



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**INVESTIGAÇÃO DE COMPOSTOS CARCINOGÊNICOS EM  
SALIVA HUMANA POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE  
SÓLIDA E DETECÇÃO POR GC-MS**

**NATÁLIA GIANINI SUTÉRIO**

Florianópolis  
Julho/2018



**Natália Gianini Sutério**

**INVESTIGAÇÃO DE COMPOSTOS CARCINOGENICOS EM SALIVA  
HUMANA POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E  
DETECÇÃO POR GC-MS**

Relatório apresentado ao Departamento de Química  
da Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial da disciplina de  
Estágio II (QMC 5512)

---

**Prof<sup>o</sup> Dr. Eduardo Carasek da Rocha**

---

**Ma. Gabriela Mafra**

Florianópolis  
Julho/2018



Este trabalho é dedicado à minha família,  
em especial aos meus pais Ricardo e Elaine  
e minhas irmãs Dalila e Marcela.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, gostaria de agradecer à Deus e aos meus pais por tornar meus estudos possíveis. Às minhas mentoras de laboratório, Sângela Nascimento do Carmo e Gabriela Mafra, que muito devo por toda a paciência e ao meu orientador Professor Dr Eduardo Carasek pela oportunidade e confiança.

Gostaria de agradecer também a todos os meus professores que contribuíram para minha formação não apenas profissional assim como pessoal. Aos meus amigos que me aturaram, apoiaram e me ajudaram nos momentos mais difíceis, em especial a Heloísa Comelli. A minha família que mesmo de longe estavam presentes, em especial minha vó Herondina. À toda a equipe da Dance Ímpar por estar presente no meu dia-a-dia e me apoiar quando necessário. Aos integrantes do laboratório CROMAAS, que sempre estiveram a disposição para me ensinar e sanar minhas dúvidas, em especial às minhas mentoras, ao Josias Merib e a Adriana Neves Dias. E a todos que acompanharam a minha trajetória me dando todo o apoio necessário, em especial minha irmã Dalila Gianini Sutério.

Gostaria também de agradecer ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro que tornou possível essa pesquisa. E a todos os voluntários que doaram suas salivas para às análises.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Amostas Biológicas.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.1 Saliva Humana.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Preparo de amostras.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.1 Microextração em fase sólida.....</b>	<b>20</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1 Materiais e Reagentes.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2 Instrumentação.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3 Preparo das soluções.....</b>	<b>27</b>
<b>4.4 Otimização dos parâmetros que influenciam a eficiência de extração.....</b>	<b>27</b>
<b>4.4.1 Otimização univariada da diluição da saliva.....</b>	<b>27</b>
<b>4.4.2 Otimização multivariada da adição de sal, temperatura e tempo de extração.....</b>	<b>27</b>
<b>4.5 Parâmetros analíticos de mérito.....</b>	<b>30</b>
<b>4.6 Exatidão e precisão do método.....</b>	<b>31</b>
<b>4.7 Aplicação em amostras reais.....</b>	<b>31</b>
<b>4.8 Segurança no trabalho.....</b>	<b>32</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 Ordem de eluição dos analitos.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2 Otimização dos parâmetros que influenciam a eficiência de extração.....</b>	<b>34</b>
<b>5.2.1 Otimização univariada da diluição da saliva.....</b>	<b>34</b>

5.2.2 Otimização multivariada da adição de sal, temperatura e tempo de extração.....	34
5.3 Parâmetros analíticos de mérito.....	36
5.4 Exatidão e precisão do método.....	37
5.5 Aplicação em amostras reais.....	38
5.6 Comparação de estudos escritos na literatura.....	41
6 CONCLUSÃO .....	44
7 REFERÊNCIAS .....	45

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Analitos alvo deste estudo.....	17
<b>Figura 2.</b> Dispositivo SPME constituído por um <i>Holder</i> (A) e uma fibra (B) formando o (C), quando a fibra está acoplada ao <i>Holder</i> .....	21
<b>Figura 3.</b> Modos de extração da SPME: A DI-SPME, B HS-SPME e C MP-SPME..	22
<b>Figura 4.</b> Dessorção da fibra enriquecida com os analitos no injetor do GC.....	23
<b>Figura 5.</b> Respostas obtidas após a otimização univariada da diluição da saliva em 2x, 10x, 20x e em 30x por DI-SPME dos analitos de interesse.....	34
<b>Figura 6.</b> Superfícies de Respostas obtidas após a otimização multivariada do tempo, temperatura e força iônica da extração por DI-SPME com a fibra de PDMS.....	35
<b>Figura 7.</b> Cromatograma 1000 ng.L <sup>-1</sup> . No qual 1 corresponde ao acenaftileno 2 – fluoreno, 3 – fenantreno, 4 – antraceno, 5 – pireno, 6 – benzo(a)antraceno, 7 – criseno, 8 - benzo(b)fluoranteno, 9 - benzo(k)fluoranteno e 10 - benzo(a)pireno.....	41
<b>Equação 1.</b> Equação para obter o numero de experimentos para análise simultânea dos parâmetros que influenciam a extração.....	29
<b>Equação 1.</b> Equação para obter o numero de experimentos para análise simultânea dos parâmetros que influenciam a extração.....	29

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> 16 HPAs considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental Americana e sua classificação segundo a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer.....	16
<b>Tabela 2.</b> Propriedades físico-químicas dos HPAs estudados neste trabalho.....	18
<b>Tabela 3.</b> Algumas fibras de SPME disponíveis comercialmente.....	21
<b>Tabela 4.</b> Razões m/z utilizadas para a determinação dos HPAs por GC-MS (valores em negrito usados para a determinação quantitativa dos analitos).....	26
<b>Tabela 5.</b> Dados estatísticos gerados pelo StatisticaTM.....	28
<b>Tabela 6.</b> Planejamento composto central empregado na otimização da extração de HPAs por DI-SPME.....	30
<b>Tabela 7.</b> Amostras analisadas de doadores em anonimato separados em fumantes e não fumantes.....	32
<b>Tabela 8.</b> Tempo de Retenção dos analitos no GC-FID e no GC-MS.....	33
<b>Tabela 9.</b> Faixa linear, equação linear, coeficiente de correlação, LODs e LOQs obtidos para extração de HPAs em saliva humana (amostra A). Sendo o LOQ definido como o primeiro ponto da curva.....	37
<b>Tabela 10.</b> Recuperação relativa e precisão <i>intraday</i> e <i>interday</i> para determinação de HPAs em saliva humana.....	38
<b>Tabela 11.</b> Concentração dos analitos presentes nas amostras analisadas.....	39
<b>Tabela 12.</b> Comparação do método proposto com estudos previamente reportados na literatura para a determinação de PAHs.....	40
<b>Tabela 13.</b> Porcentagem de semelhança do analito com a base de dados NIST no branco da saliva da amostra A e com fortificação a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de HPAs.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius.

°C.min<sup>-1</sup> – graus Celsius por minuto.

µg mL<sup>-1</sup> – micrograma por mililitro.

DI-SPME – Microextração em fase sólida no modo de imersão direta -, do inglês *Direct Immersion - Solid-Phase Microextraction*.

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*.

EPA – Agência de Proteção Ambiental Americana (em inglês, U.S. Environmental Protection Agency)

EPI – Equipamento de Proteção Individual.

eV – elétron-volts.

FID – Ionização por chama, do inglês *Flame Ionization Detection*.

GC-FID – cromatografia gasosa por detecção por ionização em chama, do inglês *Gas Chromatography by Flame Ionization Detection*.

GC-HRMS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas de alta resolução, do inglês *Gas Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry*.

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, do inglês *Gas Chromatography-mass spectrometry*.

h – hora.

HPAs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

HS-SPME – Microextração em fase sólida no modo headspace, do inglês *Headspace- Solid-Phase Microextraction*.

IARC - Agência Internacional para Pesquisa do Câncer, do inglês *International Agency for Research on Cancer*.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente.

LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*.

LOD – limite de detecção, do inglês *Limit of Detection*.

LOQ – limite de quantificação, do inglês *Limit of Quantification*.

m – metro.

m/v – massa sob volume.

m/z – massa por carga.

mg L<sup>-1</sup> – miligrama por litro.

min – minutos.

mL min<sup>-1</sup> – mililitro por minuto.

mm – milímetro.

MP-SPME – Microextração em fase sólida com proteção por membrana, do inglês *Membrane Protectec- Solid-Phase Microextraction*.

n – número de replicatas.

n/d – não detectado.

ng.L<sup>-1</sup> – nanograma.litro<sup>-1</sup>.

NIST – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, em inglês *National Institute of Standards and Technology*.

PAH – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, do inglês Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.

PDMS – Dimetil polissiloxano, do inglês *Polydimethylsiloxane*.

PTV-GC-qMS – Vaporização de Temperatura programada acoplado a um cromatografo gasoso com detecção com espectrofotômetro de massa quadrupolo.

r – coeficiente de correlação.

RDS – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*.

rpm – rotações por minuto.

RR – Recuperação Relativa, do inglês Relative Recuperation.

SIM – Monitoramento de íon selecionado, do inglês *Selected ion Monitoring*.

SPE – Extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*.

SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid-Phase Microextraction*.

TE-GC-MS – Extração térmica acoplada a cromatografia gasosa-espectrometria de massa.

T<sub>R</sub> – Tempo de Retenção

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina.

## RESUMO

Neste estudo foi proposto o uso de fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) para microextração em fase sólida (SPME) para a extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em saliva humana com detecção por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Os HPAs estudados foram o acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno para o desenvolvimento de uma metodologia para quantificação dos mesmos. Para análise dos parâmetros que influenciam a extração, foi feito um estudo univariado da diluição de saliva com água ultrapura de 2 à 30 vezes. Também foram avaliados simultaneamente a influência da temperatura, tempo de extração e força iônica da solução, utilizando um planejamento do composto central. As condições otimizadas do método foram constituídas por diluição de 30 vezes de saliva, tempo de extração de 50 min a 70° C e não adição de cloreto de sódio. A metodologia desenvolvida foi avaliada por meio de parâmetros analíticos de mérito obtidos pela construção de uma curva de calibração através da fortificação de HPAs em saliva humana. Os limites de detecção e de quantificação variaram de 0,3 a 15,2 ng L<sup>-1</sup> e de 1 a 50 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente. A precisão do método proposto foi avaliado por meio de extrações em amostra de saliva humana, apresentando valores de RDS (%) menores que 31% (n=3). A exatidão do método foi avaliado por estudos de recuperação relativa nos quais obteve-se valores de 72 a 133%. O método desenvolvido foi aplicado em saliva coletadas de doadores fumantes e não fumantes.

*Palavras-chave: HPAs, PDMS, SPME, saliva humana, cromatografia gasosa.*

## 1 Introdução

Atualmente, em decorrência de ações antropogênicas, houve um aumento no nível de poluentes orgânicos presentes no meio ambiente. Dentre esses poluentes, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são considerados poluentes ambientais prioritários devido ao risco que oferecem à saúde humana e aos ecossistemas<sup>1</sup>. Vários componentes desse grupo e seus derivados são capazes de reagir diretamente com o DNA ou, após sofrerem transformações metabólicas, tornando-se potenciais carcinogênicos e eficientes mutagênicos e teratogênicos<sup>2</sup>.

Além disso, os HPAs são considerados desreguladores endócrinos, podendo danificar diretamente um órgão endócrino ou sua função, interagir com um receptor de hormônios ou alterar seus metabolismos<sup>3,4</sup>. Esses compostos são gerados através da combustão incompleta da matéria orgânica, havendo três principais fontes de exposição para seres humanos: ingestão de alimentos ou água contaminada; por inalação ou por contato dérmico<sup>5</sup>.

Diante disso, existe um interesse no desenvolvimento de metodologias para a detecção e quantificação desses compostos em amostras biológicas. O biomonitoramento humano da exposição à maior classe de carcinogênicos químicos, os HPAs, pode servir como um forte indicador da detecção precoce à predisposição ao câncer<sup>6</sup>. Esses compostos são encontrados em baixa concentração em matrizes biológicas e ambientais, sendo necessário uma etapa para pré concentrar esses analitos antes de análises instrumentais. Com a intenção de utilizar uma técnica de preparo de amostra para enriquecer os HPAs para análise que seja menos prejudicial ao meio ambiente, a Microextração em Fase Sólida (SPME, *do inglês Solid-Phase Microextraction*) se torna uma técnica de interesse devido a utilização de pouco ou nenhum solvente orgânico, reduzindo os resíduos gerados pela análise. Com esse objetivo, este estudo propõe o uso da fibra comercial de PDMS para análises por SPME para determinar os níveis dos HPAs em amostras de saliva humana, com intuito de verificar quantidade de exposição desses compostos em grupos de pessoas fumantes e não fumantes.

## 2 Revisão da literatura

### 2.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Os HPAs compõem uma família de compostos caracterizada por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados, constituídos exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio<sup>7,8</sup>. A principal forma de emissão dessas substâncias é por meio da combustão incompleta da matéria orgânica, podendo ter origem natural, através da erupção vulcânica e das queimadas espontâneas, ou pela ação humana através do derramamento de petróleo, queima de combustíveis, produção e aplicação industrial de pesticidas, líquidos refrigerantes, produção e processamento de plásticos, corantes e pigmentos, entre outros<sup>9</sup>.

Há três principais meios de exposição dessas substâncias para os seres humanos: ingestão de alimentos ou água contaminada; inalação ou por contato dérmico<sup>10</sup>. Com isso, tudo em que há combustão incompleta da matéria orgânica e possa ser consumido, inalado ou ter algum tipo de contato dérmico, pode ser transferido ao corpo humano, sendo encontrados quando analisados em amostras biológicas como demonstram estudos realizados por Gruber *et al.* 2017<sup>11</sup>, Singh *et al.* 2008<sup>12</sup>, Beach *et al.*, 2000<sup>13</sup>, Santos *et al.*, 2018<sup>14</sup>, entre outros. A Comissão Europeia estabeleceu níveis máximos para os HPAs em várias matrizes, como por exemplo, em produtos alimentares, no qual os níveis máximos permitidos estão na faixa de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ <sup>15</sup>.

Estudos epidemiológicos e em animais mostraram uma forte ação cancerígena e mutagênica de muitos HPAs. Além disso, os produtos gerados da metabolização de HPAs como produtos da fotooxidação ou produtos de sua mistura com outros poluentes atmosféricos são mais tóxicos do que sua molécula de partida<sup>16,17,18</sup>. A Agência de Proteção Ambiental Americana (em inglês, U.S. Environmental Protection Agency – EPA) lista 16 HPAs como poluentes prioritários por serem considerados carcinogênicos e mutagênicos<sup>19</sup>, como é demonstrado na Tabela 1, além da classificação desses compostos pela IARC e a sua capacidade de produzir efeitos tóxicos e genotóxicos, sobre o material genético (genotoxicidade).

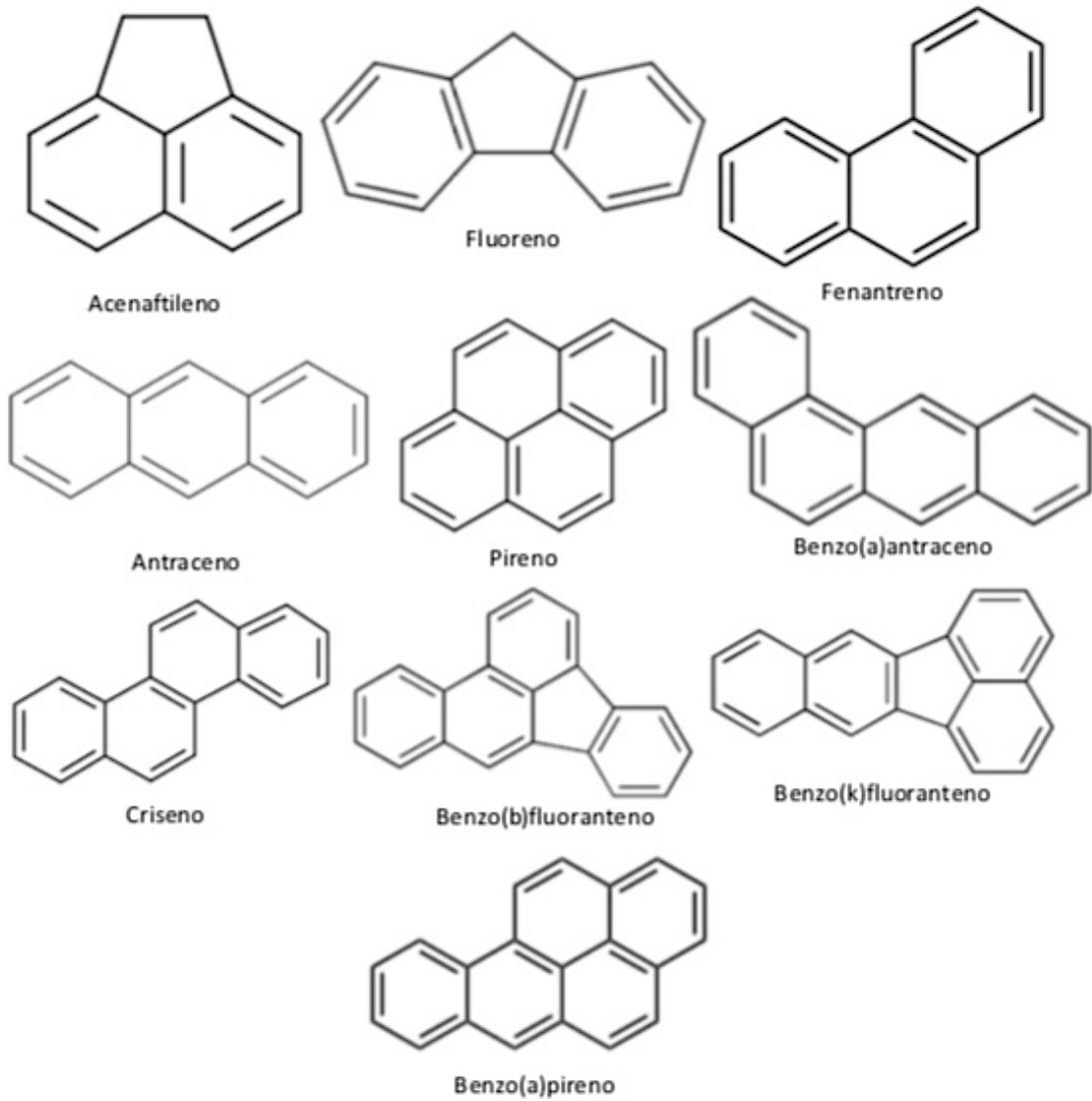
**Tabela 1.** 16 HPAs considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA)<sup>18</sup> e sua classificação segundo a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC)<sup>16</sup>. Fonte: Adaptado 2018 de Singh *et al.*, 2015<sup>20</sup>.

<b>Composto</b>	<b>EPA</b>	<b>Genotoxicidade</b>	<b>IARC</b>
<b>Acenafteno</b>	Prioritário	Questionável	Não avaliado
<b>Acenaftileno</b>	Prioritário	Questionável	Não avaliado
<b>Antraceno</b>	Prioritário	Negativo	3
<b>Benzo(a)antraceno</b>	Prioritário	Positivo	2B
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	Prioritário	Positivo	2B
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	Prioritário	Positivo	2B
<b>Benzo(g,h,i)perileno</b>	Prioritário	Positivo	3
<b>Benzo(a)pireno</b>	Prioritário	Positivo	1
<b>Criseno</b>	Prioritário	Positivo	2B
<b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>	Prioritário	Positivo	2A
<b>Fenantreno</b>	Prioritário	Questionável	3
<b>Fluoranteno</b>	Prioritário	Positivo	3
<b>Fluoreno</b>	Prioritário	Negativo	3
<b>Indeno(1,2,3-cd)pireno</b>	Prioritário	Positivo	2B
<b>Naftaleno</b>	Prioritário	Positivo	2B
<b>Pireno</b>	Prioritário	Questionável	3

1- Carcinogênico, 2A = Possível Carcinogênico para humanos – limitada evidência em humanos e suficiente em animais (IARC); 2B = Possível carcinogênico para humanos - limitada evidência em humanos e insuficiente em animais (IARC); 3 = Não é classificado como carcinogênico para humanos (IARC).

Dentre esses 16 HPAs, o acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno foram estudados em saliva humana, neste trabalho, por ser uma amostra biológica, para o desenvolvimento de uma metodologia para quantificação dos mesmos. A Figura 1 apresenta a estrutura desses compostos estudados enquanto suas propriedades estão descritos na Tabela 2.

**Figura 1.** Estrutura dos HPAs usados como analitos no presente estudo.  
Fonte: Autoria própria (2018).



**Tabela 2.** Propriedades físico-químicas dos HPAs estudados neste trabalho.  
 Fonte: Autoria própria (2018). Dados obtidos de PUBCHEM<sup>21</sup>.

<b>Analitos</b>	<b>Formula Molecular</b>	<b>Massa Molar (g mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ponto de Ebulição (°C)</b>	<b>Log K<sub>ow</sub></b>
Acenaftileno	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	152,19	265-275	3,93
Fluoreno	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	166,22	294	4,18
Fenantreno	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178,23	340	4,5
Antraceno	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178,23	342	4,45
Pireno	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202,25	404	4,88
Benzo(a)antraceno	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228,29	437,6	5,76
Criseno	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228,29	448,0	5,73
Benzo(b)fluoranteno	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,32	481,0	5,78
Benzo(k)fluoranteno	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,32	480,0	6,11
Benzo(a)pireno	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,32	310-312	6,13

## 2.2 Amostras Biológicas

Amostras biológicas são matrizes complexas com diversos constituintes, dentre estes marcadores biológicos como HPAs e interferentes presentes, necessitando de uma etapa de preparo de amostra, para assim, limpar a amostra deixando o analito livre para análise e também evitar danificar o instrumento utilizado para a análise. Na literatura, vários estudos envolvendo diversas matrizes biológicas e diversos analitos já foram reportados, desde a análise de drogas de abuso no suor<sup>22</sup>, cabelo<sup>23</sup>, saliva<sup>24</sup> e seus metabólitos em urina<sup>25</sup> à análise multi-resíduo em filetes de salmão e em tecidos moles dos mexilhões azuis<sup>26</sup>.

### 2.2.1 Saliva

A saliva é um fluido biológico clinicamente informativo, útil para novas abordagens de prognóstico, diagnóstico laboratorial ou clínico, e monitoramento e tratamento de pacientes com doenças tanto orais quanto sistêmicas<sup>27</sup>. Ela pode ser facilmente coletada e armazenada fornecendo uma alternativa barata e não invasiva

aos testes de sangue ou urina<sup>28</sup>. É ideal para a detecção precoce de doenças, pois contém marcadores biológicos solúveis específicos (biomarcadores)<sup>27</sup>.

A saliva é um fluido muito diluído, composto por mais de 99% de água, composta por uma variedade de eletrólitos (cálcio, magnésio, sódio, potássio, cloreto, bicarbonato, fosfato) e várias proteínas, representadas por enzimas, imunoglobulinas e outros fatores antimicrobianos, glicoproteínas da mucosa, traços de albumina e alguns polipeptídeos e oligopeptídeos. Também contém glicose e alguns produtos metabólicos nitrogenados, como ureia e amônia<sup>29</sup>. Esses componentes interagem e são responsáveis pelas várias funções atribuídas à saliva, e podem ser organizadas em 5 categorias principais que servem para manter a saúde bucal e criar um equilíbrio ecológico apropriado: (1) lubrificação e proteção, (2) ação e depuração tamponantes, (3) manutenção da integridade dentária, (4) atividade antibacteriana e (5) sabor e digestão<sup>30</sup>.

### 2.3 Preparo de Amostras

Devido a complexidade das amostras biológicas, o preparo de amostras é uma parte fundamental para análises químicas e biológicas e pode ser considerada uma etapa importante em um procedimento analítico<sup>31</sup>. O principal objetivo de um preparo de amostra é a remoção de possíveis interferentes presentes na matriz, concentração dos analitos e, se necessário, adequação dos analitos para detecção e/ ou separação instrumental<sup>32</sup>. Essa etapa é dependente da interação analito-matriz, exigindo otimização adequada dos parâmetros que influenciam nessa interação para aumentar a eficiência de extração do método aplicado<sup>33</sup>.

Apesar do avanço nas técnicas de separação e quantificação, ainda se utiliza métodos tradicionais de preparo de amostra, tais como extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE, em inglês *Solid-Phase Extraction*)<sup>34</sup>. Apesar de terem alta eficiência de extração, possuem algumas desvantagens por serem métodos laboriosos, que precisam de longos tempos de extração, utilizam alta quantidade de solventes tóxicos e possuem múltiplas etapas que aumentam a chance de perda de analito<sup>31,34</sup>.

Atualmente, estudos estão sendo desenvolvidos para melhoria dessa importante etapa em um procedimento analítico. Nesse sentido, se busca a simplificação, miniaturização e automação desse processo, englobando o uso de

solventes menos tóxicos e procedimentos ecologicamente corretos além da redução do tempo a fim de manter boas eficiências de extração<sup>35</sup>.

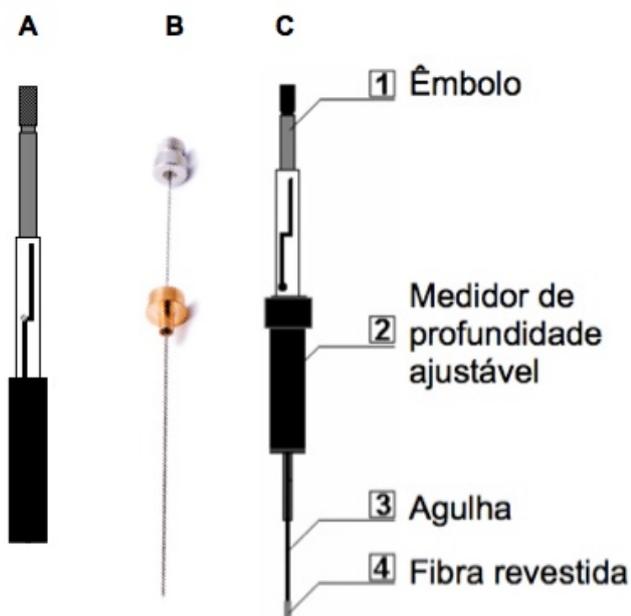
### 2.3.1 Microextração em fase sólida

A microextração em fase sólida (SPME), proposta em 1990 por Pawlisyn e colaboradores<sup>36</sup>, é uma técnica de preparo de amostras livre de solventes. A SPME apresenta vantagens sobre a SPE, como a eliminação de solventes orgânicos extratores e ainda melhora algumas limitações da técnica, como a redução da variação entre os resultados gerados devido a diferença dos fabricantes ou dos lotes de cartuchos de SPE, o tempo de extração pode ser reduzido para alguns minutos<sup>37</sup>.

A SPME é uma técnica não exaustiva, portanto, seu princípio operacional baseia-se no equilíbrio de partição dos analitos entre a matriz da amostra e a fase extratora<sup>34,38</sup>. Para que a extração ocorra, o analito tem que se deslocar da matriz e penetrar o recobrimento da fibra, vencendo a resistência contra a transferência de massa até o equilíbrio<sup>39</sup>. Essa técnica combina amostragem, isolamento e enriquecimento em uma única etapa, minimizando possíveis erros e perdas dos analitos quando comparados aos processos com várias etapas<sup>40,41</sup>.

Para a aplicação da SPME é utilizado um mostrador manual denominado *Holder*, como demonstrado na Figura 2, com o objetivo de auxiliar a exposição e retração da fibra, tendo em vista a fragilidade da mesma. As fibras, com sua respectiva fase extratora - que pode ser um polímero ou um sólido sorvente e é escolhida conforme os analitos que se deseja analisar (Tabela 3) - é inserida nesse amostrador. Com o auxílio do êmbolo na extremidade superior do *Holder*, a fibra pode ser facilmente exposta (Figura 2C) da mesma maneira em que pode ser retraída, no qual a fibra fica protegida dentro da agulha (Figura 2B)<sup>39</sup>.

**Figura 2.** Dispositivo SPME constituído por um *Holder* (A) e uma fibra (B) formando (C), quando a fibra está acoplada ao *Holder*. Fonte: Autoria própria (2018).



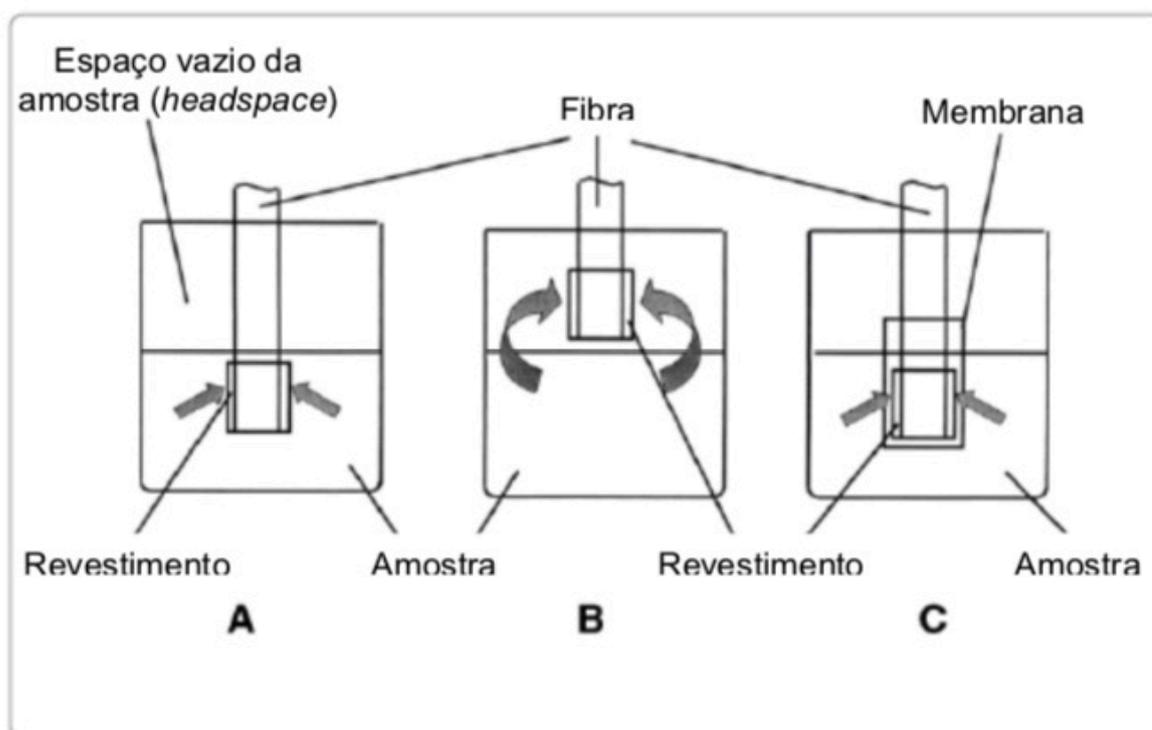
**Tabela 3.** Algumas fibras de SPME disponíveis comercialmente. Fonte: Adaptado 2018 de Valente *et al.*, 1999<sup>39</sup>.

Tipo	Composição Química	Diâmetro da fibra ( $\mu\text{m}$ )	$\Delta T$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	Aplicação sugerida
Não Polares	Polidimetildiloxano (PDMS)	100	200-270	Basicamente com compostos apolares. É possível usar com polares
Polares	Poliacrilato (PA)	85	220 - 310	Medianamente a altamente polares, como pesticidas organofosforados, fenóis.
	Carbowax/divenilbenzeno (CW-DVB)	65	200-260	Cetonas, álcoois. Voláteis de média a alta polaridade.
Bi-Polares	PDMS-DVB	65	200-270	Voláteis a não voláteis de baixa a alta polaridade.
	Carboxen-PDMS	75	-----	Voláteis

A extração pode ser realizada de três maneiras, na primeira a fibra é exposta diretamente na amostra por imersão direta (DI-SPME), no *headspace* da

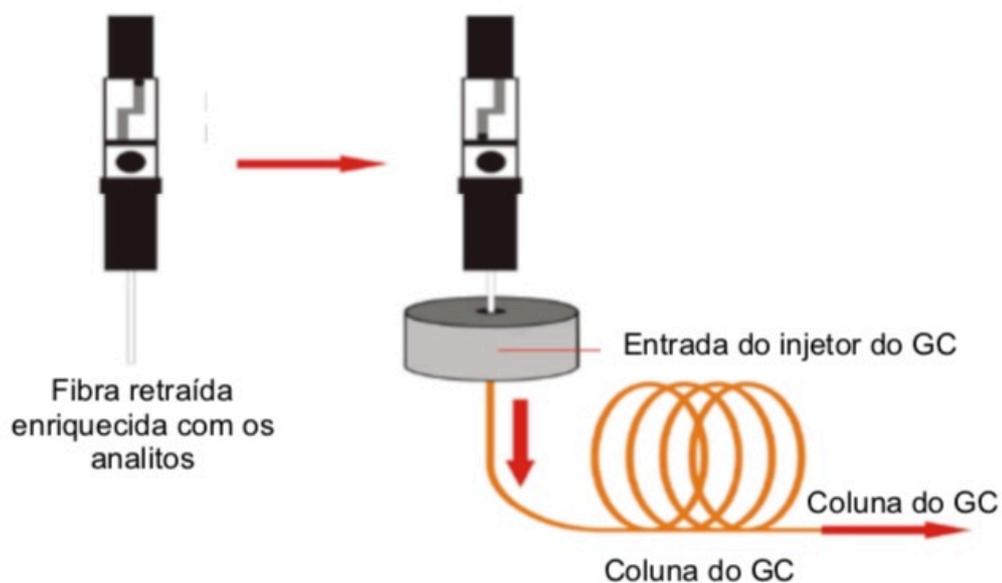
amostra (espaço vazio acima da amostra – HS-SPME) ou por proteção de membrana (MP-SPME)<sup>34</sup>. A Figura 3 ilustra a diferença entre elas. Na DI-SPME, os analitos são transportados diretamente da matriz à fase extratora. A agitação do sistema pode auxiliar na velocidade da extração transportando o analito para a vizinhança da fibra. No modo *headspace*, os analitos precisam vencer a barreira do ar até chegar ao revestimento, sendo recomendados para analitos voláteis. Esse modo protege a fase extratora de ser danificada por interferentes presentes na matriz, permitindo a modificação da matriz para acelerar a extração, como mudança no pH sem danificar a fibra. E por último, na MP-SPME a fibra de SPME é revestida por uma membrana, formando uma barreira seletiva entre a fibra extratora e a matriz da amostra. A membrana protege desse modo a fibra contra possíveis interferentes da amostra, aumentando sua vida útil e a seletividade do método. Esse modo de extração é recomendado quando a amostra apresenta matriz muito complexa<sup>34</sup>.

**Figura 3.** Modos de extração da SPME: **A** DI-SPME, **B** HS-SPME e **C** MP-SPME. Fonte: Adaptado 2018 de Pawliszyn<sup>34</sup>.



Outra vantagem dessa técnica, é a possibilidade da introdução direta em equipamentos analíticos na etapa de dessorção dos analitos, como é demonstrado na Figura 4<sup>34</sup>.

**Figura 4.** Dessorção da fibra enriquecida com os analitos no injetor do GC.  
Fonte: Adaptado 2018 de Schmidt *et al.*, 2015<sup>42</sup>.



A introdução direta no equipamento analítico só é possível devido a ausência do uso de solventes extratores. Isso só ocorre devido a natureza não-volátil da fase extratora, permitindo a introdução apenas dos analitos no instrumento, permitindo a reutilização da fibra extratora e minimizando as etapas em que possibilitam a perda dos analitos<sup>34</sup>.

### 3 Objetivos

#### 3.1. Objetivo Geral

Desenvolver e aplicar uma metodologia que empregue fibras de PDMS como fase extratora para SPME com objetivo de detectar e quantificar HPAs em saliva humana em diferentes grupos de pessoas.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Otimizar as variáveis que influenciam na extração, tais como diluição da saliva, influência da força iônica, temperatura e tempo de extração;
- Construir uma curva de calibração na matriz e determinar os parâmetros analíticos de mérito, tais como faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação ( $r$ ), limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ);
- Verificar a precisão do método através de desvio padrão relativo (RSD%) de ensaios de precisão *intradia* e *interdia*;
- Avaliar a exatidão do método através de recuperação relativa (RR%) dos analitos;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de saliva humana de fumantes e não fumantes.

## 4 Material e métodos

### 4.1. Materiais e Reagentes

Para desenvolver a metodologia proposta foi utilizado uma solução padrão contendo um mix de 13 HPAs (Acenaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Pireno, Benzo(a)antraceno, Criseno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)pireno, Dibenzo(a,h)antraceno, Benzo(g,h,i)pirileno, Indeno(1,2,3-cd)pireno) contendo  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada analito em acetona obtidos da Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Diclorometano e metanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) foram utilizados para preparo da solução estoque. As extrações foram realizadas em fibras de SPME de sílica fundida recobertas com polidimetilsiloxano de  $100 \mu\text{m}$  de espessura (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Para os ensaios de otimização foi utilizada saliva artificial de farmácia de manipulação (Maison de la Santé, Florianópolis, SC, Brasil). As diluições foram realizadas em água ultrapura obtidas pelo sistema de purificação *Mega Purity System* (Billerica, USA). Para avaliar a influência da adição de sal foi utilizado cloreto de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

### 4.2 Instrumentação

As otimizações foram realizadas em um cromatógrafo gasoso Agilent 7820A com detector por ionização em chama (FID) equipado com injetor *split/splitless*. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna capilar Zebron™ ZB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ , Torrence, CA, EUA) contendo 5% fenil-arileno e 95% dimetilpolisiloxano. O gás de arraste empregado foi o nitrogênio em um fluxo constante de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . A temperatura inicial do forno foi de  $80^\circ\text{C}$  (por 1 min), seguido por um aumento de  $6^\circ\text{C min}^{-1}$  até atingir a temperatura de  $300^\circ\text{C}$ , no qual permaneceu por 4 min, completando 41 min de corrida. A injeção foi feita em modo *splitless*, com temperatura do injetor de  $260^\circ\text{C}$  e a dessorção da SPME por 12 min. Para validação e aplicação da metodologia proposta foi utilizado um cromatógrafo gasoso GCMS QP2010 Plus com injetor *split/splitless* e detecção por espectrometria de massas (Shimadzu, Japão). Para a separação cromatográfica foi empregada uma coluna capilar ZB-5MS com dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  (Zebron, Estados Unidos da América). O método cromatográfico utilizado foi baseado em Dias *et al.* 2013<sup>43</sup>. O gás hélio foi empregado como gás de arraste com um fluxo de  $1,78 \text{ mL}$

min<sup>-1</sup>. A temperatura inicial do forno foi de 60°C, por 1min, seguido por um aumento de 8°C min<sup>-1</sup> até atingir a temperatura de 300°C, no qual permaneceu por 7 min, totalizando uma corrida de 38 min. Foi utilizado detector MS com ionização por impacto de elétrons a 70 eV com temperatura na fonte de ionização de 230°C e na interface de 280°C. Os HPAs foram analisados pelo modo SIM (monitoramento de íon selecionado, do inglês, *Selected ion Monitoring*), no qual foram selecionadas três razões massa/carga (m/z) de cada analito analisado como mostrado na Tabela 4. As razões m/z em negrito são referentes as utilizadas para a determinação quantitativa dos analitos.

**Tabela 4.** Razões m/z utilizadas para a determinação dos HPAs por GC-MS (valores em negrito usados para a determinação quantitativa dos analitos). Fonte: Autoria própria (2018).

Analitos	Razão m/z
Acenaftileno	<b>152</b> , 153, 151
Fluoreno	<b>166</b> , 165, 167
Fenantreno	<b>178</b> , 176, 179
Antraceno	<b>178</b> , 179, 176
Pireno	<b>202</b> , 203, 200
Benzo(a)antraceno	<b>228</b> , 226, 229
Criseno	<b>228</b> , 226, 229
Benzo(b)fluoranteno	<b>252</b> , 253, 250
Benzo(k)fluoranteno	<b>252</b> , 253, 250
Benzo(a)pireno	<b>252</b> , 253, 250

### 4.3 Preparo das soluções

A partir do padrão de 500 mg L<sup>-1</sup> contendo o mix de HPAs adquirido pela Supelco, foi preparada uma solução estoque em diclorometano na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>. Com o suporte da solução estoque, foram preparadas, em metanol, soluções diluídas para a execução dos experimentos, nas seguintes concentrações: 10 mg L<sup>-1</sup>, 50 µg L<sup>-1</sup> e 2 µg L<sup>-1</sup>, contendo 10 mL de cada solução diluída.

### 4.4 Otimização das condições que influenciam a eficiência de extração

#### 4.4.1 Otimização univariada da diluição da saliva

Para esse estudo, foi avaliado o efeito da diluição da saliva de 2 a 30 vezes de modo univariado, em triplicata, totalizando 12 experimentos. Dessa forma, com exceção do fator de diluição, todos os outros parâmetros foram mantidos constantes. Primeiramente, a fibra de PDMS foi condicionada termicamente por 1h a 260°C no injetor do cromatógrafo. Em seguida, o volume de saliva artificial necessário para cada diluição foi fortificado com 150 µg L<sup>-1</sup> dos HPAs e um tempo de pré-equilíbrio de 10 min foi adotado em todos os experimentos. Passado esse tempo, terminou-se o preparo da solução de extração, totalizando 10 mL de solução a 5% de NaCl. As extrações foram realizadas em modo DI-SPME por 30 min à 60°C e em agitação magnética constante de 1000 rpm. Os parâmetros que permaneceram constantes durante as extrações foram baseados Coelho *et al.* 2008<sup>44</sup>. A dessorção térmica à 260°C foi realizada diretamente no injetor do cromatógrafo por 12 min.

#### 4.4.2 Otimização multivariada da adição de sal, temperatura e tempo de extração

Foi feito um planejamento com composto central com auxílio do *software* Statistica<sup>TM</sup> (Statsoft, EUA), considerando que foi variado 3 parâmetros simultaneamente em saliva artificial, foi possível gerar dados estatísticos como o descrito na Tabela 5. Os parâmetros utilizados para a otimização multivariada foi a adição de sal (0–20% de NaCl, m/v), temperatura (20–80 °C) e tempo de extração (20–60 min). Ao total foram realizados 17 experimentos, segundo a equação 1, incluindo uma triplicata do ponto central. Com os valores obtidos pela Tabela 5 foi possível fazer um tratamento matemático com a Equação 2 para obter então a Tabela 6 no qual foi utilizado para guiar os experimentos. O tratamento matemático

foi realizado para cada parâmetro avaliado. O preparo das soluções de extração se deu conforme descrito no item 4.4.1 utilizando a condição ótima de diluição da saliva que foi de 30 vezes.

**Tabela 5.** Dados estatísticos gerados pelo Statistica™. Fonte: Autoria própria (2018).

Corrida	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Cloreto (% m/v)
1	-1	-1	-1
2	-1	1	1
3	1	-1	1
4	1	1	-1
5 (C)	0	0	0
6	-1	-1	1
7	-1	1	-1
8	1	-1	-1
9	1	1	1
10 (C)	0	0	0
11	-1,67332	0	0
12	1,67332	0	0
13	0	-1,67332	0
14	0	1,67332	0
15	0	0	-1,67332
16	0	0	1,67332
17 (C)	0	0	0

**Equação 1.** Equação para obter o numero de experimentos para análise simultânea dos parâmetros que influenciam a extração.

$$n = 2^k + 2k + C_p$$

No qual n representa o número de experimentos, k o número de variáveis e  $C_p$  o número de replicatas no ponto central.

**Equação 2.** Equação para obter o numero de experimentos para análise simultânea dos parâmetros que influenciam a extração.

$$x_i = \frac{z_i - \bar{z}}{\frac{\Delta z}{2}}$$

No qual  $x_i$  representa o valor codificado do planejamento dado pelo programa (Tabela 4),  $z_i$  é o valor experimental do nível (incógnita),  $\bar{z}$  é o valor médio entre os níveis máximo e mínimo do parâmetro e  $\Delta z$  é a diferença entre o valor máximo e mínimo.

**Tabela 6.** Planejamento composto central empregado na otimização da extração de HPAs por DI-SPME. Fonte: Autoria própria (2018).

Corrida	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Cloreto (% m/v)
1	32	28	5
2	32	52	17
3	68	28	17
4	68	52	5
5 (C )	50	40	10
6	32	28	17
7	32	52	5
8	68	28	5
9	68	52	17
10 (C )	50	40	10
11	20	40	10
12	80	40	10
13	50	20	10
14	50	60	10
15	50	40	0
16	50	40	20
17 (C )	50	40	10

#### 4.5 Parâmetros analíticos de mérito

A partir dos parâmetros otimizados foi realizada uma curva de calibração por adição de analito em seis níveis de fortificação (n = 3). As amostras de saliva foram

coletadas diretamente num frasco de vidro (aproximadamente 10 mL) a partir de uma voluntária não fumante (amostra A). O preparo das soluções seguiu o protocolo item 4.4.1. Os limites de detecção (LOD) foram calculados através da relação sinal ruído do equipamento e os limites de quantificação foram calculados como 3,3 vezes o valor do LOD obtido.

#### **4.6 Exatidão e precisão do método**

A precisão e exatidão do método foram avaliados através da fortificação dos analitos em amostras de saliva humana da amostra A em diferentes concentrações (1, 50, 250 e 1000 ng L<sup>-1</sup>). A precisão foi calculada através do desvio padrão relativo (RSD), considerando valores aceitáveis aqueles inferiores a 45%, conforme recomenda a literatura<sup>44</sup>. A precisão em termos de repetitividade foi avaliada utilizando três determinações para cada nível fortificado no mesmo dia e a precisão intermediária através de três determinações em três dias diferentes. A exatidão do método foi verificada através de ensaios de recuperação relativa dos analitos, considerando valores aceitáveis aqueles entre 40 e 120%<sup>44</sup>.

#### **4.7 Aplicação em amostras reais**

O método desenvolvido e validado foi aplicado em diversas amostras de saliva (no modo de detecção SIM), as quais foram separadas em dois grupos, conforme indicado na Tabela 7. Todas as amostras utilizadas nesse estudo foram doadas voluntariamente por alguns participantes do grupo de pesquisa em que esse projeto foi desenvolvido.

**Tabela 7.** Amostras analisadas de doadores em anonimato separados em fumantes e não fumantes. Fonte: Autoria própria (2018).

	Amostra A	Amostra B	Amostra C	Amostra D	Amostra E	Amostra F
	21 anos	52 anos	54 anos	27 anos	29 anos	26 anos
<b>Fumantes</b>		X		X		
<b>Não Fumantes</b>	X		X		X	X

#### 4.8 Segurança no trabalho

Algumas das medidas adotadas para minimizar os acidentes de trabalho foram as seguintes: uso de equipamento de proteção individual (EPI), dentre esses calça comprida, sapato fechado, cabelo amarrado, jaleco de algodão e luvas de nitrilo; utilização da capela para o manuseio das soluções estoques, preparação das soluções diluídas e para as análises realizadas no cromatógrafo gasoso.

Todos os resíduos gerados foram classificados como sobras de produtos químicos, por serem resíduos aquosos de baixas concentrações de HPAs, saliva humana e solventes orgânicos. Isto ocorre devido à utilização da SPME, na qual uma das suas maiores vantagens é a utilização de pouco ou até mesmo nenhum solvente orgânico, utilizando a água como solvente para as extrações.

Os resíduos foram encaminhados para serem tratados de acordo com a gestão de resíduos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob o código 160506 segundo a Instrução Normativa nº 13/2012 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA). Em seguida, a empresa Proactiva Meio Ambiente Brasil LTDA, que atualmente pertence ao grupo Veolia, contratada pela UFSC, coleta e armazena os resíduos sob este código temporariamente e os encaminha a empresa Momento Engenharia Ambiental S.A. para o então tratamento e destinação final.

## 5 Resultados e discussão

### 5.1 Ordem de eluição dos analitos

O programa de temperatura adotado foi baseado segundo Dias *et al.* 2013<sup>43</sup> portanto a ordem de eluição foi considerada a mesma, sendo realizado apenas injeções a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  para que, os picos que foram dobrados, foram associados aos analitos, determinando os tempos de retenção ( $T_R$ ) referentes para o GC-FID, enquanto que para o GC-MS foram feitas extrações com fortificação em 5 e  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , resultando na Tabela 8.

**Tabela 8.** Tempo de Retenção dos analitos no GC-FID e no GC-MS. Fonte: Autoria própria (2018).

Ordem de eluição	Analito	$T_R$ (min) GC-FID	$T_R$ (min) GC-MS
1	Acenaftileno	13,461	13,925
2	Fluoreno	16,057	16,119
3	Fenantreno	19,632	19,101
4	Antraceno	19,825	19,266
5	Pireno	24,983	23,497
6	Benzo(a)antraceno	29,654	27,302
7	Criseno	29,779	27,405
8	Benzo(b)fluoranteno	33,629	30,442
9	Benzo(k)fluoranteno	33,629	30,521
10	Benzo(a)pireno	34,553	31,329

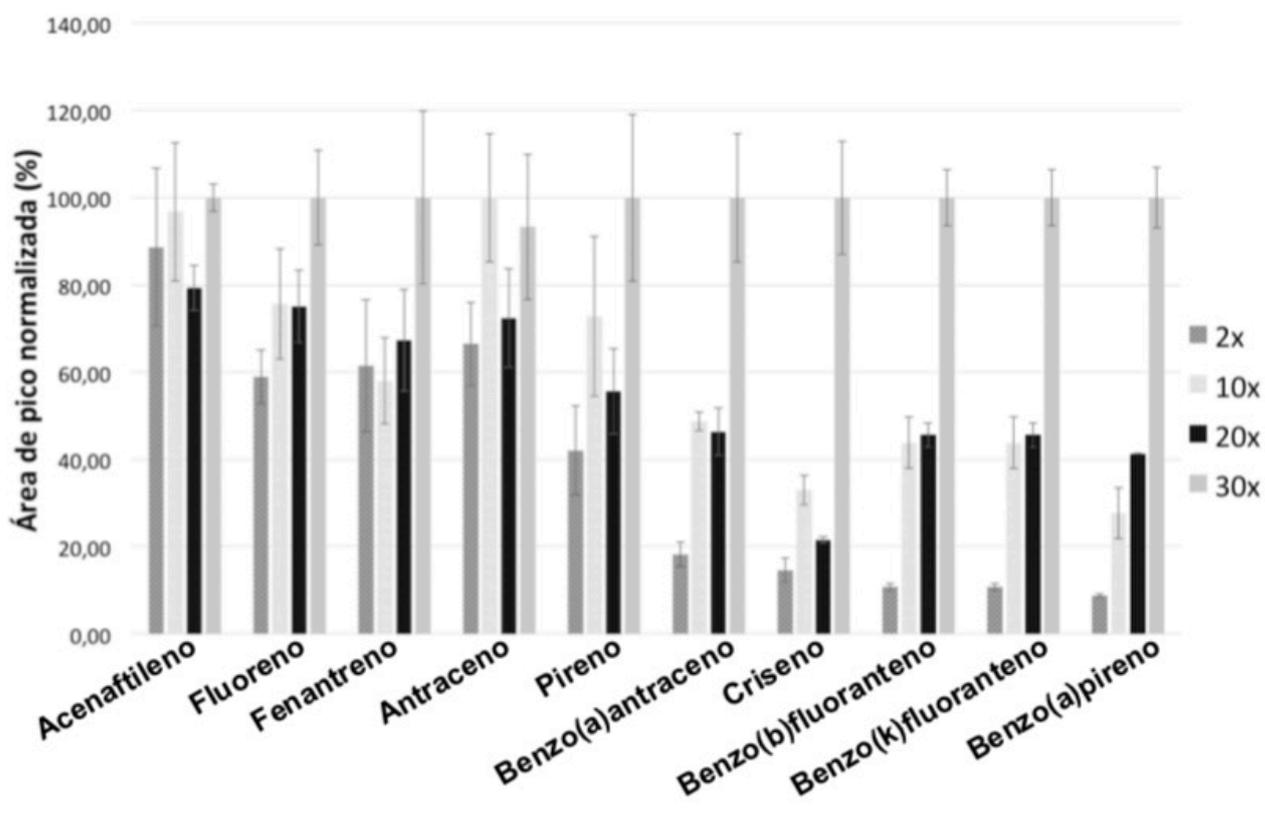
Percebe-se uma pequena diferença nos tempos de retenção dos analitos e conseqüentemente no tempo da corrida dos diferentes equipamentos utilizados; isso ocorre devido a diferença nas rampas de temperatura dos fornos empregados e nos fluxos do gás de arraste, como descrito no item 4.2 desse trabalho.

## 5.2 Otimização dos parâmetros que influenciam a extração

### 5.2.1 Otimização univariada da diluição da saliva

A partir dos resultados gerados em cada diluição (n=3), obteve-se um gráfico de barras, representado na Figura 5, com a área do pico normalizada para cada analito e seus respectivos RSDs.

**Figura 5.** Respostas obtidas após a otimização univariada da diluição da saliva em 2x, 10x, 20x e em 30x por DI-SPME dos analitos de interesse. Fonte: Autoria própria (2018).



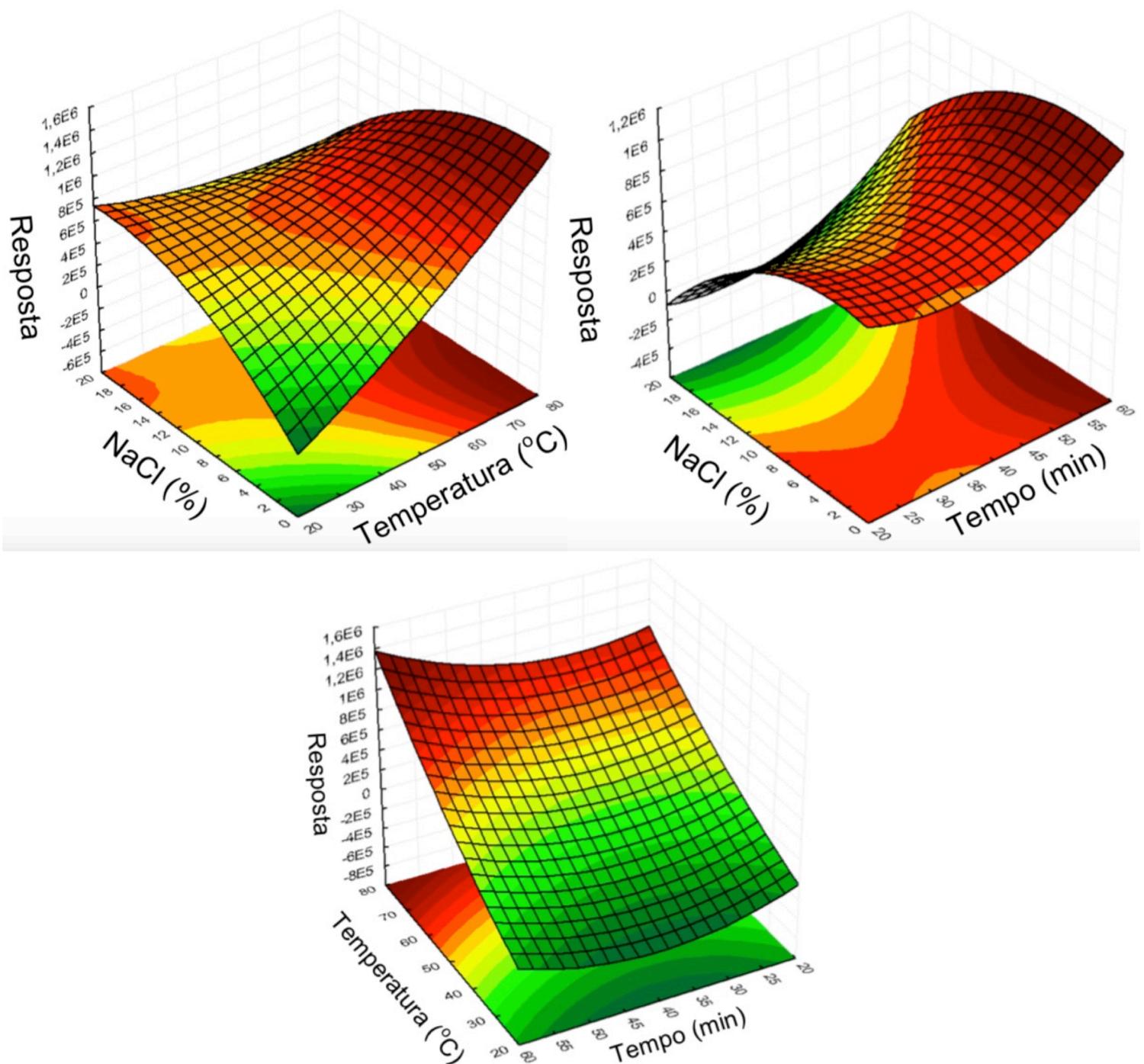
Após sua análise, foi possível observar que quanto maior a diluição da saliva, maior o sinal referente a fortificação dos analitos no cromatograma. Acredita-se que isso deve ocorrer devido ao efeito de matriz que influencia a disponibilidade do analito livre para análise. Portanto definiu-se como diluição ótima a de 30 vezes.

### 5.2.2 Otimização multivariada da adição de sal, temperatura e tempo de extração

Para a otimização do procedimento DI-SPME, foram adotadas as médias geométricas das áreas dos picos cromatográficos correspondentes aos analitos dos 17 experimentos (Tabela 6). A metodologia de superfície de resposta é usada

quando o objetivo é otimizar simultaneamente as variáveis de procedimentos analíticos para obter a melhor performance do sistema, é baseada em funções estatísticas para ajustar uma equação polinomial<sup>46</sup>. Com o auxílio do *software* Statistica™ (Statsoft, EUA), disponibilizado pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) aos alunos, foi possível gerar as superfícies de respostas representadas na Figura 6.

**Figura 6.** Superfícies de Respostas obtidas após a otimização multivariada do tempo, temperatura e força iônica da extração por DI-SPME com a fibra de PDMS. Fonte: Autoria própria (2018).



Através da análise das superfícies de resposta (Figura 6), observa-se que quanto maior a temperatura e o tempo de extração, e menor concentração de sal, maior é a eficiência de extração. A alta temperatura pode ser explicada devido ao efeito de reduzir rapidamente a constante dielétrica da água, facilitando a liberação dos analitos da matriz, aumentando assim a solubilidade dos analitos não polares na água<sup>34</sup>. Ao longo dos experimentos realizados na otimização, constatou-se uma dificuldade referente a utilização do sal, tendo em vista que o sal em altas concentrações entope o liner do cromatógrafo gasoso, além que reduzir a frequência analítica da fibra comercial. Portanto definiu-se como condições ótimas sendo 55 min como tempo de extração que demonstrou um bom particionamento dos analitos na fibra, a temperatura de 70° C e 0% de NaCl (m/v).

### 5.3 Parâmetros analíticos de mérito

Os parâmetros analíticos de mérito (faixa linear de trabalho,  $r$ , LOD e LOQ) foram determinados para avaliar o método desenvolvido e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 9. Os coeficientes de correlação ( $r$ ) das curvas variaram de 0,9906 para o fenantreno a 0,9989 para o benzo(b)fluoranteno, no qual indica um bom grau de associação entre as variáveis  $x$  e  $y$  avaliadas (concentração do analito e área do pico, respectivamente). Para o acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno e pireno o LOQ foi de 1 ng L<sup>-1</sup> enquanto o LOD foi de 0,3 ng L<sup>-1</sup>. Para o benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno o LOQ foi de 50 ng L<sup>-1</sup> enquanto o LOD foi de 15,2 ng L<sup>-1</sup>.

**Tabela 9.** Faixa linear de trabalho, curva analítica, coeficiente de correlação, LODs e LOQs obtidos para extração de HPA's em saliva humana (Amostra A). Fonte: Autoria própria (2018).

<b>Analito</b>	<b>Faixa linear de trabalho (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Curva analítica</b>	<b>r</b>	<b>LOD<sup>a</sup> (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ<sup>b</sup> (ng L<sup>-1</sup>)</b>
Acenaftileno	1 – 1000	$y = 87,79x + 5358$	0,9949	0,026	0,085
Fluoreno	1 – 1000	$y = 121,2x + 12002$	0,9939	0,006	0,018
Fenantreno	1 – 1000	$y = 241,62x + 21203$	0,9906	0,005	0,017
Antraceno	1 – 1000	$y = 305,07x + 18900$	0,9937	0,003	0,011
Pireno	1 – 1000	$y = 1203,3x + 58531$	0,9986	0,002	0,008
Benzo(a)antraceno	50 - 1000	$y = 955,18x - 48962$	0,9970	0,012	0,040
Criseno	50 - 1000	$y = 1242x + 42363$	0,9913	0,006	0,018
Benzo(b)fluoranteno	50 - 1000	$y = 547,57x - 14036$	0,9989	0,015	0,051
Benzo(k)fluoranteno	50 - 1000	$y = 1012,3x + 86822$	0,9912	0,004	0,014
Benzo(a)pireno	50 - 1000	$y = 533,61x + 51359$	0,9859	0,015	0,049

<sup>a</sup> Definido como relação sinal ruído.

<sup>b</sup> Definido pelo 3,3 vezes o valor do LOD.

#### 5.4 Exatidão e precisão do método

Para analisar a exatidão e precisão do método, foi feita a fortificação dos analitos na amostra A, após o tempo de pré-equilíbrio de 10 min, foi feita a diluição para 10 mL de solução e os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 10. A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação relativa dos analitos (RR%) realizados em triplicata (n=3). A precisão foi calculada através do desvio padrão relativo (RSD), sendo a precisão intradia em ensaios em triplicata (n=3) realizados no mesmo dia em três níveis de fortificação e a precisão interdia foi

avaliada em apenas um nível de fortificação (250 ng L<sup>-1</sup>) através de ensaios em triplicata (n=3) realizados em três dias diferentes, totalizando nove extrações (n=9).

**Tabela 10.** Recuperação relativa e precisão intradia e interdia para determinação de HPAs em saliva humana. Fonte: Autoria própria (2018).

Analito	RR (%)			Precisão intradia (%)			Precisão interdia (%)
	LOQ	250	1000	1	250	1000	250
Acenaftileno	107	106	113	20	8	10	6
Fluoreno	110	100	124	12	1	14	4
Fenantreno	100	105	122	23	2	14	7
Antraceno	99	114	121	23	2	20	7
Pireno	95	109	105	22	3	10	20
Benzo(a)antraceno	126	111	95	16	4	15	26
Criseno	95	72	86	7	8	19	26
Benzo(b)fluoranteno	81	105	100	13	12	14	27
Benzo(k)fluoranteno	74	73	105	8	3	16	31
Benzo(a)pireno	133	120	98	4	4	23	27

A recuperação relativa variou de 72 a 133%, excedendo o valor em que foi baseado pela tabela A5 do apêndice F da AOAC (Associação de Químicos Agrícolas Oficiais, do inglês Association of Official Agricultural Chemists) que diz que os valores aceitáveis para faixas trabalhadas em parte por bilhão de 40-120%, porém a faixa de unidade trabalhada é em parte por trilhão, aumentando a tolerância da faixa aceita<sup>44</sup>. Enquanto isso, a precisão intradia obteve um RSD  $\leq$  23% e a precisão interdia obteve um RSD  $\leq$  31% (n=9), todos abaixo dos 45% permitidos pela AOAC.

### 5.5 Aplicação em amostras reais

Foram realizadas análises em triplicatas de cada amostra em modo SIM de detecção, para quantificar os HPAs de interesse neste estudo, como demonstrado na Figura 7. Para averiguar se os picos gerados nas análises são dos analitos de interesse, devida à baixa concentração dos mesmos nas amostras analisadas, foi feita uma comparação por similaridade com o banco de dados de referência padrão (NIST, em inglês, *National Institute of Standards and Technology*) em três níveis de

razão massa/carga descritos na Tabela 4, gerando resultados descritos na Tabela 11. Os resultados encontrados estão descritos na Tabela 12.

**Tabela 11.** Porcentagem de semelhança do analito com a base de dados NIST no branco da saliva das amostras A, B, C, D, E e F e amostra A com fortificação a  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  de HPAs. Fonte: Autoria própria (2018).

<b>Analito</b>	<b>Fortificação em <math>10 \mu\text{g L}^{-1}</math> Amostra A (%)</b>	<b>Amostra A (%)</b>	<b>Amostra B (%)</b>	<b>Amostra C (%)</b>	<b>Amostra D (%)</b>	<b>Amostra E (%)</b>	<b>Amostr F (%)</b>
Acenaftileno	95	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
Fluoreno	90	76	97	97	96	95	97
Fenantreno	94	89	95	95	94	95	94
Antraceno	94	89	94	94	94	95	94
Pireno	95	95	93	93	93	92	n/d
Benzo(a)antraceno	98	97	97	97	96	95	95
Criseno	95	93	94	94	94	93	93
Benzo(b)fluoranteno	97	97	87	87	91	n/d	n/d
Benzo(k)fluoranteno	96	97	92	92	96	88	89
Benzo(a)pireno	92	91	84	84	n/d	n/d	n/d

\*n/d não detectado.

**Tabela 12.** Concentração dos analitos presentes nas amostras analisadas.

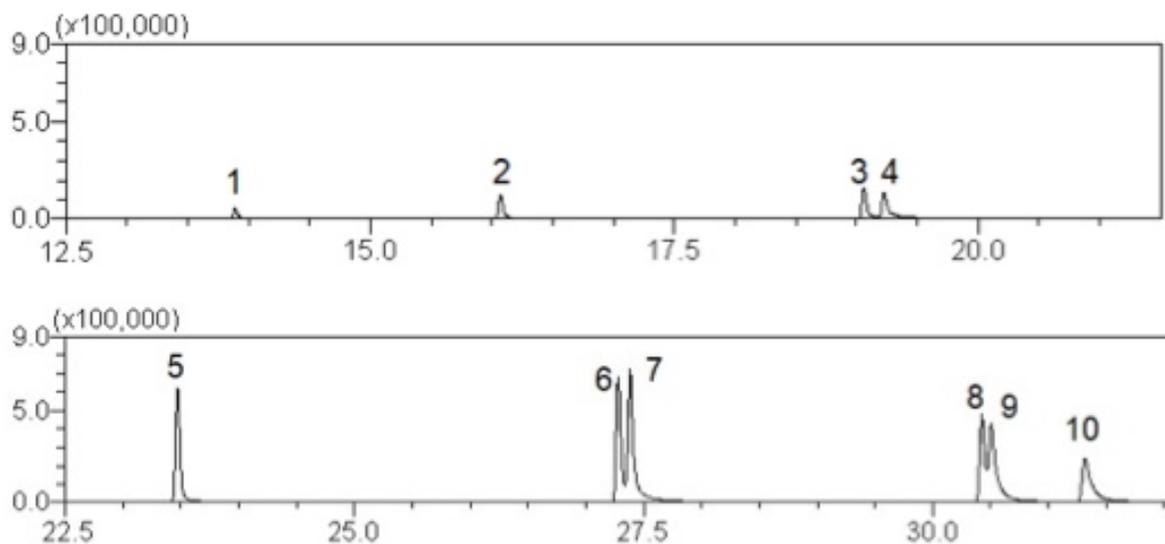
Fonte: Autoria própria (2018).

<b>Analito</b>	<b>Amostra A (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Amostra B (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Amostra C (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Amostra D (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Amostra E (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Amostra F (ng L<sup>-1</sup>)</b>
Acenaftileno	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
Fluoreno	2310	2280	2250	2430	2430	2130
Fenantreno	2100	1920	1860	2100	2010	1680
Antraceno	1350	1020	810	1260	1170	870
Pireno	1260	1110	1140	1200	n/d	1020
Benzo(a)antraceno	1560	1620	1620	1560	1590	1650
Criseno	870	720	660	870	840	720
Benzo(b)fluoranteno	n/d	870	990	n/d	n/d	900
Benzo(k)fluoranteno	2100	2040	1590	2310	2250	2160
Benzo(a)pireno	n/d	2610	n/d	n/d	n/d	n/d

\*n/d não detectado.

Não foi possível observar nenhuma diferença visual entre as amostras coletadas de fumantes e não fumantes, sendo necessário uma análise mais abrangente no qual envolva maior quantidade de pessoas para doar suas salivas. Sem contar que os hábitos diários de cada um influenciam na quantidade de HPAs em que possui na saliva, dentre esse os hábitos alimentares estão diretamente relacionados com a saliva humana.

**Figura 7.** Cromatograma 1000 ng L<sup>-1</sup>. No qual 1 corresponde ao acenaftileno, 2 – fluoreno, 3 – fenantreno, 4 – antraceno, 5 – pireno, 6 – benzo(a)antraceno, 7 – criseno, 8 - benzo(b)fluoranteno, 9 - benzo(k)fluoranteno e 10 - benzo(a)pireno. Fonte: Autoria própria (2018).



### 5.6 Comparação de estudos escritos na literatura

Foi feita uma comparação do método desenvolvido neste estudo com os dados previamente reportados na literatura para a determinação de HPAs em diversas matrizes biológicas e técnicas de análises diferentes como pode ser observado na Tabela 13.

**Tabela 13.** Comparação do método proposto com estudos previamente reportados na literatura para a determinação de HPAs. Fonte: Autoria própria (2018).

Referência	Técnica de extração	Técnica de análise	Matriz	Quantidade de amostra	LOD ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Este estudo	SPME com fibras de PDMS (100 $\mu\text{m}$ )	GC-MS	Saliva humana	333 $\mu\text{L}$	0,0003 <sup>a-e</sup> 0,0152 <sup>f-j</sup>
Cloutier <i>et al.</i> , 2017 <sup>25</sup>	QuEChERS	GC-HRMS	Tecidos biológicos	6 g de amostra	0,053 <sup>a-j</sup> 3,99 <sup>a</sup> 1,01 <sup>b</sup>
SANTO <i>et al.</i> , 2018 <sup>47</sup>	Extração Líquido-Líquido	PTV-GC-qMS	Urina	6 mL	0,69 <sup>c</sup> 1,59 <sup>g</sup> 3,02 <sup>i</sup>
GRUBER <i>et al.</i> , 2017 <sup>11</sup>	Extração Térmica	TE-GC-MS	Sangue capilar	1 $\mu\text{L}$	1,3 <sup>c</sup>
Santos <i>et al.</i> , 2018 <sup>13</sup>	Extração em fase sólida (SPE)	GC-MS	Sangue humano pós-morte	2 mL	20 <sup>c,d,h-j</sup>
Beach <i>et al.</i> , 2000 <sup>12</sup>	Extração Líquido-Líquido	GC-MS	Espécimes de tecido humano	4 g	0,007 <sup>e</sup> 0,003 <sup>f,g</sup>

<sup>a</sup>Acenaftileno; <sup>b</sup>Fluoreno; <sup>c</sup>Fenantreno; <sup>d</sup>Antraceno; <sup>e</sup>Pireno; <sup>f</sup>Benzo(a)antraceno; <sup>g</sup>Criseno; <sup>h</sup>Benzo(b)fluoranteno; <sup>i</sup>Benzo(k)fluoranteno; <sup>j</sup>Benzo(a)pireno.

Como pode-se observar na tabela acima, os LODs do método proposto foram menores quando comparados a outros métodos reportados anteriormente na literatura, exceto quando se trata do benzo(a)antraceno e do criseno quando

contrapostos às análises realizadas em espécimes de tecido humano. Outra vantagem do método desenvolvido é a quantidade de amostra utilizada, tendo em vista que em aplicações bioanalíticas nem sempre está disponível uma grande quantidade de amostra. Como se observa na Tabela 13, a quantidade de amostra utilizada é superior apenas ao método desenvolvido para sangue capilar que possui, devido a isso, um LOD superior.

## 6 Conclusão

Neste estudo foi desenvolvido uma metodologia analítica empregando fibras de PDMS como fase extratora para DI-SPME para a detecção e quantificação de 10 HPAs em saliva humana. O método demonstrou-se eficiente, com bons parâmetros analíticos de mérito, com uma boa precisão e exatidão, levando em consideração de que se trata de uma amostra biológica complexa e pouco explorada na literatura, ótimos limites de detecção que variaram de 0,3 a 15,2 ng L<sup>-1</sup> e de quantificação que variou de 1 a 50 ng L<sup>-1</sup>. Além disso, o método possui como vantagem uso de pouca quantidade de amostra para as análises e o baixo uso de solventes orgânicos, no qual torna a técnica de preparo de amostra mais barata e reduz a quantidade de resíduos perigosos gerados pelas análises.

A ausência de sal nas análises facilita o procedimento experimental, tendo em vista que o sal entope o liner do cromatógrafo gasoso tornando-se um empecilho no momento da dessorção, uma vez que as fibras são sensíveis.

Este é o primeiro estudo relacionando a saliva, uma matriz biológica facilmente coletável como uma técnica não invasiva, com esses analitos, mostrando ser uma matriz pouco explorada porém com um grande potencial, já que este estudo permitiu demonstrar o baixo uso de volume de amostra e a presença dos analitos de interesse em sua forma livre e não apenas em sua forma metabolizada como na urina.

## 7 Referências

<sup>1</sup>Agency for Toxic Substances and Disease Registry - ATSDR. **Toxicology profile for polyaromatic hydrocarbons**. ATSDR's Toxicological Profiles on CD-ROM, CRC Press, Boca Raton, FL, 2005.

<sup>2</sup>DA SILVA, D. S. **HPAs em águas superficiais e efluente hospitalar: degradação por PAOs e desenvolvimento de métodos para determinação de subprodutos**. 2016. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS).

<sup>3</sup>MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos Ecotoxicológicos de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. **Oecologia Brasiliensis**, 11, 188-201, 2007.

<sup>4</sup>DEZOTTI, M.; BILA, D. M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, 30, 651-666, 2007.

<sup>5</sup>NETTO, A. D. P.; BRUM, D. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Tripuí River, Ouro Preto, MG, Brasil. **Journal of Hazardous Materials**, 165, 447-453, 2009.

<sup>6</sup>IFEGWU, O. C.; ANYAKORA C. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Part II, Urine Markers. Elsevier, 75, 159-183, 2016.

<sup>7</sup>ZHANG, H.; XUE, M.; DAI, Z. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic products by HPLC-fluorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, 23, 469-474, 2010.

<sup>8</sup>MENZIE, C. A.; POTOCKI, B. B.; SANTODONATO, J. *Exposure to carcinogenic PAHs in the environment*. **Environmental Science Technology**, 26. n. 7., 1278-1284, 1992.

<sup>9</sup>WEGENER, J.W.M.; VAN SCHAİK, M.J.M.; AIKING, H. *Active biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons by means of mosses*. **Environmental Pollution**, 76, 1-15, 1992.

<sup>10</sup>NETTO, A. D. P.; BRUM, D. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Tripuí River, Ouro Preto, MG, Brasil. **Journal of Hazardous Materials**, 165, 447-453, 2009.

<sup>11</sup>GRUBER, B.; SCHNEIDER, J; FÖHLINGER, M.; BUTERS, J.; ZIMMERMANN, R.; MATUSCHEK, G. A minimal-invasive method for systemic bio-monitoring of the environmental pollutant phenanthrene in humans: Thermal extraction and gas chromatography – mass spectrometry from 1 mL capillary blood. **Journal of Chromatography A**, 1487, 254–257, 2017.

<sup>12</sup>SINGH, V.K.; PATEL, D.K.; RAM, S.; MATHUR, N.; SIDDIQUI, M.K.; BEHARI, J.R. Blood levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in children of Lucknow, India, Arch. **Environmental Contamination Toxicology**. 54, 348–354, 2008.

<sup>13</sup>BEACH, J. B.; PELLIZZARI, E.; Keever, L. T.; ELLIS, T. Determination of Benzo[a]pyrene and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) at Trace Levels in Human Tissues. **Journal of Analytical Toxicology**, 2000.

<sup>14</sup>SANTOS, P. M.; SÁNCHEZ, M. N.; PAVÓN, J. L. P.; CORDERO; B. M. Quantitative and qualitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine samples using a non-separative method based on mass spectrometry. **Talanta**, 181, 373–379, 2018.

<sup>15</sup>NIKOLAOU, K., MASCLLET, P. and MOUVIER, G. *Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere – a critical review*. **The Science of the Total Environment**, 32, 103-132, 1984.

<sup>16</sup>Commission Regulation (EU) n° 835/2011. As regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. **Official Journal of the European Union** 2011.

<sup>17</sup>International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France: **Polynuclear aromatic compounds, Part 1: Chemical, environmental, and experimental data**. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 32, 1983.

<sup>18</sup>International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France. **Polynuclear aromatic compounds, Part 1: Chemical, environmental, and experimental data**.

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 33, 1984.

<sup>19</sup>U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Risk Assessment Forum. **Guidelines for Ecological Risk Assessment**. Washington, DC. Abril 1998.

<sup>20</sup>SINGH, L.; VARSHNEY, J. G.; AGARWAL, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons formation and occurrence in processed food. **Food Chemistry**, 199, 768-781, 2015.

<sup>21</sup>PUBCHEM: Open Chemistry Database. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acessado em Maio de 2018.

<sup>22</sup>GIOVANNI, N.; FUCCI, N. The Current Status of Sweat Testing For Drugs of Abuse: A Review. **Current Medicinal Chemistry**, 20, 545-561, 2013.

<sup>23</sup>KINTZ, P.; VILLAIN, M.; CIRIMELE, V. Hair Analysis for Drug Detection. *Therapeutic Drug Monitoring*, 28, 3, 2006.

<sup>24</sup>ELMONGY, H.; ABDEL-REHIM, M. Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis. A review. **Trends in Analytical Chemistry**, 1-28, 2016.

<sup>25</sup>ZHAO, G.; CHEN, Y.; WANG, S.; YU, J.; WANG, X.; XIE, F.; LIU, F.; Xie, J. Simultaneous determination of 11 monohydroxylated PAHs in human urine by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Talanta**, 116, 822–826, 2013.

<sup>26</sup>CLOUTIER, P.; FORTIN, F.; GROLEAU, P. E.; Brousseau, P.; FOURNIER, M.; Desrosiers, M. QuEChERS extraction for multi-residue analysis of PCBs, PAHs, PBDEs and PCDD/Fs in biological samples. **Talanta**, 165, 332–338, 2017.

<sup>27</sup>MALAMUD, D. Saliva as a Diagnostic Fluid. *Dental Clinic North America*, 55, 1, 159-178, 2011.

<sup>28</sup>GENCO, R. J. Salivary diagnostic tests. *Journal of the American Dental Association*. 143, 10, 2012.

<sup>29</sup>ELMONGY, H.; ABDEL-REHIM, M. Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis. A review. *Trends in Analytical Chemistry*, 1-28, 2016.

- <sup>30</sup>HUMPHREY, Sue P.; WILLIAMSON, Russell T.. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **The Journal Of Prosthetic Dentistry**, 85, 2, 162-169, 2001.
- <sup>31</sup>MERIB, Josias et al. Simultaneous Determination of Environmental Contaminants with Different Volatilities in Tap Water Samples Using a New Approach to Single-Drop Microextraction Procedure. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, 1674-1683, 2015.
- <sup>32</sup>WEN, Yingying et al. Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, 59, 26-41, 2014.
- <sup>33</sup>CARASEK, Eduardo; MERIB, Josias. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, 880, 8-25, 2015.
- <sup>34</sup>PAWLISZYN, Janusz. **Solid Phase Microextraction: Theory and Practice**. Waterloo: Wiley-vch, 1997. 247 p.
- <sup>35</sup>ASENSIO-RAMOS, María et al. Liquid phase microextraction applications in food analysis. **Journal Of Chromatography A**, 1218, 42, 7415-7437, 2011.
- <sup>36</sup>ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. **Analytical Chemistry**, 62, 2145-2148, 1990.
- <sup>37</sup>LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**, 885, 153–193, 2000.
- <sup>38</sup>KAYKHALI, Massoud et al. Preparation and evaluation of solid-phase microextraction fibres based on functionalized latex nanoparticle coatings for trace analysis of inorganic anions. **Journal Of Chromatography A**, 1217, 20, 3452-3456, 2010.
- <sup>39</sup>VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO F. Microextração por fase sólida. **Química nova**, 23, 4, 2000.
- <sup>40</sup>DIAS, Adriana Neves et al. Cork as a new (green) coating for solid-phase microextraction: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 772, p.33-39, abr. 2013.

<sup>41</sup>KAYKHAIL, Massoud et al. Preparation and evaluation of solid-phase microextraction fibres based on functionalized latex nanoparticle coatings for trace analysis of inorganic anions. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1217, n. 20, p.3452-3456, maio 2010.

<sup>42</sup>SCHMIDT, Kamila; PODMORE, Ian. Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer. **Journal Of Biomarkers**, 2015, 1-16, 2015.

<sup>43</sup>DIAS, A. N.; SIMÃO, V.; MERIB, J.; CARASEK, E. Cork as a new (green) coating for solid-phase microextraction: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 772, 33-39, 2013.

<sup>44</sup>COELHO, E.; FERREIRA, C.; ALMEIDA, C. M. M. Analysis of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by SPME-GC-FID in Environmental and Tap Waters. **Journal of Brazilian Chemical Society**, 19, 6, 1084-1097, 2008.

<sup>45</sup>Appendix F Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis, 2016.

<sup>46</sup>David A. Kidwell, Janel C. Holland, Sotiris Athanaselis. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. **Journal of Chromatography B**, 713, 111-135, 1998.

<sup>47</sup>SANTOS, Patricia Martín et al. Quantitative and qualitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine samples using a non-separative method based on mass spectrometry. **Talanta**, [s.l.], v. 181, p.373-379, maio 2018.