito** – íon molecular.

Os espectros contendo os íons produto foram avaliados com o intuito de selecionar as transições íon precursor > íon produto que garantiriam uma maior detectabilidade para o método.

3.3 DERIVATIZAÇÃO COM ANIDRIDO PENTAFLUOROPROPIÔNICO (PFPA)

3.3.1 Avaliação da reação de derivatização com PFPA

Para conduzir a avaliação da reação de derivatização empregando PFPA foram realizados ensaios empregando piridina como sequestrante de ácido, sendo comparadas diferentes fontes de aquecimento: banho termostático e forno micro-ondas doméstico, sendo a metodologia que aplica banho termostático adaptada de Weiss; Angerer (2002). Nestes ensaios foi necessária realizar uma etapa de *clean-up*, empregando uma solução tampão fosfato (pH 8,0), a qual foi preparada através da pesagem de 1,673 g de K_2HPO_4 e 52,3 mg de KH_2PO_4 em 100 mL de água. O pH da solução foi ajustado utilizando soluções de hidróxido de sódio e ácido clorídrico com auxílio de um pHmetro (Micronal C474).

De forma geral, os procedimentos avaliados foram divididos em duas etapas: reação de derivatização e *clean-up*. Para dar início à reação de derivatização, alíquotas dos padrões dos analitos foram evaporadas e ressolubilizadas em 500 μ L de hexano, resultando numa concentração de 1,0 mg L⁻¹ para tais. Em seguida, foi realizada a adição de 10,0 μ L do reagente derivatizante, PFPA, e 5,0 μ L do sequestrante de ácido, piridina. O meio reacional foi submetido à agitação em vórtex por 10 s, visando à homogeneização do mesmo, e em seguida os frascos foram fechados e a reação de derivatização em banho termostático ou em forno micro-ondas foi conduzida. A derivatização em banho termostático foi conduzida por 60 min a 80 °C, enquanto a derivatização em forno micro-ondas foi conduzida por 5 min empregando uma potência de saída de 840 W.

Após o meio reacional atingir a temperatura ambiente, foi realizado o *clean-up* do mesmo, através de três etapas de LLE com alíquotas de 1,2 mL de tampão fosfato (pH 8,0). Alíquotas de 200 μ L de fase orgânica resultante foram coletadas para posterior injeção no sistema cromatográfico.

3.3.2 Otimização da reação de derivatização

3.3.2.1 Planejamento fatorial 2⁴ para reação com adição de sequestrante de ácido

Com o intuito de se obter uma resposta máxima para a derivatização em micro-ondas dos analitos utilizando PFPA como derivatizante e piridina como

sequestrante de ácido, avaliou-se um planejamento fatorial 2^4 , o qual contemplou as seguintes variáveis: potência de saída do forno micro-ondas doméstico, tempo de derivatização, volume de derivatizante e volume de sequestrante de ácido. Os níveis avaliados para tais parâmetros são relatados na TABELA 4. O desvio padrão da reação de derivatização foi avaliado através da quintuplicata do ponto central.

TABELA 4 – PARÂMETROS DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO AVALIADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^4

Parâmetro	Nível		
	-1	0	+1
Potência de saída do forno micro-ondas doméstico (W)	480	640	800
Tempo de derivatização (min)	3	5	7
Volume de derivatizante (μL)	10,0	15,0	20,0
Volume de sequestrante de ácido (μL)	5,0	7,5	10,0

Todos os ensaios foram conduzidos empregando ALC ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$) e CPF ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$) como PI respectivamente para a o-TOL ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$) e para os isômeros 1-NA e 2-NA ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$). Tais pares foram estabelecidos devido à polaridade similar entre os pares PI/analito derivatizado, conforme o apresentado na TABELA 5, e os resultados foram avaliados em termos da razão entre as áreas dos picos dos analitos e respectivos PI. As etapas do procedimento de derivatização foram conduzidas da mesma maneira descrita no item 3.3.1. A aquisição dos dados espectrométricos foi realizada no modo SIM nesta etapa.

TABELA 5 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE COMPOSTOS AVALIADOS COMO PADRÃO INTERNO E DE DERIVADOS PERFLUOROACILADOS DAS AMINAS AROMÁTICAS

Composto	Fórmula	pKa	Log P
Alacloro	$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{ClNO}_2$	-	3,59
Clorpirifós	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$	-	4,78
2,2,3,3,3-pentafluoro-N-(2-metilfenil)propanamida (o-TOL, (D))	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{F}_5\text{NO}$	11,46	3,56
2,2,3,3,3-pentafluoro-N-(naftalen-2-il)propanamida (2-NA, (D))	$\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_5\text{NO}$	11,27	4,03
2,2,3,3,3-pentafluoro-N-(naftalen-1-il)propanamida (1-NA, (D))	$\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_5\text{NO}$	10,99	4,03

Log P: logaritmo da constante de partição; pKa: constante de dissociação ácida; o-TOL – o-toluidina; 1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; (D) – derivatizada.

FONTE: Chemicalize.

3.3.2.2 Avaliação da adição de piridina

Após a avaliação preliminar de parâmetros da reação de derivatização com PFPA, para avaliar o efeito da presença de piridina no meio reacional, a qual deveria atuar como sequestrante de ácido para a reação de derivatização.

Com este intuito foram realizados ensaios em triplicata onde foi efetuada a adição de 5,0 μL de piridina e sem a adição de piridina no meio reacional da derivatização. Tais ensaios foram realizados a partir de alíquotas dos analitos o-TOL, na concentração de 10,0 mg L^{-1} , 1-NA e 2-NA, na concentração de 1,0 mg L^{-1} . A reação de derivatização foi realizada de modo geral conforme as etapas descritas no item 3.3.1., empregando 10,0 μL de PFPA, 3 min de reação e potência de saída de 480 W.

A aquisição dos espectros de massas foi realizada no modo *full scan*, visando o monitoramento de possíveis degradações da fase estacionária da coluna cromatográfica, assim como a presença de PFPA (m/z : 119, 69, 147 e 263) e o subproduto da reação de derivatização ácido pentafluoropropiônico (m/z : 100, 119, 69, 45, 97, 31 e 147).

3.3.2.3 Avaliação da etapa de *clean-up*

Com o intuito de avaliar o efeito do número de etapas de *clean-up* com tampão fosfato pH 8,0 na resposta e na repetibilidade da etapa de derivatização, ensaios em triplicata foram realizados nas condições de apenas uma etapa de *clean-up* e três repetições da etapa de *clean-up*.

Tais ensaios foram realizados a partir de alíquotas dos padrões de o-TOL e FEN-d10, utilizado como PI, na concentração de 10,0 mg L^{-1} , e de 1-NA e 2-NA, na concentração de 1,0 mg L^{-1} . A reação de derivatização foi realizada de modo geral conforme as etapas descritas no item 3.3.1., empregando 10,0 μL de PFPA, 3 min de reação e potência de saída de 480 W, sem a adição de piridina como sequestrante de ácido.

Similarmente ao estudo para avaliar o efeito da presença de piridina, as aquisições dos espectros de massas foram realizadas no modo *full scan* para acompanhar qualquer possível degradação da fase estacionária assim como a presença de PFPA e ácido pentafluoropropiônico.

3.3.2.4 Planejamento fatorial 2^3 para reação sem adição de sequestrante de ácido

Visando à otimização da reação de derivatização na ausência de um sequestrante de ácido foi realizado um planejamento fatorial 2^3 em duplicata, avaliando as variáveis volume de derivatizante, tempo de derivatização e potência de saída do forno micro-ondas doméstico, de acordo com o apresentado na TABELA 6.

TABELA 6 – PARÂMETROS DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO AVALIADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3

Parâmetro	Nível	
	-1	1
Volume de derivatizante (μL)	5,0	10,0
Tempo de derivatização (min)	1	3
Potência de saída do forno micro-ondas doméstico (W)	400	720

As faixas de tempo de derivatização e volume de derivatizante foram selecionadas de modo a fixar como valores máximos as condições otimizadas no planejamento anterior e descritas no item 3.3.2.1, com o intuito de minimizar o gasto de derivatizante e garantir uma alta frequência analítica, enquanto a faixa avaliada para a potência de saída permaneceu similar àquela avaliada no planejamento anterior. Para tal estudo, alíquotas de 400 μL de hexano foram fortificadas a concentrações finais de 10,0, 1,0 e 1,0 mg L^{-1} para o-TOL, isômeros 1-NA e 2-NA e os PI (ALC e CPF), respectivamente. Os resultados foram avaliados em termos da razão entre as áreas dos picos dos analitos e respectivos PI.

O procedimento foi realizado sem a adição de piridina, com apenas uma etapa de *clean-up* empregando 960 μL de tampão fosfato (pH 8,0), sendo o restante do procedimento de derivatização executado conforme as etapas descritas no item 3.3.1.

3.4 AMOSTRAS DE URINA

Todos os participantes foram voluntários e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A), e proveram informações adicionais conforme o solicitado no registro de amostra (APÊNDICE B). As

condições expostas referentes a participação de voluntários foram aprovadas previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor da Saúde da UFPR (ANEXO A).

Amostras de urina de voluntários não fumantes foram empregadas como amostras branco, ou seja, amostras isentas dos analitos. Tais amostras foram empregadas em etapas de otimização do procedimento de extração por MMSPE, especificamente dos parâmetros pH da amostra, teor de NaCl adicionado, teor de metanol, tempo de extração, quantidade de fase sortiva e tempo de dessorção. Estas amostras também foram empregadas na avaliação preliminar dos parâmetros de mérito do método desenvolvido no presente estudo.

As amostras de urina de fumantes ativos e passivos foram similarmente fracionadas e congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de seu uso como amostras incorridas, ou seja, amostras que refletem a exposição à fumaça de cigarro e que não são fortificadas com os analitos.

Todas as amostras de urina foram coletadas durante 24 h pelos próprios voluntários utilizando frascos estéreis com capacidade de 3,0 L, conforme orientações Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares, a qual administra os hospitais universitários federais (Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares - Ebserh, 2018). Tais amostras foram então fracionadas em frascos de 50 mL, sendo estes tubos Falcon quando as amostras eram provenientes de voluntários não fumantes. Já quando as amostras eram provenientes de fumantes ativos e passivos ou quando amostras de urina branco foram fortificadas com os analitos previamente ao armazenamento, as amostras foram armazenadas em frascos de vidro, visando minimizar perdas por sorção nos frascos de PP. Todas as amostras foram armazenadas em *freezer* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de uso.

3.5 HIDRÓLISE DAS AMOSTRAS DE URINA

A hidrólise da urina é uma etapa essencial para realizar a quebra dos conjugados aminas aromáticas-glicurônídeo, produtos do metabolismo hepático, permitindo a determinação dos analitos na sua espécie livre. O procedimento de hidrólise foi adaptado de Weiss; Angerer (2002), e foi executado para todos os ensaios que envolveram amostras de urina provenientes tanto de voluntários não fumantes quanto fumantes ativos e passivos.

Para tal, alíquotas de 7,5 mL de urina foram adicionadas a tubos de ensaio, nas quais foi realizada a fortificação com os analitos seguida da adição de 1,5 mL de HCl 37% (m/m). As soluções foram homogeneizadas e mantidas a 80 °C por 1 hora em banho termostático. Após este período, as amostras foram resfriadas em banho de gelo, e neutralizadas pela adição de alíquotas de 1,5 mL de solução de NaOH 12,0 mol L⁻¹. O pH das amostras foi ajustado a valores na faixa de 4 a 10, e em seguida foi realizada a fortificação das mesmas com os PI (ALC e CPF). Estas soluções foram mantidas em *freezer* a -20 °C até o momento de extração.

3.6 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM MEMBRANA MICROPOROSA (MMSPE)

A MMSPE apresenta diferentes parâmetros de extração que idealmente devem ser otimizados visando à obtenção de uma eficiência de extração alta e satisfatória, uma vez que técnicas miniaturizadas não são exaustivas. No presente estudo, tais parâmetros foram divididos em grupos para otimização empregando uma estratégia mista entre otimização multivariada e univariada.

Inicialmente foi realizada uma avaliação preliminar e univariada de diferentes configurações para a utilização da membrana microporosa de PP como dispositivo de extração.

Em seguida foram avaliados os parâmetros qualitativos atrelados à execução da MMSPE, como a configuração dos dispositivos de MMSPE, diferenciada quanto ao número e tamanho de segmentos de membranas e parâmetros que afetariam a etapa de derivatização, como tipo de solvente de dessorção e realização de uma etapa de evaporação deste solvente. A otimização dos parâmetros qualitativos da MMSPE foi conduzida de forma multivariada.

Demais parâmetros avaliados para otimizar a MMSPE são parâmetros quantitativos, sendo estes avaliados em grupos que refletem etapas distintas da execução do procedimento experimental, como representado na TABELA 7.

TABELA 7 – PARÂMETROS QUANTITATIVOS DA MMSPE

Etapa do procedimento de preparo de amostra	Parâmetro
Hidrólise	pH da amostra
Extração	Teor de NaCl adicionado Teor de metanol Tempo de extração
Dessorção	Quantidade de fase sortiva Tempo de dessorção

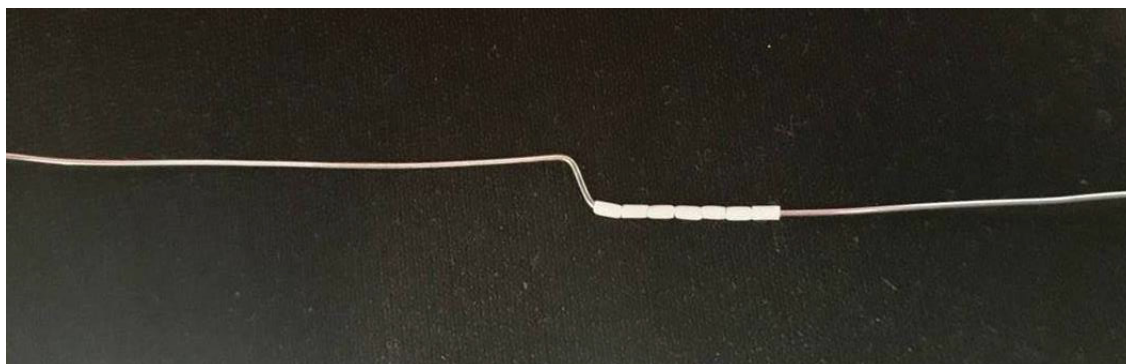
Dessa forma, a otimização dos parâmetros quantitativos da MMSPE ocorreu em três fases: otimização univariada do pH da amostra, otimização multivariada do teor de NaCl adicionado, teor de metanol e tempo de extração e otimização multivariada da quantidade de fase sortiva, tempo de dessorção e tempo de extração, sendo esta última variável incluída no planejamento com as demais variáveis que influenciam a dessorção devido à possibilidade de expansão da faixa avaliada e conseqüente possível melhora na eficiência de extração visada.

3.6.1 Confeccção dos dispositivos de MMSPE

Os dispositivos de MMSPE foram confeccionados empregando hastes metálicas obtidas a partir de um fio de cobre revestido com aço inoxidável, o qual apresenta diâmetro de 0,5 cm. Tais hastes foram seccionadas num comprimento de 10 cm e foram realizadas duas dobras consecutivas a aproximadamente 90°, de modo que os segmentos permanecessem dispostos verticalmente no interior dos tubos de ensaio utilizados no procedimento de extração.

As hastes resultantes foram descontaminadas em acetona por 10 min em banho ultrassônico. Após a evaporação da acetona, nestas hastes foram encaixados os segmentos de membrana microporosa previamente descontaminados em duas configurações diferentes, contendo sete segmentos de 0,2 cm (dispositivo 7 x 0,2 cm), como exposto na FIGURA 10, ou dois segmentos de 0,7 cm (dispositivo 2 x 0,7 cm). Os dispositivos de MMSPE foram armazenados até o procedimento de extração.

FIGURA 10 – DISPOSITIVO DE MMSPE (EXEMPLO: 7 x 0,2 cm)



FONTE: A autora (2022).

3.6.2 Procedimento de MMSPE assistida por ultrassom geral

De modo geral, a extração dos analitos foi realizada a partir da fortificação de alíquotas de 7,5 mL de amostra, sendo estas alíquotas de água ultrapura ou urina humana, em tubos de ensaio com tampa dispostos de modo circular em um suporte de poliestireno. Em seguida, foi realizada a adição de NaCl e/ou metanol às amostras, em teores de 0,0 a 5,0% (m/v) e 0,0 a 10,0% (v/v), respectivamente.

Após a homogeneização das amostras, os dispositivos de MMSPE foram adicionados ao interior da solução, de um a quatro dispositivos em total em uma única amostra, e a extração foi conduzida em banho ultrassônico por período de 15 a 60 min. Em seguida, as membranas foram removidas da amostra, secas com auxílio de lenços de papel e transferidas para frascos de 1,5 mL. A estes foram adicionadas alíquotas 400 μ L de solvente de dessorção, hexano (HX) ou acetato de etila (AcOEt) e, em seguida, tais frascos foram similarmente dispostos de forma circular em suportes de poliestireno. A dessorção foi conduzida em banho ultrassônico por período de 10 a 30 min. Em seguida, os extratos foram transferidos para frascos vazios, sendo obtido o extrato da MMSPE.

3.6.3 Avaliação preliminar de dispositivos de extração empregando membranas microporosas de PP

Visando a aplicação das membranas microporosas de PP como fase sortiva foram avaliadas diferentes configurações de extração, com as membranas livres em solução, similar ao realizado para a HF μ E, porém dispensando o uso de um solvente

de extração imobilizado nos seus poros, e as membranas dispostas em forma de haste, como um dispositivo de MMSPE.

Assim, os ensaios foram conduzidos em triplicata empregando alíquotas de 7,5 mL de água ultrapura fortificadas em concentrações finais de 20,0 mg L⁻¹ para o-TOL, 2,0 mg L⁻¹ para 1-NA e 2-NA e 1,0 mg L⁻¹ para os PI (ALC e CPF). As configurações avaliadas foram dois segmentos de membrana de 0,7 cm livres em solução e dispostos em uma única haste. A extração assistida por ultrassom foi conduzida por 20 min, as membranas foram coletadas com auxílio de uma pinça, secas com o auxílio de lenços de papel, e em seguida foi realizada a dessorção empregando 200 µL de hexano em banho ultrassônico por 20 min. A aquisição dos dados foi realizada no modo SIM para estes ensaios.

3.6.4 Otimização do procedimento de MMSPE

3.6.4.1 Planejamento fatorial 2³ A - configuração, etapa de evaporação, solvente de dessorção

Diferentes parâmetros podem afetar o desempenho de uma técnica de extração. No caso da MMSPE, para verificar se o comprimento dos segmentos de membrana apresentava algum impacto significativo no procedimento de extração, principalmente quanto a seu efeito na precisão do método proposto, foram confeccionados dois dispositivos distintos, 7 x 0,2 cm e 2 x 0,7 cm, como descrito no item 3.6.1. Dentre outros parâmetros qualitativos que podem impactar a eficiência de extração e da reação de derivatização, respectivamente, podem ser citados o tipo do solvente de dessorção e a realização de uma etapa de evaporação do mesmo. Desse modo, para avaliar os efeitos das variáveis qualitativas de configuração do dispositivo de MMSPE, tipo de solvente de dessorção e a necessidade de uma etapa de evaporação prévia ao procedimento de derivatização foi realizado um planejamento fatorial 2³ qualitativo em quadruplicata, conduzido de acordo com a TABELA 8. As respostas foram avaliadas em termos da razão entre as áreas dos picos dos analitos e do PI.

TABELA 8 – PARÂMETROS DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO/DESSORÇÃO AVALIADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ A

Parâmetro	Nível	
	-1	1
Configuração (nº de segmentos x comprimento)	2 x 0,7 cm	7 x 0,2 cm
Etapa de evaporação do extrato	Sim	Não
Solvente de dessorção	Acetato de Etila	Hexano

Para tal, alíquotas de 7,5 mL de água ultrapura foram fortificadas a concentrações finais de 20,0, 2,0 e 1,0 mg L⁻¹ para o-TOL, isômeros 1-NA e 2-NA e PI (ALC e CPF), respectivamente. As extrações foram conduzidas por 20 min, e a dessorção foi realizada em 400 µL de solvente orgânico por 20 min. Os extratos foram então fracionados em alíquotas de 150 µL, sendo uma destas alíquotas submetida à etapa de evaporação do solvente, enquanto a outra foi reservada para injeção em sistema cromatográfico. Os extratos que foram submetidos à etapa de evaporação foram ressolubilizados no mesmo solvente de origem previamente à injeção no sistema cromatográfico. As aquisições dos espectros foram realizadas no modo SIM.

3.6.4.2 Otimização univariada do pH da amostra

O pH da amostra é uma variável frequentemente avaliada ao se desenvolver um método analítico envolvendo preparo de amostra, uma vez que este ajuste impactará diretamente a distribuição das espécies neutras e carregadas de um composto, o que pode ser uma ferramenta importante para se maximizar a eficiência de extração de um analito. Assim, para garantir a maior eficiência de extração de acordo com a distribuição dos analitos nas espécies neutras e protonadas, um estudo de pH da amostra foi conduzido de forma univariada e em quintuplicata, empregando ajuste de pH a valores de 4, 6, 8 e 10.

Tais ensaios foram conduzidos empregando alíquotas de 7,5 mL de urina fortificadas em concentrações finais de 5,0 e 0,5 mg L⁻¹ de o-TOL e isômeros 1-NA e 2-NA, respectivamente, antes da etapa de hidrólise, e com 0,5 mg L⁻¹ dos PI (ALC e CPF) após o ajuste de pH. A extração foi conduzida empregando condições experimentais que correspondem a valores intermediários para as demais variáveis que seriam posteriormente avaliadas: 2,5% de cloreto de sódio, 5,0% de metanol, 30

minutos de extração, três hastes contendo sete segmentos de 0,2 cm de membrana de PP e 20 minutos de dessorção com 400 µL de hexano. As aquisições dos espectros foram realizadas no modo SIM. As respostas foram avaliadas em termos da razão entre as áreas dos picos dos analitos e do PI.

3.6.4.3 Planejamento fatorial 2³ B - teor de NaCl adicionado, teor de metanol e tempo de extração

Além do pH da amostra, a força iônica e a adição de solventes miscíveis em água a uma amostra podem afetar diretamente a eficiência de extração de um composto devido a alterações nas características da amostra como solução. Já a otimização da variável de tempo de extração é essencial ao se empregar técnicas de microextração, uma vez que estas se baseiam em equilíbrio de sorção e não são exaustivas, sendo o tempo de extração determinante para a obtenção de uma alta eficiência de extração.

Para avaliar as variáveis teor de NaCl adicionado, teor de metanol e tempo de extração foi conduzido um planejamento fatorial 2³ em duplicata, de acordo com a TABELA 9. Para tal, alíquotas de 7,5 mL de amostras de urina foram fortificadas em concentrações finais de 5,0 e 0,5 mg L⁻¹ de o-TOL e isômeros 1-NA e 2-NA, respectivamente, antes da etapa de hidrólise, e com 0,5 mg L⁻¹ dos PI (ALC e CPF) após o ajuste de pH. A extração foi conduzida empregando pH 10, otimizado previamente, três hastes contendo sete segmentos de 0,2 cm de membrana de PP e 20 minutos de dessorção com 400 µL de hexano. As aquisições dos espectros foram realizadas no modo SIM.

TABELA 9 – PARÂMETROS DA EXTRAÇÃO AVALIADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ B

Parâmetro	Nível	
	-1	1
Teor de NaCl adicionado (% m/v)	0,0	5,0
Teor de metanol (% v/v)	0,0	10,0
Tempo de extração (min)	15	45

3.6.4.4 Planejamento fatorial 2³ C - quantidade de fase sortiva, tempo de dessorção e tempo de extração

Além do tempo de extração, a quantidade de fase sortiva e o tempo de dessorção são importantes variáveis a serem avaliadas ao se trabalhar com uma técnica de microextração que seja baseada em uma fase sortiva sólida. Desse modo, tais variáveis foram avaliadas através de um planejamento fatorial 2³ em duplicata, de acordo com a TABELA 10. A terceira variável, o tempo de extração, foi novamente avaliada neste planejamento fatorial, elevando-se a faixa de tempo avaliada com o intuito de aumentar a eficiência de extração da MMSPE.

TABELA 10 – PARÂMETROS DA EXTRAÇÃO/DESSORÇÃO AVALIADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ C

Parâmetro	Nível	
	-1	1
Quantidade de fase sortiva (hastes 7 x 0,2 cm)	2	4
Tempo de dessorção (min)	10	30
Tempo de extração (min)	30	60

Para tal estudo, alíquotas de 7,5 mL de amostras de urina foram fortificadas em concentrações finais de 5,0 e 0,5 mg L⁻¹ de o-TOL e isômeros 1-NA e 2-NA, respectivamente, antes da etapa de hidrólise, e com 0,5 mg L⁻¹ dos PI (ALC e CPF) após o ajuste de pH. A extração foi conduzida empregando pH 10, teor de metanol de 10,0% (v/v), otimizados previamente, e dessorção com 400 µL de hexano. As aquisições dos espectros foram realizadas no modo SIM.

3.7 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO DO MÉTODO BIOANALÍTICO DESENVOLVIDO

Após a finalização da etapa de otimização do procedimento de extração deu-se início à etapa de avaliação preliminar de parâmetros de mérito do método analítico desenvolvido nesse projeto. Este estudo foi realizado com base nas orientações dispostas no guia de validação de métodos bioanalíticos do FDA (Food and Drug Administration, 2018). Todos os ensaios foram realizados conforme as condições otimizadas previamente e empregando alíquotas de amostras de urina fortificadas com os analitos e com o PI (ALC), e as aquisições foram realizadas no

modo MRM, exceto os ensaios de estabilidade, para os quais as aquisições foram realizadas no modo SIM.

3.7.1 Curvas analíticas

Para obter as curvas analíticas e parâmetros como limite de quantificação inferior (“*Lower limit of quantification*” – LLOQ) e linearidade, foram conduzidos ensaios em quintuplicata, sendo cada réplica obtida em dias distintos, nas concentrações de 0, 25, 50, 80, 120, 200, 350 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os analitos, enquanto o PI (ALC) foi adicionado às amostras na concentração de 60 $\mu\text{g L}^{-1}$.

O ponto de concentração de 0 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi denominado calibrante zero. O LLOQ foi considerado o ponto de menor concentração diferente do calibrante zero em que a resposta obtida é igual ou maior a cinco vezes a resposta observada para o calibrante zero.

3.7.2 Precisão e exatidão

Visando avaliar a precisão e a exatidão do método bioanalítico proposto, ensaios intra-dia foram conduzidos na concentração de 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os analitos, enquanto o PI (ALC) foi adicionado às amostras na concentração de 60 $\mu\text{g L}^{-1}$. Já os dados de precisão e exatidão inter-dia foram extraídos utilizando as respostas obtidas para os analitos nos ensaios das curvas analíticas.

3.7.3 Ensaios de recuperação

Com o intuito de verificar a taxa de recuperação do método de MMSPE proposto, ensaios de recuperação foram conduzidos. Para tal, foram comparadas as respostas obtidas para os analitos a partir da fortificação de amostras de urina branco antes do procedimento de MMSPE e após o procedimento de MMSPE, porém antes da derivatização dos analitos, sendo este segundo grupo considerado o parâmetro para taxa de recuperação de 100%. Os ensaios foram conduzidos empregando uma concentração de 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os analitos, enquanto o PI (ALC) foi adicionado às amostras na concentração de 60 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.7.4 Seletividade e especificidade

Ensaio de seletividade foram conduzidos a partir da análise de amostras de urina de seis voluntários não fumantes sem a fortificação com os analitos e o PI (ALC), visando verificar a presença de picos de interferentes de compostos endógenos na matriz.

Já os ensaios de especificidade foram realizados a partir da fortificação das mesmas amostras com possíveis interferentes em uma concentração de $60 \mu\text{g L}^{-1}$. Foram selecionados interferentes como medicamentos, conservantes, contaminantes de preocupação emergente e hormônios, que podem estar presentes na urina humana. Estes são omeprazol, pantoprazol, lansoprazol, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, ibuprofeno, octilfenol, nonilfenol, triclosan, bisfenol A, diclofenaco, estrona, estradiol, estriol, coprostanol, colesterol e estigmastanol.

Em ambos os ensaios foi observada a presença de qualquer possível pico interferente nos mesmos tempos de retenção que os analitos e o PI (ALC), tanto para as transições de quantificação, quanto para as transições de confirmação.

3.7.5 Ensaio de estabilidade

Diferentes ensaios de estabilidade foram realizados para verificar limitações operacionais do método desenvolvido envolvendo amostras de urina *in natura*, que correspondem às amostras de urina que não foram submetidas a processamento após a coleta, amostras de urina hidrolisada e extratos derivatizados. As condições avaliadas estão apresentadas na TABELA 11, sendo todos os ensaios realizados em quadruplicata.

TABELA 11 – ENSAIOS DE ESTABILIDADE

Ensaio de estabilidade	Solução	Período avaliado
<i>Freezer</i> (-20 °C)	Urina <i>in natura</i>	0 e 24 h
	Urina hidrolisada	24, 48 h e 72 h
	Extrato derivatizado	0, 24 e 48 h
Ciclos congelamento/descongelamento (22h/2h)	Urina <i>in natura</i>	0, 1, 2 e 3 ciclos
Bancada (condições ambiente)	Urina <i>in natura</i>	0, 1 e 2 h
	Urina hidrolisada	0, 1 e 2 h
Autoamostrador (20-23 °C)	Extrato derivatizado	0, 12, 24, 36 h

Foram realizados ensaios de estabilidade da urina *in natura*, da urina hidrolisada e dos extratos derivatizados em *freezer* visando avaliar a possibilidade de armazenamento das amostras e extratos em diferentes etapas do procedimento analítico. Para tal, as amostras foram armazenadas em frascos de vidro, sendo mantidas pelo período pré-estabelecido a - 20 °C.

Os ensaios de estabilidade da urina *in natura* após ciclos de congelamento e descongelamento, onde cada etapa dura 22 e 2 horas, respectivamente, foram conduzidos para verificar a viabilidade de uma amostra passar pelo processo de descongelamento mais de uma vez para procedimentos de reanálise. Neste estudo, as amostras fortificadas foram mantidas pelo período pré-estabelecido a - 20 °C na etapa de congelamento e a temperatura ambiente na etapa de descongelamento.

Já os ensaios de estabilidade dos extratos derivatizados em autoamostrador foram realizados com o intuito de verificar o período em que os extratos poderiam permanecer no autoamostrador antes da injeção em sistema cromatográfico sem que a resposta obtida para os analitos fosse alterada devido a processos de evaporação de solvente e degradação do extrato. O equipamento de análise é mantido em uma sala de temperatura controlada de aproximadamente 20 °C.

Ensaio de estabilidade em bancada foram conduzidos para urina *in natura* e hidrolisada, para os quais estas foram mantidas em condições ambientes pelo período pré-estabelecido após as etapas de fortificação com os analitos e com o PI, respectivamente. Este estudo foi realizado visando verificar os períodos máximos em que as amostras podem permanecer em repouso na bancada durante o seu processamento sem que a mesma sofra degradação.

As etapas de extração e de derivatização nestes ensaios foram realizadas de acordo com os parâmetros otimizados previamente, sendo as amostras de urina

fortificadas em concentração final de 5,0 (o-TOL) e 0,5 mg L⁻¹ (1-NA e 2-NA) antes da hidrólise, e 0,5 mg L⁻¹ do PI (ALC) após o ajuste de pH. As aquisições de dados foram realizadas no modo SIM.

3.8 APLICAÇÃO A AMOSTRAS DE URINA DE FUMANTES PASSIVOS E ATIVOS

Após a otimização e avaliação preliminar dos parâmetros de mérito do método bioanalítico desenvolvido, este foi aplicado a amostras de urina provenientes de dois fumantes passivos e dois fumantes ativos, que realizaram a coleta durante um período de 24 horas. Os volumes das amostras foram aferidos para permitir conversão das concentrações de µg L⁻¹ para µg 24 h⁻¹. Tais amostras foram fortificadas com o PI (ALC) na concentração de 60 µg L⁻¹. As aquisições foram realizadas no modo MRM.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

4.1.1 Desenvolvimento do método cromatográfico

Visando o desenvolvimento de métodos cromatográficos que demonstrassem detectabilidade e resolução adequada para a determinação das aminas aromáticas o-TOL, 1-NA e 2-NA, tanto na forma não derivatizada quanto derivatizada (nas formas de pentafluoropropanamidas), foram avaliados univariadamente os seguintes parâmetros: rampa de aquecimento, temperatura do injetor, temperatura da linha de transferência, pressão do pulso de pressão, duração do pulso de pressão, modo de injeção e tempo de amostragem. As condições avaliadas para os métodos cromatográficos para as aminas aromáticas não derivatizadas e derivatizadas estão expostas na TABELA 2.

Cada um dos parâmetros avaliados será discutido individualmente a seguir, sendo cada um destes discutidos com base na aplicação de testes estatísticos. Todos os testes foram aplicados com $\alpha = 0,05$.

Análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos ensaios que contemplaram mais de duas condições experimentais para aferir a existência de diferenças significativas entre as respostas, e quando estas foram demonstradas, o teste de Tukey foi aplicado para verificar a diferença mínima significativa.

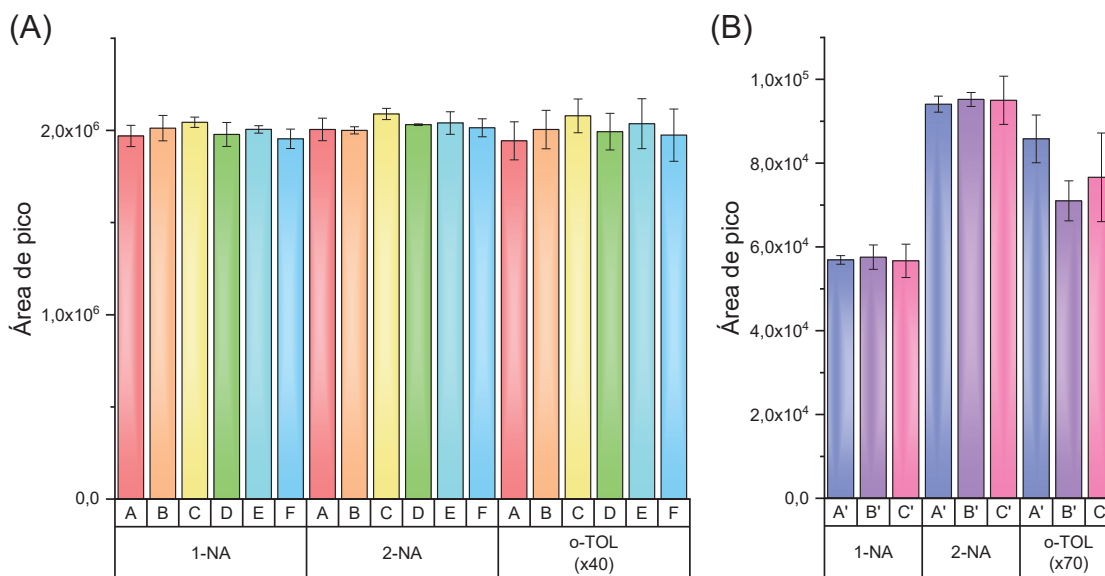
Para os ensaios que contemplaram apenas duas condições experimentais, inicialmente foi aplicado teste F, para verificar diferenças quanto às variâncias, seguido de teste t unicaudal para verificar diferenças quanto às médias, sendo estes testes t presumindo variâncias equivalentes quando F_{calc} é inferior ao F_{tab} e presumindo variâncias diferentes quando F_{calc} é superior ao F_{tab} .

4.1.1.1 Rampa de aquecimento

A otimização da rampa de aquecimento é uma etapa essencial para garantir uma separação satisfatória entre os analitos, apresentando grande importância neste estudo, uma vez que dois dos analitos, 1-NA e 2-NA, são isômeros de posição e apresentam propriedades físico-químicas semelhantes. Por sua vez, tais semelhanças podem dificultar tanto a obtenção de resolução cromatográfica

satisfatória entre ambos, quanto a análise dos dados por técnicas de deconvolução espectral. Os resultados obtidos em relação à intensidade absoluta (áreas de picos) e resolução são representados respectivamente na FIGURA 11 e na TABELA 12 para os analitos nas suas formas não derivatizadas e derivatizadas.

FIGURA 11 – EFEITO DA RAMPA DE AQUECIMENTO (n=3) NA RESPOSTA DOS ANALITOS (A) NÃO DERIVATIZADOS (o-TOL – 10,0 mg L⁻¹, 1-NA E 2-NA – 2,5 mg L⁻¹) E (B) DERIVATIZADOS (o-TOL – 2,0 mg L⁻¹, 1-NA E 2-NA – 1,0 mg L⁻¹)



1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina.

Observação: as áreas dos picos de o-TOL foram multiplicadas por 40 ou 70 para facilitar a representação gráfica e sua interpretação.

FONTE: A autora (2020).

TABELA 12 – EFEITO DA RAMPA DE AQUECIMENTO (n=3) NA RESOLUÇÃO ENTRE OS PICOS DE 1-NA E 2-NA NAS FORMAS NÃO DERIVATIZADAS E DERIVATIZADAS

Rampa		Resolução entre os picos de 1-NA e 2-NA	
		Média	RSD (%)
Analitos não derivatizados	A	1,39	5,09
	B	1,34	7,53
	C	1,63	8,16
	D	1,62	2,37
	E	1,71	2,11
	F	1,62	4,56
Analitos derivatizados	A'	7,34	4,93
	B'	6,15	5,01
	C'	4,88	0,23

1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; RSD – Desvio padrão relativo.

Em relação à área do pico, demonstrado na FIGURA 11, não foi observada diferença significativa nas condições avaliadas para os analitos não derivatizados (F-

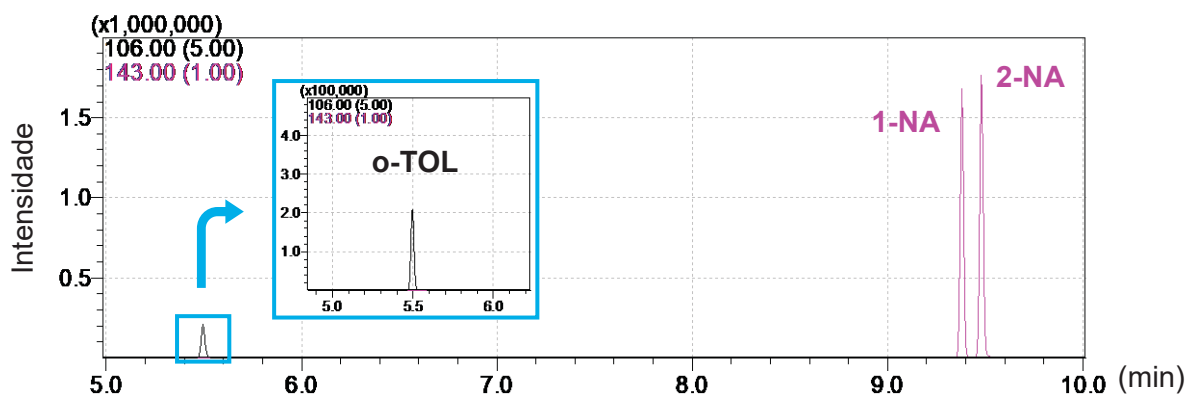
α -TOL = 0,521; $F_{1-NA} = 1,196$; $F_{2-NA} = 1,722$; $F_{tab} = 3,106$) e derivatizados ($F_{\alpha-TOL} = 3,005$; $F_{1-NA} = 0,074$; $F_{2-NA} = 0,082$; $F_{tab} = 5,143$).

No entanto, levando em consideração a resolução entre os picos dos isômeros de posição 1-NA e 2-NA constatou-se que, para os analitos não derivatizados, os métodos das rampas C, D, E e F apresentaram uma resolução com diferença significativa em relação às rampas A e B, enquanto não diferem entre si ($F = 9,777$; $F_{tab} = 3,106$). Já para os analitos derivatizados foi observada diferença significativa entre todas as rampas avaliadas ($F = 60,089$; $F_{tab} = 5,143$).

Dessa forma, é possível constatar que, para os analitos não derivatizados, as rampas de aquecimento com menores taxas de aquecimento (C e F) ou com etapas em que uma temperatura mais baixa permanece constante (D e E) resultam em maiores resoluções em comparação às rampas A e B, respectivamente, devido à eluição mais lenta dos isômeros e, conseqüentemente, permitem uma separação mais adequada dos analitos. Similarmente, para os analitos derivatizados, quanto maior a taxa de aquecimento, menor a resolução.

De modo geral, levou-se em consideração a necessidade de uma resolução mínima de 1,25, valor que indica a separação dos picos para fins quantitativos, enquanto uma resolução de 1,5 reflete a separação total da linha base para os picos (COLLINS et al., 2006; ROOD, 2007). Dessa forma, selecionou-se como rampa de aquecimento para as próximas etapas do estudo a rampa F, devido à sua duração inferior quando comparada às rampas C, D e E, totalizando 15 min, e a rampa C', a qual requer o menor tempo de análise, de 14 min, e apresenta resolução suficiente para fins quantitativos ($>1,25$). Os cromatogramas de íon extraído obtidos para as rampas de aquecimento selecionadas estão representados nas FIGURAS 12 e 13.

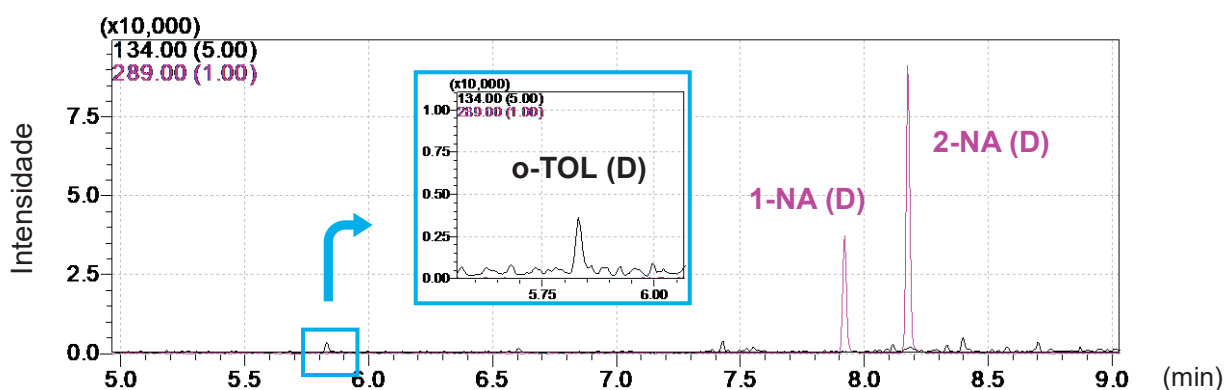
FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO OBTIDO PARA A RAMPA DE AQUECIMENTO F – 10,0 mg L⁻¹



1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina.

FONTE: A autora (2020).

FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO OBTIDO PARA A RAMPA DE AQUECIMENTO C' – 2,0 mg L⁻¹ (o-TOL) E 1,0 mg L⁻¹ (1-NA E 2-NA)



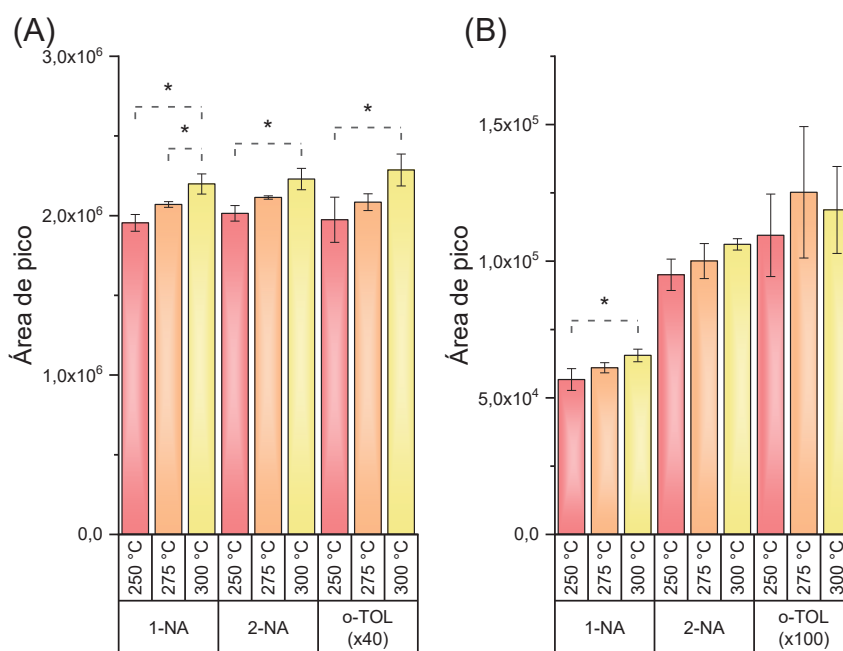
1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina; (D) - derivatizada.

FONTE: A autora (2020).

4.1.1.2 Temperatura do injetor

A temperatura do injetor é um importante parâmetro a ser otimizado para garantir a volatilização instantânea e efetiva de todos os analitos. Com este intuito, foram avaliadas três temperaturas, 250, 275 e 300 °C, garantindo que as temperaturas estivessem próximas ao ponto de ebulição dos analitos sem ultrapassar o limite de temperatura aplicado à coluna cromatográfica (320 °C). Os resultados são apresentados na FIGURA 14.

FIGURA 14 – EFEITO DA TEMPERATURA DO INJETOR (n=3) NA RESPOSTA DOS ANALITOS (A) NÃO DERIVATIZADOS (o-TOL – 10,0 mg L⁻¹, 1-NA E 2-NA – 2,5 mg L⁻¹) E (B) DERIVATIZADOS (o-TOL – 2,0 mg L⁻¹, 1-NA E 2-NA – 1,0 mg L⁻¹)



1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina, * - apresentam diferença significativa com 95% de confiança.

Observação: as áreas dos picos de o-TOL foram multiplicadas por 40 ou 100 para facilitar a representação gráfica e sua interpretação.

FONTE: A autora (2020).

Para os três analitos não derivatizados foi observada uma diferença significativa entre as respostas obtidas para as diferentes temperaturas ($F_{\text{o-TOL}} = 6,849$; $F_{\text{1-NA}} = 18,969$; $F_{\text{2-NA}} = 15,013$; $F_{\text{tab}} = 5,143$). Para o-TOL e 2-NA, a temperatura de 300 °C resultou numa resposta significativamente diferente em relação a 250 °C, porém não apresentou uma diferença significativa em relação a 275 °C, e para 1-NA, a temperatura de 300 °C forneceu uma resposta significativamente diferente quando comparada às demais temperaturas avaliadas.

Similarmente para os analitos derivatizados observou-se que para 1-NA obteve-se uma resposta significativamente diferente ao se utilizar a temperatura de 300 °C quando comparada a temperatura de 250 °C, enquanto não houve diferença significativa para a temperatura de 275 °C. Para os demais analitos não foi observada diferença significativa ($F_{\text{o-TOL}} = 0,531$; $F_{\text{1-NA}} = 7,132$; $F_{\text{2-NA}} = 3,578$; $F_{\text{tab}} = 5,143$).

Respostas superiores para temperaturas mais elevadas pode estar relacionada com a volatilização apenas parcial dos analitos nas temperaturas

inferiores, especialmente para a 1-NA e 2-NA, uma vez que os pontos de ebulição previstos para estes analitos são próximos de 300 °C.

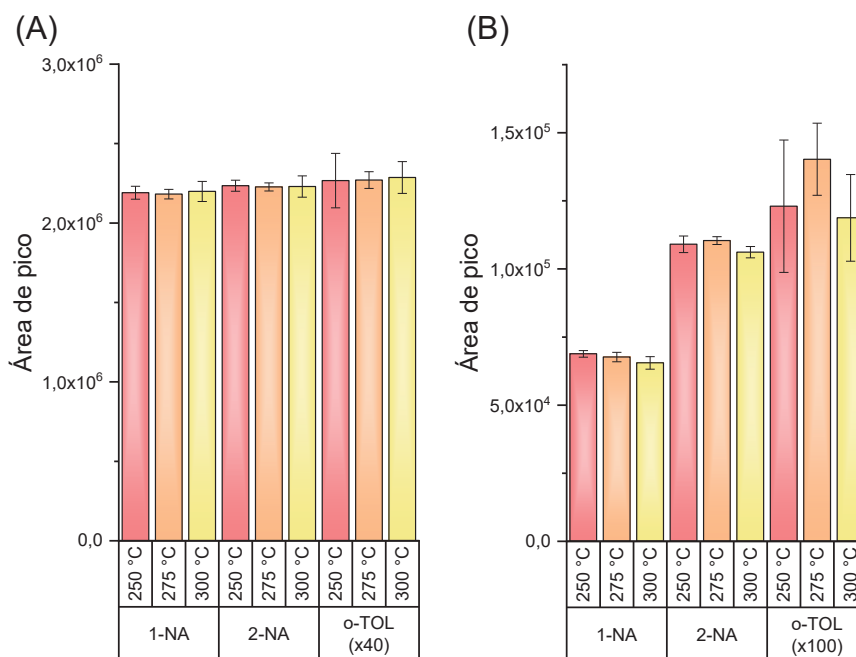
Um efeito similar foi observado por Ramírez et al. (2015), que relataram o impacto da temperatura do injetor na resposta destes analitos ao desenvolver um método baseado em GC para determinação de diferentes compostos característicos em fumaça de cigarro. Dentre estes compostos, os autores selecionaram a condição que favoreceu as N-nitrosaminas específicas para tabaco, classe de compostos que sofre degradação em temperaturas elevadas, de forma que a temperatura do injetor mais baixa resultou na volatilização parcial dos compostos 1-NA e 2-NA.

No presente estudo selecionou-se 300 °C como temperatura de injetor para a condução dos ensaios posteriores para ambos os métodos desenvolvidos.

4.1.1.3 Temperatura da linha de transferência

A linha de transferência pode ser definida como a conexão da coluna cromatográfica ao espectrômetro de massas, por onde os compostos devem ser encaminhados, na sua forma não ionizada, para a fonte de íons. A temperatura da linha de transferência deve ser compatível com a temperatura final da rampa de aquecimento, uma vez que ao encontrar uma temperatura consideravelmente mais baixa, os analitos e outros componentes da matriz que haviam sido volatilizados durante a corrida cromatográfica podem ser condensados na linha de transferência, afetando a detectabilidade do método desenvolvido e criando uma fonte de contaminação para análises posteriores. Dessa forma, foram avaliadas as temperaturas 250, 275 e 300 °C. Os resultados são apresentados na FIGURA 15.

FIGURA 15 – EFEITO DA TEMPERATURA DA LINHA DE TRANSFERÊNCIA (n=3) NA RESPOSTA DOS ANALITOS (A) NÃO DERIVATIZADOS (o-TOL – 10,0 mg L⁻¹, 1-NA E 2-NA – 2,5 mg L⁻¹) E (B) DERIVATIZADOS (o-TOL – 2,0 mg L⁻¹, 1-NA E 2-NA – 1,0 mg L⁻¹)



1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina.

Observação: as áreas dos picos de o-TOL foram multiplicadas por 40 ou 100 para facilitar a representação gráfica e sua interpretação.

FONTE: A autora (2020).

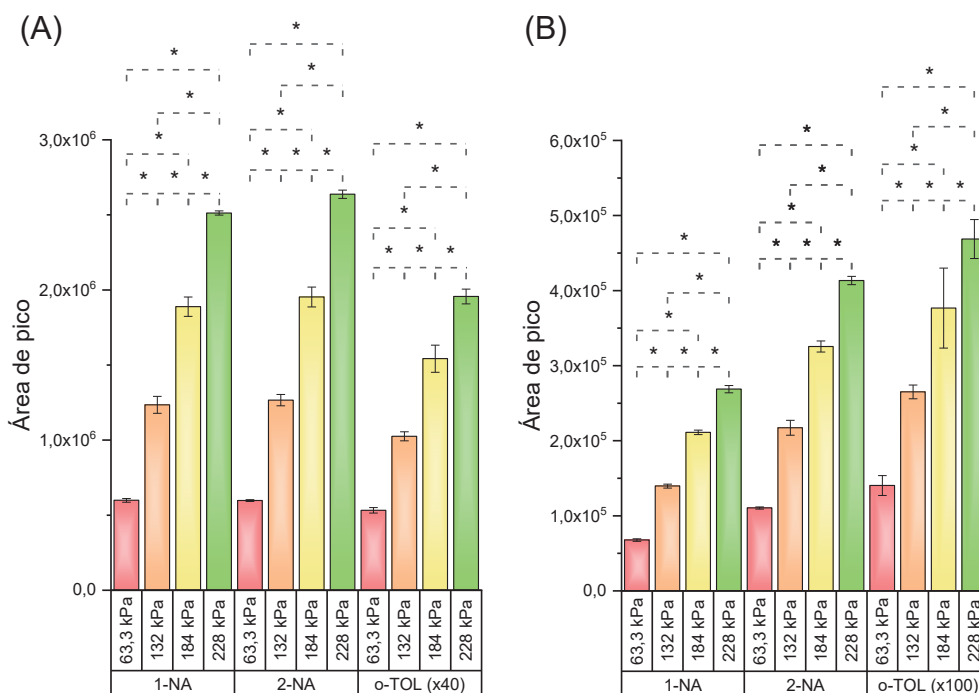
Não foi observada diferença significativa entre as temperaturas avaliadas de 250, 275 e 300 °C para nenhum dos analitos não derivatizados ($F_{o-TOL} = 0,023$; $F_{1-NA} = 0,096$; $F_{2-NA} = 0,019$; $F_{tab} = 5,143$) e derivatizados ($F_{o-TOL} = 1,146$; $F_{1-NA} = 2,608$; $F_{2-NA} = 2,713$; $F_{tab} = 5,143$), indicando que, dentre as três temperaturas avaliadas, a condensação dos analitos na linha de transferência não ocorreu de forma significativa. Dessa forma, selecionou-se a temperatura de 275 °C como a temperatura da linha de transferência para ambos os métodos para a condução de ensaios posteriores, uma vez que para esta temperatura foram observados os menores valores de desvio padrão relativo (“*Relative Standard Deviation*” – RSD), encontrando-se na faixa de 1,15 a 2,30% para os analitos não derivatizados e 1,30 a 9,44% para os analitos derivatizados.

4.1.1.4 Pressão do pulso de pressão

O pulso de pressão trata-se de um período o qual engloba a injeção e o início da corrida cromatográfica, em que a pressão no interior do injetor mantém-se

elevada em comparação ao restante da corrida cromatográfica. Este aumento de pressão resulta num aumento temporário da vazão do gás de arraste. O primeiro parâmetro avaliado relativo ao pulso de pressão foi a pressão empregada, sendo obtidos os resultados representados na FIGURA 16.

FIGURA 16 - EFEITO DA PRESSÃO DO PULSO DE PRESSÃO (n=3) NA RESPOSTA DOS ANALITOS (A) NÃO DERIVATIZADOS (o-TOL – 10,0 mg L⁻¹, 1-NA E 2-NA – 2,5 mg L⁻¹) E (B) DERIVATIZADOS (o-TOL – 2,0 mg L⁻¹, 1-NA E 2-NA – 1,0 mg L⁻¹)



1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina, * - apresentam diferença significativa com 95% de confiança.

Observação: as áreas dos picos de o-TOL foram multiplicadas por 40 ou 100 para facilitar a representação gráfica e sua interpretação.

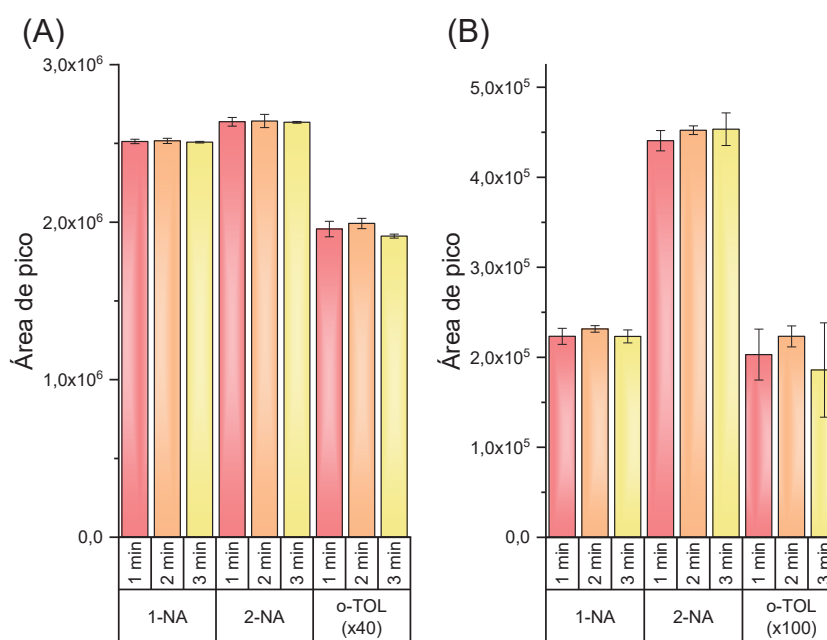
FONTE: A autora (2020).

Foi possível observar uma diferença significativa entre as respostas para as pressões avaliadas para analitos não derivatizados ($F_{o-TOL} = 387,917$; $F_{1-NA} = 1061,595$; $F_{2-NA} = 1404,829$; $F_{tab} = 4,066$) e derivatizados ($F_{o-TOL} = 64,246$; $F_{1-NA} = 2201,457$; $F_{2-NA} = 1116,883$; $F_{tab} = 4,066$). O uso de maiores pressões resulta em maiores vazões da gás de arraste durante o pulso de pressão, que por sua vez resulta numa maior quantidade de amostra efetivamente injetada na entrada da coluna cromatográfica e, conseqüentemente, numa maior resposta em termos de área de pico. Sendo assim, selecionou-se uma pressão de 228 kPa para realizar o pulso de pressão em análises posteriores para ambos os métodos.

4.1.1.5 Duração do pulso de pressão

O segundo parâmetro relativo ao pulso de pressão a ser otimizado foi a sua duração. Esta pode ser definida como o período em que a pressão se mantém elevada durante a injeção da amostra. As durações avaliadas foram de 1, 2 e 3 min. Os resultados são apresentados na FIGURA 17.

FIGURA 17 - EFEITO DA DURAÇÃO DO PULSO DE PRESSÃO (n=3) NA RESPOSTA DOS ANALITOS (A) NÃO DERIVATIZADOS (o-TOL – $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, 1-NA E 2-NA – $2,5 \text{ mg L}^{-1}$) E (B) DERIVATIZADOS (o-TOL – $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, 1-NA E 2-NA – $1,0 \text{ mg L}^{-1}$)



1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina.

Observação: as áreas dos picos de o-TOL foram multiplicadas por 40 ou 100 para facilitar a representação gráfica e sua interpretação.

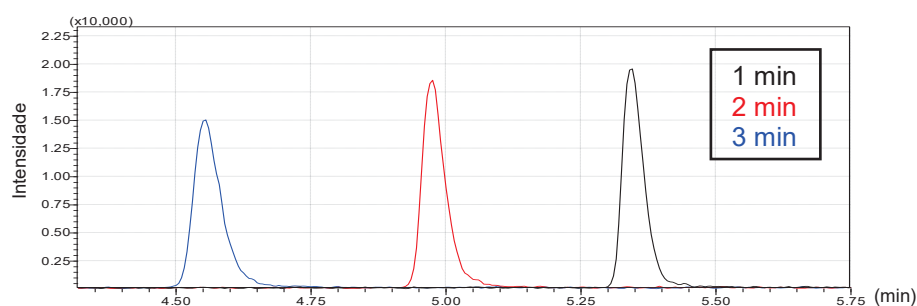
FONTE: A autora (2020).

Não se observou uma diferença significativa entre as respostas referentes a tais tempos de pulso para os analitos não derivatizados ($F_{\text{o-TOL}} = 3,980$; $F_{1\text{-NA}} = 0,291$; $F_{2\text{-NA}} = 0,063$; $F_{\text{tab}} = 5,143$) e derivatizados ($F_{\text{o-TOL}} = 0,856$; $F_{1\text{-NA}} = 1,431$; $F_{2\text{-NA}} = 0,953$; $F_{\text{tab}} = 5,143$). Durante tais testes, a válvula de *split* operou em modo *split*, com razão 1:10, ou seja, a válvula se apresenta aberta de forma que, para cada fração de amostra injetada, apenas 1/10 desta fração foi efetivamente conduzida à coluna cromatográfica, sendo 9/10 desta fração expulsa pela válvula de *split*. Assim, por não ter sido observado um aumento na resposta, há um indicativo de que o máximo do analito a ser injetado na coluna no modo *split* já é alcançado aplicando-se a pressão de 228 kPa por 1 min no início da corrida cromatográfica, e se há um

excesso de analito presente na câmara do injetor, este é expulso majoritariamente em 1 min de pulso pela válvula de *split*.

Apesar das áreas não diferirem significativamente entre si, observou-se que quanto maior a duração do pulso de pressão, maior o alargamento observado para o pico da o-TOL não derivatizada, o primeiro analito a ser eluído da coluna. Este efeito pode ser observado na FIGURA 18.

FIGURA 18 - EFEITO DA DURAÇÃO DO PULSO DE PRESSÃO NA ALTURA DO PICO DA o-TOLUIDINA NÃO DERIVATIZADA – CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO



FONTE: A autora (2020).

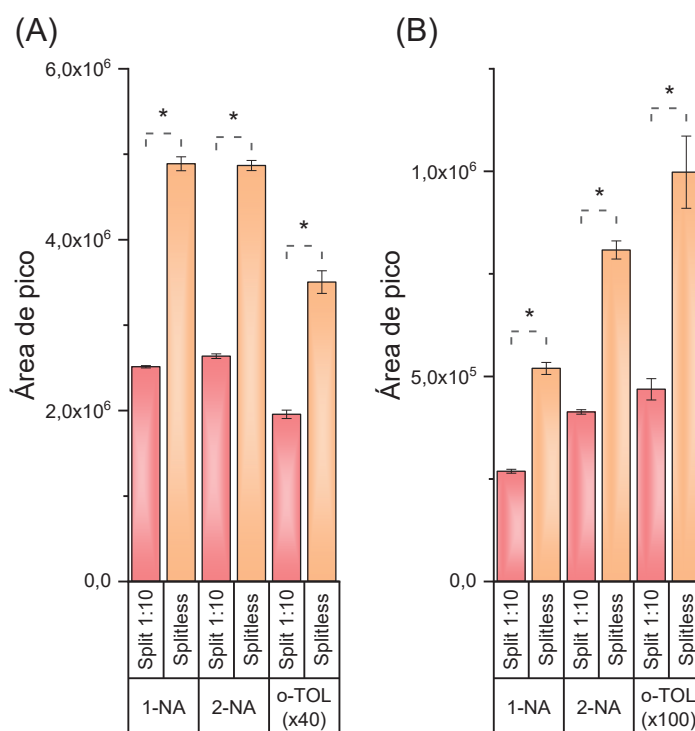
O alargamento e diminuição do tempo de retenção de picos referentes aos analitos que eluem no início da corrida cromatográfica são desvantagens que podem ser frequentemente observadas ao se empregar o pulso de pressão, que por sua vez são magnificadas ao se empregar pulso de pressão com maior duração. Este alargamento se deve ao fenômeno de *phase soaking*, onde grandes quantidades de solventes são injetadas na coluna cromatográfica, que por sua vez resulta no alargamento dos picos próximos a eluição do solvente, ou seja, os picos de menores tempos de retenção (GROB, 2001; ROOD, 2007). Tal alargamento resulta em picos de menor altura, que por sua vez acarreta numa menor detectabilidade do método, uma vez que um pico de baixa altura pode ser indistinguível do ruído da análise. Assim, selecionou-se como condição de compromisso 1 min para a duração do pulso de pressão para o método para os analitos não derivatizados.

Diferentemente do observado para os analitos não derivatizados, nos ensaios envolvendo a otimização da duração de pulso de pressão para os analitos derivatizados não foi observada uma redução significativa da altura do pico para a o-TOL. Dessa forma, selecionou-se para os ensaios posteriores o tempo de pulso de injeção de 2 min, que corresponde à condição na qual foram obtidos os menores valores de RSD na faixa de 1,06 a 5,24%.

4.1.1.6 Modo de injeção

O modo de injeção se caracteriza pela abertura da válvula de *split*, que por sua vez controla a razão do volume injetado na coluna e do volume descartado da amostra inserida na câmara do injetor. Para realizar análises no modo *splitless*, a válvula de *split* permanece fechada por um determinado período durante a injeção e início da corrida cromatográfica. Dessa forma, avaliou-se o efeito da abertura da válvula na resposta dos analitos, realizando-se injeções no modo *split*, com razão 1:10, e no modo *splitless*. Os resultados são representados na FIGURA 19.

FIGURA 19 - EFEITO DO MODO DE INJEÇÃO (n=3) NA RESPOSTA DOS ANALITOS (A) NÃO DERIVATIZADOS (o-TOL – 10,0 mg L⁻¹, 1-NA E 2-NA – 2,5 mg L⁻¹) E (B) DERIVATIZADOS (o-TOL – 2,0 mg L⁻¹, 1-NA E 2-NA – 1,0 mg L⁻¹)



1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina, * - apresentam diferença significativa com 95% de confiança.

Observação: as áreas dos picos de o-TOL foram multiplicadas por 40 ou 100 para facilitar a representação gráfica e sua interpretação.

FONTE: A autora (2020).

Observou-se que a injeção no modo *splitless* resultou em respostas significativamente superiores para todos os analitos não derivatizados ($F_{o-TOL} = 7,180$; $F_{1-NA} = 35,162$; $F_{2-NA} = 4,732$; $F_{tab} = 19$; $t_{o-TOL} = 19,006$; $t_{2-NA} = 59,378$; $t_{tab,variâncias equivalentes} = 2,132$; $t_{1-NA} = 50,052$; $t_{tab,variâncias diferentes} = 2,290$) e derivatizados ($F_{o-TOL} = 11,532$; $F_{1-NA} = 9,421$; $F_{2-NA} = 15,819$; $F_{tab} = 19$; $t_{o-TOL} = 9,990$; $t_{1-NA} = 28,139$;

$t_{2-NA} = 30,021$; $t_{\text{tab,variâncias equivalentes}} = 2,132$). Isso se deve à injeção de uma maior quantidade da amostra, uma vez que com a válvula de *split* fechada, o único caminho que a amostra pode seguir é direcionado à coluna cromatográfica. Isto se reflete numa resposta significativamente maior para a injeção no modo *splitless*.

Além da resposta dos analitos em termos de área de pico, a detectabilidade foi avaliada também através da razão sinal/ruído obtida para os analitos de acordo com o modo de injeção. Esta análise teve o intuito de elucidar se a injeção de um maior volume de amostra, e conseqüentemente, de interferentes, não impactaria de forma negativa a detectabilidade dos analitos. Tais resultados são apresentados na TABELA 13. Aplicando-se testes F e t observou-se que para os analitos não derivatizados não há uma diferença significativa entre as razões sinal/ruído obtidas ($F_{o-TOL} = 41,683$; $F_{1-NA} = 2,035$; $F_{2-NA} = 9,366$; $F_{\text{tab}} = 19$; $t_{o-TOL} = 0,975$; $t_{\text{tab, variâncias diferentes}} = 2,920$; $t_{1-NA} = 0,439$; $t_{2-NA} = - 0,180$; $t_{\text{tab, variâncias equivalentes}} = 2,132$), enquanto para os analitos derivatizados apenas para a 1-NA foi possível obter uma razão sinal/ruído significativamente maior empregando injeção no modo *splitless* ($F_{o-TOL} = 7,996$; $F_{1-NA} = 4,011$; $F_{2-NA} = 1,879$; $F_{\text{tab}} = 19$; $t_{o-TOL} = 1,035$; $t_{1-NA} = 2,994$; $t_{2-NA} = 1,923$; $t_{\text{tab}} = 2,132$).

TABELA 13 – EFEITO DO MODO DE INJEÇÃO (n=3) NA RAZÃO SINAL/RUÍDO

Analito	Modo de injeção	Razão sinal/ruído	
		Média	RSD (%)
o-TOL	<i>Split</i>	255,96	36,05
	<i>Splitless</i>	595,41	100,05
1-NA	<i>Split</i>	743,22	30,53
	<i>Splitless</i>	843,37	38,38
2-NA	<i>Split</i>	370,86	3,98
	<i>Splitless</i>	365,94	12,33
o-TOL (D)	<i>Split</i>	29,26	104,49
	<i>Splitless</i>	84,04	102,86
1-NA (D)	<i>Split</i>	733,26	59,73
	<i>Splitless</i>	2427,97	36,13
2-NA (D)	<i>Split</i>	311,08	22,92
	<i>Splitless</i>	445,38	21,94

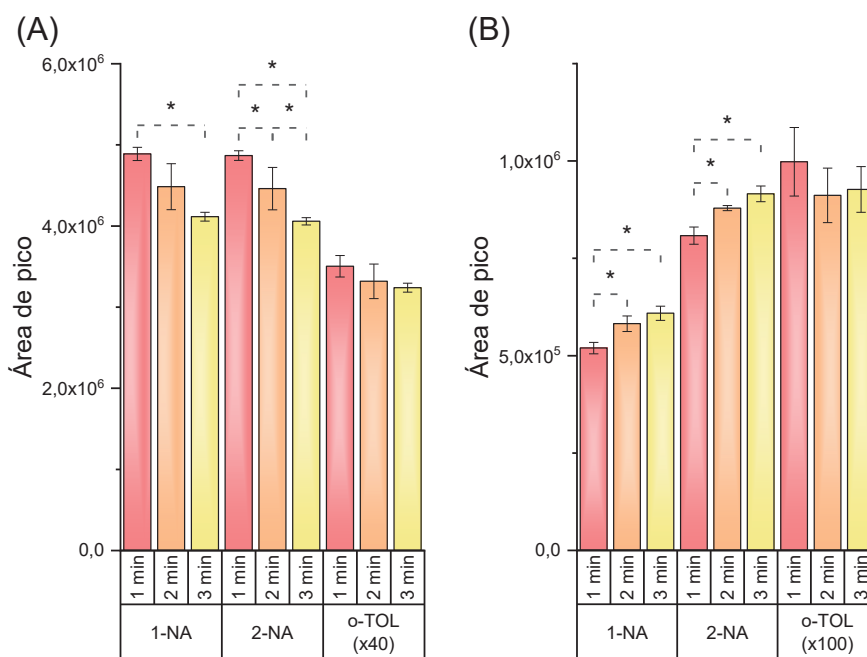
o-TOL – o-toluidina; 1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; (D) – derivatizada; RSD – desvio padrão relativo.

Deste modo, uma vez que a resposta em relação à área de pico foi elevada e a razão sinal/ruído não foi impactada negativamente, injeções no modo *splitless* foram selecionadas para ambos os métodos para condução dos ensaios posteriores.

4.1.1.7 Tempo de amostragem

Uma vez definida a injeção no modo *splitless*, houve a necessidade de se otimizar o tempo de amostragem, que corresponde ao período em que a válvula de *split* permanece fechada durante a injeção da amostra. Para isso, foram avaliados os tempos de 1, 2 e 3 min. Os resultados são apresentados na FIGURA 20.

FIGURA 20 - EFEITO DO DO TEMPO DE AMOSTRAGEM DO MODO DE INJEÇÃO *SPLITLESS* (n=3) NA RESPOSTA DOS ANALITOS (A) NÃO DERIVATIZADOS (o-TOL – 10,0 mg L⁻¹, 1-NA E 2-NA – 2,5 mg L⁻¹) E (B) DERIVATIZADOS (o-TOL – 2,0 mg L⁻¹, 1-NA E 2-NA – 1,0 mg L⁻¹)



1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; (D) – derivatizada; o-TOL – o-toluidina, * - apresentam diferença significativa com 95% de confiança.

Observação: as áreas dos picos de o-TOL foram multiplicadas por 40 ou 100 para facilitar a representação gráfica e sua interpretação.

FONTE: A autora (2020).

A partir destes resultados obtidos para os analitos não derivatizados, não foi observada uma diferença significativa para o-TOL ($F_{o-TOL} = 2,511$; $F_{1-NA} = 14,970$; $F_{2-NA} = 20,051$; $F_{tab} = 5,143$), mas para 1-NA e 2-NA observou-se que a resposta para o tempo de amostragem de 1 min mostrou-se significativamente diferente comparada às respostas para as demais condições avaliadas, sendo estas 3 min para 1-NA, e 2

e 3 min para 2-NA. Tal diferença pode ser explicada pelo fato de que longos tempos de amostragem em métodos *splitless* com pulso de pressão pode resultar em perda de amostra devido a purga do septo. Dessa forma, os tempos de amostragem devem garantir que toda a amostra seja transferida para a coluna, e não devem se estender por um período consideravelmente maior que o necessário (JENNINGS et al., 1997). Assim, selecionou-se como condição de compromisso tempo de amostragem de 1 min. Cabe destacar que o tempo de amostragem selecionado coincide com o tempo de pulso de pressão selecionado previamente.

Considerando os analitos derivatizados para o-TOL não foi observada uma diferença significativa entre os tempos de amostragem avaliados ($F_{o-TOL} = 1,184$; $F_{1-NA} = 20,135$; $F_{2-NA} = 28,630$; $F_{tab} = 5,143$), mas para a 1-NA e a 2-NA foi observada diferença significativa entre as respostas observadas para os tempos de amostragem avaliados. As respostas obtidas para 2 e 3 min de amostragem não diferem entre si, porém, ambas são significativamente diferentes em relação à resposta obtida para 1 min de amostragem, indicando que para o método envolvendo os analitos derivatizados é necessário um tempo de amostragem superior para que toda a amostra seja inserida na coluna cromatográfica. Para tal método foi previamente selecionado o tempo de pulso de pressão de 2 min, o que pode ser responsável pela menor resposta obtida ao se empregar um tempo de amostragem inferior ao mesmo. Deste modo, a válvula de *split* estaria sendo aberta anteriormente ao término do pulso de pressão, fator que pode ser responsável pela menor resposta observada para 1-NA e 2-NA na condição de tempo de amostragem de 1 min.

Apesar de não haver uma diferença significativa entre as respostas obtidas para 2 e 3 min de tempo de amostragem, utilizando-se o tempo maior foi observada a cauda do pico do solvente (hexano). Isso se deve ao fato de que tempos de amostragem muito elevados podem levar ao aprisionamento de altas quantidades de solvente no injetor, e conseqüentemente, uma grande quantidade do solvente será injetada na coluna. Idealmente, a válvula de *split* deve ser aberta em um tempo baixo o suficiente para que o solvente seja expulso do injetor a tempo de não ser observado em grandes quantidades na corrida cromatográfica (GROB, 2001). Desta forma, selecionou-se então a condição de tempo de amostragem de 2 min.

Desta maneira, os parâmetros selecionados para ambos os métodos otimizados para determinação dos analitos estão listados na TABELA 14,

destacando-se na própria tabela os parâmetros em que as condições de compromisso selecionadas foram distintas entre os métodos. Além desses, estão listados os íons de quantificação e confirmação para os analitos não derivatizados, analitos derivatizados e PI empregados nos ensaios em que a aquisição dos espectros de massas foi realizada no modo SIM. Destaca-se que estes PI não apresentam sítios derivatizáveis, de forma que os íons monitorados são os mesmos tanto nos ensaios em que os extratos foram derivatizados quanto nos que tal etapa não foi executada.

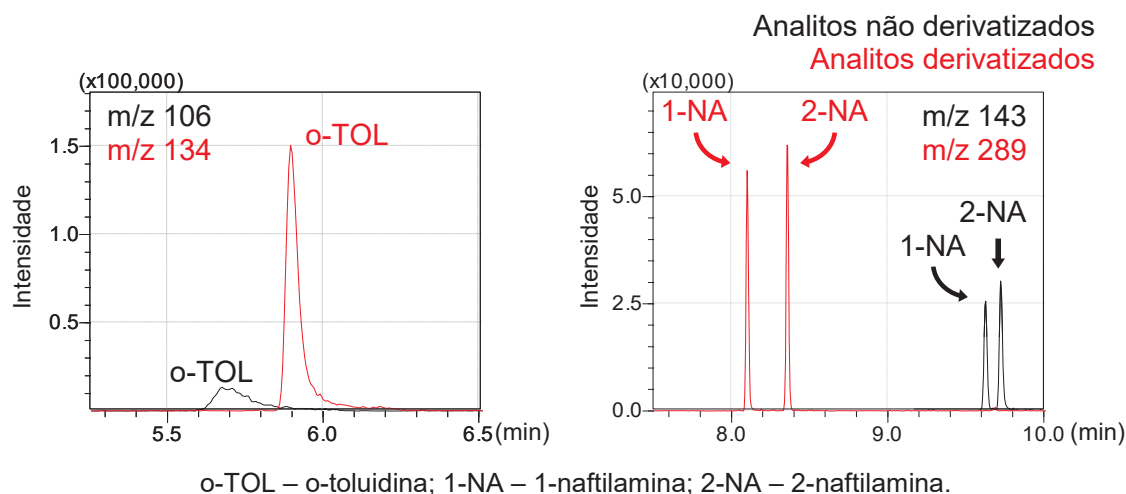
TABELA 14 – PARÂMETROS OTIMIZADOS DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DESENVOLVIDOS

Parâmetro	Parâmetro Otimizado		
Rampa de aquecimento – não derivatizado	Rampa F	a. 75 °C por 3 min b. 75 a 205 °C em 6,5 min (taxa: 20 °C min ⁻¹) c. 205 a 250 °C em 1,5 min (taxa: 30 °C min ⁻¹) d. 250 °C por 4 min Tempo de análise: 15 min	
Rampa de aquecimento - derivatizado	Rampa C'	a. 75 °C por 3 min b. 75 a 275 °C em 6,67 min (taxa: 30 °C min ⁻¹) c. 275 °C por 4,33 min Tempo de análise: 14 min	
Temperatura do injetor	300 °C		
Temperatura da linha de transferência	275 °C		
Pressão de pulso de pressão	228 kPa		
Duração do pulso de pressão	1 min (sem derivatização) e 2 min (com derivatização)		
Modo de injeção	<i>Splitless</i>		
Tempo de amostragem	1 min (sem derivatização) e 2 min (com derivatização)		
Íons de quantificação (*) e confirmação (m/z) – sem derivatização	o-TOL	1-NA	2-NA
	106*	143*	143*
	107	115	115
	77	116	116
Íons de quantificação (*) e confirmação (m/z) - com derivatização	o-TOL (D)	1-NA (D)	2-NA (D)
	134*	289*	289*
	253	115	115
	106	142	142
Íons de quantificação (*) e confirmação (m/z) – sem e com derivatização	ALC	CPF	
	160*	197*	
	188	314	
	146	258	

o-TOL – o-toluidina; 1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina, (D) – derivatizada, ALC – alacloro, CPF – clopirifós.

A partir dos métodos desenvolvidos, cujos perfis cromatográficos resultantes são apresentados na FIGURA 21, foi possível calcular os parâmetros de números de pratos teóricos e resolução cromatográfica, apresentados na TABELA 15.

FIGURA 21 - CROMATOGRAMA DE ÍON EXTRAÍDO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS OTIMIZADOS PARA ANALITOS NÃO DERIVATIZADOS E DERIVATIZADOS – 10,0 mg L⁻¹ (o-TOL) e 1,0 mg L⁻¹ (1-NA e 2-NA)



FONTE: A autora (2022).

TABELA 15 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DOS MÉTODOS OTIMIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS NÃO DERIVATIZADOS E DERIVATIZADOS

Composto	Área de pico	Tempo de Retenção (t _R) (min)	Largura de pico (W) (min)	Número de pratos (N)	Resolução entre dois picos (Rs)	
Analitos não derivatizados						
o-TOL	119290	5,675	0,530	1834		
1-NA	38123	9,628	0,060	411993	o-TOL/1-NA	13,400
2-NA	34485	9,726	0,085	209484	1-NA/2-NA	1,352
Analitos derivatizados						
o-TOL (D)	325440	5,896	0,220	11492		
1-NA (D)	60933	8,101	0,045	518528	o-TOL/1-NA	16,642
2-NA (D)	65375	8,357	0,050	446972	1-NA/2-NA	5,389

o-TOL – o-toluidina; 1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina, (D) – derivatizada

Para ambos os métodos cromatográficos avaliados foram obtidas resoluções satisfatórias ($\geq 1,25$) entre os isômeros de posição 1-NA e 2-NA, permitindo o uso desses na determinação dos analitos deste projeto.

A etapa de derivatização com PFPA resulta na conversão dos grupos $-NH_2$ para $-NHCOC_2F_5$, resultando numa diminuição da polaridade dos compostos, o que, por sua vez, impacta tanto seu perfil de retenção quanto a sua interação com os grupos silanóis. Comparando os métodos cromatográficos com base nos dados apresentados na TABELA 15, observa-se que a alteração no perfil de retenção entre os isômeros permitiu a obtenção de resoluções mais altas, de forma que foi possível

aplicar uma taxa de aquecimento mais elevada e, conseqüentemente, obter menores tempos de retenção para os analitos derivatizados.

Tal conversão também resultou na redução da interação com grupos silanóis da coluna cromatográfica e num aumento no número de interações dos analitos com a fase estacionária apolar, aumentando o número de pratos teóricos (N) e a eficiência da análise, resultando na obtenção de picos mais estreitos (menor W). Este efeito é mais proeminente para a o-TOL, sendo possível observar uma nítida redução no tamanho das caudas dos picos (FIGURA 21).

Cabe destacar que a intensidade dos picos dos analitos derivatizados foi superior àquelas dos analitos não derivatizados (FIGURA 21 e TABELA 15), representando um aumento de 172,8, 59,8 e 89,6% nas áreas de pico da o-TOL, 1-NA e 2-NA, respectivamente. Desse modo, a etapa de derivatização se torna essencial na aplicação do método proposto em urinas de fumantes, visando uma maior detectabilidade do método, sendo esta aplicada posteriormente a avaliação preliminar dos parâmetros de mérito do método e nas amostras de urina de voluntários fumantes ativos e passivos. No entanto, apenas para fins de otimização do procedimento da MMSPE o método sem a etapa de derivatização foi empregado.

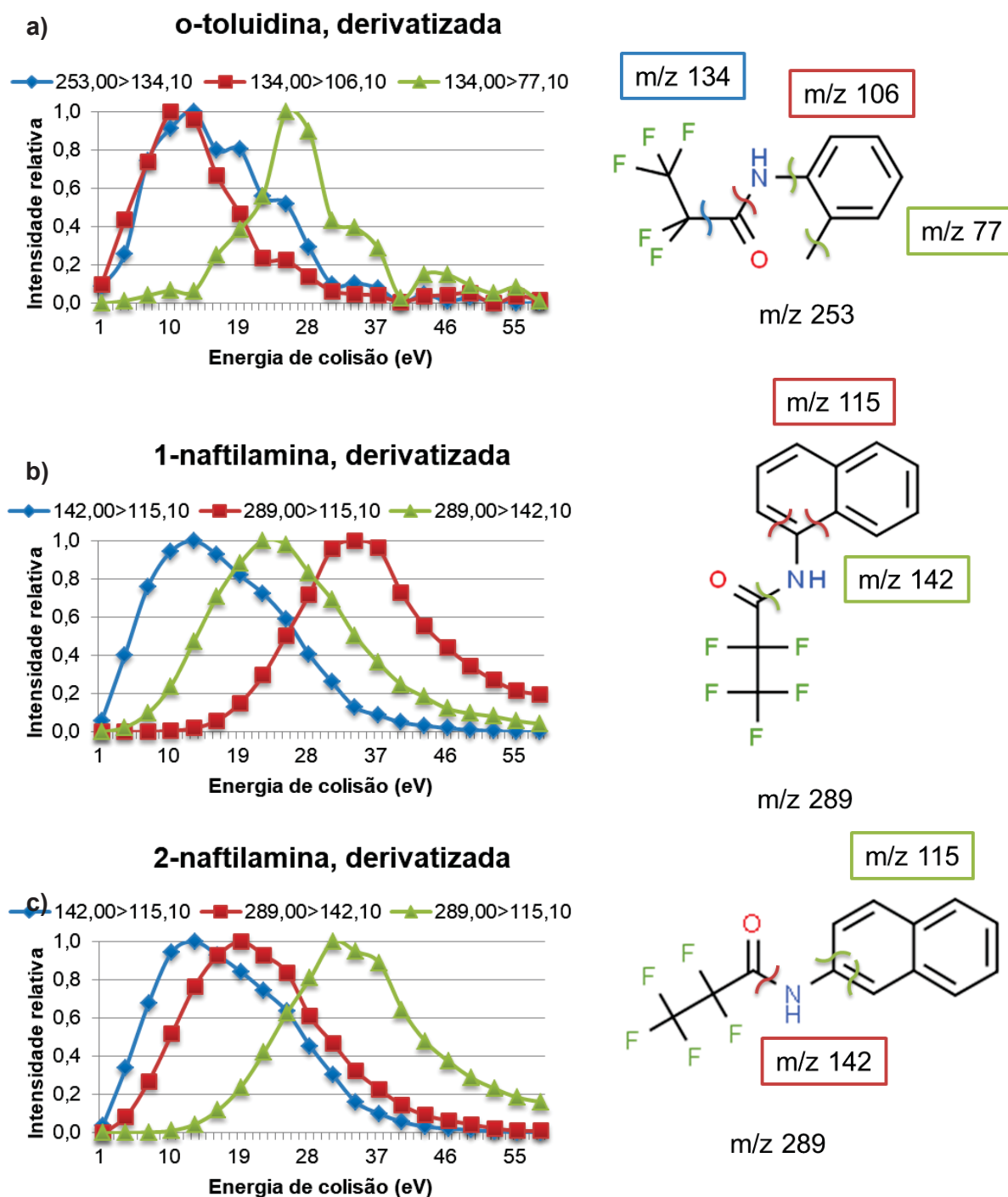
4.1.2 Estudo do modo de aquisição Monitoramento de Reações Múltiplas

O MRM consiste numa técnica de aquisição do sistema MS/MS. Em equipamentos do tipo triplo quadrupolo, o primeiro quadrupolo (Q1) faz a seleção dos íons precursores, atuando como um filtro de massa. No segundo quadrupolo (q2), os íons selecionados previamente são fragmentados pela colisão com um gás inerte. Dentre os novos íons formados a partir da colisão são denominados íons produto e, por sua vez, são identificados pelo terceiro quadrupolo (Q3). Dessa forma, é possível monitorar a transição íon precursor > íon produto, fornecendo uma maior seletividade e especificidade para o método desenvolvido, característica importante ao se estudar matrizes complexas, como é o caso da urina.

Dessa forma, o primeiro passo para desenvolver um método MRM foi a seleção das energias de colisão e as transições características para cada analito e para o PI utilizado na etapa de avaliação preliminar dos parâmetros de mérito do método bioanalítico desenvolvido, o ALC. Neste estudo, foram avaliadas energias de colisão na faixa de 1 a 58 eV, monitorando-se três íons precursores para cada

composto. Parte dos resultados obtidos referente aos analitos é apresentada na FIGURA 22, onde são apresentadas as três transições mais intensas observadas para cada analito.

FIGURA 22 – GRÁFICOS OBTIDOS NA OTIMIZAÇÃO DAS ENERGIAS DE COLISÃO E SUAS RESPECTIVAS TRANSIÇÕES PARA (A) o-TOLUIDINA, (B) 1-NAFTILAMINA E (C) 2-NAFTILAMINA DERIVATIZADAS



FONTE: A autora (2020).

Para a o-TOL a transição mais intensa, ideal como a transição monitorada para quantificação, apresentou resposta máxima utilizando-se energia de colisão de 13 eV. Esta se refere à transição m/z 253>134, que por sua vez corresponde à perda do fragmento $-C_2F_5$ do íon molecular. As demais transições selecionadas apresentam menor intensidade, e por este motivo, foram utilizadas como transições de confirmação. A transição m/z 134>106, cuja resposta máxima foi observada com a aplicação de energia de colisão de 10 eV, refere-se à perda do restante do grupo adicionado, uma carbonila, a o-TOL através da derivatização. Já a transição m/z 134>77 refere-se à formação de um íon comum a diversos compostos aromáticos pertencente ao “*aromatic rubble*”, que engloba uma série de íons derivados do próprio anel aromático sem substituições (38–40, 50–52, 63–67, 77–79 m/z) (HÜBSCHMANN, 2015). A resposta máxima para tal transição foi observada ao se utilizar energia de colisão de 25 eV.

Para os isômeros 1-NA e 2-NA foram observadas as mesmas transições, porém em intensidades distintas. A transição mais intensa para ambos os analitos apresentou resposta máxima com 13 eV, referindo-se à transição m/z 142>115, que correspondem, respectivamente, à perda do grupo inserido pela etapa de derivatização ($-C_2F_5CO$) e à perda adicional do grupo $-CNH$. A transição entre íon molecular (289 m/z) e o íon 115 m/z representou a segunda e terceira transição mais intensa para a 1-NA e 2-NA, respectivamente, e sua resposta máxima foi observada ao se empregar energia de colisão de 34 e 31 eV, respectivamente. Já a transição de confirmação restante ocorreu entre os íons 289 e 142 m/z , sendo que a resposta máxima para tal transição foi obtida utilizando energias de colisão de 22 e 19 eV para 1-NA e 2-NA, respectivamente.

Além das transições relatadas anteriormente para 1-NA e 2-NA, foram avaliadas as dez transições mais intensas para ambos os analitos, na tentativa de identificar-se uma transição que poderia ser empregada para diferenciar os isômeros. No entanto, todas as transições observadas são coincidentes, devido a grande semelhança estrutural entre os analitos. Dessa forma, a distinção entre os analitos foi conduzida a partir dos tempos de retenção e intensidade relativa entre as transições no modo MRM.

Em relação aos resultados obtidos para ALC (FIGURA 23), PI utilizado na etapa de avaliação preliminar dos parâmetros de mérito do método bioanalítico desenvolvido, a transição de quantificação empregada foi m/z 188>160, cuja

resposta máxima foi obtida aplicando energia de colisão de 10 eV. Tal transição reflete a formação do íon 188 m/z após a quebra da ligação C-O, resultando na eliminação de uma molécula de etanol e consequente formação de um anel pirrolidínico, e da quebra da ligação entre o carbono da carbonila e o seu carbono vizinho. Posteriormente, com a colisão com o argônio, forma-se o íon 160 m/z, que resulta da quebra da ligação do carbono da carbonila e o nitrogênio do anel (BOUCHONNET et al., 2011). Tais espécies são apresentadas na FIGURA 24. As transições de confirmação, m/z 160>130 e m/z 188>131, apresentaram resposta máxima ao se empregar energia de colisão de 25 e 22 eV, respectivamente.

FIGURA 23 – GRÁFICOS OBTIDOS NA OTIMIZAÇÃO DAS ENERGIAS DE COLISÃO E SUAS RESPECTIVAS TRANSIÇÕES PARA O ALACLORO

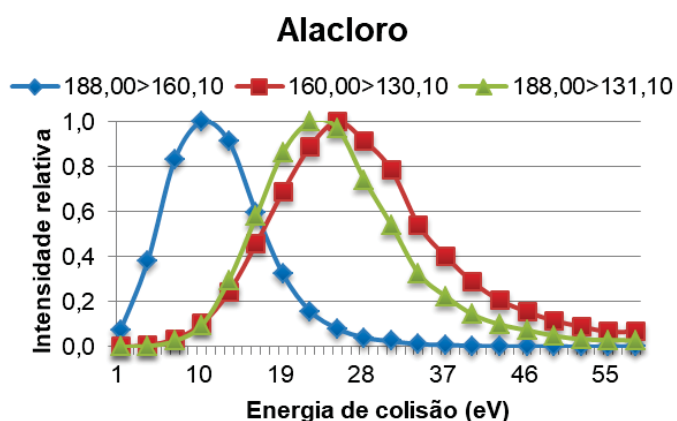
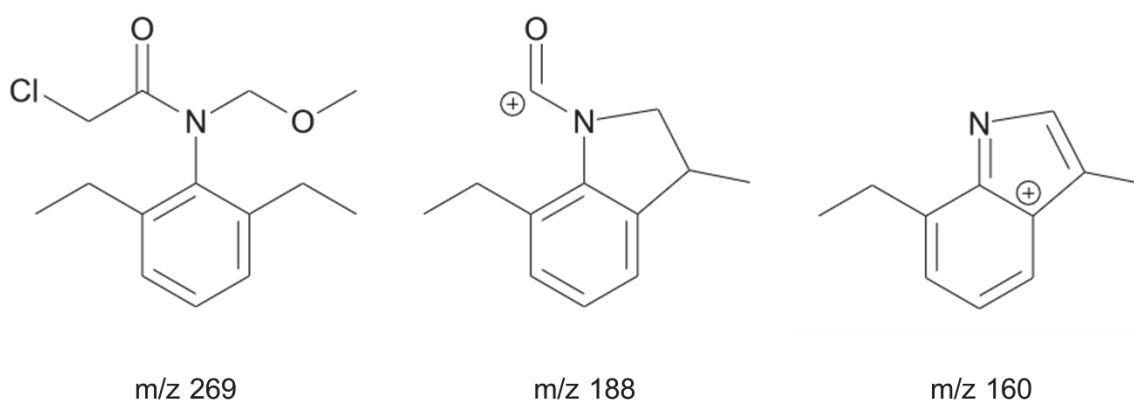


FIGURA 24 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS ESPÉCIES ENVOLVIDAS NA TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DO ALACLORO



FONTE: A autora (2022).

Os parâmetros selecionados para o método MRM otimizado são apresentados resumidamente na TABELA 16.

TABELA 16 – TRANSIÇÕES CARACTERÍSTICAS DOS ANALITOS DERIVATIZADOS A SEREM MONITORADAS NO MÉTODO MRM

Composto	Transições monitoradas (m/z)	Energia de colisão (eV)
o-toluidina	253>134	13
	134>106	10
	134>77	25
1-naftilamina	142>115	13
	289>115	34
	289>142	22
2-naftilamina	142>115	13
	289>142	19
	289>115	31
Alacloro (PI)	188>160	10
	160>130	25
	188>131	22

Observação: transições monitoradas listadas para cada analito em ordem decrescente de intensidade; **negrito** – transições de quantificação. PI – padrão interno.

4.2 DERIVATIZAÇÃO COM ANIDRIDO PENTAFLUOROPROPIÔNICO (PFPA)

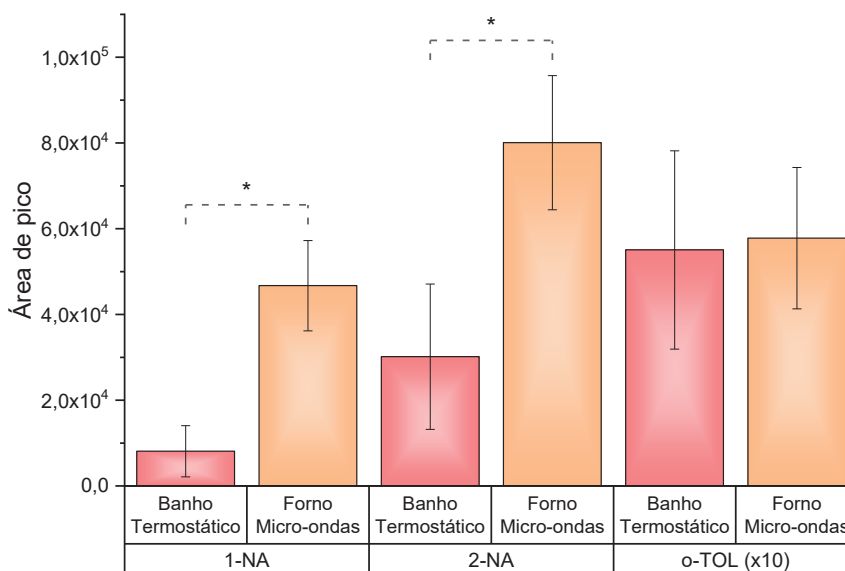
A reação de derivatização foi avaliada quanto a diferentes parâmetros, como fonte de aquecimento, volume de derivatizante, tempo de reação, volume de sequestrante de ácido, potência de saída de forno micro-ondas e etapa de *clean-up*, através de tanto estratégias de otimização univariada e multivariada. Para os ensaios que envolveram otimização univariada, foram realizados inicialmente testes F, para verificar diferenças quanto às variâncias, seguidos de testes t unicaudal para verificar diferenças quanto às médias, sendo estes testes t presumindo variâncias equivalentes quando F_{calc} é inferior ao F_{tab} e presumindo variâncias diferentes quando F_{calc} é superior ao F_{tab} . Todos os testes estatísticos empregados utilizaram $\alpha = 0,05$.

4.2.1 Avaliação de métodos de derivatização com PFPA

O PFPA é um dos reagentes mais utilizados para a derivatização de aminas aromáticas, juntamente com o anidrido heptafluorobutírico (“*Heptafluorobutyric anhydride*” – HFBA). A derivatização com tais reagentes leva a formação de derivados perfluoroacilados, que usualmente apresentam uma maior estabilidade térmica e uma menor tendência à adsorção no sistema analítico que as aminas livres (HIROYUKI, 1996). Para investigar inicialmente a reação de derivatização com PFPA, foram avaliados métodos empregando banho termostático e forno micro-

ondas doméstico como fontes de aquecimento. Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 25.

FIGURA 25 - RESPOSTAS OBTIDAS PARA A AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DERIVATIZAÇÃO COM PFPA (n = 3)



1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina, * - apresentam diferença significativa com 95% de confiança.

Observação: as áreas dos picos de o-TOL foram multiplicadas por 10 para facilitar a representação gráfica e sua interpretação.

FONTE: A autora (2020).

Observou-se uma resposta superior para os métodos de derivatização em que a fonte de aquecimento utilizada foi baseada em micro-ondas para os analitos 1-NA e 2-NA ($F_{o-TOL} = 1,969$; $F_{1-NA} = 3,012$; $F_{2-NA} = 1,201$; $F_{tab} = 19$; $t_{o-TOL} = -0,167$; $t_{1-NA} = 5,520$; $t_{2-NA} = 3,735$, $t_{tab,variâncias\ equivalentes} = 2,132$). Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que a utilização do forno micro-ondas, quando comparado ao banho termostático, corresponde a uma transferência de energia mais rápida e efetiva. As micro-ondas interagem diretamente com as moléculas do meio reacional, permitindo o aquecimento interno do mesmo, diferentemente do aquecimento conferido pelo banho termostático, que depende da transferência do calor através de convecção (SÖDERHOLM et al., 2010).

Tal efeito foi discutido previamente em reações de derivatização assistidas por micro-ondas empregando reagentes perfluoroacilantes. Damm et al. (2009) desenvolveram um método de derivatização empregando PFPA e aquecimento em forno micro-ondas doméstico com temperatura controlada para determinação de 6-monoacetilmorfina, um metabólito de morfina e heroína, por GC-MS. O método

desenvolvido foi conduzido a 100 °C por 5 min, representando uma redução significativa de tempo quando comparado a derivatização convencional, para a qual é necessário aquecer o meio reacional a 60 °C por 30 min.

Desse modo, no presente estudo selecionou-se o método empregando forno micro-ondas como base para demais otimizações.

4.2.2 Otimização da reação de derivatização

4.2.2.1 Planejamento fatorial 2^4 para reação com adição de sequestrante de ácido

Visando a otimização dos parâmetros experimentais da reação de derivatização com PFPA e piridina como sequestrante de ácido, foi proposto um planejamento fatorial 2^4 e quintuplicata do ponto central envolvendo as variáveis potência de saída do forno micro-ondas doméstico, tempo de derivatização, volume de derivatizante e volume de sequestrante de ácido, como exposto na TABELA 4 (item 3.3.2.1).

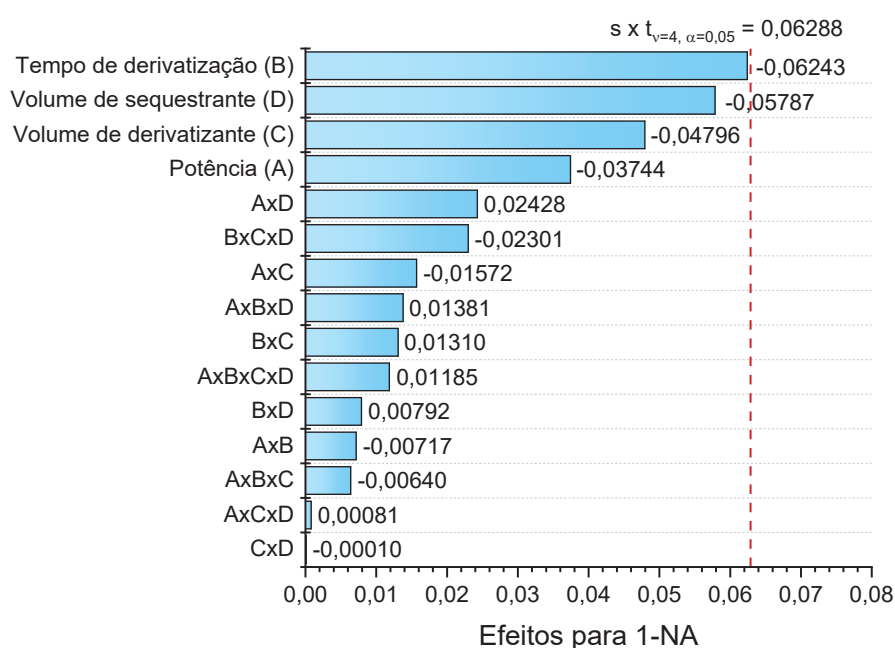
A partir dos resultados obtidos para o planejamento fatorial realizado para otimizar a reação de derivatização, com base nos ensaios de ponto central do planejamento, observou-se que o menor valor de RSD para o-TOL (52,14%) foi obtido quando não se fez uso de um PI, indicando que o ALC não foi capaz de reduzir os valores de RSD observados nestes ensaios, enquanto para 1-NA (4,17%) e a 2-NA (2,88%) os menores valores de RSD foram observados ao se utilizar CPF como PI.

Devido ao RSD elevado para a o-TOL, de 53,69%, não foi possível afirmar que os efeitos indicados como significativos são de fatos significativos, ou se efeitos significativos adicionais não estão sendo omitidos devido a grande variação observada no ponto central. Dentre as possíveis causas de um RSD tão elevado, pode ser citada a degradação do padrão empregado, além da possibilidade das condições empregadas no ponto central não fornecerem a repetibilidade adequada para a derivatização de o-TOL. Para contornar tais possíveis fontes de erros, um novo padrão analítico foi adquirido para ensaios posteriores.

Em relação aos demais analitos, os dados obtidos utilizando CPF como PI foram utilizados para avaliarem-se os efeitos significativos elucidados pelo planejamento fatorial. Avaliando-se os valores dos efeitos frente ao valor de t

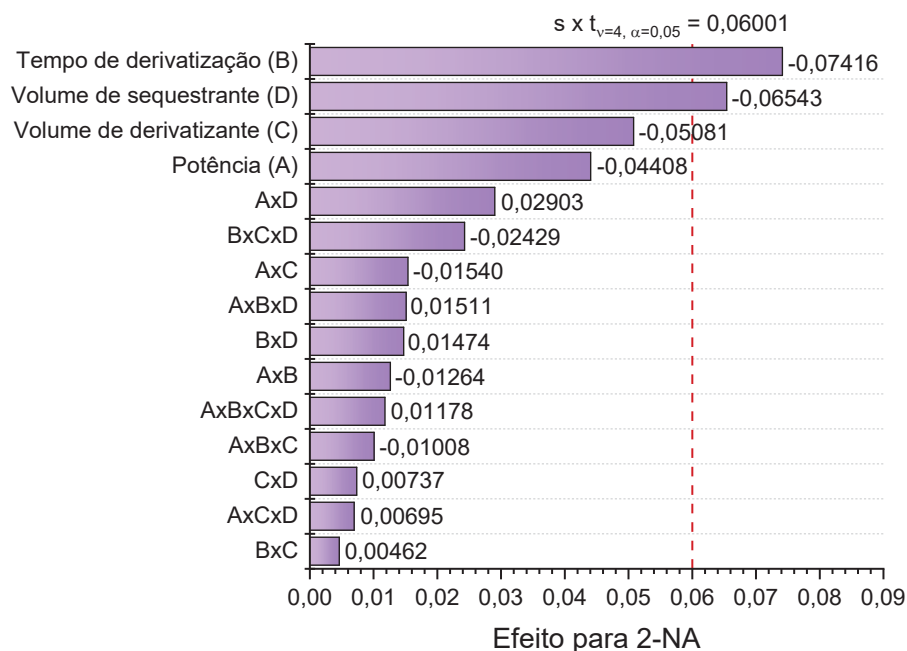
considerando-se 95% de confiança e o desvio padrão para o ponto central, para a 1-NA não foram observados efeitos significativos e para 2-NA foram observados apenas dois efeitos principais significativos, para tempo de derivatização (nível mínimo – 3 min) e volume de sequestrante de ácido (nível mínimo – 5,0 μ L). Tais resultados podem ser observados nas FIGURAS 26 e 27, onde são apresentados os gráficos de Pareto para os dois analitos.

FIGURA 26 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^4 DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO EMPREGANDO PIRIDINA COMO SEQUESTRANTE DE ÁCIDO – 1-NAFTILAMINA



FONTE: A autora (2020).

FIGURA 27 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2⁴ DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO EMPREGANDO PIRIDINA COMO SEQUESTRANTE DE ÁCIDO – 2-NAFTILAMINA



FONTE: A autora (2020).

Quanto à duração da derivatização, possivelmente, tempos superiores resultam num aquecimento excessivo do meio reacional, que por sua vez, poderia acarretar em perdas por volatilização dos analitos derivatizados e do próprio reagente derivatizante, o qual apresenta ponto de ebulição relativamente baixo, de 69 °C (DAMM et al., 2009). Adicionalmente, o meio reacional consiste majoritariamente em hexano, que também apresenta ponto de ebulição relativamente baixo, de 68,73 °C (CRC Handbook of Chemistry and Physics, 2009). Tal conjunto de fatores pode ser responsável pelas menores respostas observadas ao se realizar a reação de derivatização em tempos superiores. Adicionalmente, do ponto de vista prático, o método analítico se beneficia de menores tempos de preparo de amostra, pois desse modo uma maior frequência analítica foi proporcionada.

Já referente ao volume de sequestrante de ácido, no estudo de Stan e Klaffenbach (1991) foi desenvolvido um método de derivatização de pesticidas empregando HFBA como derivatizante e piridina como sequestrante de ácido, e durante a otimização da derivatização, verificou-se que a concentração de piridina não é crítica, desde que o derivatizante perfluoroacilante se encontre em excesso no meio reacional em termos de volume. Em estudos prévios focando na derivatização de aminas aromáticas com PFPA, é possível observar que o volume de piridina

empregado usualmente é inferior ao volume de PFPA, apresentando concordância com o descrito por Stan e Klaffenbach (1991) e com o presente estudo (RIEDEL et al., 2006; WEISS, 2002).

Para os parâmetros para os quais não foram observados efeitos significativos, selecionaram-se também os níveis mínimos (potência – 480 W, volume de derivatizante – 10,0 µL). Em relação à potência do forno micro-ondas, ao se utilizar potências inferiores, o meio reacional atinge uma temperatura menor, que por sua vez permite que a solução esfrie e atinja a temperatura ambiente rapidamente, sendo possível dar início à etapa de *clean-up* após um período menor. Já em relação ao volume de derivatizante, priorizou-se o uso de menores volumes, de modo a se reduzir o custo da análise. Dessa forma, os parâmetros otimizados para a derivatização dos analitos 1-NA e 2-NA são apresentados na TABELA 17.

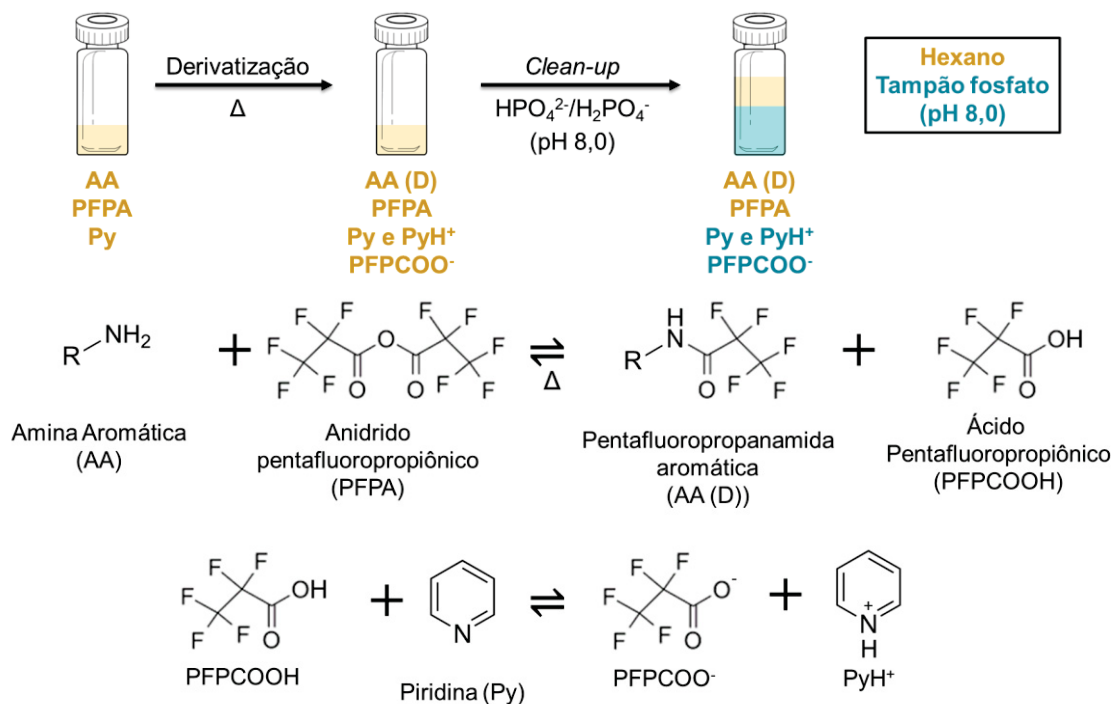
TABELA 17 – CONDIÇÕES DE COMPROMISSO PARA O PROCEDIMENTO DE DERIVATIZAÇÃO EMPREGANDO PIRIDINA COMO SEQUESTRANTE DE ÁCIDO

Parâmetro	Condição de compromisso
Potência de saída do forno micro-ondas doméstico	480 W
Tempo de derivatização	3 min
Volume de derivatizante	10,0 µL
Volume de sequestrante de ácido	5,0 µL

4.2.2.2 Avaliação da adição de piridina

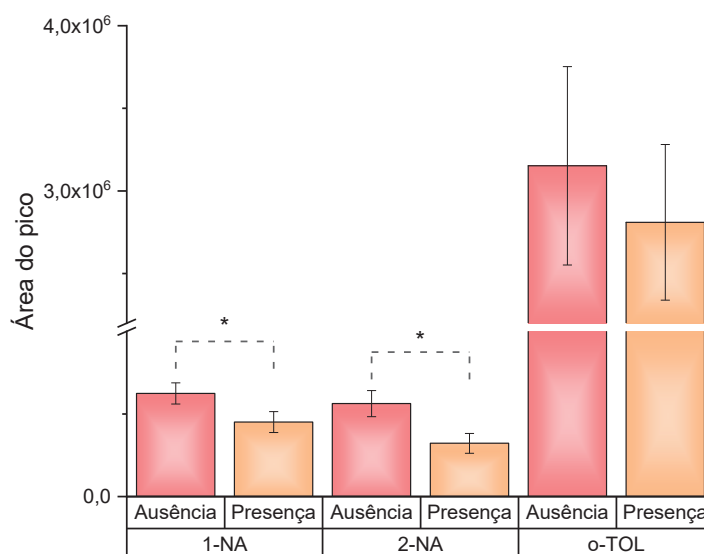
A piridina é um composto básico geralmente empregado como sequestrante de ácido em reações de derivatização com anidridos de perfluoroácidos, como representado na FIGURA 28. No entanto, tal composto apresenta potencial hepatotóxico, e sua remoção no preparo de amostra seria benéfica à segurança do procedimento e à saúde do analista (European Commission - Employment; Social Affairs and Inclusion, 2004).

FIGURA 28 – PROCEDIMENTOS DE DERIVATIZAÇÃO E CLEAN-UP NA PRESENÇA DE PIRIDINA



FONTE: A autora (2022).

Dessa forma, foi avaliada a variação na resposta quando a derivatização foi realizada na presença e na ausência de piridina. Os resultados são apresentados na FIGURA 29.

FIGURA 29 – EFEITO DA ADIÇÃO DE PIRIDINA NA DERIVATIZAÇÃO – o-TOL (10,0 mg L⁻¹) e 1-NA e 2-NA (1,0 mg L⁻¹) (n=3)

1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina, * - apresentam diferença significativa com 95% de confiança.

FONTE: A autora (2021).

Para os três analitos foi observado que para a 1-NA e 2-NA a adição de piridina resultou em uma resposta média significativamente inferior ($F_{o-TOL} = 1,622$; $F_{1-NA} = 1,021$; $F_{2-NA} = 1,743$; $F_{tab} = 19$; $t_{o-TOL} = 0,777$; $t_{1-NA} = 3,327$; $t_{2-NA} = 4,210$, $t_{tab, variâncias\ equivalentes} = 2,132$) comparada àquela observada para a derivatização realizada na ausência de piridina. Tal resultado corrobora a observação exposta anteriormente, em que o planejamento fatorial 2^4 realizado visando à otimização da reação de derivatização apresentou um efeito principal para a variável volume de sequestrante de ácido (nível mínimo – 5,0 μ L), indicando que o uso de menores volumes de piridina resulta em maiores eficiências de derivatização para a 2-NA.

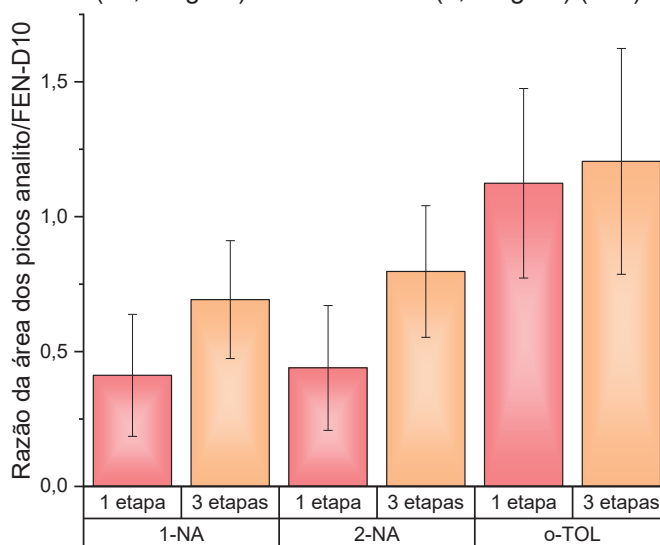
Com base em ambas as observações, há a possibilidade de que as respostas superiores na ausência de piridina e a resposta significativamente inferior ao se fazer uso de maiores volumes de piridina sejam decorrentes de resíduos de água na piridina utilizada, que podem resultar na degradação do derivatizante.

Do ponto de vista qualitativo, não foi observado nenhum pico cromatográfico referente ao derivatizante ou ao subproduto ácido da reação de derivatização, o qual seria prejudicial à vida útil da coluna cromatográfica. Esta ausência de picos de compostos nocivos à coluna e a ausência de um aumento sistemático nos picos de siloxano, observados devido à sangria da coluna, indicam que o *clean-up* com tampão fosfato pH 8,0 foi suficiente para eliminação destes compostos do extrato orgânico. Com base em tais resultados, tanto qualitativos quanto quantitativos, decidiu-se pela eliminação da piridina do procedimento experimental.

4.2.2.3 Avaliação da etapa de *clean-up*

A etapa de *clean-up* após a derivatização com PFPA, caracterizada pela LLE do extrato derivatizado com uma solução de tampão fosfato (pH 8), é empregada com o intuito de neutralizar e remover subprodutos ácidos da reação que podem ser prejudiciais à coluna cromatográfica, levando à degradação da sua fase estacionária. Desta forma, este estudo foi conduzido de forma a verificar se apenas uma etapa de *clean-up* seria suficiente para remover tais produtos, assim como verificar o impacto de múltiplas etapas de *clean-up* na repetibilidade do procedimento. Os resultados obtidos empregando FEN-d10 como PI estão apresentados na FIGURA 30.

FIGURA 30 – EFEITO DA REPETIÇÃO DA ETAPA DE *CLEAN-UP* APÓS A DERIVATIZAÇÃO– o-TOL (10,0 mg L⁻¹) e 1-NA e 2-NA (1,0 mg L⁻¹) (n=3)



1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; FEN-d10 – fenantreno-d10; o-TOL – o-toluidina.

FONTE: A autora (2021).

Para a razão da resposta dos analitos e da resposta do PI não foi observada diferença significativa de variância e média para nenhum dos analitos nas condições avaliadas ($F_{o-TOL} = 1,421$; $F_{1-NA} = 1,071$; $F_{2-NA} = 1,112$; $F_{tab} = 19$; $t_{o-TOL} = 0,259$, $t_{1-NA} = 1,547$, $t_{2-NA} = 1,840$, $t_{tab, variâncias equivalentes} = 2,132$), indicando que a redução no número de repetições de etapa da lavagem poderia ser realizada sem impactar a detectabilidade do método analítico.

Em relação à presença de compostos prejudiciais à coluna cromatográfica nos extratos e a degradação de sua fase estacionária, não foram observados picos referentes ao anidrido e ao ácido pentafluoropropiônico, assim como não foi observado um aumento sistemático na sangria da coluna, de forma que a condição de apenas uma etapa de *clean-up* foi considerada segura e selecionada para ensaios posteriores.

4.2.2.4 Planejamento fatorial 2³ para reação sem adição de sequestrante de ácido

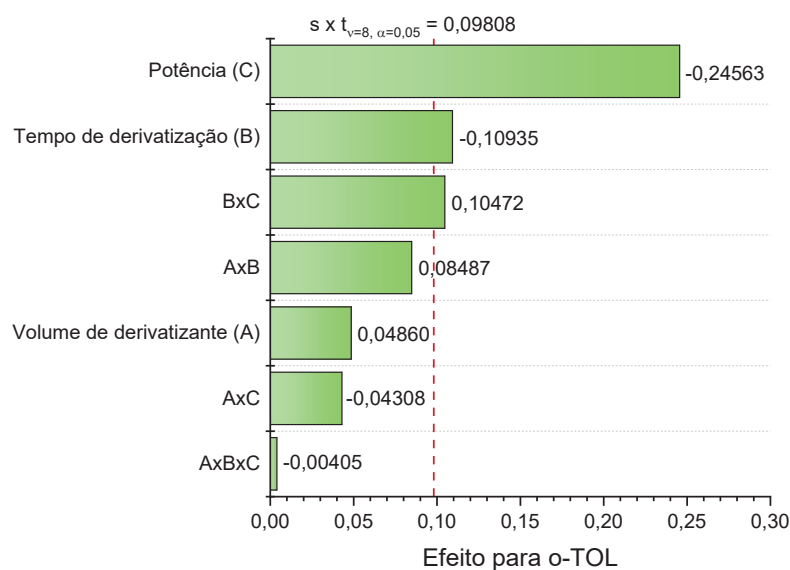
Visando otimizar o rendimento da reação de derivatização na ausência de um sequestrante de ácido, foi proposto um planejamento fatorial 2³ o qual engloba as variáveis volume de derivatizante, tempo de derivatização e potência de saída do forno micro-ondas doméstico. As faixas avaliadas foram selecionadas a partir dos resultados obtidos para o planejamento fatorial 2⁴ discutido anteriormente (item

4.2.2.1.). Dessa forma, os valores máximos de volume de derivatizante e tempo de derivatização foram fixados nos valores otimizados previamente, com o objetivo de manter a frequência analítica e menor custo do procedimento. Para a potência de saída do forno micro-ondas foi mantida uma faixa similar à avaliada no planejamento anterior.

A interpretação dos resultados foi realizada empregando o ALC e CPF como PI para a o-TOL e para os isômeros 1-NA e 2-NA, respectivamente. Tais compostos foram selecionados por não serem derivatizáveis com PFPA, e devido a sua semelhança de log P com os respectivos analitos na forma derivatizada (TABELA 5, item 3.3.2.1).

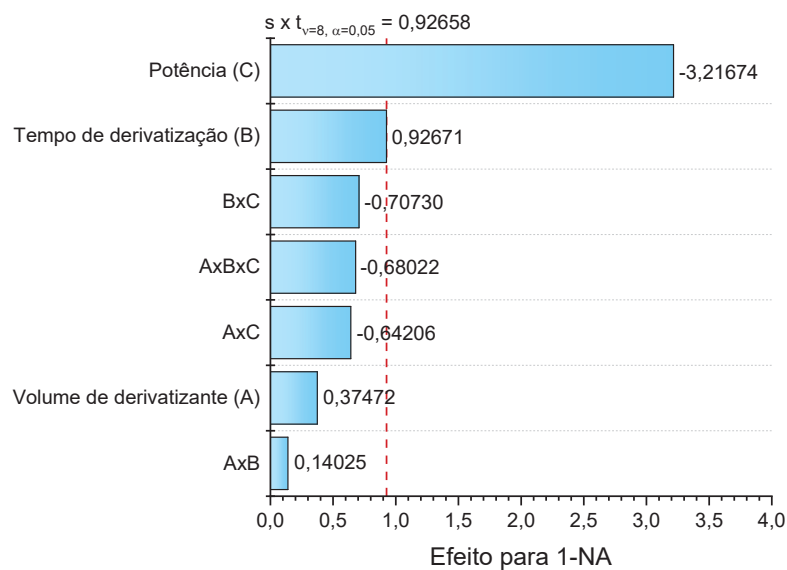
Foram observados resultados contrastantes para a o-TOL e para os isômeros 1-NA e 2-NA, sendo os respectivos gráficos de Pareto apresentados nas FIGURAS 31, 32 e 33. Para a o-TOL foram observados efeitos principais significativos para as variáveis potência de saída (nível mínimo – 400 W) e tempo de derivatização (nível mínimo – 1 min), assim como um efeito de interação de 2ª ordem (FIGURA 34) entre tais variáveis. Já para 1-NA e 2-NA foram observados apenas efeitos principais significativos para as variáveis potência de saída (nível mínimo – 400 W) e tempo de derivatização (nível máximo – 3 min).

FIGURA 31 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO NA AUSÊNCIA DE SEQUESTRANTE DE ÁCIDO – o-TOLIDINA



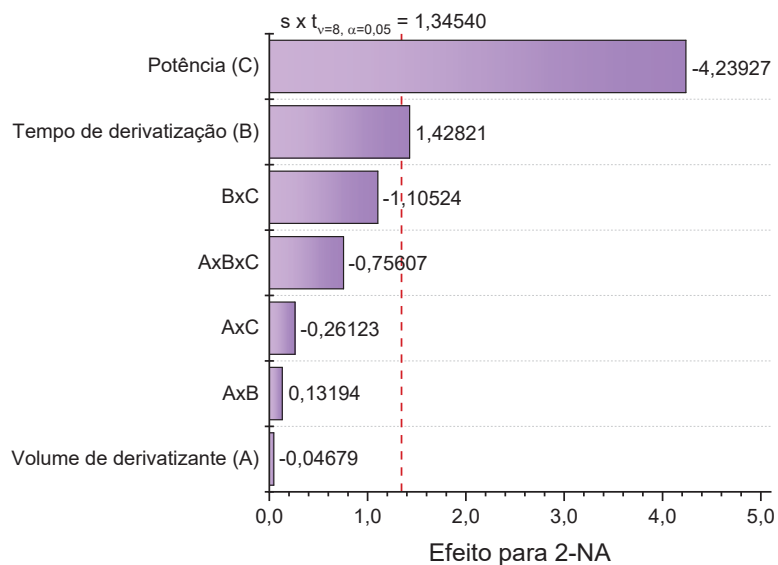
FONTE: A autora (2022).

FIGURA 32 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO NA AUSÊNCIA DE SEQUESTRANTE DE ÁCIDO – 1-NAFTILAMINA



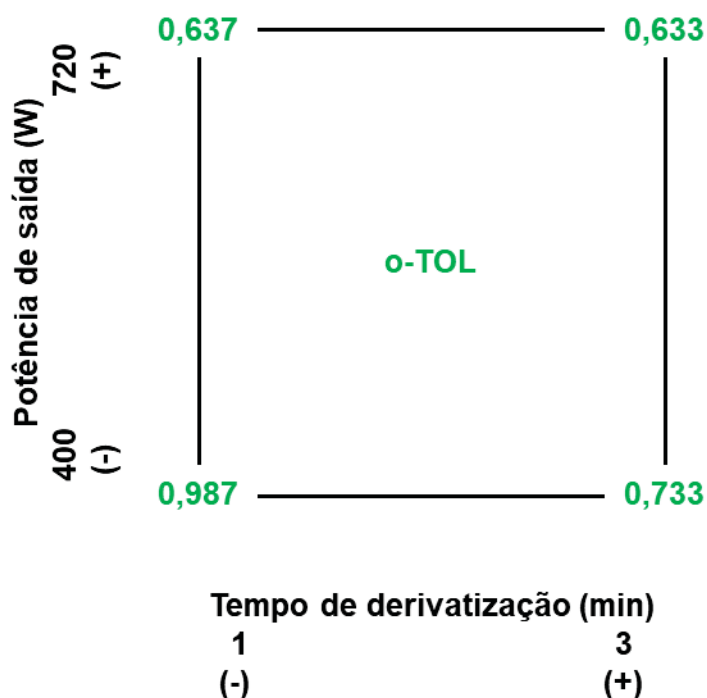
FONTE: A autora (2022).

FIGURA 33 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO NA AUSÊNCIA DE SEQUESTRANTE DE ÁCIDO – 2-NAFTILAMINA



FONTE: A autora (2022).

FIGURA 34 – EFEITO DE INTERAÇÃO ENTRE POTÊNCIA DE SAÍDA E TEMPO DE DERIVATIZAÇÃO – o-TOLUIDINA, PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO NA AUSÊNCIA DE SEQUESTRANTE DE ÁCIDO



FONTE: A autora (2022).

O único efeito em comum para todos os analitos foi o aumento na resposta da reação de derivatização com o uso de uma menor potência de saída do forno micro-ondas doméstico, sendo tal resposta a razão entre as áreas dos picos dos analitos e dos respectivos PI. Tal efeito pode ser decorrente de perdas por volatilização das aminas aromáticas, sendo esta acentuada por temperaturas mais altas atingidas com potências mais elevadas. Este mesmo efeito foi observado no planejamento fatorial 2⁴ para a derivatização na presença do sequestrante de ácido discutido no item 4.2.2.1.

Em relação aos efeitos opostos observados para tempo de derivatização, possivelmente a o-TOL seja o analito mais afetado por perdas por volatilização, uma vez que esta é a amina aromática mais volátil avaliada neste estudo, de forma que esta se beneficiaria do uso de tempos de derivatização menores. Porém, para 1-NA e 2-NA, observou-se que as respostas foram favorecidas com tempos de derivatização mais elevados, indicando que a reação de derivatização destes compostos pode ser mais lenta do que a da o-TOL ou que suas perdas por volatilização são menos críticas na temperatura alcançada no meio reacional.

Perdas por volatilização da o-TOL também justificariam o efeito de 2ª ordem observado, onde as maiores respostas foram obtidas para os experimentos em que tempo de derivatização e potência de saída do forno micro-ondas foram mantidas nos níveis mínimos (resposta média de 0,987), em contraste às menores respostas observadas para os experimentos que foram realizados empregando as mesmas condições no nível máximo (resposta média de 0,633). Ou seja, quanto menor o tempo de derivatização e a potência de saída do forno micro-ondas, menor a temperatura do meio reacional, resultando na minimização de perdas por volatilização.

Com base nestes resultados, buscando dar preferência para as condições que forneceram as melhores respostas para a maioria dos analitos, para os quais as concentrações presentes em amostras de urina foram inferiores àsquelas de o-TOL, selecionou-se as seguintes condições de compromisso: potência de saída do forno micro-ondas doméstico – 400 W, tempo de derivatização – 3 min.

Como não foi observado efeito significativo para a variável volume de derivatizante, selecionou-se como condição de compromisso o uso do maior volume de derivatizante avaliado, 10,0 µL, uma vez que os RSD observados para o experimento com estas condições (0,62 a 6,28%) foram cerca da metade do que aqueles observados para o experimento com menor volume de derivatizante (2,14 a 13,93%). Dessa forma, os parâmetros otimizados para a derivatização dos analitos são apresentados na TABELA 18, enquanto o cromatograma obtido a partir de tais condições está apresentado na FIGURA 35. O procedimento de derivatização, conforme exposto na FIGURA 36 foi posteriormente aplicado na etapa de avaliação preliminar dos parâmetros de mérito do método bioanalítico proposto.

TABELA 18 – CONDIÇÕES DE COMPROMISSO PARA O PROCEDIMENTO DE DERIVATIZAÇÃO SEM A ADIÇÃO DE SEQUESTRANTE DE ÁCIDO

Parâmetro	Condição de compromisso
Volume do derivatizante	10,0 µL
Tempo de derivatização	3 min
Potência de saída do forno micro-ondas	400 W

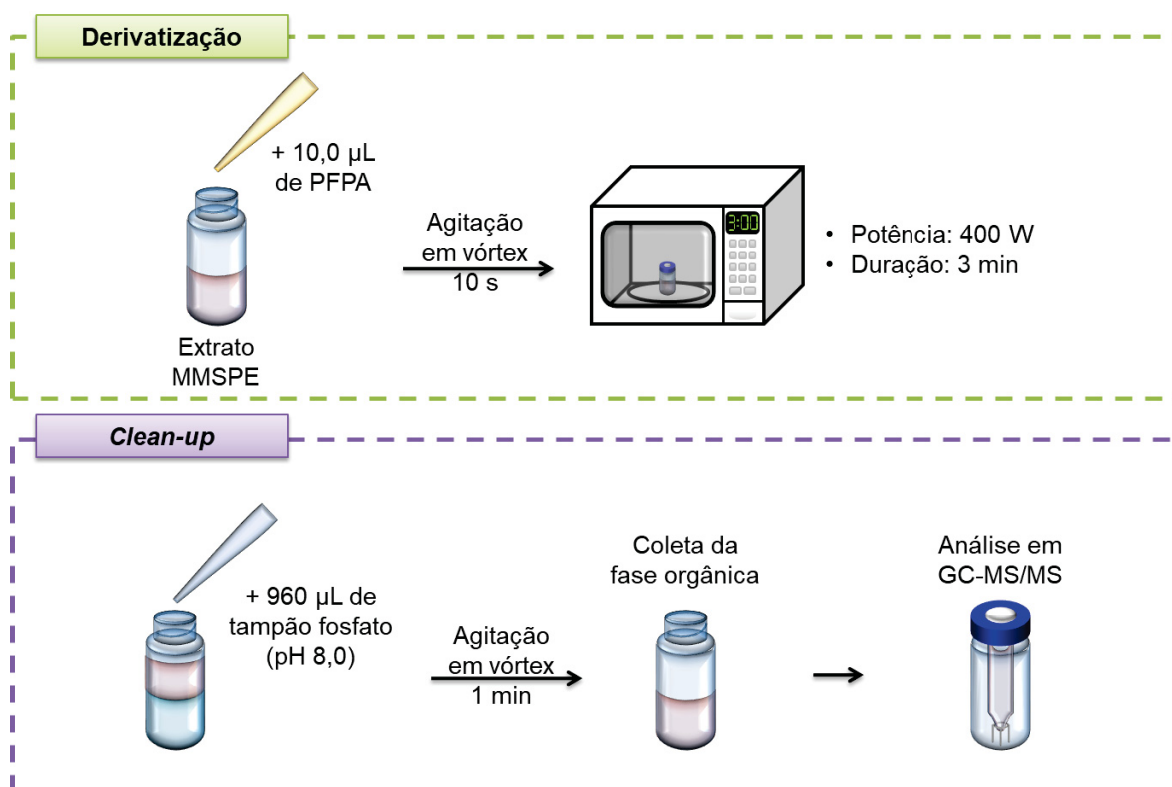
FIGURA 35 – CROMATOGRAMA OBTIDO EMPREGANDO AS CONDIÇÕES DE COMPROMISSO DE DERIVATIZAÇÃO COM PFPA – MODO SIM, 10,0 (o-TOL) E 1,0 mg L⁻¹ (1-NA e 2-NA)



PFPA – anidrido pentafluoropropiônico; o-TOL – o-toluidina; 1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina, (D) – derivatizada, SIM – monitoramento seletivo de íons.

FONTE: A autora (2022).

FIGURA 36 – ESQUEMA DO PROCEDIMENTO DE DERIVATIZAÇÃO COM PFPA OTIMIZADO



GC-MS/MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; MMSPE – extração em fase sólida com membrana microporosa; PFPA – anidrido pentafluoropropiônico.

FONTE: A autora (2022).

Com base nos parâmetros otimizados para a reação de derivatização, cada amostra requer um tempo de derivatização de apenas 3 min, devido ao uso de uma fonte de aquecimento eficiente, como o caso do forno micro-ondas doméstico, além

de uma etapa adicional de 1 min de *clean-up*. Tais condições correspondem a uma redução significativa no tempo de derivatização em relação ao tempo usual para derivatização dos mesmos analitos empregando banho termostático, o qual requer no mínimo 60 min apenas para a etapa de derivatização (RIEDEL et al., 2006; WEISS, 2002).

4.3 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM MEMBRANA MICROPOROSA (MMSPE)

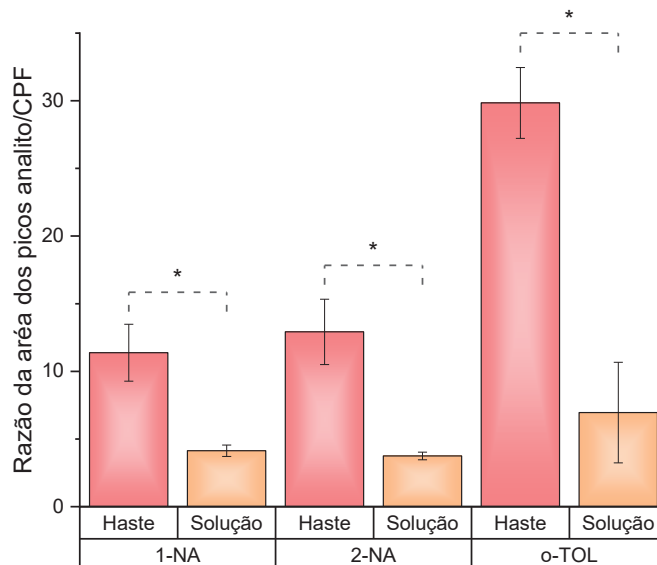
Similarmente a etapa de otimização da reação de derivatização, para se otimizar os parâmetros envolvidos nas etapas de extração e dessorção foram utilizadas abordagens de otimização univariada e multivariada. Nas otimizações univariadas foram empregados testes estatísticos com $\alpha = 0,05$, sendo estes do tipo ANOVA quando três ou mais condições foram avaliadas, sendo aplicado adicionalmente o teste de Tukey quando diferenças significativas foram observadas, e testes F e t quando apenas duas condições foram avaliadas.

Para estes últimos, primeiramente foi aplicado o teste F, para verificar diferenças quanto às variâncias, seguido de teste t unicaudal para verificar diferenças quanto às médias, sendo estes testes t presumindo variâncias equivalentes quando F_{calc} é inferior ao F_{tab} e presumindo variâncias diferentes quando F_{calc} é superior ao F_{tab} .

4.3.1 Avaliação preliminar de dispositivos de extração empregando membranas microporosas de PP

Com o intuito de verificar a viabilidade do uso de membranas microporosas como dispositivos de extração em relação a seu uso livre em solução ou como dispositivos usuais de MMSPE, onde as membranas se encontram dispostas em uma haste metálica, foram realizados ensaios empregando dois segmentos de 0,7 cm livres na amostra e dispostos em uma única haste metálica. Os resultados obtidos estão representados na FIGURA 37, empregando CPF como PI.

FIGURA 37 – EFEITO DOS DISPOSITIVOS DE EXTRAÇÃO BASEADOS EM MEMBRANAS MICROPOROSAS DE POLIPROPILENO



CPF – clorpirifós; 1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina, * - apresentam diferença significativa com 95% de confiança.

FONTE: A autora (2022).

Observou-se que o uso das membranas dispostas em uma haste metálica resultou na obtenção de uma resposta significativamente superior para todos os analitos quando comparadas as membranas livres em solução ($F_{o-TOL} = 2,014$; $F_{1-NA} = 24,843$; $F_{2-NA} = 75,280$; $F_{tab} = 19$; $t_{o-TOL} = -8,725$; $t_{tab, variâncias equivalentes} = 2,132$; $t_{1-NA} = 5,850$; $t_{2-NA} = 6,536$; $t_{tab, variâncias diferentes} = 2,920$). Tal resposta pode ser decorrente de que as membranas livres em solução tendem a permanecer na superfície da amostra, de forma que apenas parte da superfície da fase sortiva está em contato com a amostra e, conseqüentemente, a eficiência de extração pode ser prejudicada. Assim, optou-se por prosseguir os estudos empregando as membranas microporosas como fase sortiva na configuração usual de MMSPE.

4.3.2 Planejamento fatorial 2^3 A - configuração, etapa de evaporação, solvente de dessorção

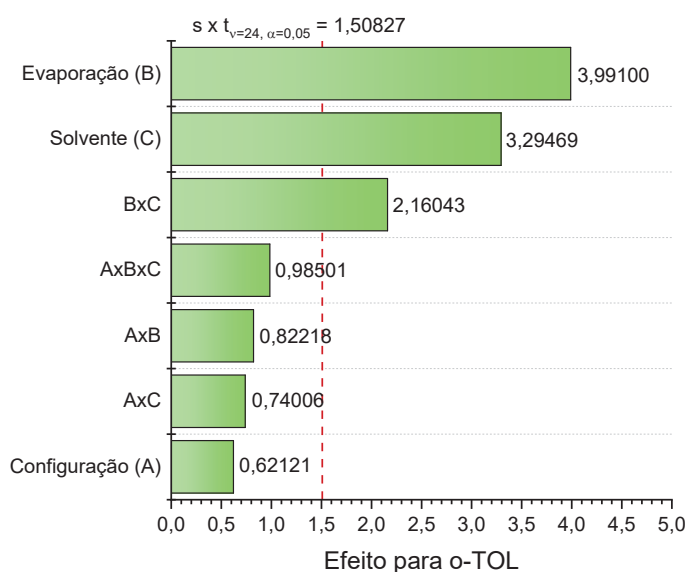
A seleção de um solvente de dessorção adequado é essencial para garantir que os analitos sejam transferidos da fase sortiva para um meio líquido de forma eficiente. Tal fator está correlacionado à polaridade do solvente de dessorção e às interações características entre analito e fase sortiva. Adicionalmente, idealmente o solvente de dessorção poderia ser processado e submetido à etapa de derivatização das aminas aromáticas.

Adicionalmente, houve interesse em avaliar a necessidade de uma etapa de evaporação do solvente prévia a derivatização, etapa que poderia ser importante visando eliminar qualquer presença residual de matriz aquosa no extrato, uma vez que o derivatizante PFPA sofre degradação quando em contato com soluções aquosas.

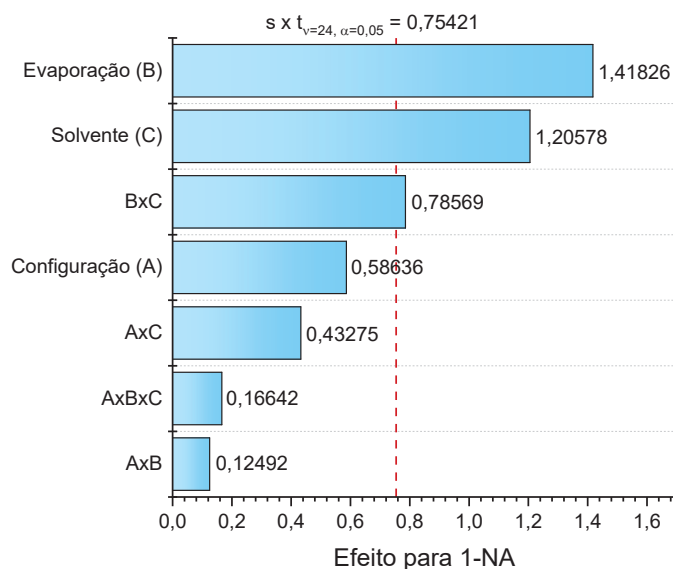
Além destas variáveis, foi também avaliada a configuração do dispositivo de extração, conservando a quantidade total de fase sortiva, mas com segmentos de comprimentos distintos. Tal estudo foi realizado empregando um planejamento fatorial 2^3 em quadruplicata, de acordo com a TABELA 8 (item 3.6.4.1).

Em relação ao solvente de dessorção, ensaios preliminares comparando metanol, acetona, acetato de etila e hexano resultaram no descarte dos dois primeiros como solventes de dessorção, uma vez que seu uso não resultou em uma maior eficiência de extração, e sua miscibilidade em água acarreta num risco maior para a presença da mesma nos extratos orgânicos. A partir da execução do planejamento fatorial descrito anteriormente foi possível obter os gráficos de Pareto apresentados nas FIGURAS 38, 39 e 40. Foram observados efeitos principais para a realização da etapa de evaporação (nível máximo – evaporação do extrato) e para o tipo de solvente para todos os analitos (nível máximo – hexano), assim como um efeito de interação de 2ª ordem para tais variáveis para o-TOL e 1-NA (FIGURA 41).

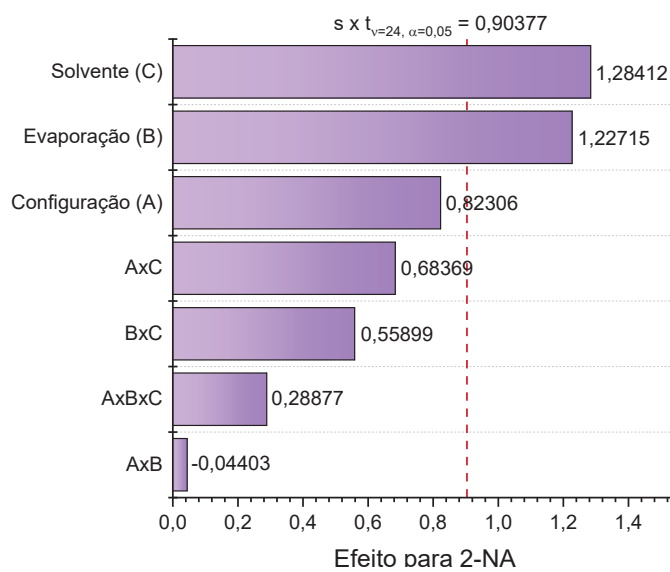
FIGURA 38 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 A – o-TOLUIDINA



FONTE: A autora (2022).

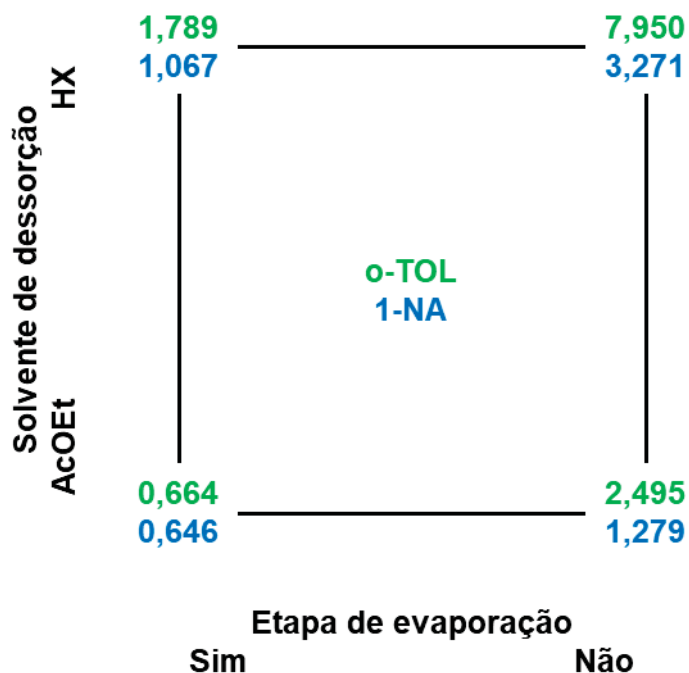
FIGURA 39 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ A – 1-NAFTILAMINA

FONTE: A autora (2022).

FIGURA 40 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ A - 2-NAFTILAMINA

FONTE: A autora (2022).

FIGURA 41 – EFEITO DE INTERAÇÃO ENTRE ETAPA DE EVAPORAÇÃO E TIPO DE SOLVENTE - o-TOLUIDINA E 1-NAFTILAMINA, PLANEJAMENTO 2³ A



AcOEt – acetato de etila; HX – hexano; o-TOL – o-toluidina, 1-NA – 1-naftilamina.

FONTE: A autora (2022).

As maiores respostas obtidas na dessorção com hexano corrobora os indícios de que a extração dos analitos se dá devido a interações hidrofóbicas entre os anéis aromáticos dos analitos e membrana de PP, de forma que o solvente de menor polaridade seria mais eficiente no processo de dessorção. Em relação à etapa de evaporação, os extratos que não foram evaporados resultaram em respostas mais elevadas, o que pode ser decorrente da perda por volatilização dos analitos nesta etapa, mesmo sem o uso de aquecimento.

Por sua vez, o efeito de interação de 2^a ordem entre a etapa de evaporação e o solvente de dessorção observado pode ser decorrente do fato de o hexano ser um solvente mais volátil do que acetato de etila, com pressões de vapor de 128 e 78 mmHg, respectivamente (SMALLWOOD, 1996). Sendo assim, na etapa de evaporação os extratos em hexano seriam secos mais rapidamente, e a perda por volatilização dos analitos seria acentuada.

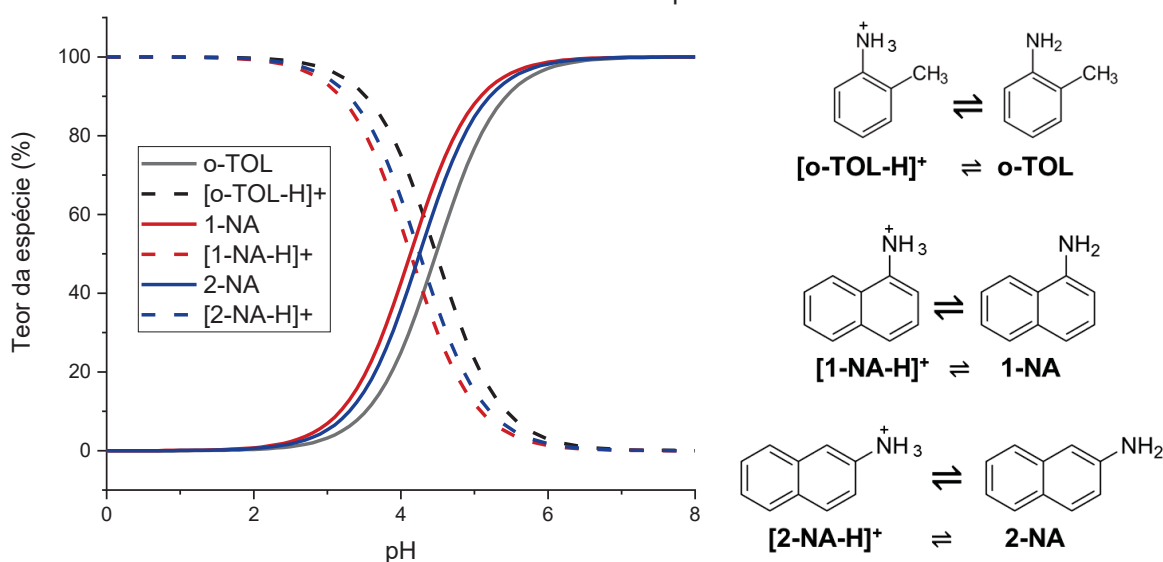
Como não foi observado efeito principal para o tamanho dos segmentos de membrana, selecionou-se como condição de compromisso os dispositivos com sete segmentos de 0,2 cm de membrana de PP. Tal condição forneceu os menores

valores de RSD observados, na faixa de 27,9 a 40,0%, em comparação àqueles obtidos para os dispositivos com dois segmentos de 0,7 cm de membrana de PP, que estão na faixa de 73,3 a 75,9%. Essa discrepância na repetibilidade do procedimento pode ser decorrente do aprisionamento de pequenas quantidades de solução aquosa no interior dos segmentos de membrana mais longos, as quais não foram removidas na etapa de secagem com papel. A presença destes pequenos volumes pode resultar em um processo por LLE entre tais resíduos e o solvente de dessorção, afetando a precisão do procedimento. Cabe destacar que tal observação não foi consistente em todas as réplicas, o que suporta a proposta de que este acontecimento seja um dos fatores que afeta a repetibilidade do procedimento.

4.3.3 Otimização univariada do pH

Os analitos selecionados no presente projeto são aminas aromáticas, portanto, estas são passíveis de protonação em menores valores de pH, o que por sua vez afetaria sua eficiência de extração ao se empregar uma fase sortiva de baixa polaridade. A distribuição destas espécies ocorre de acordo com o pKa de cada analito, como representado na FIGURA 42.

FIGURA 42 – DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES NEUTRAS E PROTONADAS DOS ANALITOS DE ACORDO COM O pH

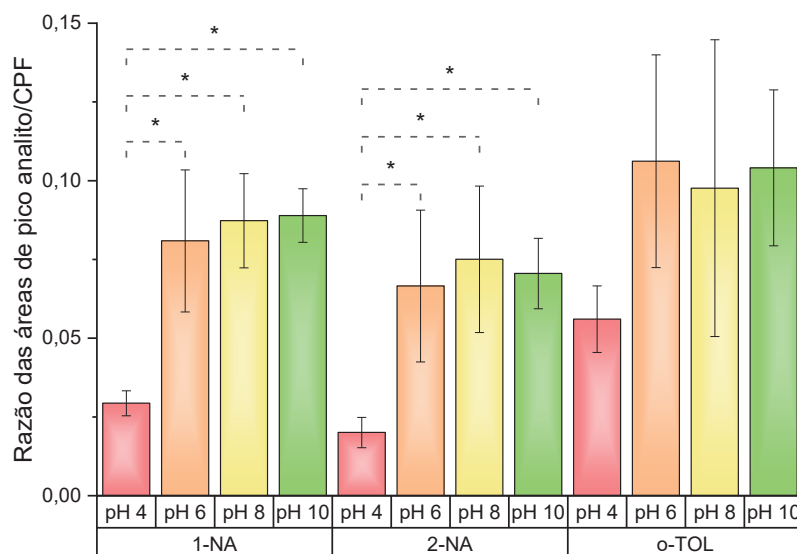


FONTE: A autora (2022), a partir de dados obtidos em Chemicalize.

Dessa forma, com o intuito de se obter uma eficiência de extração adequada, foi avaliado de forma univariada o ajuste de pH das amostras de urina de

modo que tal ajuste fosse realizado entre as etapas de hidrólise e MMSPE. As condições avaliadas foram pH 4, 6, 8 e 10, de forma univariada e em quintuplicata, atendo-se a condições próximas e superiores ao pKa dos analitos. Os resultados obtidos são apresentados na FIGURA 43.

FIGURA 43 – EFEITO DO pH NA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO POR MMSPE – 5,0 (o-TOL) e 0,5 mg L⁻¹ (1-NA E 2-NA) (n = 5)



CPF – clorpirifós; 1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina, * - apresentam diferença significativa com 95% de confiança.

FONTE: A autora (2022).

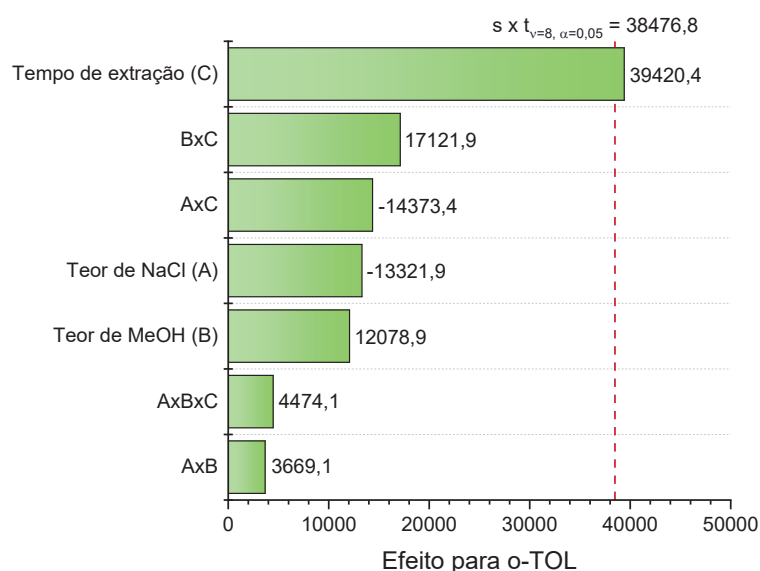
Para os três analitos foi observado que para a 1-NA e 2-NA houve uma diferença significativa entre as respostas obtidas para os valores de pH avaliados ($F_{o-TOL} = 2,459$; $F_{1-NA} = 18,362$; $F_{2-NA} = 9,863$; $F_{tab} = 3,239$), sendo a resposta obtida para pH 4 significativamente diferente em relação àquelas obtidas para os demais valores de pH. Esta observação pode ser decorrente do fato de que os valores de pKa dos analitos se encontram próximos de 4 (TABELA 1, item 1.2), de forma que esses se encontram distribuídos entre as espécies neutras e protonadas neste pH (FIGURA 42), que por sua vez diminuiria a sua extração pela membrana de PP. Dessa forma, dentre os valores avaliados, o pH 10 resultou nos menores valores de RSD, na faixa de 9,57 a 23,8%, sendo esta condição selecionada para ensaios posteriores.

4.3.4 Planejamento fatorial 2³ B - teor de NaCl adicionado, teor de metanol e tempo de extração

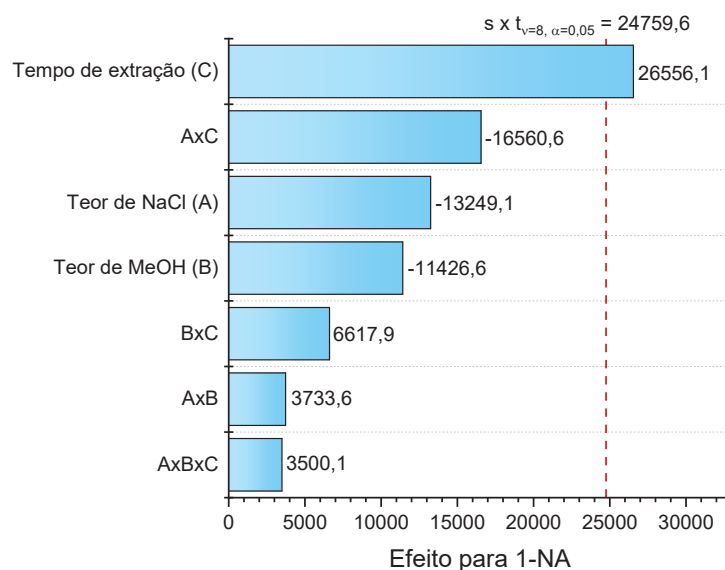
A adição de sais e de solventes orgânicos miscíveis em água são práticas comuns quando se estuda a extração de compostos orgânicos em fluidos biológicos. A adição de sais é realizada frequentemente como estratégia de *salting out*, uma vez que a força iônica do meio afeta o equilíbrio de sorção de um composto na fase sortiva no caso de técnicas de extração em fase sólida enquanto a adição de solventes como metanol ou acetonitrila é conduzida para minimizar a interação entre compostos orgânicos e proteínas presentes em matrizes biológicas (HO et al., 2002; HYDE et al., 2017).

Em relação ao tempo de extração, é essencial que o mesmo seja avaliado para garantir uma eficiência de extração adequada. Dessa forma, tais variáveis foram avaliadas num planejamento fatorial 2³ com duplicata dos ensaios, de acordo com a TABELA 9 (item 3.6.4.3). Os gráficos de Pareto obtidos são apresentados nas FIGURAS 44, 45 e 46.

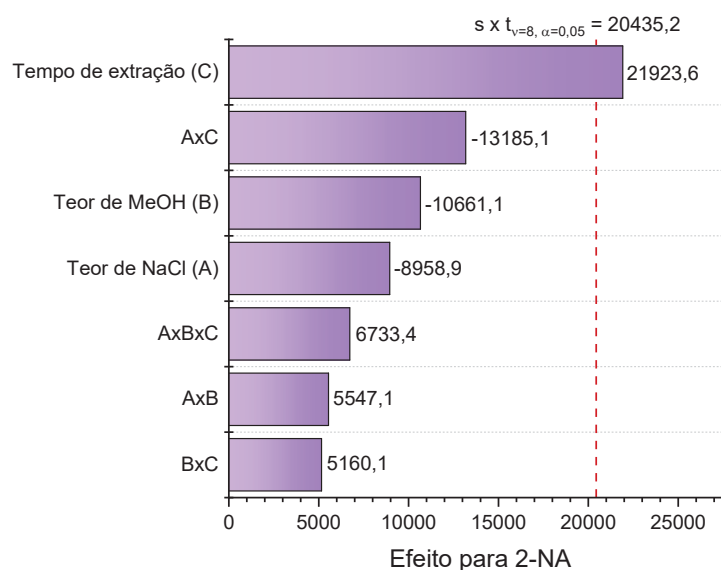
FIGURA 44 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ B – o-TOLUIDINA



FONTE: A autora (2022).

FIGURA 45 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ B – 1-NAFTILAMINA

FONTE: A autora (2022).

FIGURA 46 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ B - 2-NAFTILAMINA

FONTE: A autora (2022).

Para todos os analitos foi possível observar apenas efeitos principais para o tempo de extração, favorecendo condições de extração com tempos superiores (nível máximo – 45 min). Neste caso, tal resposta é condizente com o fato que na maioria das vezes técnicas de microextração não são exaustivas e se beneficiam de tempos mais elevados. Nos estudos de Montes et al. (2008) e Carpinteiro et al. (2009), que empregaram membranas de PP para extração de compostos

aromáticos, os métodos propostos fizeram uso de tempos de extração de 2 e 1 hora, respectivamente.

No entanto, ambos os estudos realizaram tal extração no modo estático, ou seja, não assistida por ultrassom, o qual por sua vez foi empregado no presente estudo como alternativa para facilitar a transferência de massa e, conseqüentemente, favorecer a extração dos analitos. Adicionalmente, tempos elevados de extração resultam na diminuição da frequência analítica de um método. Dessa forma, uma nova avaliação de tempo de extração foi realizada posteriormente, fixando 60 min como tempo máximo, visando não impactar excessivamente a frequência analítica do método proposto no presente projeto.

Quando avaliadas as respostas das demais variáveis contempladas no planejamento fatorial apresentado anteriormente, quanto ao teor de NaCl adicionado, as condições avaliadas abrangem uma faixa estreita devido a limitações da solubilidade do sal nas amostras, uma vez que a urina naturalmente apresenta uma força iônica pré determinada, sendo que as concentrações de Na^+ e Cl^- se encontram em torno de 1170 a 4390 mg L^{-1} e 1870 a 8700 mg L^{-1} , respectivamente, correspondendo 0,3 a 1,12% (m/v) de NaCl para indivíduos saudáveis (RANDALL; NAIDOO, 2018).

Além disto, o procedimento de hidrólise com HCl e posterior neutralização com NaOH resulta numa elevação da força iônica, correspondendo a uma concentração final de cerca de 10 a 11% (m/v) de NaCl após a neutralização e antes da adição de NaCl. Sendo assim, é possível que a faixa avaliada possa se encontrar acima daquela para qual seria observada alguma diferença significativa em relação à eficiência de extração dos analitos por MMSPE devido ao efeito *salting out*.

Já para o teor de metanol, este pode não ter afetado significativamente a eficiência de extração devido ao baixo teor de proteínas em urina de indivíduos saudáveis, encontrando-se na faixa de 0,5 e 1,0 g L^{-1} , em contraste ao teor de proteínas em plasma que está na faixa de 60 a 80 g L^{-1} (FERNÁNDEZ-PERALBO; CASTRO, 2012).

Dessa forma, a adição de um solvente orgânico miscível em água não se torna necessária para a extração das aminas aromáticas selecionadas em urina, No entanto, foi possível afirmar que a adição de metanol, apesar de não favorecer a extração dos analitos, também não prejudicou a mesma, de forma que os analitos

continuam a apresentar a preferência pela sorção no polímero que constitui as membranas microporosas mesmo na presença de um solvente orgânico.

Dessa forma, para as variáveis teor de NaCl adicionado e teor de metanol foram selecionadas as condições 0,0% (m/v) e 10,0% (v/v), respectivamente, uma vez que tais condições apresentaram os menores valores de RSD para os analitos, na faixa de 0,04 a 28,46%, em comparação a 34,64 a 35,72%, sendo tais valores correspondentes a faixa de RSD para o ensaio no qual não foi realizada a adição de NaCl e metanol e a extração foi conduzida no nível máximo.

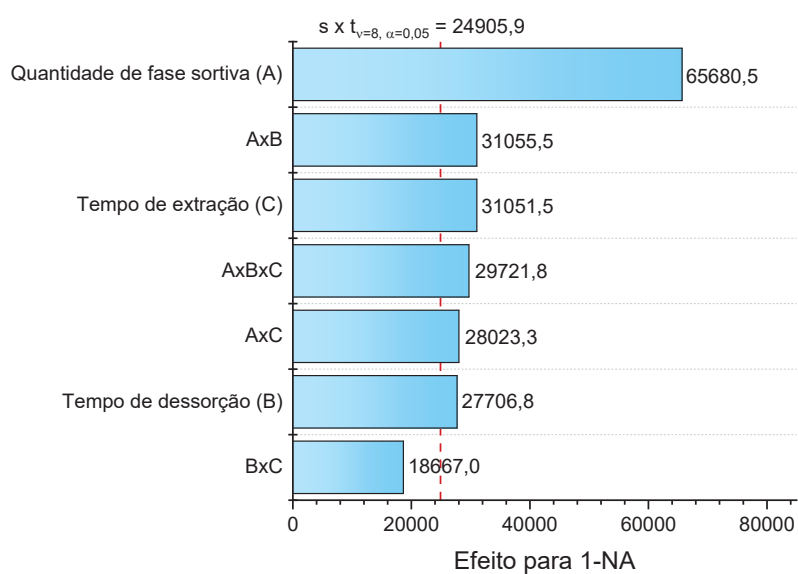
4.3.5 Planejamento fatorial 2^3 C - quantidade de fase sortiva, tempo de dessorção e tempo de extração

A quantidade de fase sortiva, o tempo de dessorção e o tempo de extração são variáveis intrinsecamente ligadas à eficiência de extração de um método que emprega técnicas de microextração em fase sólida. A quantidade de fase sortiva, neste estudo avaliada como quantidade de dispositivos de MMSPE empregados, está diretamente atrelada à quantidade de sítios sortivos disponíveis para interação com os analitos, que por sua vez afetará os equilíbrios de sorção envolvidos nas etapas de extração e dessorção. Já o tempo de dessorção afetará a eficiência da MMSPE devido ao equilíbrio de sorção envolvido na etapa de dessorção.

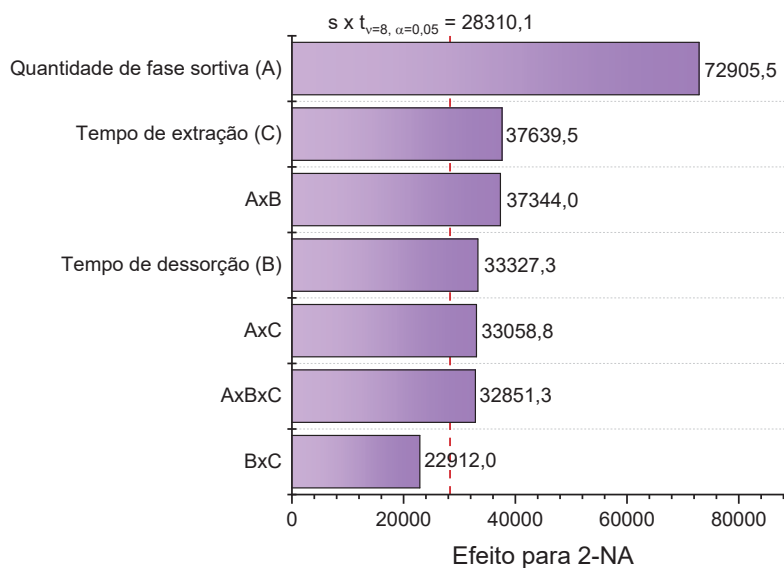
Dessa forma, tais variáveis foram avaliadas em planejamento fatorial 2^3 em duplicata de acordo com a TABELA 10. Os resultados obtidos, na forma de gráficos de Pareto, estão apresentados nas FIGURAS 47, 48 e 49. As mesmas tendências foram constatadas para os três analitos, sendo observados efeitos principais para as três variáveis, exceto o efeito principal para tempo de extração para o-TOL, assim como efeitos de 2ª e 3ª ordem, sendo os últimos apresentados na FIGURA 50.

FIGURA 47 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ C – o-TOLUIDINA

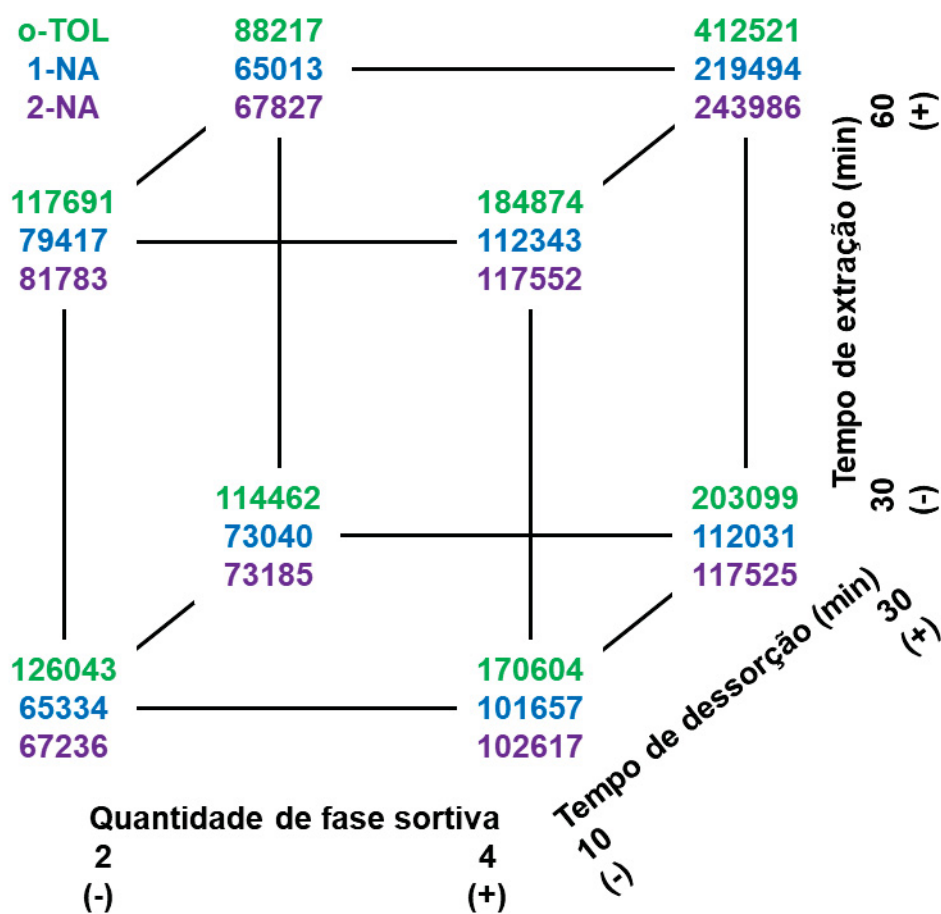
FONTE: A autora (2022).

FIGURA 48 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ C – 1-NAFTILAMINA

FONTE: A autora (2022).

FIGURA 49 – GRÁFICO DE PARETO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ C - 2-NAFTILAMINA

FONTE: A autora (2022).

FIGURA 50 – EFEITO DE INTERAÇÃO QUANTIDADE DE FASE SORTIVA, TEMPO DE DESSORÇÃO E TEMPO DE EXTRAÇÃO - o-TOLUIDINA, 1-NAFTILAMINA E 2-NAFTILAMINA, PLANEJAMENTO 2³ C

FONTE: A autora (2022).

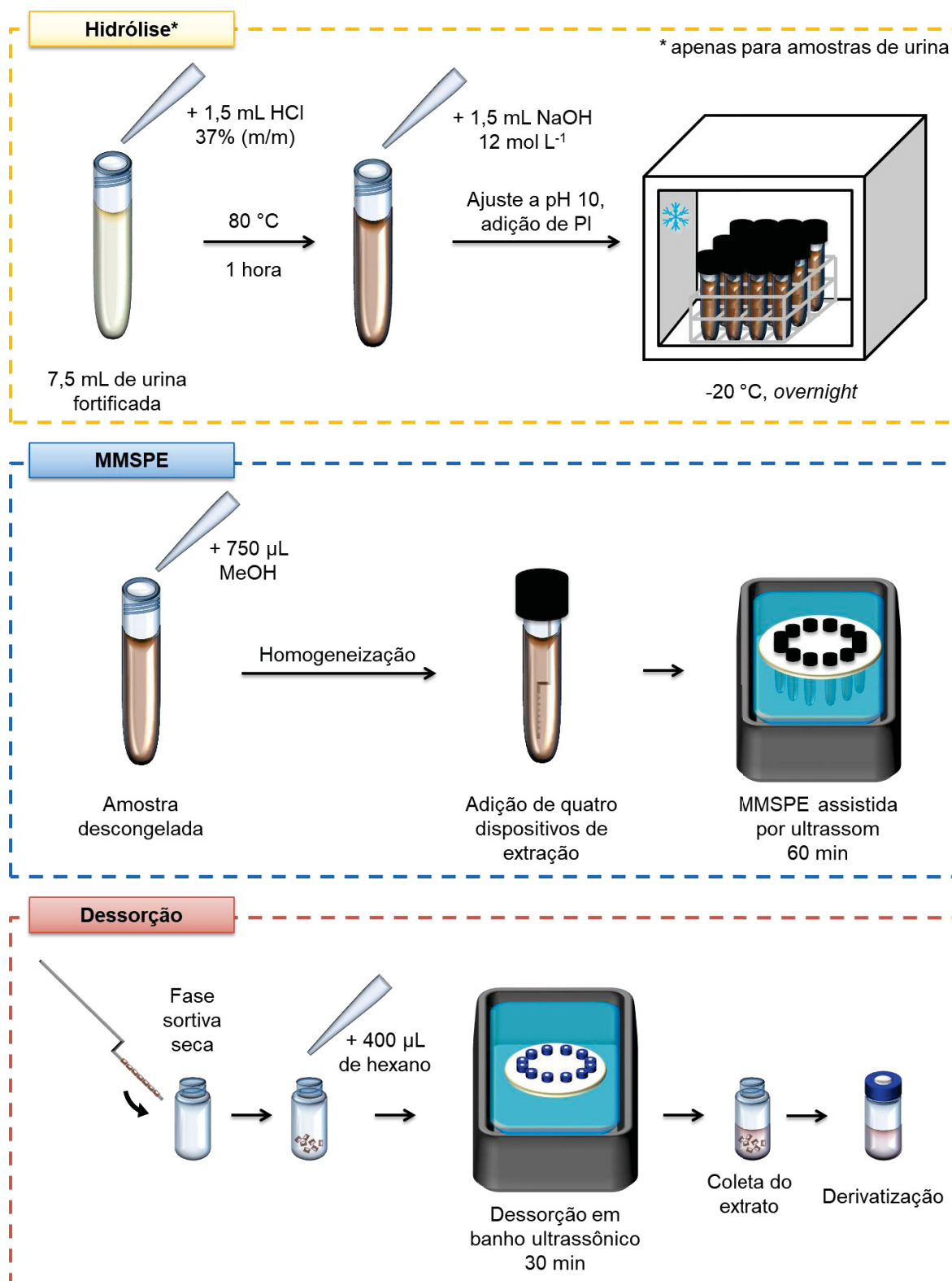
O efeito de 3ª ordem observado, onde as maiores respostas foram obtidas para os níveis máximos das três variáveis (quatro hastes 7 x 0,2 cm, 60 min de extração, 30 min de dessorção), pode ser explicado pelo fato de que quanto maior a quantidade de fase sortiva, maior a disponibilidade de sítios de sorção para que os analitos interajam, fator que isoladamente aumentaria a eficiência de extração. Como técnicas de microextração em fase sólida se baseiam em equilíbrios de sorção, quanto maior a disponibilidade de sítios de sorção, maior tende a ser a eficiência de extração. Devido a essa maior disponibilidade de sítios, o tempo de extração em que se alcança um equilíbrio tende a ser mais elevado. Paralelamente, devido a maior quantidade de analito extraída, maiores tempos podem ser necessários para realizar a dessorção desses de forma eficiente.

Dessa forma, as condições de compromisso selecionadas foram quatro hastes contendo sete segmentos de 0,2 cm de membrana de PP, 30 min de dessorção e 60 min de extração. As condições de compromisso selecionadas para todas as variáveis avaliadas estão resumidas na TABELA 19. O procedimento experimental da MMSPE otimizado, incluindo a etapa de hidrólise de urina, está apresentado na FIGURA 51.

TABELA 19 – CONDIÇÕES DE COMPROMISSO PARA MMSPE

Parâmetro	Nível
Configuração (nº de segmentos x comprimento)	7 x 0,2 cm
Etapa de evaporação do extrato	Não
Solvente de dessorção	Hexano
pH da amostra	10
Teor de NaCl adicionado (% m/v)	0,0
Teor de metanol (% v/v)	10,0
Quantidade de fase sortiva (hastes 7 x 0,2 cm)	4
Tempo de dessorção (min)	30
Tempo de extração (min)	60

FIGURA 51 – ESQUEMA DOS PROCEDIMENTOS DE HIDRÓLISE E MMSPE OTIMIZADO



PI – padrão interno.

FONTE: A autora (2022).

O procedimento de MMSPE otimizado apresenta a vantagem de baixo custo, uma vez que as membranas de PP são uma fase sortiva acessível, de forma que o custo de cada extração, levando-se em consideração apenas a confecção dos dispositivos, foi cerca de R\$ 0,11 por amostra. Adicionalmente, foi possível fazer uso de um solvente de dessorção compatível com a reação de derivatização com PFPA, eliminando uma etapa de evaporação do extrato do preparo de amostra. Levando em consideração todos os parâmetros otimizados, e a realização das etapas de extração e dessorção em batelada, com até 12 amostras por batelada, cada amostra requereu cerca de 9 min para seu preparo.

4.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO DO MÉTODO BIOANALÍTICO DESENVOLVIDO

Após a otimização do método bioanalítico, o qual compreendeu o método cromatográfico, aquisição espectrométrica, reação de derivatização e MMSPE, foi realizada a avaliação preliminar dos parâmetros de mérito do método desenvolvido. Esta avaliação foi conduzida com base nas diretrizes para validação de métodos bioanalíticos propostas pelo FDA (Food and Drug Administration, 2018), sendo realizados ensaios para a obtenção de curvas analíticas, das quais seriam obtidos os parâmetros de linearidade, LLOQ, precisão e exatidão inter-dia, ensaios de precisão e exatidão intra-dia, recuperação, seletividade, especificidade e estabilidade.

4.4.1 Curvas analíticas

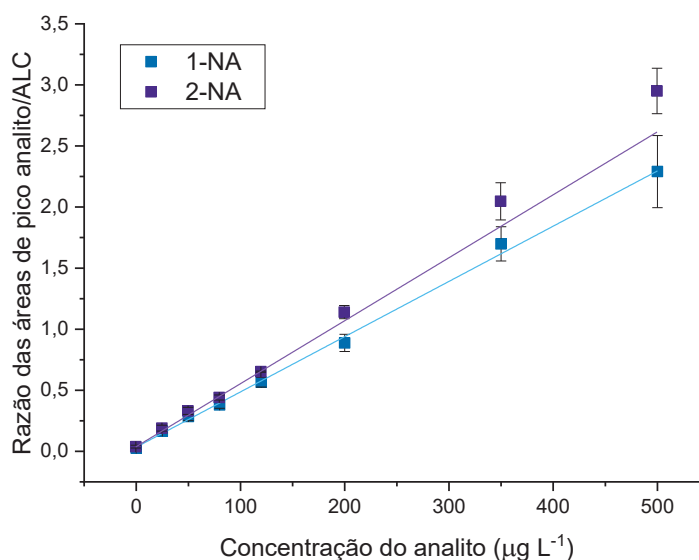
As curvas analíticas foram avaliadas em quintuplicata na faixa de concentração de 25 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, a partir da fortificação de amostras de urina branco com os padrões dos analitos e do PI (ALC), cuja concentração foi mantida em 60 $\mu\text{g L}^{-1}$. Além destes pontos, calibrantes zero foram preparados a partir da fortificação de amostras de urina branco apenas com o PI, como preconizado pelas orientações do FDA. Tais amostras foram hidrolisadas, extraídas e derivatizadas de acordo com o método bioanalítico desenvolvido e otimizado.

De acordo com a definição fornecida pelo FDA, o LLOQ refere-se a menor concentração da curva analítica em que a resposta é igual ou maior que 5 vezes a resposta do calibrante zero, ou seja, aquele no qual é realizada apenas a fortificação

com o PI. Para a o-TOL apenas os pontos de concentração a partir $200 \mu\text{g L}^{-1}$ apresentam respostas acima desse valor, de modo que restaram apenas três concentrações que poderiam compor a curva analítica. Idealmente, com base nas diretrizes do FDA, seriam necessários no mínimo seis pontos de concentração diferentes do calibrante zero. Dessa forma, não foi possível obter uma curva analítica satisfatória para este analito.

A FIGURA 52 apresenta as curvas analíticas obtidas para os analitos 1-NA e 2-NA, e os parâmetros de mérito obtidos a partir das mesmas estão apresentados na TABELA 20.

FIGURA 52 – CURVAS ANALÍTICAS PARA 1-NAFTILAMINA E 2-NAFTILAMINA NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE 0 A $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (n = 5)



FONTE: A autora (2022).

TABELA 20 – PARÂMETROS DE MÉRITO OBTIDOS COM BASE NAS CURVAS ANALÍTICAS

Parâmetro	Analito	
	1-NA	2-NA
Equação da reta	$y = 0,00452x + 0,03428$	$y = 0,00515x + 0,03444$
Coefficiente de correlação de Pearson (r)	0,99663	0,9984
Faixa de concentração linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	25 - 500	25 - 500
LLOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	25	25

LLOQ – limite inferior de quantificação; 1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina.

Uma vez que não há um parâmetro de linearidade pré-estabelecido pelo FDA quanto à validação de métodos bioanalíticos, as linearidades representadas na forma de coeficientes de correlação de Pearson obtidas para 1-NA e 2-NA, superiores a 0,990, são consideradas satisfatórias de acordo com o estabelecido

pela resolução referente da validação de métodos analíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017).

Para ambos os analitos foi observado um LLOQ de $25 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo as razões entre a resposta obtida para o LLOQ e para o calibrante zero de 7,255 e 5,182 para 1-NA e 2-NA, respectivamente. A TABELA 21 apresenta uma comparação dos valores de LLOQ obtidos no presente estudo com demais estudos relatados na literatura.

TABELA 21 – COMPARAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO DESENVOLVIDO COM OS MÉTODOS DA LITERATURA

Técnica Analítica	Preparo de Amostra	Analito	LOD	LOQ	Referência
GC-ECD	LLE Derivatização com HFBA	2-NA	$1 \mu\text{g L}^{-1}$	-	Riffelmann et al. (1996)
GC-MS	LLE Derivatização com PFPI	1-NA 2-NA	$0,05 \text{ ng L}^{-1}$ $0,05 \text{ ng L}^{-1}$	-	Grimmer et al. (2000)
GC-MS	LLE Derivatização com PFPA	1-NA 2-NA	150 ng L^{-1} 75 ng L^{-1}	-	Weiss; Angerer (2002)
GC-MS	LLE Derivatização com PFPA	2-NA	1 ng L^{-1}	3 ng L^{-1}	Riedel et al. (2006)
LC-MS/MS	MIPs-SPE	1-NA 2-NA	5 ng L^{-1} 3 ng L^{-1}	20 ng L^{-1} 10 ng L^{-1}	Yu et al. (2014)
LC-UV	MSPE	1-NA	$1,3 \mu\text{g L}^{-1}$	$4,3 \mu\text{g L}^{-1}$	Jiang et al. (2014)
GC-MS/MS	SPME	1-NA 2-NA	$0,010 \text{ ng L}^{-1}$ $0,012 \text{ ng L}^{-1}$	-	Niu et al. (2018)
GC-MS/MS	SLE	1-NA 2-NA	$1,5 \text{ ng L}^{-1}$ $2,8 \text{ ng L}^{-1}$	-	Mazumder et al. (2019)
LC-MS/MS	MSPE	1-NA 2-NA	$0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$	$0,22 \mu\text{g L}^{-1}$ $0,09 \mu\text{g L}^{-1}$	Yu et al. (2020)
GC-MS/MS	MMSPE Derivatização assistida por micro-ondas com PFPA	1-NA 2-NA	-	$25 \mu\text{g L}^{-1}$ * $25 \mu\text{g L}^{-1}$ *	Presente estudo

Observações: * LLOQ foi determinado no presente estudo.

1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2- naftilamina; GC-ECD – cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons; GC-MS – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas; GC-MS/MS – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas sequencial; HFBA – anidrido heptafluorobutírico; LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial; LC-UV – cromatografia líquida com detecção ultravioleta; LLE – extração líquido-líquido; LLOQ – limite de quantificação inferior; LOD – limite de detecção; LOQ – limite de quantificação; MIPs-SPE – extração em fase sólida com polímero molecularmente impresso; MMSPE – extração em fase sólida com membrana microporosa; MSPE – extração em fase sólida magnética; PFPA – anidrido pentafluoropropiônico; PFPI – 1-(pentafluoropropionil)imidazol; SLE – extração líquida suportada; SPME – microextração em fase sólida.

Embora o LLOQ obtido empregando o método bioanalítico desenvolvido seja superior aos demais apresentados na literatura, o uso de dispositivos de extração baseados em fases sortivas comerciais de baixo custo é uma vantagem quando

comparado a métodos que envolvem dispositivos comerciais de custo elevado, como é o caso para os estudos de Mazumder et al. (2019) e Yu et al. (2014), além de dispensar uma etapa de síntese da fase sortiva, como é necessário para os métodos propostos por Jiang et al. (2014), Niu et al. (2018) e Yu et al. (2020).

Além disso, a MMSPE, como demais técnicas miniaturizadas, envolve o uso de pequenos volumes de solventes orgânicos. Esta é uma vantagem quando comparada a métodos que envolvem técnicas de extração que resultam num maior uso de solventes orgânicos, e por sua vez geram um maior volume de resíduos, como os relatados no estudos de Grimmer et al. (2000), Riedel et al. (2006), Riffelmann et al. (1996) e Weiss; Angerer (2002), que empregam a LLE como técnica de extração.

Dessa forma, considerou-se o método bioanalítico proposto comparável aos demais já estabelecidos, sendo esta uma evidência da aplicabilidade de dispositivos de extração baseados em membranas microporosas de PP para a determinação de aminas aromáticas.

4.4.2 Precisão e exatidão

O método bioanalítico desenvolvido foi avaliado quanto à precisão e exatidão intra-dia através da análise de amostras de urina branco fortificada com os analitos na concentração de $120 \mu\text{g L}^{-1}$ em sextuplicada, enquanto a precisão e exatidão inter-dia foi obtida a partir dos pontos da curva analítica em quintuplicata. Os dados obtidos estão apresentados na TABELA 22, sendo a precisão apresentada em termos de RSD e a exatidão em termos da razão entre a concentração determinada experimentalmente e a concentração nominal em que foi realizada a fortificação.

TABELA 22 – DADOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRA-DIA (n = 6) E INTER-DIA (n = 5)

Concentração do analito ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Analito			
	1-NA		2-NA	
	Precisão (RSD - %)	Exatidão (%)	Precisão (RSD - %)	Exatidão (%)
Ensaio intra-dia (n = 6)				
120	14,36	104,52	9,47	112,71
Ensaio inter-dia (n = 5)				
25 (LLOQ)	10,84	116,71	7,15	118,77
50	13,56	111,08	9,82	114,21
75	7,74	95,46	5,15	98,00
120	7,52	97,95	0,80	99,61
200	8,26	94,38	4,89	107,10
350	8,40	105,20	7,58	111,54
500	13,07	99,83	6,38	113,16

LLOQ – limite inferior de quantificação; 1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina.

A precisão e exatidão intra e inter-dia foram consideradas satisfatórias, uma vez que valores de precisão permaneceram abaixo 20 e 15% para o LLOQ e demais pontos, respectivamente, e os valores de exatidão permaneceram entre 80 e 120% e 85 a 115% para o LLOQ e demais pontos, respectivamente.

4.4.3 Ensaio de recuperação

Ensaio de recuperação foram conduzidos em triplicata na concentração de $120 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo comparadas as respostas entre extratos em que a fortificação foi realizada anteriormente a todas as etapas do preparo de amostra e entre as etapas de dessorção e derivatização.

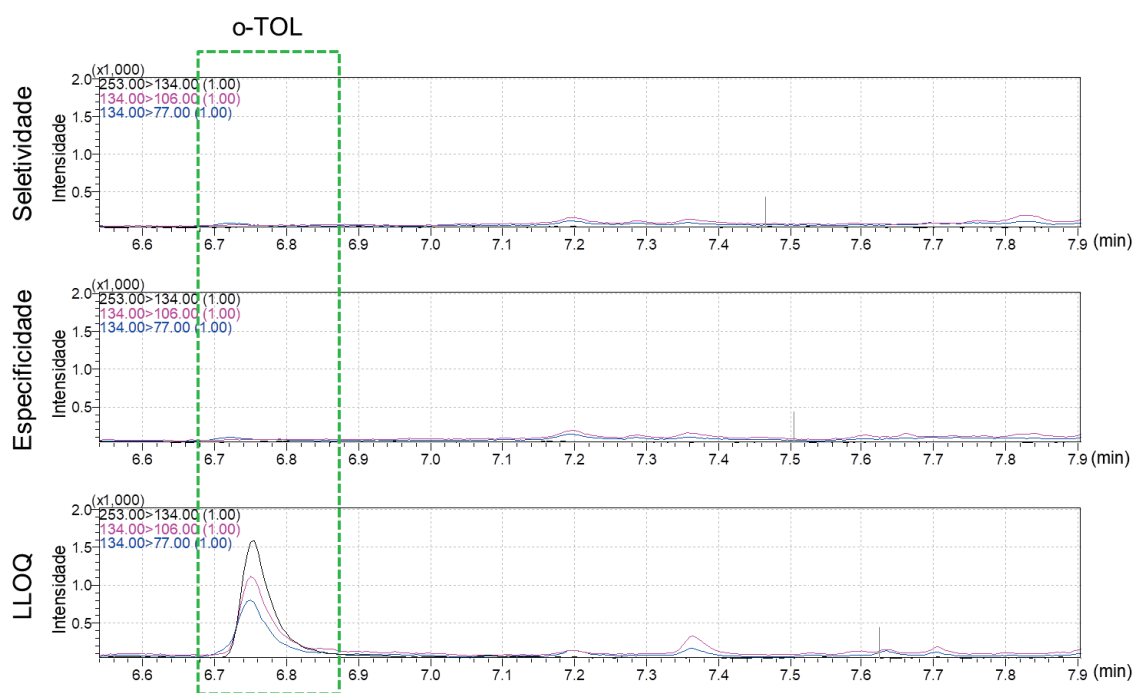
As taxas de recuperação obtidas foram 91,86 e 58,43% para 1-NA e 2-NA, respectivamente. Uma vez que a MMSPE é uma técnica miniaturizada e não exaustiva de extração as taxas de recuperação foram consideradas satisfatórias, principalmente para a 1-NA, no qual a técnica aproximou-se de valores de técnicas exaustivas, ou seja, próximas a 100% de recuperação. Além disso, a recuperação de ambos os analitos foi realizada obtendo-se valores de RSD de 12,76 e 11,73% para 1-NA e 2-NA, respectivamente, permanecendo dentro das orientações estabelecidas pelo FDA.

4.4.4 Seletividade e especificidade

A seletividade do método bioanalítico foi averiguada a partir da análise de seis amostras de urina branco provenientes de voluntários distintos, já a especificidade foi verificada ao se fortificar as mesmas amostras com possíveis interferentes. Os resultados de ambos os ensaios foram avaliados com base na variação na resposta das três transições selecionadas para os analitos e o PI do presente estudo. Sendo assim, tais ensaios foram avaliados do ponto de vista qualitativo.

As FIGURAS 53, 54 e 55 apresentam de forma comparativa os cromatogramas obtidos nos ensaios de seletividade, especificidade e o primeiro ponto dos ensaios das curvas analíticas onde a resposta foi superior a 5 vezes a resposta no calibrante zero para cada um dos analitos e a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ para o PI.

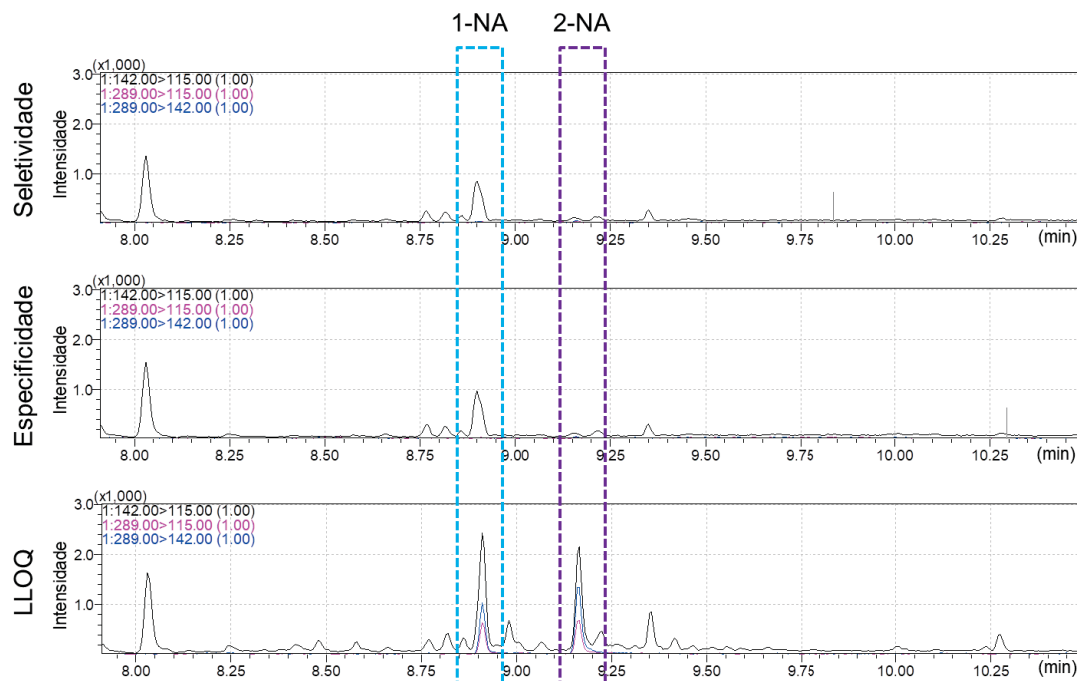
FIGURA 53 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA *o*-TOLUIDINA NOS ENSAIOS DE SELETIVIDADE, ESPECIFICIDADE E FORTIFICAÇÃO A $200 \mu\text{g L}^{-1}$



LLOQ – limite inferior de quantificação, *o*-TOL – *o*-toluidina.

FONTE: A autora (2022).

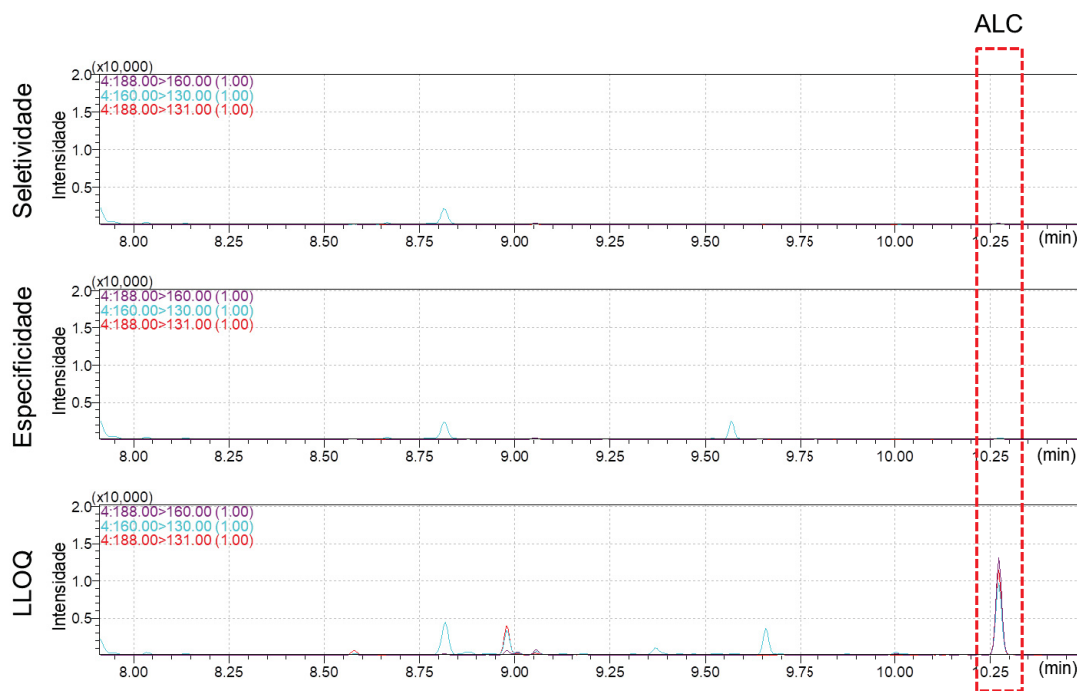
FIGURA 54 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA 1-NAFTILAMINA E 2-NAFTILAMINA NOS ENSAIOS DE SELETIVIDADE, ESPECIFICIDADE E FORTIFICAÇÃO A $25 \mu\text{g L}^{-1}$



LLOQ – limite inferior de quantificação, 1-NA – 1-naftilamina, 2-NA – 2-naftilamina.

FONTE: A autora (2022).

FIGURA 55 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA ALACLORO NOS ENSAIOS DE SELETIVIDADE, ESPECIFICIDADE E FORTIFICAÇÃO A $60 \mu\text{g L}^{-1}$



ALC – alacloro, LLOQ – limite inferior de quantificação.

FONTE: A autora (2022).

Apenas para a 1-NA há indício de um pico interferente, o qual foi eluído no mesmo tempo de retenção do analito e compartilha a transição de quantificação com o mesmo. No entanto, devido à ausência das transições de confirmação da 1-NA para tal pico nos ensaios de seletividade e especificidade, e a identificação dos analitos no modo MRM ser realizada empregando a proporção entre as transições de quantificação e confirmação, é possível afirmar que tal pico não pode ser considerado um interferente. Adicionalmente, o LLOQ adere aos pré-requisitos do FDA, como estabelecido previamente.

Apesar da presença deste pico não afetar a seletividade e especificidade do método conforme os critérios pré-estabelecidos, possivelmente sua observação pode explicar os maiores valores de RSD para a 1-NA quando comparados os valores de RSD obtidos para a 2-NA (TABELA 22, item 4.4.3).

Em relação a o-TOL, apesar de não ter sido obtida uma curva analítica satisfatória na faixa de concentração avaliada, devido à ausência de picos interferentes, há indícios de que o método bioanalítico desenvolvido poderia ser empregado qualitativamente para a identificação desse analito.

4.4.5 Ensaios de estabilidade

Foi conduzida uma série de ensaios de estabilidade da urina *in natura*, urina hidrolisada e do extrato derivatizado, os quais são importantes para garantir que as amostras sejam sempre processadas obedecendo às limitações das amostras e do método. Os resultados obtidos para tais ensaios foram avaliados a partir da aplicação de testes estatísticos, os quais empregaram $\alpha = 0,05$.

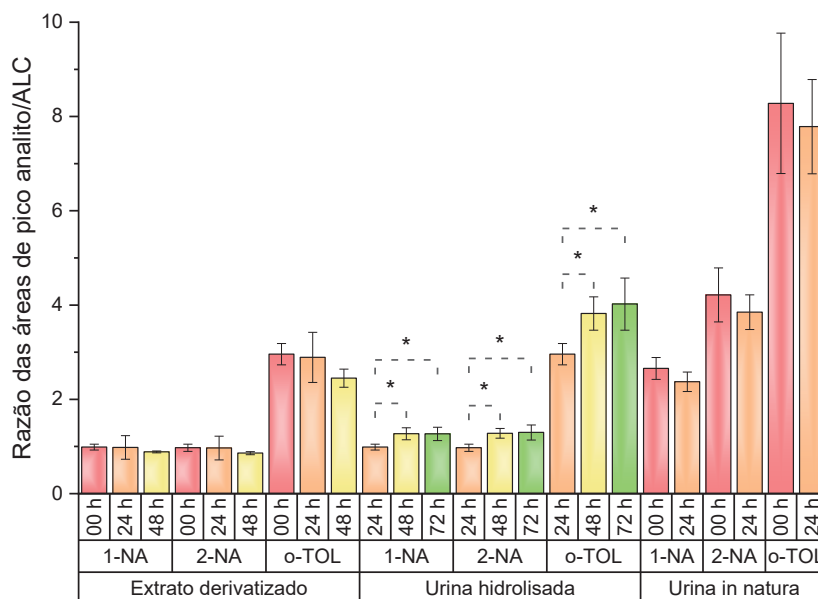
Nos ensaios que contemplaram apenas duas condições experimentais, inicialmente foi aplicado teste F, para verificar diferenças quanto às variâncias, seguido de teste t unicaudal para verificar diferenças quanto às médias, sendo estes testes t presumindo variâncias equivalentes quando F_{calc} é inferior ao F_{tab} e presumindo variâncias diferentes quando F_{calc} é superior ao F_{tab} .

Nos ensaios que envolveram um maior número de condições experimentais, aplicou-se ANOVA, seguida de teste de Tukey quando diferenças significativas puderam ser observadas.

Os ensaios de estabilidade em *freezer* foram realizados com o intuito de verificar por quanto tempo as amostras de urina *in natura*, urina hidrolisada e do

extrato derivatizado poderiam ser armazenadas após a coleta, entre etapas do procedimento de preparo de amostra e entre preparo de amostra e injeção no sistema cromatográfico, respectivamente. Os resultados estão representados na FIGURA 56.

FIGURA 56 – ENSAIOS DE ESTABILIDADE EM *FREEZER* - 5,0 (o-TOL) e 0,5 mg L⁻¹ (1-NA E 2-NA) (n = 4)



ALC – alacloro; 1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina, * - apresentam diferença significativa com 95% de confiança.

FONTE: A autora (2022).

Em relação à urina *in natura* foi avaliado apenas o intervalo de 24 horas, e observou-se que a amostra pode ser considerada estável neste período ($F_{o-TOL} = 2,213$; $F_{1-NA} = 1,258$; $F_{2-NA} = 2,428$; $F_{tab} = 19$; $t_{o-TOL} = 0,551$; $t_{1-NA} = 1,812$; $t_{2-NA} = 1,078$; $t_{tab, variâncias equivalentes} = 1,943$), indicando que após a coleta a amostra pode ser armazenada por pelo menos 24 horas antes de ser submetida ao procedimento de hidrólise.

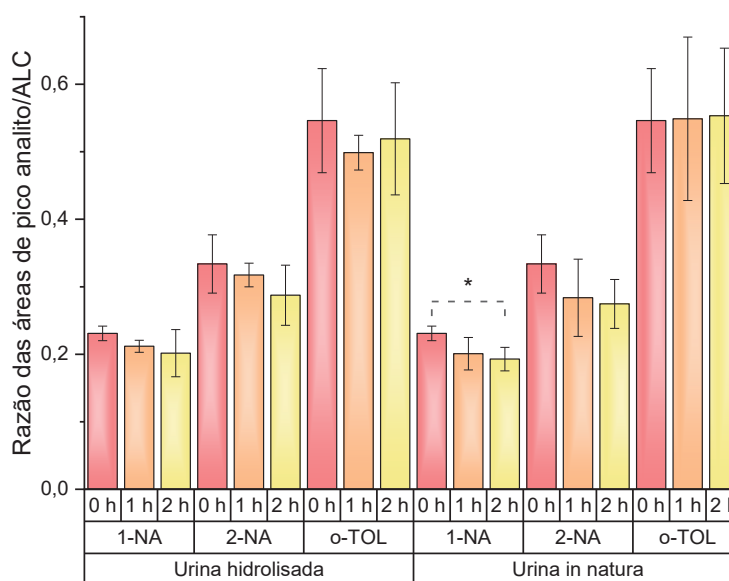
Já para a urina hidrolisada foi observada diferença significativa para todos os analitos entre as respostas para a urina armazenada por 24 horas e as demais condições avaliadas ($F_{o-TOL} = 7,905$; $F_{1-NA} = 7,930$; $F_{2-NA} = 9,618$; $F_{tab} = 4,256$), indicando que a urina hidrolisada pode ser armazenada a -20 °C por um período máximo de 24 horas após o procedimento de hidrólise para garantir a reprodutibilidade do método. Períodos inferiores a 24 horas de armazenamento em

freezer não foram avaliados no presente estudo devido à necessidade da divisão do procedimento experimental em no mínimo dois dias.

Por fim, para o extrato derivatizado, não foi observada diferença significativa entre as respostas das condições avaliadas ($F_{o-TOL} = 2,474$; $F_{1-NA} = 0,582$; $F_{2-NA} = 0,702$; $F_{tab} = 4,256$), de forma que o extrato pode ser considerado estável em *freezer* por pelo menos 48 horas.

Os ensaios de estabilidade em bancada refletem condições ambientes às quais as amostras podem ser submetidas durante o preparo de amostra, sendo tal estudo realizado para verificar a estabilidade das amostras de urina *in natura* e hidrolisada. A estabilidade do extrato derivatizado em bancada não foi avaliada, pois uma vez preparado, este foi imediatamente armazenado em *freezer*. Os resultados obtidos estão representados na FIGURA 57.

FIGURA 57 – ENSAIOS DE ESTABILIDADE EM BANCADA - 5,0 (o-TOL) e 0,5 mg L⁻¹ (1-NA E 2-NA) (n = 4)



ALC - alacloro; 1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina, * - apresentam diferença significativa com 95% de confiança.

FONTE: A autora (2022).

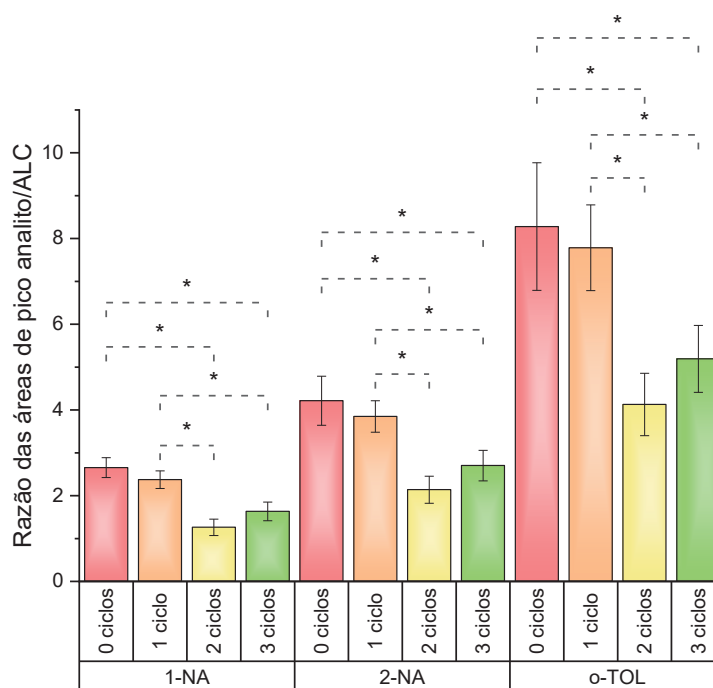
Em relação à urina *in natura*, foi observada uma diferença significativa para a 1-NA ($F_{o-TOL} = 0,005$; $F_{1-NA} = 4,859$; $F_{2-NA} = 1,885$; $F_{tab} = 4,256$) entre a urina que permaneceu 2 horas sobre a bancada e que foi submetida à hidrólise logo após a fortificação. No entanto, não foi observada uma diferença significativa entre as respostas para a urina hidrolisada logo após a fortificação e a urina que permaneceu 1 hora sobre a bancada em condições ambientes, de modo que se considerou que a

urina *in natura* poderia ser manuseada por até 1 hora sem que a resposta dos analitos fosse afetada.

Quanto à urina hidrolisada não foi observada diferença significativa entre as condições avaliadas ($F_{o-TOL} = 0,505$; $F_{1-NA} = 1,879$; $F_{2-NA} = 1,592$; $F_{tab} = 4,256$), de forma que esta pode ser considerada estável por pelo menos 2 horas.

O último ensaio a ser realizado com as amostras de urina *in natura* foram os ensaios de estabilidade em ciclos de congelamento/descongelamento, sendo estes realizados em etapas de aproximadamente 22 horas de congelamento e 2 horas de descongelamento, visando verificar a viabilidade do congelamento e descongelamento de uma única amostra para análise e reanálise. Os resultados obtidos estão representados na FIGURA 58.

FIGURA 58 – ENSAIOS DE ESTABILIDADE EM CICLOS DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO - 5,0 (o-TOL) e 0,5 mg L⁻¹ (1-NA E 2-NA) (n = 4)



ALC - alacloro; 1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina, * - apresentam diferença significativa com 95% de confiança.

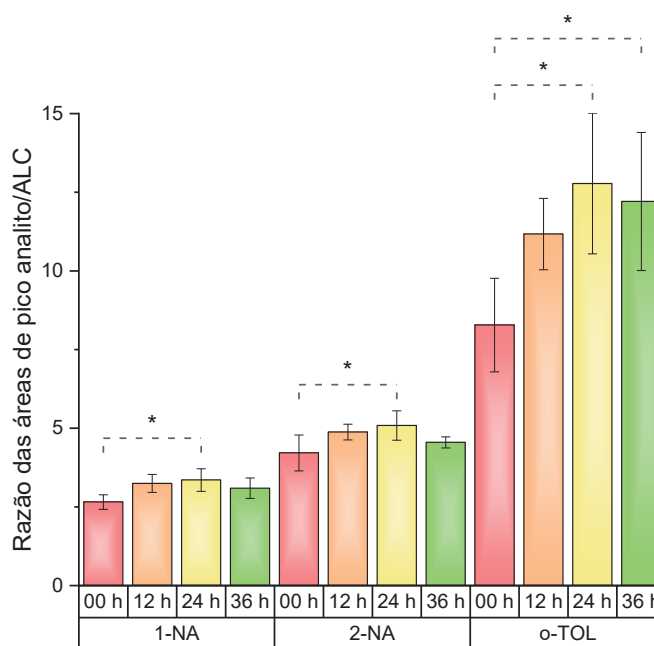
FONTE: A autora (2022).

Foi possível observar uma diferença significativa para todos os analitos ($F_{o-TOL} = 14,759$; $F_{1-NA} = 36,779$; $F_{2-NA} = 21,807$; $F_{tab} = 3,490$), sendo esta observada para as respostas obtidas para a amostra que não passou por congelamento e a que foi submetida a apenas um ciclo de congelamento/descongelamento em relação às respostas para os ensaios envolvendo dois e três ciclos de

congelamento/descongelamento, enquanto entre a amostra que não foi submetida a congelamento e a que passou por apenas um ciclo não foi observada uma diferença significativa. Tal resultado indica que entre o primeiro e o segundo ciclo de congelamento/descongelamento ocorre a degradação das amostras que resulta nessa diferença de resposta para todos os analitos. Desta forma, as amostras de urina *in natura* podem ser congeladas e descongeladas uma única vez, dentro do período de 24 horas avaliado para a execução de um ciclo de congelamento/descongelamento.

O último ensaio de estabilidade realizado refere-se à estabilidade dos extratos derivatizados em autoamostrador, o qual é mantido em condições de temperatura controlada entre 20 e 23 °C, visando refletir por quantas horas os extratos poderiam permanecer em repouso até serem analisados em sistema cromatográfico. Os resultados obtidos são representados na FIGURA 59.

FIGURA 59 – ENSAIOS DE ESTABILIDADE EM AUTOAMOSTRADOR - 5,0 (o-TOL) e 0,5 mg L⁻¹ (1-NA E 2-NA) (n = 4)



ALC - alacloro; 1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2-naftilamina; o-TOL – o-toluidina, * - apresentam diferença significativa com 95% de confiança.

FONTE: A autora (2022).

Com base nos resultados constatou-se uma diferença significativa entre as respostas nas condições avaliadas para todos os analitos ($F_{o-TOL} = 4,811$; $F_{1-NA} = 4,079$; $F_{2-NA} = 3,657$; $F_{tab} = 3,490$). Em relação a o-TOL para as análises realizadas após 24 horas as respostas obtidas foram significativamente diferente quando

comparada à análise inicial, o que pode ser decorrente da evaporação do solvente de ressolubilização dos extratos de forma significativa após 24 horas sob as condições do autoamostrador, resultando no aumento da concentração dos extratos.

Já para a 1-NA e a 2-NA é possível observar que apenas a resposta obtida nas análises após o período de 24 horas foi significativamente diferente à análise realizada imediatamente após o extrato ser inserido no autoamostrador, sendo que entre as análises realizadas imediatamente e após os períodos de 12 e 36 horas não há diferença significativa. Tais resultados podem ser indicativos da evaporação do solvente de ressolubilização dos extratos de forma significativa após 24 horas sob as condições do autoamostrador, similarmente ao observado para o-TOL, e que após o período de 36 horas a 1-NA e a 2-NA sofrem perdas por volatilização ou degradação em uma taxa mais elevada do que esta evaporação do solvente. Desta forma, os extratos devem ser submetidos à análise em sistema cromatográfico em até 12 horas após a sua retirada do *freezer*.

4.5 APLICAÇÃO A AMOSTRAS DE URINA DE FUMANTES PASSIVOS E ATIVOS

O método bioanalítico desenvolvido foi aplicado a amostras de urina de fumantes passivos e ativos após a avaliação preliminar dos parâmetros de mérito do mesmo. Nestes ensaios, foram empregadas alíquotas de amostras provenientes de dois fumantes passivos e dois fumantes ativos, visando à determinação dos analitos. Para as amostras em que não foi possível realizar a determinação dos compostos, e considerando que o FDA não define parâmetros para detecção dos analitos, admitiu-se como critério de detecção no presente estudo: apresentar uma resposta abaixo àquela observada para o LLOQ, porém acima à resposta média observada para o calibrante zero; observação das três transições atribuídas ao analito derivatizado.

Nas amostras de urina de fumantes passivos não foi possível quantificar nenhum dos analitos, porém foi possível detectar todos os analitos envolvidos no presente estudo nas amostras de urina de ambos os voluntários. Já nas amostras de fumantes ativos, a 1-NA foi determinada nas concentrações de $20,98 \mu\text{g } 24 \text{ h}^{-1}$, equivalente a $49,95 \mu\text{g L}^{-1}$ (sexo feminino, consumo médio 10 cigarros por dia) a $89,09 \mu\text{g } 24 \text{ h}^{-1}$, equivalente a $35,64 \mu\text{g L}^{-1}$ (sexo masculino, consumo médio de 30 cigarros por dia), enquanto a o-TOL e a 2-NA foram detectadas em ambas as amostras.

Com base no presente estudo e nos demais estudos relatados na literatura (TABELA 23), é possível afirmar que a concentração destes compostos na urina de fumantes ativos varia consideravelmente.

TABELA 23 – COMPARAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO DESENVOLVIDO COM OS MÉTODOS DA LITERATURA

Técnica Analítica	Preparo de Amostra	Analito	Concentração média na urina de fumantes ativos	Referência
GC-ECD	LLE Derivatização com HFBA	2-NA	3,9 $\mu\text{g L}^{-1}$	Riffelmann et al. (1996)
GC-MS	LLE Derivatização com PFPI	1-NA 2-NA	506,7 ng 24 h ⁻¹ 84,5 ng 24 h ⁻¹	Grimmer et al. (2000)
GC-MS	LLE Derivatização com PFPA	2-NA	20,8 ng 24 h ⁻¹	Riedel et al. (2006)
LC-MS/MS	MIPs-SPE	1-NA 2-NA	67,02 ng 24 h ⁻¹ 47,4 ng 24 h ⁻¹	Yu et al. (2014)
GC-MS/MS	SPME	1-NA 2-NA	97,95 ng L ⁻¹ 80,7 ng L ⁻¹	Niu et al. (2018)
LC-MS/MS	Não informado	1-NA 2-NA	101,6 ng 24 h ⁻¹ 27,9 ng 24 h ⁻¹	Yuki et al. (2018)
LC-MS/MS	MSPE	1-NA 2-NA	189,60 pg mg ⁻¹ de creatinina 416,21 pg mg ⁻¹ de creatinina	Yu et al. (2020)
GC-MS/MS	MMSPE Derivatização assistida por micro-ondas com PFPA	1-NA 2-NA	55,04 $\mu\text{g 24 h}^{-1}$, equivalente a 42,80 $\mu\text{g L}^{-1}$ -	Presente estudo

1-NA – 1-naftilamina; 2-NA – 2- naftilamina; GC-ECD – cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons; GC-MS – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas; GC-MS/MS – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas sequencial; HFBA – anidrido heptafluorobutírico; LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial; LLE – extração líquido-líquido; MIPs-SPE – extração em fase sólida com polímero molecularmente impresso; MMSPE – extração em fase sólida com membrana microporosa; MSPE – extração em fase sólida magnética; PFPA – anidrido pentafluoropropiônico; PFPI – 1-(pentafluoropropionil)imidazol; SPME – microextração em fase sólida.

Apesar das concentrações mais elevadas de 1-NA encontradas no presente estudo quando comparadas aos demais estudos relatados previamente, de acordo com os estudos de Grimmer et al. (2000), Niu et al. (2018), Yu et al. (2014) e Yuki et al. (2018) a 1-NA tende a ser observada em concentrações mais elevadas que a 2-NA na urina de fumantes. Este fator pode ser responsável pela determinação da 1-NA, enquanto a 2-NA pode apenas ser detectada. Assim, as observações realizadas com base no método bioanalítico proposto foram consideradas condizentes com o exposto previamente na literatura.

A partir da aplicação do método bioanalítico proposto em urina de fumantes ativos e passivos, ressalta-se a aplicabilidade da MMSPE para o monitoramento dos biomarcadores de exposição à fumaça de cigarro selecionados no presente estudo, o qual é o primeiro a envolver a determinação de aminas aromáticas em qualquer tipo de matriz e a análise de qualquer tipo de matriz biológica empregando dispositivos de MMSPE.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Utilizando-se da estratégia de pulso de pressão-injeção *splitless*, foi possível desenvolver métodos cromatográficos com respostas mais elevadas para os analitos, com e sem a etapa adicional de derivatização. No entanto, a derivatização com anidrido pentafluoropropiônico se demonstrou eficiente na tarefa de acentuar a resposta dos analitos, permitindo a determinação de analitos em concentrações mais baixas quando comparado ao método sem tal etapa. Dessa forma, essa etapa foi incluída no procedimento de preparo de amostra visando à obtenção de uma maior detectabilidade.

O desenvolvimento de um método de derivatização utilizando forno micro-ondas doméstico como fonte de aquecimento foi um grande avanço na etapa de derivatização. No presente estudo, o tempo necessário para tal etapa foi reduzido significativamente em comparação aos métodos relatados previamente na literatura, os quais empregam no mínimo 30 min para a etapa de derivatização, enquanto o método desenvolvido utiliza apenas 3 min para a derivatização e 1 min para *clean-up*. Dessa forma, é possível afirmar que a frequência analítica foi beneficiada pela condução da derivatização no forno micro-ondas. Adicionalmente, a remoção da piridina do procedimento experimental representa uma melhoria significativa para o preparo de amostra, uma vez que proporciona uma maior segurança para o analista, mais barato e os resíduos gerados apresentam menor toxicidade quando comparados a métodos que empregam este sequestrante de ácido.

Os dispositivos de extração empregando membranas de PP como fase sortiva se demonstraram viáveis para a extração de aminas aromáticas em amostras de urina, evidenciando a aplicabilidade destes para uma gama de compostos aromáticos e matrizes mais ampla do que relatado previamente na literatura. O procedimento de preparo de amostra otimizado pode ser dividido em aproximadamente 70 min de extração e 40 min de dessorção, ressaltando que as etapas de extração e dessorção são realizadas em forma de bateladas de 12 amostras por procedimento. Desse modo, cada amostra requer cerca de 9 min para o procedimento de MMSPE, obtendo-se uma excelente frequência analítica. Adicionalmente, o uso dos dispositivos de MMSPE para extração das aminas aromáticas acarretou um custo de aproximadamente R\$ 0,11 por amostra, refletindo o baixo custo dos dispositivos frente a dispositivos comerciais de SPME.

Em relação à avaliação preliminar dos parâmetros de mérito do método bioanalítico desenvolvido, é possível afirmar que para 1-NA e 2-NA o mesmo apresentou linearidade, precisão, exatidão, seletividade e especificidade satisfatórias, sendo obtido um LLOQ de $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Para a o-TOL não foi possível obter uma curva analítica satisfatória, no entanto, foi possível verificar seletividade e especificidade do método para este analito, fator que atua como indício da sua aplicabilidade de forma qualitativa para a identificação deste analito em amostras de urina de fumantes.

Além disso, os ensaios de estabilidade conduzidos permitiram a obtenção de limites operacionais para o método desenvolvido, sendo verificada a estabilidade de amostras de urina *in natura*, hidrolisada e dos extratos derivatizados em diferentes condições visando à determinação dos três analitos envolvidos no presente estudo.

O método desenvolvido foi aplicado de forma satisfatória a amostras de urina de fumantes passivos e ativos, sendo a 1-NA determinada nas concentrações de 20,98 a $89,09 \mu\text{g 24 h}^{-1}$ nas amostras de fumantes ativos, enquanto a o-TOL e a 2-NA foram identificadas em todas as amostras de fumantes passivos e ativos.

O método bioanalítico descrito no presente estudo também reflete melhorias quanto a metodologias de derivatização que podem ser atingidas ao substituir-se as fontes de aquecimento convencionais, tais como banho termostático, por fontes que permitem o aquecimento do meio reacional de maneira mais homogênea, como fornos micro-ondas. Adicionalmente, o método proposto permitiu a eliminação da piridina do procedimento experimental, o que não havia sido previamente sugerido na literatura. Como resultado, esse método representa uma alternativa com frequência analítica elevada, mais barata que aquelas que empregam dispositivos comerciais de extração e que gera resíduos de menor toxicidade.

Com base em tais considerações, é possível afirmar que o método desenvolvido no presente estudo permitiu uma melhor compreensão das potencialidades de dispositivos de MMSPE empregando membranas microporosas de PP. Este é o primeiro estudo envolvendo o uso da técnica para extração de aminas aromáticas em qualquer tipo de matriz. Além disso, a técnica ainda não havia sido relatada para matrizes biológicas, havendo apenas relatos prévios da sua aplicação a matrizes ambientais. Deste modo, este é o primeiro estudo empregando MMSPE envolvendo análise de urina, um fluido biológico de alta complexidade, bem como o primeiro do tipo focado na avaliação de biomarcadores.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN CANCER SOCIETY INC.; VITAL STRATEGIES. The Tobacco Atlas - Consumption. Disponível em: <<https://tobaccoatlas.org/topic/consumption/>>. Acesso em: 2/5/2019.
- AMORIM, L. C. A. O Uso dos Biomarcadores na Avaliação da Exposição Ocupacional a Substâncias Químicas. • **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, v. 1, n. 2, p. 124–132, 2003.
- ANDRADE-EIROA, A.; CANLE, M.; LEROY-CANCELLIERI, V.; CERDÀ, V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 641–654, 2016a.
- ANDRADE-EIROA, A.; CANLE, M.; LEROY-CANCELLIERI, V.; CERDÀ, V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 655–667, 2016b.
- ANVISA. Resolução RDC n° 166 - Validação de Métodos Analíticos. , 2017.
- AZAD, N. S.; RASOOL, N.; ANNUNZIATA, C. M.; et al. Proteomics in Clinical Trials and Practice. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 1819–1829, 2006.
- BARROS, A. J. D.; CASCAES, A. M.; WEHRMEISTER, F. C.; MARTÍNEZ-MESA, J.; MENEZES, A. M. B. Tabagismo no Brasil: Desigualdades regionais e prevalência segundo características ocupacionais. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, n. 9, p. 3707–3716, 2011.
- BASHEER, C.; ALI ALNEDHARY, A.; RAO, B. S. M.; VALLIYAVEETIL, S.; LEE, H. K. Development and application of porous membrane-protected carbon nanotube micro-solid-phase extraction combined with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 8, p. 2853–2858, 2006.
- BASHEER, C.; LEE, H. K. Hollow fiber membrane-protected solid-phase microextraction of triazine herbicides in bovine milk and sewage sludge samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, n. 2, p. 189–194, 2004.
- BELARDI, R. P.; PAWLISZYN, J. B. The Application of Chemically Modified Fused Silica Fibers in the Extraction of Organics from Water Matrix Samples and their Rapid Transfer to Capillary Columns. **Water Quality Research Journal**, v. 24, n. 1, p. 179–191, 1989.
- BOUCHONNET, S.; KINANI, S.; SOUISSI, Y.; et al. Investigation of the dissociation pathways of metolachlor, acetochlor and alachlor under electron ionization - Application to the identification of ozonation products. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, n. 1, p. 93–103, 2011.
- BOŽOVIĆ, A.; KULASINGAM, V. Quantitative mass spectrometry-based assay development and validation: From small molecules to proteins. **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 444–455, 2013.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

CARPINTEIRO, M. I.; RODRÍGUEZ, I.; CELA, R.; RAMIL, M. Headspace solid-phase microextraction of halogenated toluenes in environmental aqueous samples with polypropylene microporous membranes. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 14, p. 2825–2831, 2009.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. The analytical process to search for metabolomics biomarkers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 341–349, 2018.

CHEMAXON LTD. Chemicalize. Disponível em: <<https://chemicalize.com/>>. Acesso em: 20/5/2019.

COLLINS, C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. SI. **Fundamentos de Cromatografia**. 1ª ed. Editora Unicamp, 2006.

CRC Handbook of Chemistry and Physics. 89ª ed. CRC Press/Taylor and Francis, 2009.

DALMOLIN, S. P.; DREON, D. B.; THIESEN, F. V.; DALLEGRAVE, E. Biomarkers of occupational exposure to pesticides: Systematic review of insecticides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 75, n. 103304, p. 1–11, 2020.

DAMM, M.; RECHBERGER, G.; KOLLROSER, M.; KAPPE, C. O. An evaluation of microwave-assisted derivatization procedures using hyphenated mass spectrometric techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5875–5881, 2009.

DU, M.; MULLINS, B. J.; FRANKLIN, P.; et al. Measurement of urinary 1-aminopyrene and 1-hydroxypyrene as biomarkers of exposure to diesel particulate matter in gold miners. **Science of the Total Environment**, v. 685, p. 723–728, 2019.

DUNN, W. B. Mass spectrometry in systems biology: An introduction. **Methods in Enzymology**, v. 500, p. 15–35, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES - EBSEH. Procedimento Operacional Padrão: Coleta de materiais biológicos - Subunidade de Patologia Clínica. , 2018. EBSEH.

EUROPEAN COMMISSION - EMPLOYMENT; SOCIAL AFFAIRS AND INCLUSION. Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for pyridine. , 2004.

FARAJZADEH, M. A.; NOURI, N.; KHORRAM, P. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 55, p. 14–23, 2014.

FARRÉ, M.; KANTIANI, L.; PETROVIC, M.; PÉREZ, S.; BARCELÓ, D. Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental

samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 86–99, 2012.

FERNÁNDEZ-PERALBO, M. A.; CASTRO, M. D. L. Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 41, p. 75–85, 2012.

FILIPPOU, O.; BITAS, D.; SAMANIDOU, V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 44–62, 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Harmful and Potentially Harmful Constituents in Tobacco Products and Tobacco Smoke: Established List**. 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**. 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION; NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **BEST (Biomarkers, Endpoints, and other Tools) Resource**. 2021.

FREUDENTHAL, R. I.; STEPHENS, E.; ANDERSON, D. P. Determining the potential of aromatic amines to induce cancer of the urinary bladder. **International Journal of Toxicology**, v. 18, n. 5, p. 353–359, 1999.

FULLER, T. W.; ACHARYA, A. P.; MEYYAPPAN, T.; et al. Comparison of Bladder Carcinogens in the Urine of E-cigarette Users Versus Non E-cigarette Using Controls. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 6–11, 2018.

GAO, P.; DA SILVA, E.; HOU, L.; et al. Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolomics perspective. **Environment International**, v. 119, p. 466–477, 2018.

GARG, U. **Clinical Applications of Mass Spectrometry in Drug Analysis: Methods and Protocols**. Nova Iorque: Humana Press, 2016.

GRIMMER, G.; DETTBARN, G.; SEIDEL, A.; JACOB, J. Detection of carcinogenic aromatic amines in the urine of non-smokers. **Science of the Total Environment**, v. 247, n. 1, p. 81–90, 2000.

GROB, K. **Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography**. 4^a ed. Wiley-VCH, 2001.

HEALTH CANADA. **Determination of 1- and 2-Aminonaphthalene and 3- and 4-Aminobiphenyl in Mainstream Tobacco Smoke (T-102)**. 1999.

HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions. **The Analyst**, v. 127, p. 608–613, 2002.

HÜBSCHMANN, H.-J. **Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications**. 2^a ed. Wiley-VCH, 2008.

HÜBSCHMANN, H.-J. **Handbook of GC-MS**. 3^a ed. Wiley-VCH, 2015.

HYDE, A. M.; ZULTANSKI, S. L.; WALDMAN, J. H.; et al. General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. **Organic Process Research & Development**, v. 21, p. 1355–1370, 2017.

HYODO, T. Evaluation of functional relationships for predicting mainstream smoke constituent machine yields for conventional cigarettes from the Japanese market. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 194–224, 2007.

IDE, A. H.; NOGUEIRA, J. M. F. Hollow fiber microextraction: a new hybrid microextraction technique for trace analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 12, p. 2911–2920, 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saúde: 2019 - Percepção do estado de saúde, estilos de vida, doenças crônicas e saúde bucal: Brasil e grandes regiões**. Rio de Janeiro: IBGE, 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **A review of human carcinogens. Part F: Chemical agents and related occupations**. 2012.

JEDDI, M. Z.; HOPF, N. B.; VIEGAS, S.; et al. Towards a systematic use of effect biomarkers in population and occupational biomonitoring. **Environment International**, v. 146, n. 106257, p. 1–18, 2021.

JENNINGS, W.; MITTFELDELT, E.; STREMPLE, P. **Analytical Gas Chromatography**. 2^a ed. Academic Press, Inc., 1997.

JIANG, C.; SUN, Y.; YU, X.; et al. Application of C18-functional magnetic nanoparticles for extraction of aromatic amines from human urine. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 947–948, p. 49–56, 2014.

JURADO-SANCHEZ, B.; BALLESTEROS, E.; GALLEGO, M. Evaluation of stationary phases and gas chromatographic detectors for determination of amines in water. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 3365–3373, 2010.

KARIM, M. M. G.-E.; RAMANUJAM, V. M. S.; LEGATOR, M. S. Trans, trans-muconic acid, an open-chain urinary metabolite of benzene in mice. Quantification by high-pressure liquid chromatography. **Xenobiotica**, v. 15, n. 3, p. 211–220, 1985.

KATAOKA, H. Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 733, n. 1–2, p. 19–34, 1996.

KATAOKA, H. **Amines: Gas Chromatography**. Elsevier Inc., 2014.

KONKLE, S. L.; ZIEROLD, K. M.; TAYLOR, K. C.; et al. National secular trends in ambient air volatile organic compound levels and biomarkers of exposure in the United States. **Environmental Research**, v. 182, n. 108991, p. 1–10, 2020.

LASHGARI, M.; YAMINI, Y. An overview of the most common lab-made coating materials in solid phase microextraction. **Talanta**, v. 191, p. 283–306, 2019.

LESS, M.; SCHMIDT, T. C.; LÖW, E. VON; STORK, G. Gas chromatographic determination of aromatic amines in water samples after solid-phase extraction and derivatization with iodine II. Enrichment. **Journal of Chromatography A**, v. 810, p. 173–182, 1998.

LOPES, D.; MORÉS, L.; DA SILVA, M.; et al. Determination of hormones in urine by hollow fiber microporous membrane liquid–liquid extraction associated with 96-well plate system and HPLC-FLD detection. **Journal of Chromatography B**, v. 1207, p. 1–9, 2022.

LUCERI, F.; PIERACCINI, G.; MONETI, G.; DOLARA, P. Primary Aromatic Amines from Side-stream Cigarette Smoke are Common Contaminants of Indoor Air. **Toxicology and Industrial Health**, v. 9, n. 3, p. 405–413, 1993.

MALBERGIER, A.; OLIVEIRA, H. P. Dependência de tabaco e comorbidade psiquiátrica. **Revista de Psiquiatria Clinica**, v. 32, n. 5, p. 276–282, 2005.

MALTA, D. C.; GOMES, C. S.; SZWARCOWALD, C. L.; et al. Distanciamento social, sentimento de tristeza e estilos de vida da população brasileira durante a pandemia de COVID-19. **Saúde em Debate**, v. 44, p. 177–190, 2021.

MASTRANGELO, A.; FERRARINI, A.; REY-STOLLE, F.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 900, p. 21–35, 2015.

MAZUMDER, S.; AHAMED, R. A.; MCGAHEE, E.; WANG, L.; SEYLER, T. H. A new automated method for the analysis of aromatic amines in human urine by GC-MS/MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 25–35, 2019.

MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF - LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p. 249–262, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hábito de fumar cai em 36% entre os brasileiros. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/43401-habito-de-fumar-cai-em-36-entre-os-brasileiros>>. Acesso em: 2/5/2019.

MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO. **Portaria nº 34/2001**. 2001.

MOGADDAM, M. R. A.; MOHEBBI, A.; PAZHOHAN, A.; KHODADADEIAN, F.; FARAJZADEH, M. A. Headspace mode of liquid phase microextraction: A review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 110, p. 8–14, 2019.

MOLNÁR-PERL, I. **Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography: Methods and Protocols**. Amsterdam: Elsevier, 2005.

MONTES, R.; RODRÍGUEZ, I.; RUBÍ, E.; RAMIL, M.; CELA, R. Suitability of polypropylene microporous membranes for liquid- and solid-phase extraction of

halogenated anisoles from water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1198–1199, n. 1–2, p. 21–26, 2008.

MÜLLER, S.; MÖDER, M.; SCHRADER, S.; POPP, P. Semi-automated hollow-fibre membrane extraction, a novel enrichment technique for the determination of biologically active compounds in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 985, n. 1–2, p. 99–106, 2003.

NG, C. H.; JANOO-GILANI, R.; SIPAHIMALANI, P.; et al. Interaction between organochlorines and the AHR gene, and risk of non-Hodgkin lymphoma. **Cancer Causes and Control**, v. 21, n. 1, p. 11–22, 2010.

NIU, J.; ZHAO, X.; JIN, Y.; et al. Determination of aromatic amines in the urine of smokers using a porous organic framework (JUC-Z2)-coated solid-phase microextraction fiber. **Journal of Chromatography A**, v. 1555, p. 37–44, 2018.

NUTT, D.; KING, L. A.; SAULSBURY, W.; BLAKEMORE, C. Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. **Lancet**, v. 369, n. 9566, p. 1047–1053, 2007.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2650–2656, 1999.

PŁOTKA-WASYLKA, J.; SZCZEPAŃSKA, N.; DE LA GUARDIA, M.; NAMIEŚNIK, J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 73, p. 19–38, 2015.

RAMÍREZ, N.; VALLECILLOS, L.; LEWIS, A. C.; et al. Comparative study of comprehensive gas chromatography-nitrogen chemiluminescence detection and gas chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry for determining nicotine and carcinogen organic nitrogen compounds in thirdhand tobacco smoke. **Journal of Chromatography A**, v. 1426, p. 191–200, 2015.

RANDALL, D. G.; NAIDOO, V. Urine: The liquid gold of wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 2627–2635, 2018.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang and Dale's Pharmacology**. 8th ed. Elsevier Ltd., 2016.

RIEDEL, K.; SCHERER, G.; ENGL, J.; HAGEDORN, H.-W.; TRICKER, A. R. Determination of three carcinogenic aromatic amines in urine of smokers and nonsmokers. **Journal of analytical toxicology**, v. 30, n. 3, p. 187–195, 2006.

RIFFELMANN, M.; MULLER, G.; SCHMIEDING, W.; POPP, W.; NORPOTH, K. Biomonitoring of urinary aromatic amines and arylamine hemoglobin adducts in exposed workers and nonexposed control persons. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 68, n. 1, p. 36–43, 1996.

ROOD, D. **The Troubleshooting and Maintenance Guide for Gas Chromatographers**. 4th ed. Wiley-VCH, 2007.

SABBIONI, G.; CASTAÑO, A.; ESTEBAN LÓPEZ, M.; et al. Literature review and evaluation of biomarkers, matrices and analytical methods for chemicals selected in the research program Human Biomonitoring for the European Union (HBM4EU). **Environment International**, v. 169, n. August, 2022.

SILVA, D. A. R.; PIMENTEL, R. F. W.; MERCES, M. C. Covid-19 and the pandemic of fear: Reflections on mental health. **Revista de Saude Publica**, v. 54, p. 1–2, 2020.

SIMPSON, N. J. K. **Solid-Phase Extractions: Principles, Techniques and Applications**. 1^a ed. Dekker, 2000.

SMALLWOOD, I. M. **Handbook of Organic Solvent Properties**. 1996.

SÖDERHOLM, S. L.; DAMM, M.; KAPPE, C. O. Microwave-assisted derivatization procedures for gas chromatography/mass spectrometry analysis. **Molecular Diversity**, v. 14, p. 869–888, 2010.

STAN, H. J.; KLAFFENBACH, P. Determination of thermolabile urea pesticides after derivatization with HFBA using GC-ECD and confirmation by means of GC-MSD. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 339, p. 40–45, 1991.

STECKLING, N.; GOTTI, A.; BOSE-O'REILLY, S.; et al. Biomarkers of exposure in environment-wide association studies – Opportunities to decode the exposome using human biomonitoring data. **Environmental Research**, v. 164, p. 597–624, 2018.

THEOPHILUS, E. H.; COGGINS, C. R. E.; CHEN, P.; SCHMIDT, E.; BORGERDING, M. F. Magnitudes of biomarker reductions in response to controlled reductions in cigarettes smoked per day: A one-week clinical confinement study. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 225–234, 2015.

TREVIÑO, M. J. S.; PEREIRA-COELHO, M.; LÓPEZ, A. G. R.; et al. How pesticides affect neonates? - Exposure, health implications and determination of metabolites. **Science of the Total Environment**, v. 856, n. July 2022, 2023.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General**. 1^a ed. U.S. Department of Health and Human Services, 2010.

VINEIS, P.; FECHT, D. Environment, cancer and inequalities — The urgent need for prevention. **European Journal of Cancer**, v. 103, p. 317–326, 2018.

VISWANATH, K.; HERBST, R. S.; LAND, S. R.; et al. Tobacco and Cancer: An American Association for Cancer Research Policy Statement. **Cancer Research**, v. 70, n. 9, p. 3419–3430, 2010.

VORKAMP, K.; CASTAÑO, A.; ANTIGNAC, J. P.; et al. Biomarkers, matrices and analytical methods targeting human exposure to chemicals selected for a European human biomonitoring initiative. **Environment International**, v. 146, p. 1–20, 2021.

VORKAMP, K.; ESTEBAN LÓPEZ, M.; GILLES, L.; et al. Coordination of chemical

analyses under the European Human Biomonitoring Initiative (HBM4EU): Concepts, procedures and lessons learnt. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 251, n. 114183, p. 1–11, 2023.

WEISS, T.; ANGERER, J. Simultaneous determination of various aromatic amines and metabolites of aromatic nitro compounds in urine for low level exposure using gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 778, p. 179–192, 2002.

WHO. **Human biomonitoring: facts and figures**. 2015.

YU, J.; WANG, B.; CAI, J.; et al. Selective extraction and determination of aromatic amine metabolites in urine samples by using magnetic covalent framework nanocomposites and HPLC-MS/MS. **RSC Advances**, v. 10, n. 47, p. 28437–28446, 2020. Royal Society of Chemistry.

YU, J.; WANG, S.; ZHAO, G.; et al. Determination of urinary aromatic amines in smokers and nonsmokers using a MIPs-SPE coupled with LC-MS/MS method. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 958, p. 130–135, 2014.

YUKI, D.; TAKESHIGE, Y.; NAKAYA, K.; FUTAMURA, Y. Assessment of the exposure to harmful and potentially harmful constituents in healthy Japanese smokers using a novel tobacco vapor product compared with conventional cigarettes and smoking abstinence. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 96, p. 127–134, 2018.

YUSA, V.; YE, X.; CALAFAT, A. M. Methods for the determination of biomarkers of exposure to emerging pollutants in human specimens. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 38, p. 129–142, 2012.

ZOLLER, O.; RHYN, P.; ZARN, J. A.; DUDLER, V. Urine glyphosate level as a quantitative biomarker of oral exposure. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 228, n. 113526, p. 1–6, 2020.

ZORITA, S.; BARRI, T.; MATHIASSEN, L. A novel hollow-fibre microporous membrane liquid-liquid extraction for determination of free 4-isobutylacetophenone concentration at ultra trace level in environmental aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, n. 1–2, p. 30–37, 2007.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CAAE: 46267121.2.0000.0102
Número do Parecer de Aprovação: 4.785.097

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Bruno José Gonçalves da Silva, professor do Departamento de Química, orientador e pesquisador responsável pelo presente estudo, Andressa Marinho, aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, e Beatriz Isabella Cestaro, aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química – da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, fumante ativo, passivo ou não-fumante a participar de um estudo intitulado "Desenvolvimento de Fases Extratoras Baseadas em Gel para determinação de Aminas Aromáticas em Urina Humana", que consiste no desenvolvimento de métodos analíticos para determinação das aminas aromáticas em urina humana. Estes utilizarão materiais obtidos a partir de fontes renováveis, como casca de laranja e algas, e que são biodegradáveis, representando alternativas com menor impacto ambiental e de baixo custo quando comparadas que outros métodos atualmente utilizados. Futuramente, os métodos desenvolvidos poderão ser aplicados em estudos de biomonitoramento de exposição à fumaça de cigarro e toxicologia.

a) O objetivo desta pesquisa é o desenvolvimento de dispositivos de extração baseados em gel para determinação de aminas carcinogênicas em urina humana.

b) Caso você concorde em participar da pesquisa, será necessário o procedimento de coleta de amostras de urina, onde você coletará toda a urina produzida durante um período de 24 h. Também será necessário o preenchimento de um breve questionário no qual serão solicitados sua idade, gênero, e consumo médio diário de cigarros.

c) Para tanto você deverá comparecer no Laboratório de Cromatografia e Técnicas de Microextração (CroMe), do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, localizado no Centro Politécnico, Av. Cel. Francisco H. dos Santos, 100 - Jardim das Américas, Curitiba - PR, para execução de algumas etapas da sua participação como voluntário. Esta participação será dividida em três etapas: I - orientações de coleta e retirada do frasco de coleta e luvas descartáveis no Laboratório CroMe, que levará cerca de 15 min; II - coleta de urina durante um período de 24 h, que será realizada em seu ambiente residencial, de forma que a primeira urina do dia seja descartada, e o período de 24 h será iniciado a partir da segunda urina do dia - toda a urina eliminada neste período de 24 h deve ser coletada e transferida para o frasco de coleta, sem descarte de jato inicial, e deve permanecer sob refrigeração (geladeira ou em gelo) até o momento de entrega de amostra; III - entrega da amostra de urina (mantida sob refrigeração) dentro de um intervalo de 24 h após o término da coleta no Laboratório CroMe e preenchimento de um questionário breve, o que levará aproximadamente 10 minutos.

d) É possível que você experimente algum desconforto, causado pelo constrangimento ao coletar e transportar a amostra de urina.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal [rubrica]
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE [rubrica]
Orientador [rubrica]

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR | CEP/SD Rua Padre Camargo, 285 | 1º andar | Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 | cometica.saude@ufpr.br – telefone (041) 3360-7259

CAAE: 46267121.2.0000.0102

Número do Parecer de Aprovação: 4.785.097

e) Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser o constrangimento relacionado à realização da coleta, como um breve contato acidental com a urina, e ao transporte da amostra. Para minimizar o desconforto durante a coleta, serão providenciadas luvas descartáveis para você utilizar durante a coleta, assim como os frascos estéreis para a realização da mesma. Adicionalmente, a coleta será realizada em ambiente residencial, para garantir seu conforto durante esta etapa. Para minimizar o constrangimento no transporte da amostra, o frasco de coleta de urina 24 h fornecido será opaco, para impedir a visualização do conteúdo do frasco por terceiros, e será providenciada uma caixa de isopor para o transporte do mesmo, a qual deve ser preenchida com gelo para refrigerar a amostra. Para garantir seu anonimato, a amostra fornecida será prontamente registrada sob um número de identificação que será vinculado às demais informações coletadas, eliminando a vinculação de sua identidade com os resultados obtidos a partir da análise da amostra de urina.

f) O principal benefício esperado com essa pesquisa é o desenvolvimento de protocolos analíticos para determinação dos compostos carcinogênicos em urina humana, os quais poderão ser futuramente empregados em estudos de biomonitoramento de uma importante classe de substâncias prejudiciais à saúde humana em decorrência do uso de cigarro. Não há benefício direto ao participante, entretanto, como benefício indireto, o participante contribuirá em prol da ciência e do desenvolvimento de novos materiais extratores.

g) Os pesquisadores Bruno José Gonçalves da Silva, Andressa Marinho e Beatriz Isabella Cestaro, responsáveis por este estudo poderão ser localizados no Departamento de Química da UFPR, localizado no Campus Centro Politécnico, Avenida Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 100 - Jardim das Américas, Curitiba, no Laboratório do Grupo de Cromatografia e Técnicas de Extração, bruno@quimica.ufpr.br, andressamar4@gmail.com ou beatrizcestaro@gmail.com, 3361-3299 ou 99146-4703 (telefone fixo e celular - Bruno), no horário das 8h às 17h em dias úteis, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

h) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

i) O material obtido – amostras biológicas e questionários – será utilizado unicamente para essa pesquisa e será devidamente descartado ao término do estudo, dentro de 5 anos.

j) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas como os pesquisadores deste estudo, sob forma codificada após o preenchimento do questionário, para que a sua identidade seja preservada e mantida a confidencialidade.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal [rubrica]
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE [rubrica]
Orientador [rubrica]

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR | CEP/SD Rua Padre Camargo, 285 | 1º andar | Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 | cometica.saude@ufpr.br – telefone (041) 3360-7259

CAAE: 46267121.2.0000.0102
Número do Parecer de Aprovação: 4.785.097

k) Você terá a garantia de que quando os dados/resultados obtidos com este estudo forem publicados, não aparecerá seu nome, a menos que seja seu desejo ter sua identidade revelada.

l) As despesas necessárias para a realização da pesquisa, como materiais de coleta e análise de amostra biológica, não são de sua responsabilidade e você não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação. Entretanto, caso seja necessário seu deslocamento até o local do estudo os pesquisadores asseguram o ressarcimento dos seus gastos com transporte (Item II.21, e item IV.3, sub-item g, Resol. 466/2012).

m) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

n) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo e-mail cometica.saude@ufpr.br e/ou telefone 41-3360-7259, das 08:30h às 11:00h e das 14:00h às 16:00h. O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão colegiado multi e transdisciplinar, independente, que existe nas instituições que realizam pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil e foi criado com o objetivo de proteger os participantes de pesquisa, em sua integridade e dignidade, e assegurar que as pesquisas sejam desenvolvidas dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde).

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal [rubrica]
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE [rubrica]
Orientador [rubrica]

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR | CEP/SD Rua Padre Camargo, 285 | 1º andar | Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 | cometica.saude@ufpr.br – telefone (041) 3360-7259

CAAE: 46267121.2.0000.0102
Número do Parecer de Aprovação: 4.785.097

Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e o objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo, voluntariamente, em participar deste estudo.

Curitiba, ___ de _____ de _____

Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal

Eu declaro ter apresentado o estudo, explicado seus objetivos, natureza, riscos e benefícios e ter respondido da melhor forma possível às questões formuladas.

Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR | CEP/SD Rua Padre Camargo, 285 | 1º andar | Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 | cometica.saude@ufpr.br – telefone (041) 3360-7259

APÊNDICE B – MODELO DE REGISTRO DE AMOSTRA DE URINA**REGISTRO DE AMOSTRA**

Número de Identificação: _____ (preenchido pelo pesquisador)

Dados do voluntário:

Idade: _____

Gênero: Feminino
 Masculino
 Não-binário
 Outro: _____
 Prefiro não informar

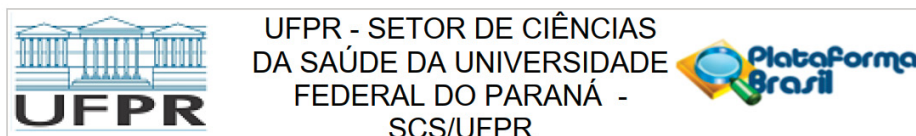
Grupo de voluntários: Fumante ativo
 Fumante passivo
 Não-fumante

Consumo médio diário de cigarros*: _____ cigarros por dia.

*do voluntário fumante ativo ou do coabitante do voluntário fumante passivo

Curitiba, / / .

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR DA SAÚDE DA UFPR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE FASES EXTRATORAS BASEADAS EM GEL PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS EM URINA HUMANA

Pesquisador: BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46267121.2.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de pós graduação em química

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.785.097

Apresentação do Projeto:

O projeto em análise ética tem como título: "DESENVOLVIMENTO DE FASES EXTRATORAS BASEADAS EM GEL PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS EM URINA HUMANA" e está sob responsabilidade do Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva do PPG em Química - UFPR

Projeto a ser desenvolvido a partir do momento da aprovação por este comitê até a data de 31 de agosto de 2023.

Como membros da pesquisa tem-se a inclusão de Andressa Marinho e Beatriz Isabella Cestaro.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo o pesquisador o objetivo do projeto é:

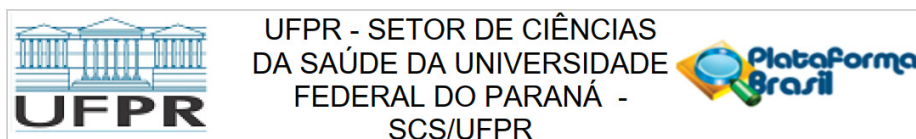
"Desenvolver dispositivos de extração empregando fases sortivas baseadas em gel para determinação de aminas aromáticas carcinogênicas em urina humana por técnicas cromatográficas."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

São riscos e benefícios descritos pelo pesquisador:

"Riscos:

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 4.785.097

Os riscos relacionados à participação nesta pesquisa são mínimos, devido à urina ser coletada de forma não invasiva. Dentre os possíveis riscos podem ser citados um pequeno desconforto e constrangimento relacionados à realização da coleta, assim como o breve contato acidental com a amostra.

Benefícios:

O principal benefício deste projeto é o desenvolvimento de um protocolo analítico para determinação de aminas aromáticas carcinogênicas em urina humana, os quais poderão ser futuramente empregados em estudos de biomonitoramento de uma importante classe de substâncias prejudiciais à saúde humana em decorrência do uso de cigarro. Além disso, os protocolos farão uso, em maioria, de materiais obtidos a partir de fontes renováveis, como casca de laranja e algas, e que são biodegradáveis, representando alternativas com menor impacto ambiental e de baixo custo quando comparadas que outras fases sortivas atualmente utilizadas.

O principal benefício para o voluntário da pesquisa é a satisfação pessoal na contribuição em benefício da ciência e no desenvolvimento de novos materiais extratores e métodos de análise. Houve a inclusão da frase que não haverá benefício direto ao participante"

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador descreve que "o método analítico para determinação de aminas aromáticas em urina de voluntários fumantes passivos e ativos será desenvolvido e validado utilizando amostras de urina branco, fornecida por voluntários não fumantes. Nesta etapa serão otimizados os procedimentos de extração empregando dispositivos lab-made baseados em fases sortivas de gel e também serão otimizados os métodos cromatográficos envolvidos na determinação dos compostos selecionados. Após a validação dos métodos analíticos desenvolvidos, os mesmos serão aplicados a amostras de urina de fumantes passivos e ativos.

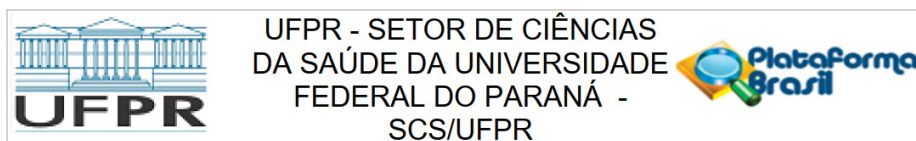
Como critérios de inclusão e exclusão, o pesquisador considera:

"Critério de Inclusão:

Os critérios de inclusão serão distintos para cada grupo de voluntários.

Como critério de inclusão para o grupo dos fumantes ativos, os voluntários devem fazer uso

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar	CEP: 80.060-240
Bairro: Alto da Glória	
UF: PR	Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259	E-mail: cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 4.785.097

regular de cigarros num período mínimo de 7 dias anteriores à coleta de urina.

Para o grupo de fumantes passivos, o critério de inclusão é que os voluntários dividam uma residência com fumantes ativos, o qual deve ter feito uso regular de cigarros convencionais num período mínimo de 7 dias anteriores à coleta de urina do fumante passivo. O critério de exclusão para este grupo é que os voluntários tenham feito uso de produtos de tabaco (ex: narguilé, cigarros eletrônicos, etc) num período mínimo de 30 dias anteriores à coleta de urina.

O grupo de não-fumantes, cujas amostras de urina serão empregadas no desenvolvimento dos métodos analíticos e na avaliação preliminar dos parâmetros de mérito dos mesmos, tem como critérios de inclusão a abstinência de qualquer produto de tabaco num período mínimo de 30 dias anteriores à coleta de urina e a não coabitação com fumantes ativos neste mesmo período.

Critério de Exclusão:

Os critérios de exclusão serão distintos para cada grupo de voluntários.

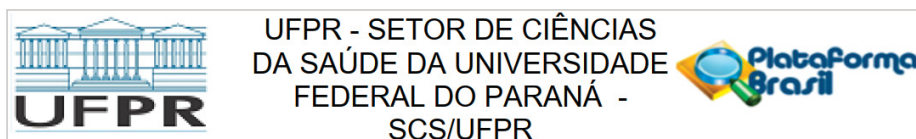
Para o grupo dos fumantes ativos e para o grupo dos não-fumantes não há critérios de exclusão.

O critério de exclusão para o grupo dos fumantes passivos é que os voluntários tenham feito uso de produtos de tabaco (ex: narguilé, cigarros eletrônicos, etc) num período mínimo de 30 dias anteriores à coleta de urina."

Estratégias para o recrutamento

Será estabelecido contato com possíveis voluntários através do e-mail institucional da UFPR do pesquisador principal, convidando alunos matriculados na Graduação e no Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR. Este e-mail também será distribuído pelo Departamento de Química para os demais departamentos e programas de pós-graduação. Neste convite será solicitada a participação voluntária de indivíduos pertencentes a três grupos distintos: fumantes ativos, fumantes passivos e não fumantes. Os esclarecimentos serão apresentados na forma de uma conversa simples, solicitando a participação voluntária de indivíduos usuários de cigarro, para fornecer as amostras reais, explicando de maneira simples e concisa os objetivos do estudo e qual será sua participação no projeto de pesquisa. Serão voluntário será apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e explicado os detalhes do projeto, e com a concordância final do participante, será solicitada a assinatura do TCLE.

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 4.785.097

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando-se que todos os pontos questionados foram esclarecidos e modificações pertinentes ao TCLE foram realizadas a contento, visando a manutenção do caráter ético do projeto, este parecerista é favorável ao desenvolvimento da pesquisa.

Favor inserir em seu TCLE e TALE o número do CAAE e o número do Parecer de aprovação, para que possa aplicar aos participantes de sua pesquisa, conforme decisão da Coordenação do CEP/SD de 13 de julho de 2020.

Após o isolamento, retornaremos à obrigatoriedade do carimbo e assinatura nos termos dos novos projetos.

Qualquer dúvida, retornar e-mail ou pelo WhatsApp 41-3360-7259.

Considerações Finais a critério do CEP:

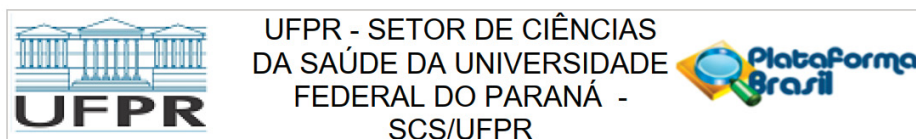
Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Emenda – ver modelo de carta em nossa página: www.cometica.ufpr.br (obrigatório envio).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1745189.pdf	08/06/2021 09:18:44		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projeto_CEP_BJGS_02_corrigido.docx	08/06/2021 09:16:31	BRUNO JOSE GONCALVES DA	Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br



UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -
SCS/UFPR

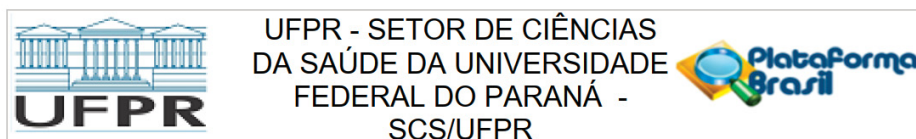
Continuação do Parecer: 4.785.097

Investigador	projeto_CEP_BJGS_02_corrigido.docx	08/06/2021 09:16:31	SILVA	Aceito
Outros	Carta_simples_pendencias_CEP.docx	08/06/2021 09:15:47	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_ESCLARECIDO_03_corrigido.docx	08/06/2021 09:15:28	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_ESCLARECIDO_02.docx	30/04/2021 09:53:00	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_CEP_BJGS_01.docx	29/04/2021 15:55:36	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Check_List_Documental_02122020_ok_assinado_final.pdf	29/04/2021 15:54:34	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_Anuencia_Graduacao.pdf	29/04/2021 15:51:23	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	TERMO_DE_GUARDA_DE_MATERIAL_BIOLOGICO.pdf	29/04/2021 15:49:38	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_COMPROMISSOS_DA_EQUIPE_DA_PESQUISA.pdf	29/04/2021 15:48:40	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	CONCORDANCIA_DOS_SERVICOS_ENVOLVIDOS.pdf	29/04/2021 15:47:45	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	ANALISE_DO_MERITO_CIENTIFICO.pdf	29/04/2021 15:47:04	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Aprovacao_PPGQ_Extraato_Atta_CEP.pdf	29/04/2021 15:46:34	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	CARTA_DE_ENCAMINHAMENTO_DO_PESQUISADOR_AO_CEP.pdf	29/04/2021 15:45:14	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_assinada.pdf	29/04/2021 15:41:48	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 4.785.097

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 16 de Junho de 2021

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br