



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Lucas Morés

**AVALIAÇÃO DA CORTIÇA COMO BIORSORVENTE DA TÉCNICA DE  
MICROEXTRAÇÃO EM PONTEIRA PARA DETERMINAÇÃO DE DROGAS  
DE ABUSO E BIOMARCADORES EM URINA HUMANA POR TÉCNICAS  
CROMATOGRÁFICAS**

Florianópolis

2022

Lucas Morés

**AVALIAÇÃO DA CORTIÇA COMO BIORSORVENTE DA TÉCNICA DE MICROEXTRAÇÃO EM PONTEIRA PARA DETERMINAÇÃO DE DROGAS DE ABUSO E BIOMARCADORES EM URINA HUMANA POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação  
Em Química da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do título de doutor em  
Química.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

Co-orientador: Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Morés, Lucas

Avaliação da cortiça como biossorvente da técnica de microextração em ponteira para determinação de drogas de abuso e biomarcadores em urina humana por técnicas cromatográficas / Lucas Morés ; orientador, Eduardo Carasek da Rocha, coorientador, Josias de Oliveira Merib, 2022.

145 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Química. 2. Química Analítica. 3. Preparo de Amostras. 4. Cromatografia. 5. Urina. I. Carasek da Rocha, Eduardo . II. de Oliveira Merib, Josias. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Lucas Morés

**AVALIAÇÃO DA CORTIÇA COMO BIORSORVENTE DA TÉCNICA DE MICROEXTRAÇÃO EM PONTEIRA PARA DETERMINAÇÃO DE DROGAS DE ABUSO E BIOMARCADORES EM URINA HUMANA POR TÉCNICAS CROMATÓGRAFICAS**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Eugênia Costa Queiroz  
Universidade de São Paulo (USP)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Neves Dias  
Instituto Federal Catarinense (IFC)

Prof. Dr. Eduardo Sidinei Chaves  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Luciano Vitali  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib  
Coorientador  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Química com especialização em Química Analítica.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

Florianópolis, 2022

*Dedico aos meus pais, Marisa e Silvio, irmã Carla e  
aos meus avós Luiz e Zulide, e  
Américo (in memorian) e Nair (in memorian).*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marisa e Silvio e, irmã Carla, por todo o suporte por apoiarem minhas escolhas acadêmicas, sempre me incentivando a seguir em frente e a realizar este doutorado. Agradeço por tudo, amo vocês.

A toda minha família, principalmente meus avós, Nair e Américo (*in memoriam*) e Luiz e Zulide, por serem grandes exemplos de perseverança e por me apoiarem sempre em tudo.

Ao Lucas, que esteve ao meu lado na maior parte do meu doutorado, me apoiando e me dando suporte nos momentos difíceis. Agradeço por ter caminhado ao meu lado neste ciclo, amo você.

Ao meu orientador, Prof. Eduardo Carasek, um agradecimento especial pela oportunidade de ter aprendido e trabalhado durante 8 anos nessa trajetória. Sou grato por ter aprendido e dividido conhecimentos e momentos com o senhor. Será sempre lembrado como alguém que foi um exemplo e um grande amigo nesta vida.

Ao meu coorientador, Prof. Josias Merib, te agradeço muito pela oportunidade de dividir conhecimento e por ter permitido fazer colaborações de grande importância para minha tese e conhecimento acadêmico, principalmente com o grupo MS-UFCSPA. Obrigado por todo apoio e presença nos momentos bons e ruins, você é um grande amigo.

A todos os colegas do grupo CROMAAS que conheci e fiz amizade durante todos estes anos. Ter participado e dividido todos os momentos dessa carreira acadêmica com vocês com certeza me fez ser uma pessoa melhor. Agradeço cada pessoa que conheci. Todo o meu carinho, apoio e respeito por cada um. Desejo que todos tenham uma vida maravilhosa.

Agradeço aos Professores Eduardo Sidinei Chaves, Josiel Barbosa Domingos, Luiz Augusto dos Santos Madureira e Thiago Ferreira Conceição pelas colaborações feitas durante a minha qualificação e que engrandeceram a minha tese.

A todos os meus amigos, eu agradeço de coração por ter cada um de vocês na minha vida. Vocês foram importantes para que esta trajetória desse certo, me ajudando

em momentos difíceis e dividindo os momentos felizes. A amizade de vocês será sempre presente no meu coração.

A todas as pessoas que participaram do meu ciclo, professores, servidores e demais colaboradores. O conhecimento, espaço e oportunidade foram divididos comigo e me fez chegar aonde estou hoje. Sou grato a cada um.

À UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em química pelo espaço concedido e oportunidade e pelo ensino público e de qualidade.

Ao CNPq pela bolsa de estudos permitindo dedicação exclusiva ao Programa de Pós-Graduação em química.

*“A felicidade pode ser encontrada mesmo nas horas mais sombrias.*

*Basta lembrar de acender a luz.”*

*A.D.*



## RESUMO

Neste trabalho foi proposta a avaliação da aplicabilidade da cortiça em técnica de microextração em ponteira, utilizando como nova configuração para a técnica definida de extração em ponteira descartável (DPX), para matrizes de urina humana. A cortiça é um material natural e renovável, com composição química heterogênea e diferentes grupos funcionais que permitem distintas interações químicas, e composição física porosa, com alta área superficial. Três abordagens foram realizadas utilizando esta configuração, com parâmetros devidamente otimizados, validados e aplicados em matrizes de urina humana. O primeiro estudo foi a aplicação na determinação de THC-COOH em urina utilizando a DPX-Cortiça e sistema de separação/detecção *fast*-GC-FID. Os resultados permitiram utilizar condições ideais em pH ajustado para faixa entre 2-3, 700  $\mu\text{L}$  de amostra, 8 ciclos de 60 s. para extração, 15 mg de cortiça, 1 ciclo de 5 s. para dessorção com ACN/MeOH (1:1) como mistura de solventes e apenas uma etapa de limpeza com as condições de dessorção para reuso da ponteira. O LOD e LOQ foram de 0,22 e 0,73  $\text{ng mL}^{-1}$ , respectivamente. As precisões intradia e interdia foram menores que 14% e as recuperações foram de 96 a 108%, ambas em três concentrações diferentes. A reprodutibilidade indicou um erro entre ponteiras menor que 10,9% e uma estabilidade que permite até 90 ciclos de experimentos com eficiência  $\geq 80\%$ . A aplicação da metodologia foi realizada em urina de indivíduos voluntários e doadas pelo IGP-RS, sendo possível identificar e quantificar em duas delas, 6 e 42  $\text{ng mL}^{-1}$ , sendo as demais, abaixo do LOQ e LOD do método. O segundo estudo foi a determinação de aminas biogênicas como marcadores de câncer através da DPX-Cortiça com um dispositivo em paralelo, permitindo o uso de 5 ponteiras ao mesmo tempo, e detecção por GC-MS. As condições compromisso obtidas nas otimizações foram 10 min de hidrólise sob agitação e aquecimento em 60 °C, 10 min de centrifugação, 5 min de reação de derivatização com IBCF (180  $\mu\text{L}$ ), pH da amostra ajustado para 12, 2 mL de amostra para cada ciclo, 25 mg de cortiça e 6 ciclos de extração, 2 ciclos de dessorção e 300  $\mu\text{L}$  de solvente AcEt. Os parâmetros analíticos de mérito obtidos foram LODs de 2,1, 2,7 e 6,6  $\text{ng mL}^{-1}$  e LOQs de 6,9, 8,8 e 21,7  $\text{ng mL}^{-1}$  para espermidina, cadaverina e putrescina, respectivamente. As precisões intradia e interdia foram menores que 28% e recuperações entre 62 e 130%, ambas em três diferentes concentrações. A análise de amostras doadas apresentou sinal analítico apenas para putrescina abaixo do LOQ e, as demais, podem estar abaixo do LOD do método. A terceira proposta foi utilizar uma nova configuração na determinação de aldeídos marcadores de câncer pulmonar, com a DPX-Cortiça-Paralelo e detecção por HPLC-DAD. As condições otimizadas foram 30  $\mu\text{L}$  e 6 min de impregnação de DNPH, urina 10x diluída em água U.P., pH ajustado para 4,8, 7 ciclos de extração com 1 min e 30 s cada, 30 mg de cortiça, 2 ciclos de dessorção e solvente acetonitrila com 300  $\mu\text{L}$ . Os LODs e LOQs foram 0,13  $\text{ng mL}^{-1}$  para ambos analitos e, 0,40 e 0,41  $\text{ng mL}^{-1}$ , para hexanal e heptanal, respectivamente. As precisões intradia e interdia variaram de 4 a 21% e as recuperações foram de 86 a 107%. A aplicação do método demonstrou que as urinas utilizadas não apresentavam a presença dos aldeídos, estando estes, abaixo do LOD do método e não indicando a presença de câncer pulmonar nos indivíduos. Conclui-se que o dispositivo DPX-Cortiça foi eficiente em extrair e determinar os diferentes analitos em matrizes de urina.

**Palavras-chave:** Cortiça, DPX, urina, THC-COOH, aminas biogênicas, aldeídos, GC-FID, GC-MS, HPLC-DAD.

## ABSTRACT

In this work, it was proposed to evaluate the applicability of cork in the technique of microextraction in tip, using as a new configuration for the defined technique of disposable pipette extraction (DPX), for human urine matrices. Cork is a natural and renewable material, with a heterogeneous chemical composition, presents different functional groups that allow different chemical interactions, and a porous physical composition, with a high surface area. Three methodologies were performed using this configuration, with parameters properly optimized, validated, and applied to human urine matrices. The first study was the application in the determination of THC-COOH in urine using the DPX-Cork and fast-GC-FID separation/detection system. The results obtained allowed the use of ideal conditions in pH adjusted to the range between 2-3, 700  $\mu\text{L}$  of sample, 8 cycles of 60 s. for extraction, 15 mg of cork, 1 cycle of 5 s. for desorption with ACN/MeOH (1:1) as solvent mixture, and only one cleaning step with desorption conditions for reuse of the tip. The LOD and LOQ were 0.22 and 0.73  $\text{ng mL}^{-1}$ , respectively. Intraday and interday accuracies were less than 14% and recoveries were 96 to 108%, both at three different concentrations. The reproducibility indicated an RSD between tips of less than 10.9% and a stability that allows up to 90 cycles of experiments with efficiency  $\geq 80\%$ . The application of the methodology was carried out in the urine of voluntary individuals and donated by the IGP-RS, being possible to identify and quantify in two of them, 6 and 42  $\text{ng mL}^{-1}$ , the others being below the LOQ and LOD of the method. The second study was the determination of biogenic amines as cancer markers through DPX-Cork with a device in parallel, allowing the use of 5 tips at the same time, and detection by GC-MS. The compromise conditions obtained in the optimizations were 10 min of hydrolysis under stirring and heating at  $60^\circ\text{C}$ , 10 min of centrifugation, 5 min of derivatization reaction with IBCF (180  $\mu\text{L}$ ), pH of the sample adjusted to 12, 2 mL of sample for each cycle, 25 mg of cork and 6 extraction cycles, 2 desorption cycles and 300  $\mu\text{L}$  of EtAc solvent. The analytical parameters of merit obtained were LODs of 2.1, 2.7 and 6.6  $\text{ng mL}^{-1}$  and LOQs of 6.9, 8.8 and 21.7  $\text{ng mL}^{-1}$  for spermidine, cadaverine and putrescine, respectively. The intraday and interday accuracies were less than 28% and recoveries between 62 and 130%, both at three different concentrations. The analysis of donated samples showed an analytical signal only for putrescine below the LOQ and the others may be below the LOD of the method. The third proposal was to use a new configuration in the determination of aldehyde markers of lung cancer, with DPX-Cork-Parallel, with detection by HPLC-DAD. The optimized conditions were 30  $\mu\text{L}$  and 6 min of DNPH impregnation, 10x urine diluted in U.P. water, pH adjusted to 4.8, 7 extraction cycles with 1 min and 30 s each, 30 mg of cork, 2 desorption cycles and solvent acetonitrile with 300  $\mu\text{L}$ . The LODs and LOQs were 0.13  $\text{ng mL}^{-1}$  for both analytes and, 0.40 and 0.41  $\text{ng mL}^{-1}$  for hexanal and heptanal, respectively. Intraday and interday accuracies ranged from 4 to 21% and recoveries ranged from 86 to 107%. The application of the method showed that the urine used did not present the presence of aldehydes, which were below the LOD of the method and did not indicate the presence of lung cancer in the individuals. It was concluded that the DPX-Cork device was efficient in extracting and determining the different analytes in urine matrices.

**Keywords:** Cork, DPX, urine, THC-COOH, biogenic amines, aldehydes, GC-FID, GC-MS, HPLC-DAD.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática: (A) do dispositivo da DPX; (B) etapas envolvidas no processo da técnica (Adaptado de: Carasek <i>et al</i> , 2022).....	32
<b>Figura 2</b> - Estruturas químicas da celulose, hemicelulose e lignina (Adaptado de: Ferreira e da Rocha, 2009). .....	38
<b>Figura 3</b> - Rede polimérica da suberina (Adaptado de: Gil, 1993). .....	42
<b>Figura 4</b> - Espectro de ATR-FTIR obtido para o pó da cortiça (Adaptado de: Mafra et al. 2018; Dias et al. 2013).....	42
<b>Figura 5</b> - Favo de mel da cortiça vista pela microscopia eletrônica de varredura sendo: (A) 600 $\mu\text{m}$ e (B) 100 $\mu\text{m}$ (Adaptado de: Barbosa et al., 2017).....	44
<b>Figura 6</b> - Estrutura 3D de um pedaço da casca do sobreiro (cortiça) mostrando a sua porosidade (imagem ao centro com 500 $\mu\text{m}$ ) e direções de corte: (A) Não-radial (50 $\mu\text{m}$ ) e (B) Radial (50 $\mu\text{m}$ ) (Adaptado de: Fernandes et al., 2015). .....	45
<b>Figura 7</b> - Imagens de SEM obtidas para o pó de cortiça em: (A) magnificação em 100x e (B) em 1000x (Adaptado de: Mafra et al. 2018).....	45
<b>Figura 8</b> - Estruturas dos canabinóides: (A) $\Delta^9$ -THC; (B) THC-COOH; e (C) THC-OH (Adaptado de: Citty et al., 2018). .....	52
<b>Figura 9</b> - Reação de desproteíntização através da enzima $\beta$ -glucuronidase, sendo: (A) THC-COOH ligado ao ácido glucurônico; (B) THC-COOH livre; e (C) ácido glucurônico livre (Adaptado de: Citty et al. 2018).....	53
<b>Figura 10</b> - Gráfico de barras comparativo entre as fases selecionadas para o estudo de eficiência de extração do THC-COOH da urina, com os sorventes puros e uma mistura entre bráctea/cortiça. Condições: Urina sem diluição, fortificação em 100 $\text{ng mL}^{-1}$ do analito, 700 $\mu\text{L}$ de amostra, pH ajustado para 2,5, 3 ciclos de extração com 10 s. cada, 20 mg de sorvente, 200 $\mu\text{L}$ de metanol como solvente de dessorção e 2 ciclos (Fonte: Autoria Própria, 2020).....	59
<b>Figura 11</b> - Cromatograma comparativo entre: (A) Extração do THC-COOH pela DPX-Cortiça; (B) Injeção direta de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de THC-COOH; e (C) Branco da urina. Condições da DPX: Urina sem diluição, fortificação em 100 $\text{ng mL}^{-1}$ do analito, 700 $\mu\text{L}$ de amostra, pH ajustado para 2.5, 3 ciclos de extração com 10 s. cada, 20 mg de sorvente, 200 $\mu\text{L}$ de metanol como solvente de dessorção e 2 ciclos (Fonte: Autoria Própria, 2020).....	60

<b>Figura 12</b> - Gráfico de barras para a comparação entre urina não diluída e diluída até 40x. Condições da DPX: 20 mg de cortiça, 700 µL de amostra, 3 ciclos de extração com 30 s. cada, pH da matriz ajustado para 2-3, 2 ciclos de dessorção de 10 s. cada e ACN/MeOH (1:1) como solvente de dessorção. (Fonte: Autoria Própria, 2020). .....	61
<b>Figura 13</b> - Superfície ternária obtida para a escolha do solvente ou mistura de solventes de dessorção. Condições da DPX: 20 mg de cortiça, 700 µL de amostra, 3 ciclos de extração com 30 s. cada, pH da matriz ajustado para 2-3, 2 ciclos de dessorção de 10 s. cada (Fonte: Autoria Própria, 2020).....	62
<b>Figura 14</b> - Superfície de resposta obtida do planejamento Doehlert para número de ciclos e tempo para a dessorção. Condições da DPX: 20 mg de cortiça, 700 µL de amostra, pH da matriz ajustado para 2-3, 3 ciclos de extração de 30 s. cada, ACN/MeOH (1:1) como solvente de dessorção (Fonte: Autoria Própria, 2020). .....	63
<b>Figura 15</b> - Superfícies de resposta obtidas para o composto central: (A) Tempo vs Ciclos; (B) Massa vs Ciclos; (C) Tempo vs Massa. Condições da DPX: pH da matriz ajustado para 2-3, 700 µL de amostra, 1 ciclo de 5 s. para dessorção com ACN/MeOH (1:1) como solvente de dessorção (Fonte: Autoria Própria, 2020).....	65
<b>Figura 16</b> - Gráfico de barras para limpeza da DPX-Cortiça entre experimentos. Condições da DPX: pH da matriz ajustado para 2-3, 700 µL de amostra, 8 ciclos de 60 s. para extração, 15 mg de cortiça, 1 ciclo de 5 s. para dessorção com ACN/MeOH (1:1) como solvente de dessorção (Fonte: Autoria Própria, 2020).....	66
<b>Figura 17</b> - Gráfico de barras com as respostas obtidas entre 30, 60 e 90 ciclos para as três ponteiros de DPX-Cortiça em 10 ng mL <sup>-1</sup> . Condições da DPX: pH da matriz ajustado para 2-3, 700 µL de amostra, 8 ciclos de 60 s. para extração, 15 mg de cortiça, 1 ciclo de 5 s. para dessorção com ACN/MeOH (1:1) como solvente de dessorção e 1 ciclo de limpeza com as condições de dessorção (Fonte: Autoria Própria, 2020). .....	67
<b>Figura 18</b> - Gráfico de barras produzido a partir da resposta entre as ponteiros de DPX-Cortiça com urina fortificada em 100 ng mL <sup>-1</sup> . Condições da DPX: pH da matriz ajustado para 2-3, 700 µL de amostra, 8 ciclos de 60 s. para extração, 15 mg de cortiça, 1 ciclo de 5 s. para dessorção com ACN/MeOH (1:1) como solvente de dessorção e 1 ciclo de limpeza com as condições de dessorção (Fonte: Autoria Própria, 2020). .....	68
<b>Figura 19</b> - Cromatograma comparativo entre as 8 amostras de urinas analisadas, correspondendo: (A, B, C) fumante ativo; (D) fumante passivo; (E, F, G, H) fumantes passivos ou não-usuários (Fonte: Autoria Própria, 2020). .....	70

<b>Figura 20</b> - Esquema representativo para o desenvolvimento de cânceres em órgãos. (Adaptado de: INCA, 2020). .....	75
<b>Figura 21</b> – Estruturas químicas das principais aminas biogênicas encontradas no organismo humano, sendo: (A) Putrescina; (B) Cadaverina; e (C) Espermidina (Adaptado de: Sethi et al., 2011). .....	76
<b>Figura 22</b> - Reação de derivatização para a putrescina com o agente cloroformato de isobutila seguindo as etapas: (A) reação inicial com ataque do par de elétrons dos dois nitrogênios da amina com o carbono da carbonila e duas moléculas do derivatizantes com rearranjo da ligação dupla com o oxigênio da carbonila; (B) rearranjo eletrônico na molécula entre ligações químicas após incorporação das duas moléculas de derivatizantes na amina; e (C) formação do carbamato final com liberação de duas moléculas de HCl (Adaptado de: Hušek, 1998; Kataoka, 2014). .....	78
<b>Figura 23</b> - Representação esquemática do dispositivo para uso em paralelo de 5 ponteiros de DPX usadas simultaneamente: (A) aparato metálico contendo 5 seringas acopladas e (B) demonstração do manipulador móvel metálico (Huelsmann et al., 2021). .....	81
<b>Figura 24</b> - Aparato polimérico com suporte para apoio com 5 seringas descartáveis acopladas e 3 ponteiros de DPX contendo cortiça no seu interior: (A) Imagem frontal com aparato plástico para suporte do dispositivo; (B) Imagem superior apresentando o aparato polimérico; (Fonte: Aatoria Própria, 2022). .....	82
<b>Figura 25</b> - Cromatograma comparativo entre: (Azul) Extração com DPX-Cortiça em $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; (Vermelho) Injeção Direta com Derivatização em $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; e (Verde) Branco da Urina com Extração e Derivatização. Condições: sem diluição da urina, 15 min de hidrólise, 10 min de centrifugação, 5 min de derivatização com IBCF (40 $\mu\text{L}$ ), 15 mg de cortiça, pH da amostra ajustado para 12, 4 ciclos de extração com 2 mL de amostra cada, 2 ciclos de dessorção em 300 $\mu\text{L}$ de solvente ACN/MeOH (1:1) (Fonte: Aatoria Própria, 2022). .....	84
<b>Figura 26</b> - Gráfico de barras para a comparação dos resultados da matriz não diluída (ND), diluída 15x e 30x em água ultrapura. Condições: 500 $\text{ng mL}^{-1}$ de fortificação, 15 min de hidrólise, 10 min de centrifugação, 5 min de derivatização com IBCF (40 $\mu\text{L}$ ), 15 mg de cortiça, pH da amostra ajustado para 12, 4 ciclos de extração com 2 mL de amostra cada e 30 s., 2 ciclos de dessorção com 30 s. cada em 300 $\mu\text{L}$ de solvente ACN/MeOH (1:1) (Fonte: Aatoria Própria, 2022). .....	85

<b>Figura 27</b> - Superfície de resposta pelo planejamento composto central entre tempo para reação de derivatização e volume de IBCF. Condições: 500 ng mL <sup>-1</sup> de fortificação, 15 min de hidrólise, 10 min de centrifugação, 15 mg de cortiça, pH da amostra ajustado para 12, 4 ciclos de extração com 2 mL de amostra cada e 30 s., 2 ciclos de dessorção com 30 s. cada em 300 µL de solvente ACN/MeOH (1:1) (Fonte: Autoria Própria, 2022).....	86
<b>Figura 28</b> - Gráfico de paretos gerados a partir dos dados obtidos no planejamento fatorial fracionário 2 <sup>6-1</sup> , sendo: (A) Ciclos de Extração; (B) Massa de Cortiça; (C) Solvente de Dessorção; (D) Tempo de Dessorção; (E) Tempo de Extração; e (F) Ciclos de Dessorção. Condições: 500 ng mL <sup>-1</sup> de fortificação, 15 min de hidrólise, 10 min de centrifugação, 5 min de reação de derivatização com IBCF (180 µL), pH da amostra ajustado para 12, 2 mL de amostra para cada ciclo e 300 µL de solvente de dessorção. (Fonte: Autoria Própria, 2022). .....	87
<b>Figura 29</b> - Superfície de resposta gerada pelo planejamento <i>Simplex Lattice</i> para os 3 solventes selecionados. Condições: 500 ng mL <sup>-1</sup> de fortificação, 15 min de hidrólise, 10 min de centrifugação, 5 min de reação de derivatização com IBCF (180 µL), pH da amostra ajustado para 12, 2 mL de amostra para cada ciclo, 4 ciclos de extração, 20 mg de cortiça, 2 ciclos de dessorção e 300 µL de solvente. (Fonte: Autoria Própria, 2022). .....	88
<b>Figura 30</b> – Estruturas químicas do acetato de etila e cloroformato de isobutila, respectivamente (Fonte: Autoria Própria, 2022). .....	89
<b>Figura 31</b> - Superfície de resposta obtida para o composto central para avaliação de ciclos de extração e massa de cortiça adicionada a ponteira de DPX. Condições: 500 ng mL <sup>-1</sup> de fortificação, 15 min de hidrólise, 10 min de centrifugação, 5 min de reação de derivatização com IBCF (180 µL), pH da amostra ajustado para 12, 2 mL de amostra para cada ciclo, 2 ciclos de dessorção e 300 µL de solvente AcEt. (Fonte: Autoria Própria, 2022). .....	90
<b>Figura 32</b> - Cromatograma comparativo entre todas as amostras utilizadas na aplicação do método proposto: (Rosa) Indivíduo masculino (30 anos); (Azul) indivíduo feminino (25 anos); (Verde) indivíduo masculino (25 anos); (Vermelho) indivíduo masculino (55 anos); (Azul Claro) indivíduo feminino (30 anos). (Magnificação x10.000) (Fonte: Autoria Própria, 2022).....	93
<b>Figura 33</b> - Estruturas químicas dos compostos hexanal e heptanal, respectivamente (Fonte: Autoria Própria, 2022). .....	98

<b>Figura 34</b> - Estrutura química da 2,4-dinitrofenilhidrazina (Fonte: Aatoria Própria, 2022).....	101
<b>Figura 35</b> - Etapas envolvidas no processo da reação entre aldeídos e o DNPH (Adaptado de: Liu et al., 2015).....	101
<b>Figura 36</b> - Gráfico de barras correspondente a diluição realizada na matriz de urina nas diferentes condições. Condições: Derivatização com 50 µL de DNPH e 5 min em agitação, 300 ng mL <sup>-1</sup> de fortificação, 15 mg de cortiça, pH ajustado para 4,0, 3 ciclos de extração, 2 ciclos de dessorção, solvente de dessorção acetonitrila com 300 µL. (Fonte: Aatoria Própria, 2022). ....	105
<b>Figura 37</b> - Cromatograma comparativo, em 360 nm, para: (A) Extração branco da urina com a derivatização com DNPH; (B) Extração em 1 µg mL <sup>-1</sup> dos aldeídos nas amostras de urina; e (C) Injeção direta de 1 µg mL <sup>-1</sup> dos aldeídos derivatizados com DNPH. Condições: Derivatização com 50 µL de DNPH e 5 min de impregnação, urina 10x diluída em água U.P., 15 mg de cortiça, pH ajustado para 4,0, 3 ciclos de extração, 2 ciclos de dessorção, solvente de dessorção acetonitrila com 300 µL (Fonte: Aatoria Própria, 2022).....	106
<b>Figura 38</b> - Superfície ternária gerada a partir do planejamento Simplex Lattice para avaliação do solvente de dessorção. Condições: Derivatização com 50 µL de DNPH e 5 min de impregnação, urina 10x diluída em água U.P., 15 mg de cortiça, pH ajustado para 4,0, 3 ciclos de extração, 2 ciclos de dessorção, solvente de dessorção em 300 µL (Fonte: Aatoria Própria, 2022). ....	107
<b>Figura 39</b> - Gráfico de barras obtidos para a otimização do número de ciclos de dessorção. Condições: Derivatização com 50 µL de DNPH e 5 min de impregnação, urina 10x diluída em água U.P., 15 mg de cortiça, pH ajustado para 4,0, 3 ciclos de extração, solvente de dessorção AcEt/MeOH (1:1) em 300 µL. (Fonte: Aatoria Própria, 2022).....	108
<b>Figura 40</b> - Superfície de resposta para o composto central entre tempo de impregnação e volume de DNPH. Condições: Fortificação de 300 ng mL <sup>-1</sup> dos analitos, urina 10x diluída em água U.P., 15 mg de cortiça, pH ajustado para 4,0, 3 ciclos de extração, 2 ciclos de dessorção, solvente de dessorção acetonitrila com 300 µL. (Fonte: Aatoria Própria, 2022).....	109
<b>Figura 41</b> - Superfície de resposta para a otimização dos ciclos de extração (reação in-situ) pelo tempo de reação. Condições: 30 µL e 6 min de impregnação de DNPH, 300 ng mL <sup>-1</sup> de fortificação dos analitos, urina 10x diluída em água U.P., 15 mg de cortiça,	

pH ajustado para 4,0, 2 ciclos de dessorção, solvente de dessorção acetonitrila com 300 $\mu\text{L}$ . (Fonte: Aatoria Própria, 2022).....	110
<b>Figura 42</b> - Gráfico de barras para as diferentes massas de cortiça adicionadas a ponteiros de DPX-Branco. Condições: 30 $\mu\text{L}$ e 6 min de impregnação de DNPH, 300 $\text{ng mL}^{-1}$ de fortificação dos analitos, urina 10x diluída em água U.P., pH ajustado para 4,0, 7 ciclos de extração com 1min e 30 s. cada, 2 ciclos de dessorção, solvente de dessorção acetonitrila com 300 $\mu\text{L}$ . (Fonte: Aatoria Própria, 2022).....	111
<b>Figura 43</b> - Cromatogramas obtidos da análise de 4 amostras de urina aplicando-se o método proposto, em 360 nm. (A) Amostra 1; (B) Amostra 2; (C) Amostra 3; (D) Amostra 4 (Fonte: Aatoria Própria, 2022).....	114



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Algumas propriedades de materiais lignocelulósicos (Adaptado de: Tran et al., 2015).....	39
<b>Tabela 2</b> - Materiais lignocelulósicos de baixo custo com a proporção dos principais componentes químicos de suas estruturas (Adaptado de: Tran et al., 2015).....	40
<b>Tabela 3</b> - Proporção dos principais componentes da cortiça para diferentes amostras e regiões (Adaptado de: Olivellá et al., 2013).....	41
<b>Tabela 4</b> - Frequências de absorção obtidas a partir do espectro de ATR-FTIR da Figura 4 dos grupos funcionais identificados para o pó de cortiça (Adaptado de: Mafra et al. 2018).....	43
<b>Tabela 5</b> - Aplicação da cortiça como fase extratora em técnicas de preparo de amostras e aplicação em diferentes matrizes, compostos e instrumentos de separação e análise (Fonte: Autoria Própria, 2022). ....	46
<b>Tabela 6</b> - Propriedades físico-químicas e nível de concentração afirmativo do metabólito THC-COOH para usuários de Cannabis sativa L na urina (Fonte: DrugBank, 2022; Kulig, 2017).....	53
<b>Tabela 7</b> - Parâmetros analíticos de mérito obtidos para o THC-COOH (Fonte: Autoria Própria, 2020). ....	69
<b>Tabela 8</b> - Recuperação relativa, precisão intradia e interdia em diferentes urinas (voluntário masculino para precisões e feminina para recuperações) (Fonte: Autoria Própria, 2020). ....	69
<b>Tabela 9</b> - Tabela comparativa para diferentes métodos na extração de THC-COOH em urina humana. ....	72
<b>Tabela 10</b> - Propriedades físico-químicas para as 3 aminas biogênicas selecionadas (Fonte: DrugBank, 2022).....	77
<b>Tabela 11</b> - Abreviações e informações das razões m/z para quantificação e identificação dos analitos (Fonte: Płotka-Wasyłka et al., 2016). ....	80
<b>Tabela 12</b> - Parâmetros analíticos de mérito do método de DPX-Cortiça para as 3 aminas biogênicas derivatizadas (Fonte: Autoria Própria, 2022).....	91
<b>Tabela 13</b> - Recuperação relativa, precisão intradia e interdia em diferentes urinas (voluntário masculino para precisões e feminina para recuperações) (Fonte: Autoria Própria, 2022). ....	92

<b>Tabela 14</b> - Tabela comparativa entre diferentes metodologias descritas na literatura para aminas biogênicas em urina humana. ....	94
<b>Tabela 15</b> - Propriedades físico-químicas do compostos hexanal e heptanal (Fonte: PubChem, 2022). ....	101
<b>Tabela 16</b> - Parâmetros analíticos de mérito obtidos para o hexanal e o heptanal pelo método proposto. (Fonte: Aatoria Própria, 2022). ....	112
<b>Tabela 17</b> - Ensaios de recuperação e precisão para os analitos em diferentes concentrações. (Fonte: Aatoria Própria, 2022). ....	113
<b>Tabela 18</b> - Comparação entre o método proposto com outros reportados na literatura para determinação de hexanal e heptanal em urinas humanas. ....	115

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

**ANOVA** – Análise de variância.

**AOAC** – Associação Oficial dos Químicos Analíticos, do inglês *Association Official of Analytical Chemists*.

**ACN** – Acetonitrila.

**AcEt** – Acetato de etila.

**ATR-FTIR** - Transformada de fourier e amostragem por reflectância total atenuada, do inglês, *Attenuated Total Reflection – Fourier Transform Infrared*.

**BA $\mu$ E** – Microextração em barra adsortiva, do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*.

**BMVGI** - Orientação de Validação de Métodos Bioanalíticos para Indústria, do inglês *Bioanalytical Methods Validation Guide for Industries*.

**CAD** – Cadaverina.

**CDZ-AD** - Eletroforese de zona capilar com detecção amperométrica, do inglês *Capillary Zone Electrophoresis with Amperometric Detection*.

**D2EHPA** – Di-(2-etilhexil)ácido fosfórico, do inglês *Di-(2-ethylhexil)phosphoric acid*.

**DES** – Solventes eutéticos profundos, do inglês *Deep Eutetic Solvents*.

**DPX** – Extração em ponteira descartável, do inglês *Disposable Pipette Extraction*.

**DNPH** – 2,4-difenilnitrohidrazina.

**EDS** - espectroscopia de energia dispersiva de raio-X, do inglês *Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy*.

**ESP** – Espermidina.

**GAC** – Química analítica verde, do inglês *Green Analytical Chemistry*.

**GC-ECD** – Cromatógrafo gasoso com detector por captura de elétrons, do inglês *Gas Chromatography-Electron Capture Detector*.

**GC-FID** – Cromatógrafo gasoso com detector por ionização em chama, do inglês *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*.

**GC-MS** – Cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas, do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*.

**HAHC** – Cloridrato de hidroxilamina, do inglês *Hydroxylamine Hydrochloride*.

**HEX** – Hexanal.

**HEPT** – Heptanal.

**HF-LPME** – Microextração em fase líquida com fibra oca, do inglês *Hollow-Fiber Liquid Phase-Microextraction*.

**HPLC-DAD** – Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector por arranjo de diodos, do inglês *High Performance Liquid Chromatography acoupled with Diode Array Detector*.

**HPLC-UV** – Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector ultravioleta, do inglês *High Performance Liquid Chromatography acoupled with Ultraviolet Detector*.

**IBCF** – Cloroformato de isobutila.

**IGP-RS** – Instituto Geral de Perícias do Rio Grande do Sul.

**INCA** – Instituto Nacional de Câncer.

**LC-MS/MS** – Cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas em tandem, do inglês *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Tandem*.

**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*.

**LPME** – Microextração em fase líquida, do inglês *Liquid Phase Microextraction*.

**MeOH** – Metanol.

**NLNPE** - Nanoextração em Fase Líquida Nanoconfinada., do inglês *Nanoextraction Liquid Nanoconfied Phase Extraction*.

**PUT** – Putrescina.

**R<sup>2</sup>** - Coeficiente de determinação.

**RDSE** – Extração sortiva em disco rotativo, do inglês *Rotating-Disk Sorptive Extraction*.

**RSE** – Extração sortiva rotatória, do inglês *Rotating Sorptive Extraction*.

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

**SEM** – Microscopia eletrônica de varredura, do inglês *Scanning Eletronic Microscopy*.

**SIM** – Monitoramento de íon seletivo, do inglês *Selective Ion Monitoring*.

**SLM** - Membrana líquida suportada, do inglês *Supported Liquid Membrane*.

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

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

**TCA** – Ácido tricloroacético, do inglês *Trichloroacetic Acid*.

**TF-SPME** – Microextração em filme fino, do inglês *Thin-Film Microextraction*.

**THC** - (-)-trans- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, do inglês (-)-*Trans- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol*.

**THC-COOH** - Ácido-11-nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinólico, do inglês *11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid*.

**THC-OH** - 11-hidroxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, do inglês *11-Hydroxi- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol*.

**UNODC** - Relatório Mundial de Drogas das Nações Unidas, do inglês, *U.N. Drug World Report*.

**UFCSPA** – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

**WHO** – Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>27</b>
2.1 <i>Análises Biológicas</i> .....	27
2.2 <i>Urina</i> .....	28
2.3 <i>Preparo de Amostras</i> .....	29
2.4 <i>Extração em Ponteira Descartável</i> .....	31
2.5 <i>Materiais Alternativos Verdes</i> .....	35
2.6 <i>Cortiça</i> .....	40
<b>CAPÍTULO III – OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
3.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	49
3.2 <i>Objetivo Específico</i> .....	49
3.2.1 <i>Proposta I</i> .....	49
3.2.2 <i>Proposta II</i> .....	49
3.2.3 <i>Proposta III</i> .....	50
<b>CAPÍTULO IV – RÁPIDA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO-11-NOR-9-CARBOXI-<math>\Delta^9</math>-TETRAHIDROCANABINÓICO (THC-COOH) POR <i>FAST-GC-FID</i> EM URINA HUMANA EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM PONTEIRA DESCARTÁVEL E CORTIÇA COMO FASE EXTRATORA .....</b>	<b>51</b>
4.1 <i>Introdução</i> .....	51
4.2 <i>Metodologia</i> .....	54
4.2.1 <i>Reagentes, Materiais e Amostras</i> .....	54
4.2.2 <i>Preparo dos Biossorbentes para Aplicação na DPX</i> .....	54
4.2.3 <i>Instrumentação e Condições Cromatográficas</i> .....	55
4.2.4 <i>Otimização do Procedimento de DPX-Cortiça</i> .....	56
4.2.5 <i>Parâmetros Analíticos de Mérito e Aplicação nas Amostras de Urina</i> .....	57
4.3 <i>Resultados e Discussão</i> .....	57
4.3.1 <i>Comparação da Eficiência de Extração do THC-COOH entre Cortiça e outras Fases</i> .....	57
4.3.2 <i>Diluição da Matriz de Urina</i> .....	61
4.3.3 <i>Otimização do Solvente de Dessorção</i> .....	62
4.3.4 <i>Otimização dos Ciclos de Dessorção e Tempo</i> .....	63
4.3.6 <i>Otimização de uma Etapa de Limpeza entre Ciclos de Experimentos</i> .....	65
4.3.7 <i>Avaliação da Estabilidade da Ponteira de DPX-Cortiça para o THC-COOH</i> .....	66

4.3.8 Avaliação da Reprodutibilidade entre DPX-Cortiça .....	67
4.3.9 Parâmetros Analíticos de Mérito e Aplicação do Método Proposto em Matrizes de Urina .....	68
4.3.10 Comparação do Método Proposto com outros Reportados na Literatura para Determinação de THC-COOH em Urina Humana .....	71
4.4 Conclusão Parcial.....	74
<b>CAPÍTULO V – APLICAÇÃO DE DPX-CORTIÇA EM PARALELO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOMARCADORAS COMO PRÉ-DIAGNÓSTICO DE CÂNCER EM AMOSTRAS DE URINA E QUANTIFICAÇÃO POR GC-MS.....</b>	<b>75</b>
5.1 Introdução .....	75
5.2 Metodologia .....	79
5.2.1 Reagentes, Materiais e Amostras .....	79
5.2.2 Instrumentação e Condições Cromatográficas .....	79
5.2.3 Preparação das Ponteiras para DPX-Cortiça em Paralelo .....	80
5.2.4 Otimização do Procedimento de DPX-Cortiça em Paralelo .....	82
4.2.5 Parâmetros Analíticos de Mérito e Aplicação nas Amostras de Urina .....	83
5.3 Resultados e Discussão .....	84
5.3.1 Separação Cromatográfica e Diluição da Matriz de Urina .....	84
5.3.2 Tempo de Derivatização e Volume de Derivatizante IBCF/Aminas .....	85
5.3.3 Fatorial Fracionário $2^{6-1}$ para Definição das Variáveis Significativas .....	87
5.3.4 Otimização do Solvente de Dessorção .....	88
5.3.5 Otimização dos Ciclos de Extração pela Massa de Cortiça na DPX .....	89
5.3.6 Parâmetros Analíticos de Mérito obtidos para DPX-Cortiça e Aplicação em Matrizes de Urina .....	90
5.3.7 Comparação do Método Proposto com outros Reportados na Literatura para Determinação de Aminas Biogênicas em Urina Humana.....	93
5.4 Conclusões Parciais.....	97
<b>CAPÍTULO VI – DERIVATIZAÇÃO IN-SITU DE ALDEÍDOS BIOMARCADORES DE CÂNCER PULMONAR POR DPX-CORTIÇA-PARALELA E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC-DAD.....</b>	<b>98</b>
6.1 Introdução .....	98
6.2 Metodologia .....	102
6.2.1 Reagentes, Materiais e Amostras .....	102
6.2.2 Instrumentação e Condições Cromatográficas .....	103
6.2.3 Preparo das Ponteiras de Cortiça para o Sistema DPX-Paralelo.....	103
6.2.4 Otimização do Procedimento de DPX-Cortiça em Paralelo .....	104

6.2.5 Parâmetros Analíticos de Mérito e Aplicação nas Amostras de Urina .....	104
6.3 Resultados e Discussões .....	105
6.3.1 Avaliação da diluição da urina .....	105
6.3.2 Otimização do Solvente de Dessorção .....	107
6.3.3 Otimização dos Ciclos de Dessorção .....	108
6.3.4 Otimização do Tempo de Impregnação e Volume de DNPH para Derivatização In-Situ.....	109
6.3.5 Otimização dos Ciclos de Extração (Reação In-Situ) pelo Tempo .....	110
6.3.6 Otimização da Massa de Cortiça adicionada à DPX .....	111
6.3.7 Parâmetros Analíticos de Mérito e Aplicação das Amostras de Urina .....	111
6.3.8 Comparação do Método Proposto de DPX-Cortiça-Paralela com outros Reportados na Literatura .....	114
6.4 Conclusões Parciais .....	118
<b>CAPÍTULO VII – CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>119</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>136</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>143</b>



## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

Ao se realizar uma análise química, diversas etapas estão envolvidas entre a problemática e a solução. Algumas são mandatórias e outras alternativas, entretanto, a mais crítica e crucial, na maioria dos procedimentos, é o preparo de amostras. Este estágio está relacionado com a pré-concentração e isolamento dos compostos alvo, limpeza de interferentes e adequação da matriz ao instrumento de análise (KRUG e ROCHA, 2016; CARASEK e MERIB, 2015; BORGES e QUEIROZ, 2015). Existem diversas técnicas desenvolvidas e empregadas para o preparo de distintas amostras, dentre elas, algumas são denominadas de clássicas, como a extração em fase sólida (SPE) e a extração líquido-líquido (LLE). Estas apresentam uma importante aplicação já difundida mundialmente, entretanto, pela busca constante de adequação aos conceitos de química verde, técnicas miniaturizadas vêm sendo desenvolvidas e empregadas para substituí-las (BOYACI *et al.* 2015; CARASEK e MERIB, 2015).

As limitações que as técnicas de microextração buscam suprir são o uso de menores volumes de amostra, redução ou isenção do emprego de solventes orgânicos, diminuição do período de preparo, visando menor uso de energia e tempo do laboratorista, e atenuação dos resíduos gerados. Dentre as técnicas desenvolvidas e já estabelecidas, temos principalmente a microextração em fase sólida (SPME) e a microextração em fase líquida (LPME) (CARASEK *et al.* 2018; PAWLISZYN, 1990; TOBISZEWSKI *et al.* 2009). A partir destas técnicas, novas configurações e dispositivos têm sido propostos, dentre eles, destaca-se a extração em ponteira descartável (DPX) (BREWER, 2003).

A DPX é uma técnica recente, com aplicações que vem crescendo cada vez mais na literatura. Derivada da SPE, possui um procedimento semelhante, sendo realizado em uma ponteira que contém um material extrator em seu interior, selado por dois filtros. Esse material pode se dispersar livremente, e a inovação está em aspirar a amostra e gerar uma mistura dinâmica com a fase sorvente, que permite altas superfícies de contato, gerando uma extração/dessorção/limpeza mais rápidos e eficientes (BORDIN *et al.*, 2016; CARASEK *et al.*, 2022). Outra vantagem desta técnica é a versatilidade na escolha do material sorvente, podendo ser introduzidas novas fases alternativas, com conceitos verdes, como a cortiça (CARASEK *et al.*, 2022; MORÉS *et al.*, 2019);

A cortiça é um material natural, proveniente de árvores do sobreiro, com inúmeros trabalhos indicando a sua eficiente sorção de diferentes classes de compostos, através de sua composição heterogênea, permitindo diferentes interações químicas e físicas, sendo utilizada em técnicas como SPME, microextração em barra adsortiva (BA $\mu$ E), microextração em filme-fino (TF-SPME) e poucos estudos envolvendo a DPX. Dentre estes projetos, os que mais se destacam são em aplicações ambientais, e poucas abordagens em matrizes biológicas (OLIVELLÁ *et al.*, 2013; DIAS *et al.*, 2013; DIAS *et al.*, 2015; OENNING *et al.*, 2017; MORÉS *et al.*, 2018).

Métodos de bioanálise são de extrema importância e estão presentes ao redor do mundo para a determinação de diferentes compostos que sejam empregados em áreas forenses, clínicas e terapêuticas. Estas metodologias são muitas vezes empregadas em laboratórios que necessitam verificar a veracidade de informações, como os de perícia que trabalham sob legislações, até os clínicos que permitam diagnósticos que indiquem tratamentos adequados (SRINIVAS *et al.*, 2001; STRIMBU e TAVEL, 2010).

Visando o emprego de novas abordagens que possam suprir a demanda da população mundial para testes biológicos, a proposta deste trabalho é expandir a aplicabilidade da cortiça como fase extratora na técnica de DPX, como metodologia rápida, eficaz e simples para a determinação de diferentes marcadores biológicos em urina, visando a redução de tempo, custo e indo ao encontro com os princípios da química analítica verde (GAC).

## CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Análises Biológicas

A saúde é definida, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), como “um estado completo de bem-estar físico, mental e social, não apenas a ausência de doença ou enfermidade”. Apesar desta afirmação, a população mundial apresenta, quase constantemente, algum destes pontos como sendo uma problemática para a sua saúde (WHO, 2021).

Destacando-se principalmente a parte biológica (uma combinação entre estado físico e mental), muitos são os obstáculos para se manter uma integridade da saúde humana. A exposição contínua a diferentes substâncias causa estes distúrbios nos organismos e muitas são as vias que podem afetá-los, sendo vias naturais como solo, água e ar, ou sintéticas, como medicamentos, produtos de higiene, embalagens, entre outros (WHO, 1993).

Uma das formas de se evitar ou corrigir eventuais anomalias, são fazendo diagnósticos, que comparados a valores de referências, indiquem o tratamento adequado, e isto é realizado por meio de análises biológicas. Essas análises são realizadas por meio da coleta de várias amostras, dependendo do local (no organismo) e tipo de disfunção presentes (sintomas), podendo ser, urina, sangue, saliva, cabelo, tecidos humanos, fluidos corporais, dentre outros. Deve-se levar em consideração, que todas as matrizes biológicas possuem sua composição própria, sendo heterogênea e contendo diversos tipos de substâncias. Além destes fatores, outras variáveis também são consideradas, como sexo, idade, dieta, peso, ambiente, entre outros, na hora da avaliação final (SRINIVAS *et al.*, 2001; WHO, 2001).

Para a obtenção destes diagnósticos, geralmente, são adquiridos por meio da seleção e identificação de biomarcadores. Este termo (também conhecido como marcador biológico) se dá como sendo qualquer substância, estrutura ou processo que pode ser medido no corpo (humano ou animal), bem como seus produtos, sejam metabólitos ou produtos de biotransformação, onde são importantes para indicar a influência na prevenção, incidência ou resultado para alguma doença. Além disso, também são aplicados na avaliação da exposição ou identificação de produtos químicos, tanto terapêuticos quanto de uso abusivo (SRINIVAS, *et al.*, 2001; STRIMBU e TAVEL, 2010; WHO, 1993).

A aplicação de biomarcadores na pesquisa se torna muito complexa, pois cada organismo está constantemente em mudança, sejam por fatores externos, como clima e ambiente de vivência, ou por fatores internos, desde a dieta, uso de medicamentos, utilização de drogas ilícitas, entre outros. Desta forma, deve-se fazer a seleção do biomarcador de forma crítica a fim de causar um impacto mais preciso na resposta final, onde compreenda uma população ou subgrupo de indivíduos que estejam relacionados a problemas em comum (SRINIVAS, *et al.*, 2001; STRIMBU e TAVEL, 2010).

Além de se identificar o tipo de biomarcador e a situação a que este se aplica, um planejamento deve ser aplicado como, a seleção do(s) biomarcador(es) para o estudo, a identificação da sua periculosidade, a quantidade (dose ou concentração) e por fim o tempo de exposição. Apesar destas múltiplas informações, os biomarcadores devem ser fáceis de serem detectados, mensuráveis para um grande grupo de indivíduos e promover as informações necessárias, seja para um diagnóstico prévio, durante o desenvolvimento de uma doença ou na identificação de produtos de uso externo (STRIMBU e TAVEL, 2010).

Em suma, essas matrizes biológicas são complexas, havendo um obstáculo na sua análise. Além disso, a disponibilidade é um fator crucial pois dependendo do que se irá avaliar, necessitará de uma quantidade significativa de amostra. Dentre essas matrizes, uma que se destaca é a urina, uma amostra biológica que pode ser obtida em quantias suficientes para maioria das análises biológicas.

## 2.2 Urina

A urina humana é um fluido biológico sendo um subproduto resultante da filtração do sangue, secretado pelos rins. O processo biológico de produção da urina é complexo e passa por diversas etapas, portanto, a sua composição final acaba sendo heterogênea (PERON *et al.* 2020).

Essa matriz biológica é uma mistura com mais de 3000 componentes, sendo o principal a água (90-95%), mas com a presença em menor quantidade de sais, ureia, proteínas, ácido úrico, entre outras substâncias. Essa composição depende da dieta do indivíduo, bem como a presença ou alteração dos componentes habituais causadas por bactérias, vírus, ou algum problema presente no corpo (doenças, medicamentos etc.) (ZHANG *et al.*, 2012).

O organismo humano produz uma quantidade relativamente grande de urina todos os dias, sendo de grande interesse para análises biológicas, se comparada a

disponibilidade e a não invasão do corpo para coleta, diferente de sangue, tecidos, humor vítreo, entre outros. Além disso, mais de 50% das substâncias (ingeridas ou de ocorrência natural no organismo) são excretadas na sua forma original ou metabolizada, sendo de grande interesse em métodos de bioanálise (MONTESANO *et al.* 2014; SOUZA-SILVA *et al.*, 2015).

Esses métodos bioanalíticos são bem estabelecidos na atualidade, entretanto, devido à composição dessa matriz, muitas vezes acaba dificultando a identificação e quantificação, exata e precisa, dos biomarcadores, prejudicando a avaliação do diagnóstico final. Além disso, muitos se apresentam como dispendiosos ou de periculosidade considerável. Desta forma, técnicas de preparo de amostras estão sempre em desenvolvimento para que as metodologias sejam mais eficientes, diminuindo o risco de exposição a reagentes e solventes tóxicos, bem como tornar o custo de análise mais barato (WHO, 2001; CARASEK e MERIB, 2015).

### *2.3 Preparo de Amostras*

A química analítica tem como objetivo sugerir ferramentas para determinar diferentes compostos com o uso de diversos materiais em inúmeras matrizes. Desta forma, essas análises se tornam complexas e passíveis de muitos erros, portanto, métodos devem ser propostos e que sejam apropriados e validados para tal situação (KRUG e ROCHA, 2016).

Para obter uma resposta confiável, uma investigação é feita em uma série de etapas. Essas etapas são diversificadas, podendo ser ou não obrigatórias, entretanto, algumas são mandatórias para se conseguir um sucesso na análise. Pode se denominar como marcha analítica essa série de procedimentos, dentre os quais, os mais importantes são uma revisão das informações, plano de estudos, amostragem, preparo de amostras, análises quantitativa/qualitativa, identificação/confirmação dos compostos, interpretação dos dados e relatório final (KRUG e ROCHA, 2016).

Dentro do contexto de análises, sejam rotineiras ou não, uma etapa é crucial em 75-80% dos métodos analíticos atuais, o preparo de amostras. Metodologias ainda são um desafio dentro da química analítica, devido à complexidade das amostras, seja pela influência de concomitantes e interferentes que dificultam a quantificação dos compostos alvo, a presença de materiais particulados que possam causar danos ao sistema analítico, ou até mesmo, a incompatibilidade da matriz com o instrumento. Dentre as metas que esta etapa busca são o isolamento e concentração do(s)

composto(s) de interesse, reduzindo potenciais interferentes da matriz, bem como adequar a níveis possíveis de detecção. Além disso, a matriz a ser utilizada deve ser compatível com o instrumento analítico sem que ocorra danificações ao mesmo (CARASEK, *et al.* 2018; NOVÁKOVÁ e VLČKOVÁ, 2009).

Apesar de promover maior possibilidade do sucesso de uma metodologia analítica, a etapa de preparo é crítica, pois neste procedimento podem ocorrer perdas do analito e contaminação da amostra devido a manipulação humana, e alguns procedimentos demandam longo tempo de execução. Sendo assim, a escolha da técnica é um fator determinante para se evitar maiores erros ao final da análise. Além dos parâmetros apresentados, deve-se levar em conta as características dos analitos, como solubilidade e polaridade, pois os sorventes utilizados nas técnicas de preparo devem apresentar propriedades suficientes para interagir com os compostos de interesse, e assim, garantir dados confiáveis (BOYACI *et al.* 2015; BORGES e QUEIROZ, 2015).

Muitas técnicas já foram desenvolvidas e vem sendo aplicadas até os dias atuais. Técnicas clássicas, como extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) e a extração em fase líquida (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) são bem consolidadas em organizações internacionais como métodos oficiais em laboratórios credenciados. Apesar de sua ampla aplicabilidade, essas técnicas apresentam problemas com matrizes complexas, bem como alto consumo de solventes tóxicos, gerando grandes quantidades de resíduos perigosos para o meio ambiente, e demandam tempo e manipulação extensa. Além disto, apresentam problemas ao se trabalhar com amostras *in vivo* por necessitarem de grandes quantidades, o que é um problema para amostras biológicas, como sangue e saliva (BOYACI *et al.* 2015; FILIPPOU *et al.* 2017).

Para se contornar algumas das limitações referente as técnicas clássicas, a partir do século XX, vem se desenvolvendo metodologias baseadas em técnicas de microextração, com finalidades de se melhorar as eficiências de extração e adequar esses métodos aos conceitos da química verde, com foco para diminuir a geração de resíduos, utilizar solventes menos tóxicos e em menor quantidade, e utilizar fontes renováveis como materiais para aplicação nas etapas de extração destes métodos (TOBISZEWSKI *et al.* 2009; GALUSZKA *et al.* 2013).

As técnicas de microextração são aplicadas para aliar vantagens como enriquecimento, limpeza da matriz e redução do tempo global para se realizar a análise. Um dos marcos mais importantes destas técnicas foram os desenvolvimentos das

técnicas de microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*), introduzida em 1990 por Janusz Pawliszyn, e as diversas técnicas de microextração em fase líquida (LPME, do inglês *Liquid Phase Microextraction*). Com o passar dos anos, novas técnicas foram surgindo, partindo-se dos princípios das técnicas anteriores, porém com diferentes configurações, sendo, por exemplo, a extração em ponteira descartável (DPX, do inglês *Disposable Pipette Extraction*) (CARASEK *et al.* 2018; PAWLISZYN, 1990; BREWER, 2003).

#### 2.4 Extração em Ponteira Descartável

No ano de 2003, o Dr. Willian Brewer desenvolveu uma técnica, partindo de uma modificação da SPE, sendo denominada DPX. A técnica de SPE é muito utilizada para concentração/extração de diversos compostos, e consiste em um cartucho contendo um material sorvente compactado. A amostra passa através dessa fase, retendo os analitos e em seguida é feita a passagem de um solvente adequado para eluição dos compostos (muitas vezes com o auxílio de vácuo) (BREWER, 2003).

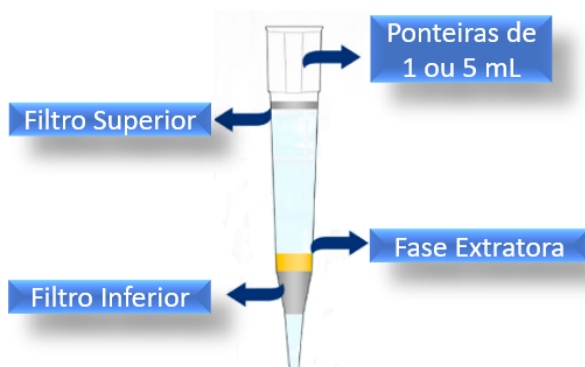
O equipamento da DPX consiste em uma ponteira de polipropileno, com volumes de 1 e 5 mL, onde o material extrator fica entre dois filtros, podendo ser constituídos, geralmente, de um polímero poroso ou uma membrana semipermeável, onde o filtro inferior fica preso e o superior pode ser removido. Esse propósito é permitir que o filtro inferior, amostras líquidas ou solventes sejam aspirados, e promovam a formação de bolhas, sem que ocorra a perda da fase extratora, e para o superior, que não ocorra a contaminação ao se fazer o processo de aspiração, bem como perda da matriz ou sorvente (BORDIN *et al.*, 2016; CARASEK *et al.*, 2022). Na Figura 1 é ilustrada uma ponteira de DPX (A) e os processos envolvidos para realização da técnica com um ciclo completo de experimento (B).

A DPX vem com uma configuração diferente, porém as etapas do processo são semelhantes à da SPE. Como é observado pelo esquema da Figura 1, as etapas seguem: (1) Condicionamento da fase extratora com solventes para limpeza e ativação dos sítios ativos para interação com os analitos. Este processo é alternativo, sendo necessária a avaliação da fase para realizar esta etapa; (2) Extração dos analitos com aspiração da amostra para o interior da ponteira juntamente com uma quantidade significativa de ar para promoção de microbolhas que proporcionam a mistura dinâmica entre sorvente/analito, aumentando a superfície de contato entre ambos, conseqüentemente, a eficiência e rapidez na extração. Em seguida, a amostra é descartada, estando retidos os

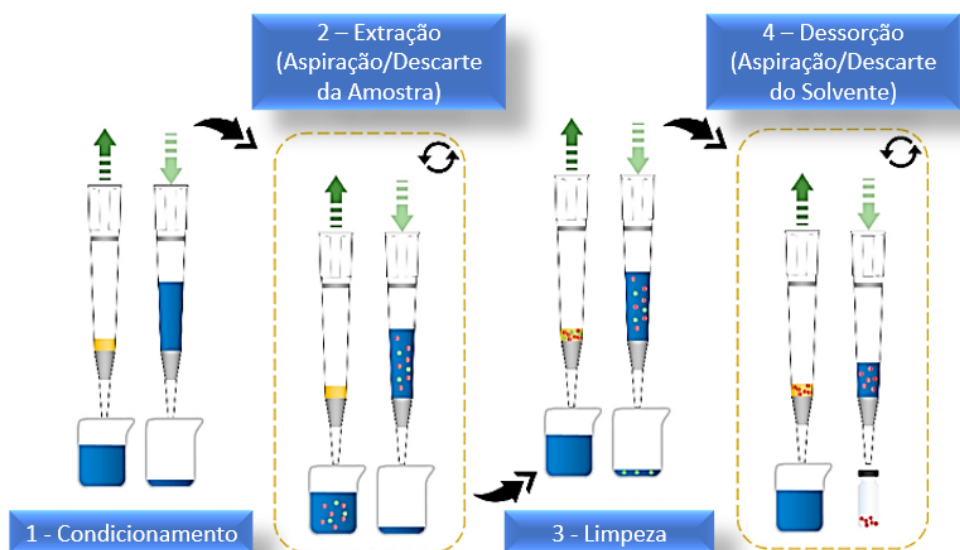
compostos alvo; (3) Limpeza da fase extratora com aspiração de um solvente adequado para retirar possíveis impurezas que causem interferências e problemas na análise. Assim como o condicionamento, também deve ser avaliada sua necessidade; (4) Dessorção dos analitos com outro solvente para quebrar a interação analito/solvente e poder injetar no equipamento analítico. O processo de aspiração de ar é realizado em todas as etapas da metodologia, assim, aumentando a eficácia de cada processo (BORDIN *et al.*, 2016; CARASEK *et al.*, 2022).

**Figura 1** - Representação esquemática: (A) do dispositivo da DPX; (B) etapas envolvidas no processo da técnica (Adaptado de: Carasek *et al.*, 2022).

(A)



(B)





Em cada uma das etapas envolvidas, alguns parâmetros são otimizados para garantir que as melhores condições são aplicadas na DPX e garantir a maior capacidade de extração e resultados precisos e exatos. São as principais variáveis otimizadas:

- I) Ciclos de Extração/Dessorção: etapa crucial e limitante para obter o melhor fator de enriquecimento, pois quanto mais ciclos na etapa de extração, maior a pré-concentração dos analitos, podendo ser realizados vários ciclos, em novas alíquotas de amostra ou não, para se obter a melhor resposta. Consequentemente, quantos mais ciclos na dessorção, melhor o enriquecimento no solvente e maior resposta analítica. Estes parâmetros interferem diretamente na frequência analítica do método, sendo em alguns casos, uma limitação se necessário fazer muitos ciclos (CARASEK *et al.*, 2022; CORAZZA *et al.*, 2017).
- II) Volume de Amostra/Solvente: este parâmetro também se relaciona diretamente com o fator de enriquecimento, visto que, quanto maior a razão amostra/solvente de dessorção, melhor a concentração dos analitos. Também é uma etapa limitante dependendo da amostra a ser trabalhada, mesmo utilizando alguns mililitros (CARASEK *et al.* 2022).
- III) pH da Amostra: esta variável deve ser estudada quando se está trabalhando com compostos ionizáveis e fases sensíveis a diferentes pHs. Além disso, pHs extremos podem ser prejudiciais dependendo da instrumentação a ser trabalhada. Para compostos orgânicos, geralmente o ideal é fazer o ajuste para que a maior parte esteja na forma neutra para ser extraída (CORAZZA *et al.*, 2017; HUELSMANN, *et al.* 2020).
- IV) Efeito *Salting-out*: este fator é principalmente estudado em fases aquosas e para analitos polares. A solvatação das moléculas de água pela adição de um sal (geralmente cloreto de sódio), permitem que os analitos estejam mais disponíveis para migrarem para a fase extratora e assim, aumentar a eficiência de extração. Porém, conforme se aumenta a concentração do sal, aumenta-se a viscosidade da matriz, podendo ocorrer problemas de entupimento nos filtros da DPX devido a precipitação do sal, além de dificultar a promoção de microbolhas para mistura dinâmica (HUELSMANN, *et al.* 2020).
- V) Solvente de Dessorção: a escolha do melhor solvente para a etapa de dessorção tem como objetivo quebrar a interação fase extratora/analito

em um menor número de ciclos possíveis, visando a melhor resposta analítica e maior frequência do método (MORÉS *et al.* 2019; OENNING *et al.*, 2018).

Além destas variáveis otimizadas, que são quase mandatórias na técnica de DPX, existem alguns parâmetros que podem ser avaliados dependendo da metodologia desenvolvida. São eles:

- VI) Avaliação da Fase Extratora Comercial/Alternativa: ao se trabalhar com fases alternativas, estudos são necessários para se avaliar a sua aplicabilidade na técnica de DPX. Propriedades físico-químicas como estabilidade, grupos funcionais e área superficial são importantes características para a escolha do material. Reprodutibilidade, seletividade e boa concentração dos analitos são cruciais para aplicação do sorvente. Além disto, a quantidade de massa também é importante pois se relaciona diretamente com o fator de enriquecimento dos analitos (BORDIN *et al.*, 2016; MORÉS *et al.*, 2019).
- VII) Tempo de Equilíbrio: em alguns casos específicos, alguns segundos podem ser necessários para atingir a máxima eficiência de extração/dessorção, portanto, empiricamente deve ser avaliado (MORÉS *et al.* 2019; OENNING *et al.* 2018).
- VIII) Condicionamento/Limpeza: principalmente ao se trabalhar com fases alternativas, condicionamentos podem ser aplicados para limpeza de impurezas e retirada de contaminações que podem estar presentes no material. Além disto, em alguns casos, a limpeza antes e depois da dessorção pode ser necessária caso muitos compostos sejam extraídos na etapa de extração e causem interferência, sendo utilizado um solvente alternativo para limpar a matriz e após a dessorção, para reutilizar a ponteira sem que haja efeito de memória (MORÉS *et al.*, 2019; OENNING *et al.*, 2018; CORAZZA *et al.* 2017).

A DPX é uma técnica simples e rápida, que, quando totalmente otimizada, faz o uso de poucos ciclos para extração/dessorção, tornando-a de alta frequência analítica e muito aplicável em laboratórios de rotina. Além disto, já existem fases comercialmente disponíveis com diferentes aplicações, muitas disponíveis através da DPX Technologies, Merck e outras companhias, com variações de ponteiras de 1 a 5 mL, e

quantidades de massas de 20 até 250 mg. Sorventes como estireno-divinilbenzeno, C18, sílica gel, são muito utilizados na extração de compostos de baixa polaridade, e materiais contendo grupos poliaminos, ácido sulfônicos, policarboxilatos, entre outros, aplicados para compostos polares e com diferentes faixas de pKa. Ademais, existem já outras fases disponíveis e que vem sendo desenvolvidas pelas empresas para ampliar a aplicação em diferentes compostos e amostras. Uma das formas de realizarem o desenvolvimento de novas metodologias utilizando novas fases, é através da DPX-Branco, uma ponteira contendo somente os filtros, mas sem material em seu interior (DPX TECHNOLOGIES, 2021; MERCK 2021; KOLE *et al.*, 2011; MORÉS *et al.*, 2019).

### 2.5 Materiais Alternativos Verdes

As fases extratoras comercialmente disponíveis se destacam por serem testadas e apresentarem bons e confiáveis resultados, quanto a precisão e exatidão. Apesar das diversas aplicações já realizadas, a quantidade de compostos orgânicos e matrizes vem cada vez mais aumentando, e assim, a necessidade de adquirir novos materiais, que apresentem uma ampla faixa de sorção, propriedades físico-químicas específicas, disponibilidade de matéria-prima para produção e que tornem o custo de produção e aplicação mais barato (KOLE *et al.* 2011; TURONŇOVÁ *et al.*, 2021). Muitas fases extratoras são produzidas em laboratórios para diferentes aplicações, sendo de grande importância para o meio acadêmico e podendo ser novas ferramentas para o uso em laboratórios de rotina/análises. Uma forma de agregar mais vantagens a estes novos sorventes, são adequá-los aos princípios da química analítica verde (GAC, do inglês *Green Analytical Chemistry*) (CARASEK *et al.*, 2021).

A GAC é um conceito que relaciona diversos princípios que buscam o desenvolvimento sustentável, relacionando com a implementação de sistemas que envolvam produtos e processos que sejam menos nocivos à saúde humana e ambiental, ou até mesmo, eliminando a sua necessidade (NAMIEŚNIK, 2001). As regras envolvidas na GAC foram introduzidas em 1998, relacionando 12 tópicos, dentre eles os seguintes, resumidamente (ANASTAS e WARNER, 1998):

- I) *Prevenção*: Sem resíduos não é necessário tratá-los após serem gerados;
- II) *Economia de Átomos*: os materiais usados nos reagentes devem ser consumidos e incorporados totalmente nos produtos;

- III) *Síntese de Produtos Menos Perigosos*: Sempre sintetizar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade;
- IV) *Desenho de Produtos Seguros*: As substâncias devem ser utilizadas de forma eficiente e segura;
- V) *Solventes e Auxiliares mais Seguros*: Reduzir ou eliminar os usos de substâncias auxiliares como solventes, secantes, entre outros e devem ser inofensivas;
- VI) *Busca pela Eficiência de Energia*: O uso de energia em processos químicos deve ser reduzido ao máximo. Sempre conduzir os processos em temperatura e pressão ambientes;
- VII) *Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima*: sempre que possível fazer uso de matérias primas renováveis nas técnicas;
- VIII) *Evitar Formação de Derivados*: evitar o uso de derivatizantes para reduzir o número de etapas e consumo de substâncias, bem como gerar resíduos;
- IX) *Catálise*: usar reagentes catalíticos ao invés dos estequiométricos;
- X) *Desenho para a Degradação*: Os produtos devem ser gerados de tal forma que se degradem de forma inofensiva e não poluam o ambiente;
- XI) *Análise em Tempo Real para Prevenção da Poluição*: desenvolver metodologias analíticas em que se deve realizar o monitoramento e controle da formação dos produtos para que não sejam nocivos;
- XII) *Química Intrinsecamente Segura para Prevenção de Acidentes*: as substâncias escolhidas para o processo devem ser selecionadas a fim de minimizar acidentes como explosões, vazamentos ou incêndios.

De maneira geral, todos os 12 princípios são aplicados dentro do preparo de amostras, onde solventes comumente utilizados como clorofórmio, benzeno, tolueno, entre outros, podem ser substituídos por outros como a própria água, os solventes eutéticos profundos (DES), os solventes de hidrofiliabilidade comutável (SHS), e alguns verdes produzidos de vegetais como ésteres metílicos de soja, ésteres lácticos, etanol, etc. Além disso, o uso de técnicas com tempo reduzido para se gastar menos energia, fazendo uso de técnicas de microextração que tenham alta frequência analítica, como a DPX, quando não possível deixar de utilizar solventes, fazer uso de menores

quantidades (de litros/mililitros para microlitros), gerando menos resíduos (SPIETELUN *et al.*, 2013; ARMENTA *et al.*, 2015; CARASEK *et al.* 2021).

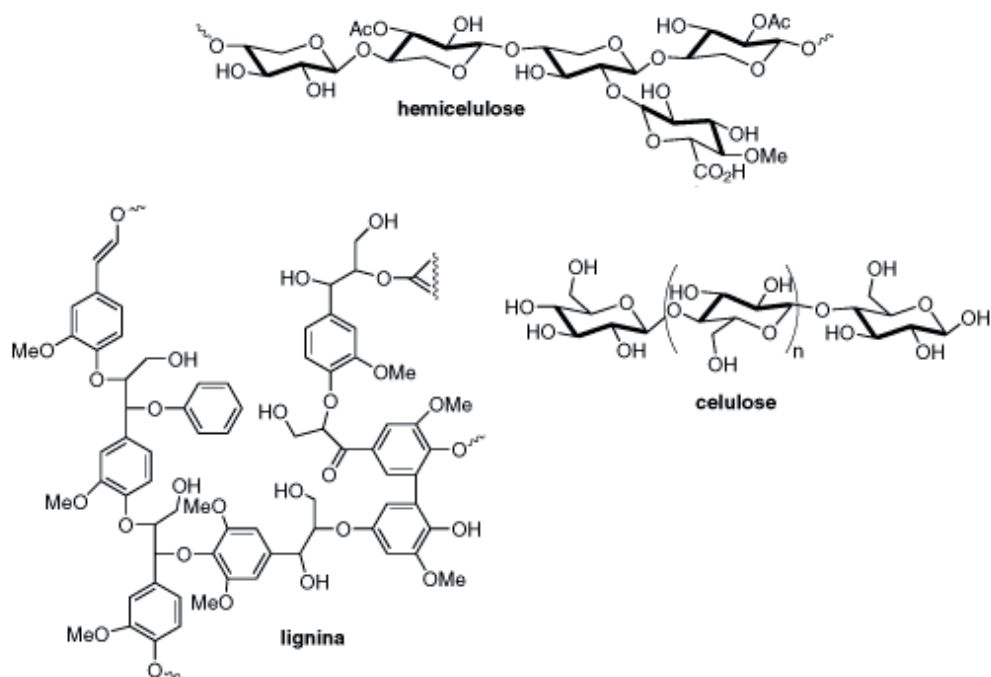
O tópico que cita o “Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima” se destaca para o uso de materiais que sejam biodegradáveis, renováveis, fontes que busquem ser ambientalmente amigáveis, mesmo que sejam obtidos por métodos sintéticos. Dentre esses materiais podemos citar os biossorbentes que são materiais naturais e apresentam macromoléculas em sua composição estrutural com diferentes grupos funcionais. Essas fases vêm se tornando uma importante alternativa aos sorbentes sintéticos presentes comercialmente, devido aos diferentes meios de interação, seja por sorção, complexação ou troca-iônica e visando principalmente a redução no custo de produção, menor toxicidade ao pesquisador/cientista/trabalhador que os manipulam e, conseqüentemente, geram resíduos com menor impacto ambiental (SILVA *et al.*, 2018; CARASEK *et al.*, 2019).

Além dos aspectos ambientais, os biossorbentes apresentam propriedades de interesse científico e tecnológico, como grande capacidade sorbente devido a área superficial ser ampla em suas partículas, estabilidade química e física a diversos produtos e substâncias, e vasta disponibilidade, o que os infere um custo mais acessível. Devido a essas características, dentro da academia, mais precisamente na química analítica, esses materiais têm apresentado um grande interesse na parte de desenvolvimento de metodologias analíticas envolvendo técnicas de extração/microextração (CARASEK *et al.*, 2019; RAMRAKHIANI *et al.*, 2017).

Biossorbente é um termo geral que descreve várias subclasses, com ênfase para biopolímeros, como lignocelulose e quitina/quitosana, algas, lodo ativado, leveduras, argilas, dentre outros. Dentre as apresentadas, a classe que se destaca neste trabalho é a lignocelulose. Esses materiais apresentam os biopolímeros mais abundantes em plantas e são constituídos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina (TRAN *et al.*, 2015). Estruturas representativas destes principais polímeros são apresentadas na Figura 2.

A celulose é o maior componente orgânico em abundância na natureza e apresenta uma estrutura majoritariamente orientada e cristalina (~65%), sendo sua cadeia linear importante para permitir a interação com compostos por ligações de hidrogênio, de forma intramolecular ou intermolecular. Além disso, uma característica interessante da celulose é uma certa resistência química, tanto a alguns solventes quanto a atividade microbiana (DING e HIMMEL, 2006; ABDOLALI *et al.* 2014).

**Figura 2** - Estruturas químicas da celulose, hemicelulose e lignina (Adaptado de: Ferreira e da Rocha, 2009).



Diferentemente da celulose, a hemicelulose é uma rede não-cristalina formada por polissacarídeos, pentoses e hexoses, e/ou ácido glucurônico, estando dispostas de maneira intercalada a celulose, conferindo elasticidade a este polímero. Já a lignina, é o segundo maior componente na natureza, apresentando uma estrutura heterogênea, complexa, com rede cristalina não-definida e, diferente dos outros dois polímeros, a sua rede possui anéis aromáticos que conferem uma certa hidrofobicidade, concedendo a parede celular de plantas uma proteção mecânica, protegendo de fatores externos e garantindo uma boa estabilidade física. Devido a composição química heterogênea e a estrutura física, estes biopolímeros possuem a capacidade de interagir com diversos compostos orgânicos, tornando-se interessantes para aplicação como materiais sortivos (HOFRICHER, 2022; KEN e CHEN, 2013). Na Tabela 1 é apresentado um comparativo da composição genérica de materiais lignocelulósicos no que diz respeito a sua composição, grupos funcionais e área superficial.

**Tabela 1** - Algumas propriedades de materiais lignocelulósicos (Adaptado de: Tran *et al.*, 2015).

<b>Composição química</b>	<b>Grupos funcionais</b>	<b>Área superficial</b>
Celulose: 7-73%; Hemicelulose: 6 a 33%; Lignina: 2 a 33%; Cinza: 1 a 17%; Outros: 1 a 69%	(-OH), (-COOH), (Si-OH), alcino, anéis aromáticos, cetona, aldeídos e lactonas.	Forma bruta: 3,41 a 25,97 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> Forma modificada: 566 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>

Como é possível observar, toda a composição química confere a presença de diferentes grupos funcionais, principalmente grupos hidroxila, carboxila, silanóis e anéis aromáticos, mas também apresentando grupos cetonas, aldeídos e lactonas, permitindo diferentes interações como Van der Waals, dipolo-dipolo,  $\pi$ - $\pi$ , forças eletrostáticas (troca-iônica) e interações intermoleculares fracas. Além disso, uma importante propriedade destes materiais é a área superficial que apresentam em sua forma bruta e após um tratamento específico para serem utilizados como sorvente, garantindo um aumento de aproximadamente 20 vezes. Juntamente com a alta porosidade, esses materiais lignocelulósicos já foram estudados e se apresentaram interessantes na adsorção de diversos compostos orgânicos, desde poluentes e até mesmo persistentes no meio ambiente. Existem diversos materiais desta classe, e o que os diferencia é a quantidade de cada polímero em sua composição (TRAN *et al.*, 2015; ABDOLALI *et al.*, 2014). Na Tabela 2 são apresentados alguns biossorventes com a proporção de celulose, hemicelulose e lignina. Além dos apresentados, existe um biossorvente obtido de uma casca de árvore do sobreiro, a cortiça, um material de grande importância comercial e acadêmica, sendo apresentada na Tabela 2 a proporção geral entre os seus 3 principais componentes lignocelulósicos.

**Tabela 2** - Materiais lignocelulósicos de baixo custo com a proporção dos principais componentes químicos de suas estruturas (Adaptado de: Tran *et al.*, 2015).

<b>Material</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Cinzas (%)</b>	<b>Outros (%)</b>
<b>Casca de Arroz</b>	~35	~25	~20	~15	~5
<b>Casca de Coco</b>	~45	~10	~35	~3	~7
<b>Madeira Dura</b>	~45	~30	~20	~3	~2
<b>Madeira Macia</b>	~35	~30	~30	~3	~2
<b>Bambu</b>	~40	~35	~15	~3	~7
<b>Bagaço de Cana</b>	~40	~30	~20	~1	~9
<b>Madeira de Pinho Vermelho</b>	~40	~15	~25	~1	~19
<b>Casca de Banana</b>	~15	~5	~10	Não Informado	~70
<b>Caule de Bananeira</b>	~60	~5	~20	~2	~13
<b>Resíduos de Café</b>	~40	~5	~1	~3	~49
<b>Folhas de Palmeira</b>	~50	~25	~20	~3	~2
<b>Folhas de Abacaxi</b>	~75	~5	~10	~2	8
<b>Cortiça</b>	~15	~5	~25	~10	~45

## 2.6 Cortiça

A cortiça é obtida da casca de uma árvore, de nome científico *Quercus Suber L*, sendo constituída principalmente de suberina, lignina, celulose e hemicelulose



(polissacarídeos), ceras e outros extratos. Assim como apresentado na tabela anterior, a cortiça também tem diferentes proporções de cada um dos compostos citados, sendo já relatado na literatura um estudo que envolve três diferentes espécies de cortiça em três regiões distintas, apresentando a proporção de cada um dos seus principais componentes (OLIVELLÁ *et al.*, 2013). Este estudo é apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3** - Proporção dos principais componentes da cortiça para diferentes amostras e regiões (Adaptado de: Olivellá *et al.*, 2013).

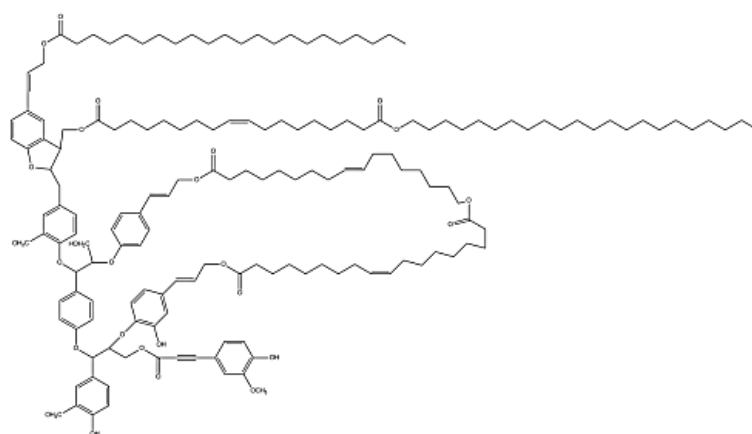
Amostra de Cortiça <sup>1</sup>	Fragmento <sup>2</sup>	Composição em Proporção (%)			
		Suberina	Lignina	Polissac.	Extrativos
A	B	40.7	23.9	8.6	11.8
	C	41.7	13.4	7.4	19.7
B	B	21.1	27.9	10.1	12
	C	33.5	31.0	2.5	12.6
C	B	33.8	25.1	12.6	13
	C	48.7	22.7	10.3	11.7

<sup>1</sup> Três amostras da casca do sobreiro desconhecidas obtidas de três origens diferentes.

<sup>2</sup> Estudo realizado em dois fragmentos de cada amostra de cortiça, sendo B a parte da casca externa e C a parte intermediária da cortiça.

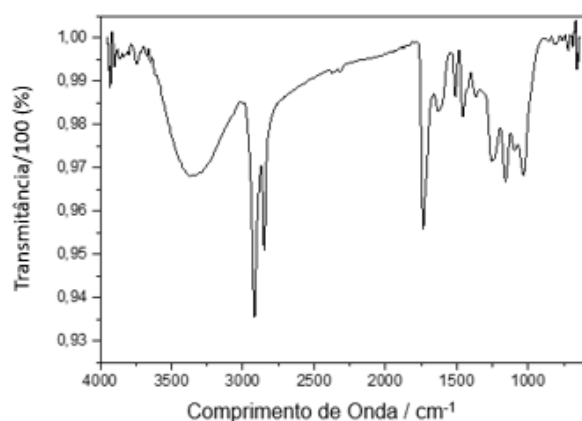
Ao analisar os dados obtidos, é possível afirmar que a maior contribuição para a composição da cortiça é feita pela suberina, com aproximadamente 40% de sua estrutura, seguindo da lignina, cerca de 30%, para a celulose e hemicelulose a porcentagem é pequena, sendo comparada com os extrativos, somando um total de 30%. Como mencionado no tópico 2.5 *Materiais Alternativos Verdes*, a lignina contribui com a parte de anéis aromáticos e grupos funcionais polares, entretanto, a suberina é uma rede de diversos monômeros de cadeia alifática, majoritariamente formada de carbono e hidrogênio, com poucos grupos funcionais em sua estrutura (OLIVELLÁ *et al.*, 2013; GALLARDO-CHACÓN e KARBOWIAK, 2015). Uma representação da rede polimérica constituída por diversos monômeros presentes na suberina é apresentada na Figura 3.

**Figura 3** - Rede polimérica da suberina (Adaptado de: Gil, 1993).



A combinação de suberina e lignina na estrutura da cortiça conferem a ela uma hidrofobicidade significativa, além disso, a presença dos diferentes grupos permite a interação com compostos tanto polares quanto apolares, mostrando a versatilidade do material (OLIVELLÁ *et al.*, 2015). Para comprovar a presença destes grupos na cortiça, Mafra *et al.* e Dias *et al.* obtiveram espectros de infravermelho onde foi possível identificar as principais bandas presentes, sendo caracterizadas e definidas para cada grupo funcional apontado. Na Figura 4 é apresentado um espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier e amostragem por Reflectância Total Atenuada, (ATR-FTIR, do inglês *Attenuated Total Reflection – Fourier Transform Infrared*) das bandas obtidas para uma quantidade de pó de cortiça, e na Tabela 4 estão definidas para quais grupos e compostos são referentes a estas bandas (MAFRA *et al.*, 2018; DIAS *et al.*, 2013).

**Figura 4** - Espectro de ATR-FTIR obtido para o pó da cortiça (Adaptado de: Mafra *et al.* 2018; Dias *et al.* 2013).



**Tabela 4** - Frequências de absorção obtidas a partir do espectro de ATR-FTIR da Figura 4 dos grupos funcionais identificados para o pó de cortiça (Adaptado de: Mafra *et al.* 2018).

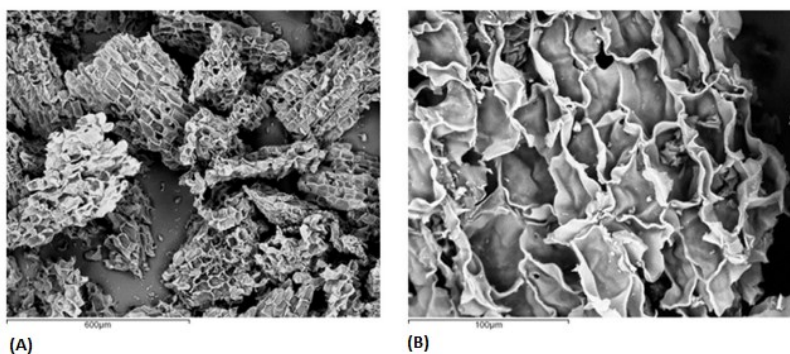
$\tilde{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )	Estrutura/Grupo de Superfície	Constituinte
3369	Alongamento OH	Água, hemicelulose, celulose, lignina.
2918, 2851	Alongamento CH <sub>3</sub> alifático	Suberina.
1735	Alongamento C=O	Suberina, hemicelulose, celulose.
1631, 1509	Alongamento C=C	Suberina, lignina, extrativos.
1509	C≡C	Lignina, anel aromático.
1458	Deformação Assimétrica CH	Lignina.
1458	δsCH <sub>2</sub>	Grupos alifáticos da suberina.
1366	Deformação Simétrica CH	Extrativos.
1366	δsCH <sub>3</sub>	Suberina.
1256	Alongamento CO	Suberina, hemicelulose, celulose, lignina.
1158	Deformação Assimétrica CO	Suberina, hemicelulose, celulose, lignina.
1158	ν <sub>as</sub> COC	Suberina.
1095	Deformação CH	Hemicelulose, celulose.
1095	δCH	Polissacarídeos.
1031	Deformação CO	Hemicelulose, celulose.
1031	δCO	Polissacarídeos.
719	τCH (oop)	Suberina.

Como é possível observar, diversas bandas são obtidas para os distintos grupos e ligações presentes na estrutura composta da cortiça, destacando-se o alongamento OH em 3369 cm<sup>-1</sup>, uma banda alargada como sendo característica da presença de hidroxilas nos polissacarídeos e lignina, e para água que eventualmente é absorvida, em 2918 e 2851 cm<sup>-1</sup> para o grupo CH<sub>3</sub> alifático pertencente aos monômeros de suberina, majoritariamente, e entre 1735 e 1631 cm<sup>-1</sup> são alongamentos das ligações específicas das carbonilas (C=O) que são relativas a suberina e lignina, respectivamente. Já para a

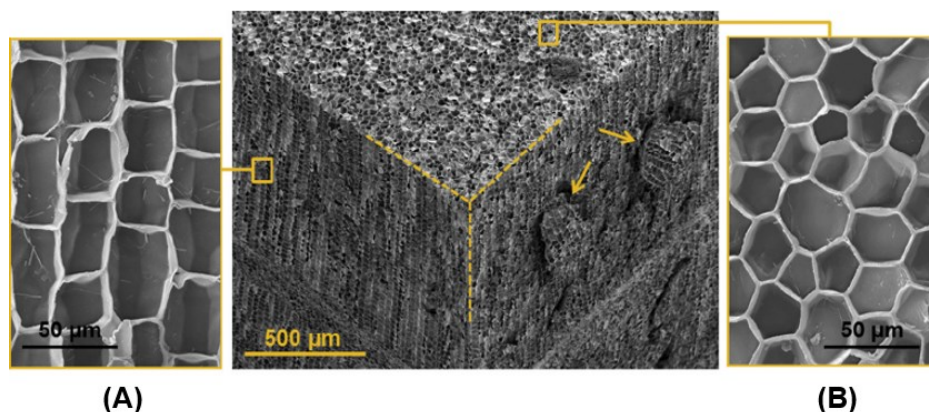
ligação C=C em  $1509\text{ cm}^{-1}$  faz alusão aos anéis aromáticos presentes na lignina. Os demais comprimentos de onda, de  $1458$  até  $719\text{ cm}^{-1}$ , são deformações e alongamentos de ligação menos característicos, porém, pertencentes a toda a parte dos polímeros presentes na cortiça, relacionado as ligações entre carbonos, hidrogênios e oxigênios (CH e CO) (MAFRA *et al.*, 2018; DIAS *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2015; PINTOR *et al.*, 2012). Junto a essa caracterização, uma complementação foi realizada através da espectroscopia de energia dispersiva de raio-X (EDS, do inglês *Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy*), onde os principais elementos foram quantificados como sendo o carbono o principal ( $87.43\% \pm 0.47$ ), seguido do oxigênio ( $6.55\% \pm 1.45$ ) e nitrogênio ( $6.02 \pm 0.32$ ), sendo este último, proveniente das ceras e outros extrativos, principalmente.

Além da composição química heterogênea, a cortiça apresenta uma estrutura física muito porosa e anisotrópica, ou seja, suas propriedades variam de acordo com a direção. Essa composição remete a um formato de “favo de mel”, onde pode ser observado em uma microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*) nas Figuras 5, com cortes irregulares de pedaços da casca do sobreiro (cortiça) e na Figura 6 com cortes regulares nas direções radiais e não-radiais, indicando sua anisotropia. Na Figura 7, é apresentado uma microscopia obtida por SEM do pó de cortiça, em tamanhos médios de partículas que variam de  $125$  a  $250\text{ }\mu\text{m}$ , o que proporciona uma alta porosidade e alta superfície de contato, com valores médios de  $33\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$  e um agregado de células que indicam cerca de 42 milhões por centímetro cúbico. (OLIVELLÁ *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2017; MAFRA *et al.*, 2018).

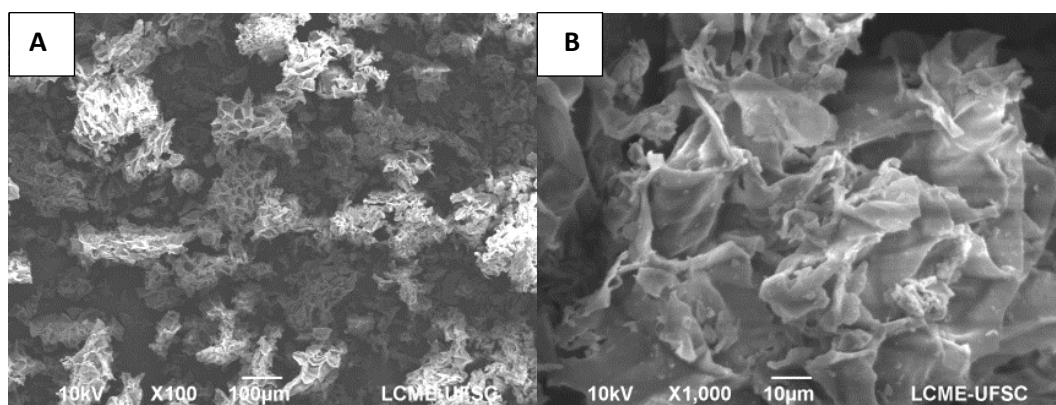
**Figura 5** - Favo de mel da cortiça vista pela microscopia eletrônica de varredura sendo: (A)  $600\text{ }\mu\text{m}$  e (B)  $100\text{ }\mu\text{m}$  (Adaptado de: Barbosa *et al.*, 2017).



**Figura 6** - Estrutura 3D de um pedaço da casca do sobreiro (cortiça) mostrando a sua porosidade (imagem ao centro com 500µm) e direções de corte: (A) Não-radial (50 µm) e (B) Radial (50 µm) (Adaptado de: Fernandes *et al.*, 2015).



**Figura 7** - Imagens de SEM obtidas para o pó de cortiça em: (A) magnificação em 100x e (B) em 1000x (Adaptado de: Mafra *et al.* 2018).



A cortiça vem sendo empregada em técnicas de preparo de amostras pelas suas propriedades físico-químicas definidas e interessantes, bem como a possibilidade de interagir com diferentes compostos orgânicos por distintas ligações químicas. Ainda é um material recente nesta área, sendo aplicada em diversas técnicas para mostrar a sua versatilidade não só para extração de diferentes compostos, mas sua compatibilidade com diferentes configurações. Na Tabela 5 são apresentadas aplicações da cortiça como fase extratora em diferentes técnicas de preparo de amostras, incluindo a SPME, a microextração em barra adsorvente (BAµE, do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*), a extração sortiva em disco rotatório (RDSE, do inglês *Rotating-Disk Sorptive Extraction*), a extração sortiva rotatória (SER, do inglês *Rotating Sorptive Extraction*), a

microextração em filme fino (TFME, do inglês *Thin-Film Microextraction*) e a DPX, sendo aplicadas para diferentes matrizes ambientais e biológicas, compostos e instrumentos de análises (HPLC-DAD, LC-MS/MS, GC-MS e GC-ECD).

**Tabela 5** - Aplicação da cortiça como fase extratora em técnicas de preparo de amostras e aplicação em diferentes matrizes, compostos e instrumentos de separação e análise (Fonte: Autoria Própria, 2022).

<b>Técnica de Preparo de Amostras</b>	<b>Analitos</b>	<b>Amostra</b>	<b>Instrum.</b>	<b>Ref.</b>
SPME	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	Água	GC-MS	Dias <i>et al.</i> , 2013
SPME	Pesticidas Organoclorados	Água	GC-ECD	Dias <i>et al.</i> , 2015
SPME	Filtros UV	Água	GC-MS	Silva <i>et al.</i> , 2017
BA $\mu$ E	Parabenos, Benzofenona e Triclocarban	Água	HPLC-DAD	Dias <i>et al.</i> , 2015
BA $\mu$ E	<i>Hexanal e Heptanal</i>	<i>Urina Humana</i>	<i>HPLC-DAD</i>	Oenning <i>et al.</i> , 2017
BA $\mu$ E	Parabenos	Água	HPLC-DAD	Morelli <i>et al.</i> , 2020
BA $\mu$ E	Pesticidas Organoclorados	Água	GC-ECD	Hinz <i>et al.</i> , 2021
DPX	<i>Fármacos</i>	<i>Urina Humana</i>	<i>HPLC-DAD</i>	<i>Mafra et al.</i> , 2018
				Continua...

<b>Técnica de Preparo de Amostras</b>	<b>Analitos</b>	<b>Amostra</b>	<b>Instrum.</b>	<b>Ref.</b>
DPX	Contaminantes Emergentes	Água	HPLC-DAD	Morés <i>et al.</i> , 2019
RDSE	Parabenos	Água	LC-MS/MS	Vieira <i>et al.</i> , 2018
RDSE	Compostos Micro Poluidores	Água	GC-MS	Vieira <i>et al.</i> , 2020
RSE	Pesticidas	Frutas e Vegetais	GC-MS	Vieira <i>et al.</i> , 2022
TFME	Contaminantes Emergentes	Água	HPLC-DAD	Morés <i>et al.</i> , 2017

Durante esses últimos 10 anos, a cortiça começou a ser aplicada dentro das técnicas de preparo de amostras como pode ser observado na Tabela 5. Muitas de suas aplicações estão centradas em amostras ambientais, principalmente para compostos poluentes como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, pesticidas, parabenos e alguns contaminantes emergentes sendo filtros UV, plastificantes, antibactericidas, entre outros. Observando estas aplicações, assegura-se sua capacidade sortiva em extrair diferentes compostos orgânicos. Assim, outras matrizes como as alimentares começaram a ser exploradas, iniciando com a de Vieira *et al.* 2022 e em matrizes biológicas, sendo uma aplicada em BA $\mu$ E e outra em DPX para urina humana até o momento.

Partindo-se dos trabalhos que demonstram a versatilidade desse material, no emprego de extrações para compostos tanto polares, quanto apolares, as propriedades ambientalmente amigáveis que se encaixam nos princípios da química analítica verde e as poucas aplicações desta fase em amostras biológicas, foi selecionada para desenvolvimento e pesquisa de diferentes metodologias envolvendo analitos de

tendência biológica em amostras de urina, utilizando a DPX, uma técnica simples, de frequência analítica satisfatória e boa capacidade de sorção de compostos orgânicos.



## CAPÍTULO III – OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

O objeto principal desta tese é desenvolver metodologias analíticas aplicando a técnica de extração em ponteira descartável (DPX) e expandindo o uso de um material alternativo verde, o pó de cortiça, para o isolamento e pré-concentração de compostos marcadores biológicos em amostras de urina humana com identificação e quantificação por cromatografia gasosa com detectores por ionização em chama (GC-FID) e acoplada com espectrometria de massas (GC-MS), e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada por um detector por arranjo de diodos.

### 3.2 Objetivo Específico

- Produzir o pó de cortiça de 200 *mesh* ( $\geq 75\mu\text{m}$ ) para ser utilizado como fase extratora para a técnica de DPX;
- Otimizar os principais parâmetros de otimização da técnica de DPX;
- Determinar os principais parâmetros analíticos de mérito: LOD, LOQ,  $R^2$ , faixa linear de trabalho, equação linear das curvas, recuperações relativas, precisões intradia e interdía;
- Comparar os métodos propostos com outros publicados na literatura.

#### 3.2.1 Proposta I

- Identificar o analito THC-COOH no instrumento de *fast*-GC-FID;
- Comparar a cortiça com outras fases comerciais e biossorbentes;
- Otimizar os parâmetros para a extração/dessorção de DPX/Cortiça, sendo:  
Extração: Diluição da Urina, Ciclos, Tempo, Massa de Cortiça.  
Dessorção: Ciclos, Tempo e Solvente ou Mistura de Solventes.
- Otimizar etapa de limpeza entre ciclos de experimentos;
- Estudar estabilidade e reprodutibilidade das ponteiras de DPX-Cortiça;
- Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de urina humana fornecidas pelo IGP-RS e de voluntários anônimos.

#### 3.2.2 Proposta II

- Separar e identificar as aminas biogênicas (cadaverina, putrescina e espermidina) no GC-MS;

- Otimizar os parâmetros para a derivatização/extração/dessorção de DPX/Cortiça, sendo:
  - Derivatização: Tempo e Volume de Derivatizante;
  - Extração: Diluição da Urina, Ciclos, Massa e Tempo;
  - Dessorção: Solvente, Ciclos e Tempo.
- Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de urina humana fornecidas por voluntários anônimos.

### 3.2.3 Proposta III

- Separar e identificar os aldeídos (hexanal e heptanal) no HPLC-DAD;
- Otimizar os parâmetros para a derivatização/extração/dessorção de DPX/Cortiça, sendo:
  - Derivatização: Tempo de Impregnação e Volume de Derivatizante;
  - Extração: Diluição da Urina, Ciclos, Massa e Tempo;
  - Dessorção: Solvente e Ciclos.
- Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de urina humana fornecidas por voluntários anônimos.

## CAPÍTULO IV – RÁPIDA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO-11-NOR-9-CARBOXI- $\Delta^9$ -TETRAHIDROCANABINÓICO (THC-COOH) POR *FAST-GC-FID* EM URINA HUMANA EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM PONTEIRA DESCARTÁVEL E CORTIÇA COMO FASE EXTRATORA

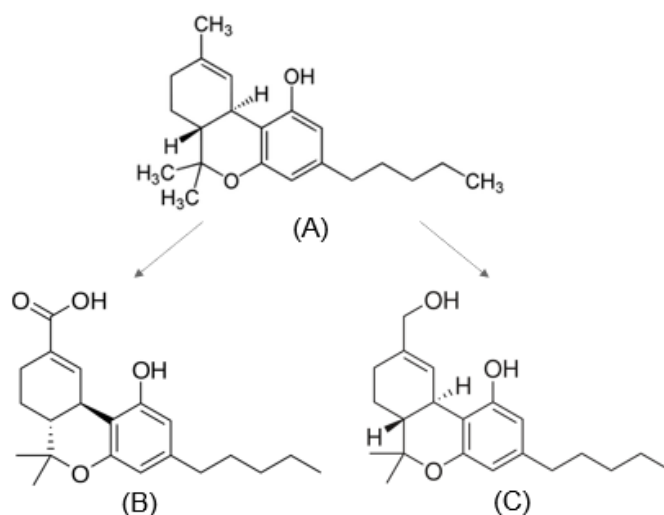
### 4.1 Introdução

A urina é uma matriz complexa pois apresenta uma quantidade relativamente alta de compostos, dentre eles, água, sais, proteínas, além de medicamentos, substâncias provenientes da dieta do indivíduo, entre outros. Por conta disto, injetar diretamente em equipamentos analíticos podem acarretar entupimentos, danificações das conexões e conseqüentemente, erros de análise. Assim, concentrar os compostos de interesse e adequar a uma matriz compatível ao sistema é necessário através do preparo de amostras. Essa matriz é interessante pois é possível obter em quantidades grandes e de maneira não invasiva, tornando a possibilidade de se desenvolver novas metodologias (ZHANG *et al.*, 2012; CARASEK e MERIB, 2015). Focando-se na análise de canabinóides, a urina é considerada a matriz primária para determinação destes compostos pois podem estar presentes em até 4 dias em indivíduos que fazem uso de baixas quantidades da planta que contém estas substâncias (MONTESANO *et al.*, 2014).

A *Cannabis* é a droga ilícita de maior consumo mundialmente, sendo relatada pelo Relatório Mundial de Drogas das Nações Unidas (UNODC, do inglês *U.N. Drug World Report*) com aproximadamente 183 milhões de usuários no ano de 2017 (MEIER *et al.*, 2018; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2014; UNODC, 2017). Os principais compostos presentes são os terpenóides tricíclicos, também conhecidos como canabinóides. Dentre estes, o principal é o (-)-trans- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, ou apenas  $\Delta^9$ -THC, caracterizado em 1964 por Raphael Mecholaum (PALMER *et al.*, 2002; MERCOLINI *et al.*, 2008; RUSSO, 2007). Este composto é o principal canabinóide com atividade psicoativa, sendo rapidamente absorvido no organismo, cerca de 10-12 horas, ligando-se a proteínas no plasma e distribuindo-se entre diversos órgãos do corpo, como pulmões, fígado e outros tecidos adiposos. A sua absorção gera metabólitos por processos enzimáticos através do Citocromo P-450, sendo o majoritário o ácido-11-nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinóico (THC-COOH), seguido do 11-hidroxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC-OH), e metabólitos secundários em baixas concentrações (MERCOLINI *et al.*, 2008; RAHARJO e VERPOORTE, 2004;

BATTISTA *et al.*, 2013). Na Figura 8 são apresentadas as estruturas dos três compostos citados.

**Figura 8** - Estruturas dos canabinóides: (A)  $\Delta^9$ -THC; (B) THC-COOH; e (C) THC-OH (Adaptado de: Citty *et al.*, 2018).

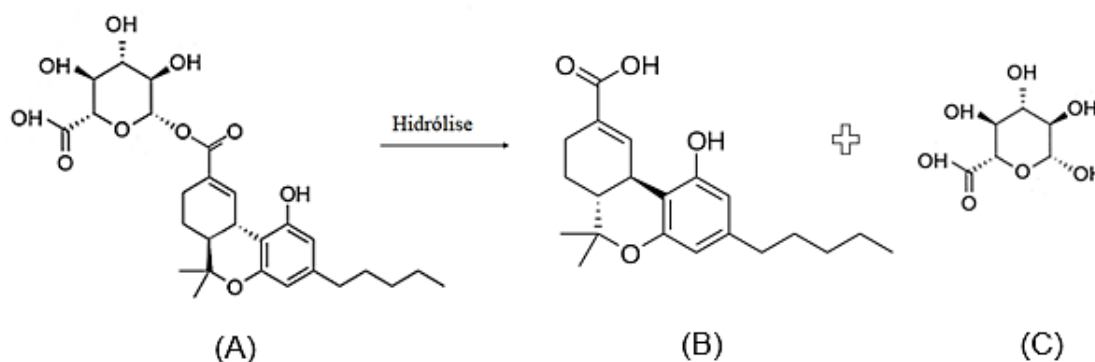


A planta é muito utilizada em diversas áreas da ciência, sendo apresentados na literatura estudos com tratamento para cânceres, epilepsia, doenças como Parkinson e Alzheimer, e em problemas associados a ansiedade. Entretanto, por conter os canabinóides psicoativos, o uso incorreto e descontrolado pode levar o usuário a problemas de alteração de humor, comportamento e cognição, por afetar diretamente o sistema nervoso central, ocasionando situações de risco a saúde do indivíduo. Portanto, o controle e determinação destes compostos é importante (MERCOLINI *et al.*, 2008; HUNG *et al.*, 2015; IUVONE *et al.*, 2009; LIGRESTI *et al.*, 2006; LOWE *et al.*, 2009). A principal forma de análise do  $\Delta^9$ -THC é pelos metabólitos, sendo o THC-COOH formado aproximadamente 70% do precursor (BATTISTA *et al.*, 2013).

O ácido-11-nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinóico apresenta em sua estrutura um grupo ácido carboxílico ligado ao anel cíclico não aromático, possuindo uma propriedade não psicoativa e sendo excretado na urina na forma livre e ligado, principalmente, ao ácido glucurônico. Para contornar essa situação e ter o analito na forma livre, uma etapa de desproteinização pode ser realizada utilizando a enzima  $\beta$ -glucuronidase para quebrar a ligação entre o THC-COOH e o ácido glucurônico (BATTISTA *et al.*, 2013; CITTY *et al.*, 2018). Na Figura 9 é ilustrada a reação com os

respectivos compostos e na Tabela 6 são apresentadas as principais propriedades físico-químicas do THC-COOH. As propriedades apresentadas na Tabela descrevem um comportamento com caráter apolar acentuado ( $\log P = 5,24$ ), um pKa ácido (pKa) referente ao hidrogênio do ácido carboxílico ligado ao anel não aromático, uma baixa solubilidade em água devido a suas cadeias carbônicas longas e um nível afirmativo utilizado na legislação para indicar o uso de cannabis com o produto de transformação referente ao THC-COOH (DRUGBANK, 2022; KULIG, 2017).

**Figura 9** - Reação de desproteção através da enzima  $\beta$ -glucuronidase, sendo: (A) THC-COOH ligado ao ácido glucurônico; (B) THC-COOH livre; e (C) ácido glucurônico livre (Adaptado de: Citty *et al.* 2018).



**Tabela 6** - Propriedades físico-químicas e nível de concentração afirmativo do metabólito THC-COOH para usuários de *Cannabis sativa* L na urina (Fonte: DrugBank, 2022; Kulig, 2017).

Fórmula Química	$\log P$	pKa	Solubilidade ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Nível de THC-COOH afirmativo na Urina
$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4$	5,24	4,02	$8,39 \times 10^{-3}$	$15 \text{ ng mL}^{-1}$

Após hidrólise, as metodologias oficiais mais empregadas são a SPE e LLE (CITTY *et al.*, 2018; NOVÁKOVÁ, 2013). A problemática dessas técnicas é que vão

contra princípios da GAC já descritos. Além disso, estudos com técnicas miniaturizadas de preparo de amostras para matrizes biológicas e determinação de canabinóides, são pouco explorados. Associando estes argumentos a complexidade da matriz de urina, mesmo tendo uma etapa prévia de desproteínização, muitos compostos ainda são presentes, como sais, macromoléculas, hormônios etc. que podem interferir na análise e prejudicar equipamentos com sua injeção direta. Então, faz-se a necessidade de aplicação de novas técnicas, como a DPX, para se adequar a matriz à instrumentação desejada e concentrar o analito a níveis de detecção adequados, além de materiais alternativos mais naturais, como a cortiça para extrações eficientes, fornecendo dados satisfatórios.

## 4.2 Metodologia

### 4.2.1 Reagentes, Materiais e Amostras

O padrão analítico do ácido-11-nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinóico (THC-COOH) foi adquirido da Cerilliant Analytical Reference Standards (Round Rock, TX, EUA). Uma solução de trabalho foi preparada na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  em metanol (MeOH) com grau HPLC obtido de J.T. Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA). Os solventes acetonitrila (ACN) e acetato de etila (AcEt) são de grau HPLC obtidos da J.T. Baker e Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), respectivamente. A água ultrapura (UP) foi obtida de um sistema de purificação com resistividade de  $18,3 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  (Mega Purity, Billerica, EUA). O sulfato de sódio anidro foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Ponteiros de 1 mL de DPX-Branco foram obtidas na DPX Labs (Columbia, SC, EUA). A amostra de urina branco utilizada no desenvolvimento do método foi obtida de um voluntário do sexo masculino, utilizando frascos PTFE, selados e mantidos refrigerados a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para avaliar a metodologia desenvolvida, foram obtidas oito amostras de urina de indivíduos anônimos entre 20 e 30 anos, sendo as positivas cedidas pelo Instituto Geral de Perícias do Rio Grande do Sul. O Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina aprovou este estudo com o número 11300913718.3.0000.0121.

### 4.2.2 Preparo dos Biossorventes para Aplicação na DPX

Foi realizado um comparativo da cortiça com outras fases extratoras, sendo a bráctea, *Moringa oleifera*, como fases verdes alternativas e, C18 e WAX, como

comerciais. Para os biossorbentes, diferentes preparos foram realizados para se obter o pó utilizado nas ponteiras de DPX. Os procedimentos são descritos a seguir:

- Pó de cortiça: O procedimento para preparar o pó de cortiça já foi estabelecido anteriormente por Dias *et al.*, 2013. Rolhas de cortiça foram obtidas em garrafas de vinho, nos mercados locais de Florianópolis, SC, Brasil. Uma etapa de lavagem com água ultrapura foi realizada por 2 h sob sonicação, sendo repetida até a água ficar transparente. O segundo passo foi a secagem por 12 horas a 110 °C em estufa. Em seguida, o pó de cortiça foi obtido utilizando uma lixa e as partículas com tamanho acima de 200 mesh foram separadas com auxílio de uma peneira e utilizadas para os experimentos. Foi realizada uma etapa de condicionamento usando 10 ciclos de 400 µL de uma mistura de ACN/MeOH 50:50 (v/v) e 5 ciclos de 700 µL de água ultrapura como descrito por Morés *et al.*, 2019.
- Pó de bráctea: Essa fase foi obtida de árvores cultivadas na cidade de Curitiba (SC, Brasil), e o pó foi preparado como descrito por Ramrakhiani *et al.*, 2017. As brácteas foram moídas usando um moinho de facas e o pó foi peneirado para obter partículas com tamanho acima de 200 mesh. A etapa de lavagem/condicionamento foi realizada usando 10 ciclos de 400 µL de ACN e 10 ciclos de 700 µL de água ultrapura.
- Pó de *Moringa oleifera*: As cascas de Moringa foram obtidas na cidade de Ituiutaba, MG, Brasil, com o procedimento realizado por do Carmo *et al.*, 2013. As sementes foram lavadas em água destilada e secas. Após a secagem, eles foram moídos com auxílio de um moinho de facas e passados por uma peneira de malha para obter o pó usado como fase de extração em partículas com tamanho acima de 200 mesh. O condicionamento foi realizado utilizando uma mistura de 400 µL de ACN/MeOH 50:50 (v/v) e 10 ciclos de 700 µL de água ultrapura.

Para as fases comerciais C18 e WAX, uma simples limpeza em solvente orgânico 400 µL de ACN/MeOH 50:50 (v/v) foi aplicado com 2 ciclos da mistura.

#### 4.2.3 Instrumentação e Condições Cromatográficas

Um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID) modelo GC-2010 de Shimadzu (Kyoto, Japão) foi utilizado. A separação

cromatográfica foi realizada em uma coluna RTX-1 (espessura do filme de 10 m x 0,10 mm x 0,10  $\mu\text{m}$ ). Hidrogênio ultrapuro foi usado como gás de arraste a 0,6 mL  $\text{min}^{-1}$  (White Martins, São Paulo, Brasil). O programa de temperatura do forno foi definido da seguinte forma: 180 °C e aumentado para 240 °C a 60 °C  $\text{min}^{-1}$ , com a análise cromatográfica concluída em 1 minuto. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 280 °C e 300 °C, respectivamente. Uma injeção manual no modo *split* com 0,5  $\mu\text{L}$  na razão de divisão de 100:25 foi realizada. Utilizou-se uma centrífuga modelo NT815 (Nova Tecnica, Brasil) para precipitação de proteínas e uma placa de aquecimento (AREC, Velp Scientifica, Brasil) foi aplicada para a etapa de hidrólise.

#### 4.2.4 Otimização do Procedimento de DPX-Cortiça

Uma ponteira branco de 1 mL foi utilizada para a técnica de DPX, sendo estabelecido um volume de urina de 700  $\mu\text{L}$ , com 300  $\mu\text{L}$  de ar para promoção da mistura dinâmica, e uma fortificação da matriz para realização das otimizações em 100 ng  $\text{mL}^{-1}$  de THC-COOH. Como descrito por diversos autores, é necessário realizar uma etapa de desproteínização para que ocorra a quebra da ligação entre o THC-COOH e o ácido glucurônico para ter a maior quantidade em sua forma livre, gerando assim, uma quantificação mais precisa e exata. Além deste fator, o processo de desproteínização geral da urina auxilia na etapa de preparo de amostras com a DPX. Assim sendo, Eller *et al.*, 2014, descreveu que uma hidrólise básica apresenta aproximadamente 70-80% da eficiência na desproteínização do conjugado em relação a utilização da enzima  $\beta$ -glucuronidase, sendo complementado por outro estudo também relatado na literatura de Abraham *et al.*, 2007. Baseando-se nestes resultados e associando-se ao custo de se obter a enzima, uma solução de NaOH 2 mol  $\text{L}^{-1}$  foi preparada e empregada na proporção de 1:8 (v/v) em relação ao volume da amostra, ajustando o pH para 12, onde foi mantida a 60 °C em um bloco de aquecimento por 15 minutos, transferida para tubos falcon e centrifugada por 10 min a 3500 rpm para a separação do sobrenadante e das proteínas, incluindo o ácido glucurônico. Uma solução de 3 mol  $\text{L}^{-1}$  de HCl foi adicionada ao sobrenadante na proporção de 1:5 (v/v) para manter o pH entre 2-3, garantindo que a maior parte do analito esteja em sua forma neutra para ser extraída.

Ao fazer a etapa de desproteínização, iniciou-se os estudos pela comparação da cortiça com as demais fases previamente escolhidas, sendo a bráctea, moringa, C18 e WAX. Ao se efetuar a eficácia da cortiça, procedeu-se para a otimização da etapa de dessorção, onde foram estudados os parâmetros de solventes (ACN, MeOH e AcEt),



tempo (5 a 30 s) e número de ciclos (1 a 10 ciclos). Em relação à etapa de extração, foram examinadas as variáveis tempo de extração (5 a 120 s), número de ciclos (1 a 12 ciclos) e massa de biossorvente (5 a 25 mg). Além disso, uma etapa de limpeza foi realizada para evitar qualquer efeito de memória entre experimentos do analito, bem como retirar possíveis compostos que afetariam a eficiência dos novos experimentos. Ao final da dessorção, o solvente é transferido para frascos de vidro de 1,5 mL e adicionado sulfato de sódio anidro para secagem de moléculas de água. Planejamentos univariados e multivariados foram aplicados para otimizações utilizando a área cromatográfica do pico como resposta analítica à avaliação das condições experimentais. O Statsoft Statistica 10 (Statsoft, EUA) e o Microsoft Excel 2010 foram utilizados para o tratamento estatístico.

#### *4.2.5 Parâmetros Analíticos de Mérito e Aplicação nas Amostras de Urina*

A curva de calibração foi construída em uma amostra de urina de um voluntário masculino e foram obtidos os parâmetros limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e faixa linear de trabalho. O LOD foi calculado usando 3 vezes o desvio padrão da primeira concentração da curva de calibração dividida pela inclinação obtida na equação da reta e o LOQ foi calculado como 3,3 vezes o LOD (MORÉS *et al.*, 2019; MAFRA *et al.*, 2019). Recuperação relativa e precisão intradia ( $n = 3$ ) e interdia ( $n = 9$ ) foram obtidas em diferentes amostras de urina, sendo avaliadas em três concentrações diferentes (BMVGI, 2018; AOAC, 2016). Oito amostras de urina obtidas de indivíduos de 20 a 30 anos foram analisadas para avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido. Quatro destas amostras foram cedidas pelo Instituto Geral de Perícias do Rio Grande do Sul (IGP-RS).

### *4.3 Resultados e Discussão*

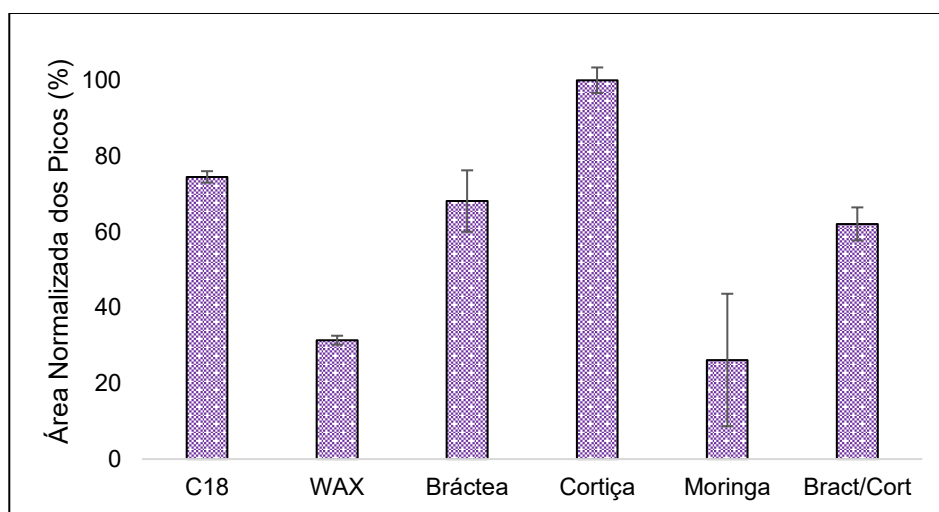
#### *4.3.1 Comparação da Eficiência de Extração do THC-COOH entre Cortiça e outras Fases.*

Um dos primeiros parâmetros a ser selecionado em técnicas de preparo de amostras é a fase extratora. O material sorvente deve ser escolhido de acordo com as propriedades físico-químicas que este apresenta, para o estudo a ser realizado. Dentre as propriedades devem-se destacar, grupos funcionais que possam interagir de forma eficiente, estabilidade mecânica e química frente a diferentes pHs e, composição da matriz e solventes, boa porosidade e área superficial para ter o maior contato para

extração dos analitos. Particularmente relacionada a DPX, a versatilidade para empregar fases alternativas é um recurso importante a ser explorado (CARASEK *et al.*, 2022; MORÉS *et al.*, 2019; MAFRA *et al.* 2019; CHAVES *et al.*, 2015). Partindo-se destas concepções e conceitos, foi feito um estudo inicial comparativo da fase selecionada neste projeto, a cortiça, com demais fases comerciais e biosorventes, a fim de indicar a suas qualidades em relação a extração do composto ácido-11-nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -tetrahidrocanabinóico.

As fases utilizadas foram a C18, WAX, Bráctea e *Moringa oleífera*. A C18 é uma fase composta de cadeias carbônicas contendo 18 carbonos, a WAX apresenta em sua estrutura grupos poliaminos contendo carbono e nitrogênio. A bráctea é um biossorvente proveniente da árvore *Araucária angustifolia*, que produz sementes chamadas de pinhas e quando estas não são desenvolvidas, são denominadas de bráctea. É um material que possui grupos carboxílicos (-COOH), hidroxilas (-OH), e anéis aromáticos, sendo principalmente provenientes de compostos fenólicos em sua estrutura (do CARMO *et al.*, 2017). Com tratamento adequado, é possível produzir um pó do material que pode ser utilizado em técnicas de preparo de amostras, como a DPX. Já a *Moringa oleífera* é uma semente proveniente da família das plantas *Moringaceae*, onde apresenta uma estrutura porosa, com grupos lignina e celulose, principalmente, além de outras proteínas que podem interagir por meio de adsorção iônica, quando analitos ionizáveis forem estudados (GOMES *et al.*, 2022). Além das formas puras de cada material, uma mistura foi realizada entre bráctea e cortiça em proporção 1:1 (m/m), a fim de avaliar a possibilidade de diferentes propriedades físico-químicas entre materiais, na extração do THC-COOH. Na Figura 10 está apresentado um gráfico de barras onde foi utilizada a normalização das médias entre as áreas do pico cromatográfico obtido para o sinal do analito no GC-FID, comparando-se a eficiência entre as 5 fases testadas, com a de cortiça. As condições utilizadas estão descritas na legenda da figura.

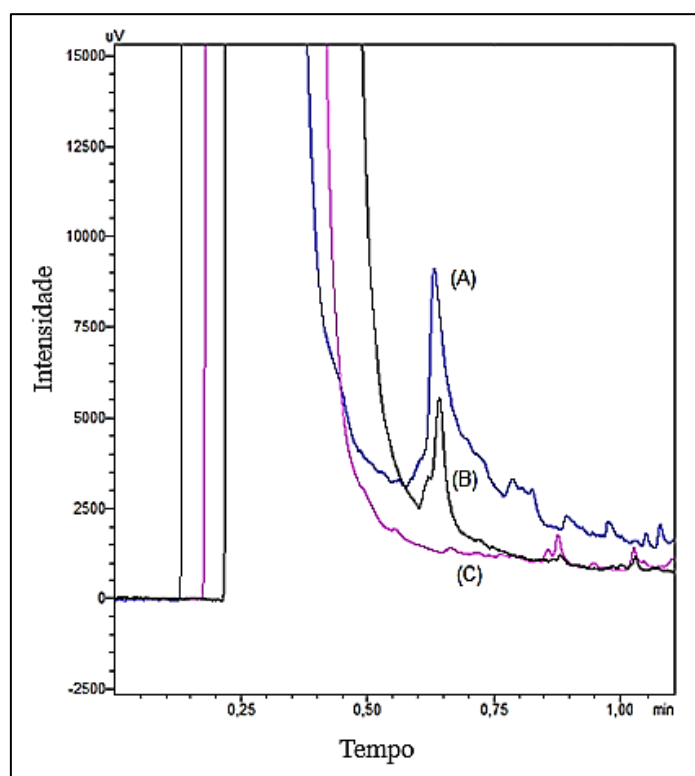
**Figura 10** - Gráfico de barras comparativo entre as fases selecionadas para o estudo de eficiência de extração do THC-COOH da urina, com os sorventes puros e uma mistura entre bráctea/cortiça. Condições: Urina sem diluição, fortificação em  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  do analito,  $700 \text{ }\mu\text{L}$  de amostra, pH ajustado para 2,5, 3 ciclos de extração com 10 s. cada, 20 mg de sorvente,  $200 \text{ }\mu\text{L}$  de metanol como solvente de dessorção e 2 ciclos (Fonte: Autoria Própria, 2020).



As respostas obtidas foram: C18 ( $74,5 \pm 1,5\%$ ), WAX ( $31,5 \pm 1,2\%$ ), Bráctea ( $68,8 \pm 8\%$ ), *Moringa oleífera* ( $30 \pm 17\%$ ), mistura entre Bráctea/Cortiça ( $62 \pm 4,3\%$ ) e Cortiça ( $100 \pm 3,3\%$ ). Analisando os resultados, a cortiça se confirmou como a mais eficiente na extração do analito estudado, seguindo da C18, bráctea pura e a mistura entre as duas. A moringa e a WAX apresentaram eficiências baixas, com um RSD elevado para a moringa. A C18 interagiu de forma satisfatória através interações de Van der Waals com a estrutura do analito por ser um composto que apresenta um alto valor de log P, portanto, um caráter apolar acentuado. Ao contrário da WAX, que é um material mais indicado para compostos polares devido a presença de vários grupos amino em sua estrutura, indicando sua baixa eficiência de extração. A moringa apresentou o menor valor comparado aos demais, além de um erro grande (17%). Uma possível explicação é que este material está carregado eletricamente devido ao pH que está submetido na amostra (2.5), deixando suas proteínas mais carregadas e diminuindo a interação com o analito que está, preferencialmente, na forma neutra. A bráctea e a mistura entre as duas fases apresentaram valores bons, mas ainda menores que a cortiça. A interpretação que pode ser dada para a cortiça ter sido a mais eficiente está na sua composição química e física. Composta por lignina e suberina com diferentes grupos

químicos, incluindo -CO, -OH e -CH, a cortiça permite interações químicas principalmente através de ligações  $\pi$ - $\pi$  e hidrogênio com THC-COOH, sendo interações fortes. Além da composição química, a sorção física também é pronunciada devido à alta área superficial da cortiça na forma de pó, além da porosidade de suas partículas (CARASEK *et al.*, 2019; NETO *et al.*, 1995). Assim, um comparativo entre um branco da matriz de urina doada pelo voluntário, uma injeção direta do padrão de THC-COOH e uma extração em urina fortificada foi realizado e apresentado na Figura 11.

**Figura 11** - Cromatograma comparativo entre: (A) Extração do THC-COOH pela DPX-Cortiça; (B) Injeção direta de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de THC-COOH; e (C) Branco da urina. Condições da DPX: Urina sem diluição, fortificação em  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  do analito,  $700 \mu\text{L}$  de amostra, pH ajustado para 2.5, 3 ciclos de extração com 10 s. cada, 20 mg de sorvente,  $200 \mu\text{L}$  de metanol como solvente de dessorção e 2 ciclos (Fonte: Autoria Própria, 2020).

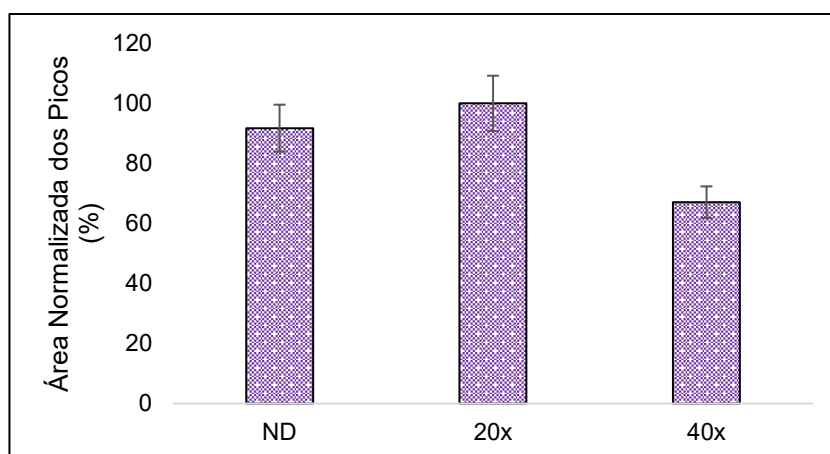


Observando o cromatograma comparativo, pode-se definir que não há interferentes no pico do analito, bem como uma boa resolução comparando-se a injeção do padrão com o analito extraído pela DPX-Cortiça para confirmação do sinal analítico com tempo de retenção aproximado em 0,65-0,75. Partindo-se destes estudos, iniciou-se as otimizações da metodologia.

### 4.3.2 Diluição da Matriz de Urina

A urina é considerada a matriz biológica mais utilizada para análise de metabólitos e compostos que têm várias aplicações no organismo. No entanto, muitos problemas envolvendo a presença de sais, proteínas e macromoléculas, em geral, dificultam o uso dessa matriz em sua forma bruta, pois podem ser interferentes (PIERRI *et al.*, 2022). Na Figura 12, é apresentada a otimização da urina diluída, sendo fortificada e posteriormente diluída, onde é considerando a matriz original, não diluída (ND), 20x e 40x diluídas em água UP.

**Figura 12** - Gráfico de barras para a comparação entre urina não diluída e diluída até 40x. Condições da DPX: 20 mg de cortiça, 700  $\mu$ L de amostra, 3 ciclos de extração com 30 s. cada, pH da matriz ajustado para 2-3, 2 ciclos de dessorção de 10 s. cada e ACN/MeOH (1:1) como solvente de dessorção. (Fonte: Aatoria Própria, 2020).

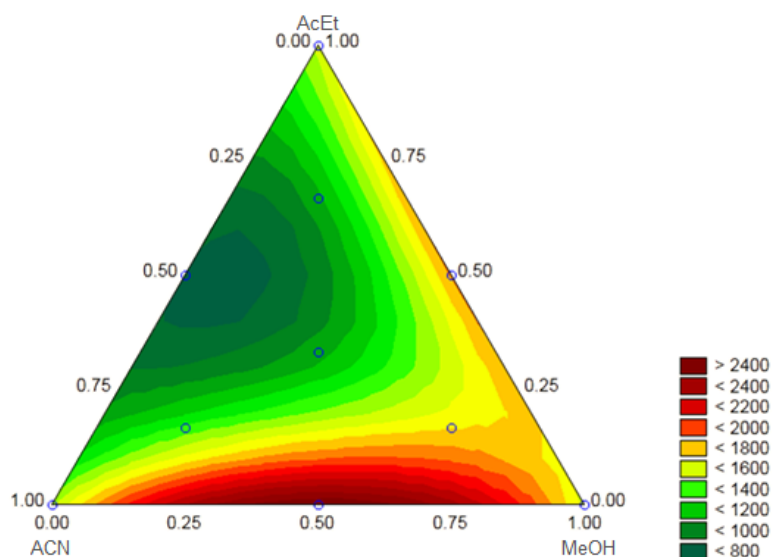


Considerando as respostas, 20x diluído em água ultrapura apresentou o melhor resultado para THC-COOH. Isto pode facilitar a extração do analito, fazendo com que uma porção de água adicionada deixe o analito mais livre para interagir com a fase de cortiça, diluindo sais e outros compostos que poderiam estar interferindo sem comprometer a concentração final do analito. Já em 40x ( $67 \pm 5,3\%$ ), a resposta já começou a ter um decréscimo no sinal, indicando que o analito estaria sendo diluído juntamente com a amostra. No entanto, a resposta para ND ( $92 \pm 7,8\%$ ) foi muito próxima de 20x ( $100 \pm 9,2\%$ ) e não apresenta diferenças relevantes. Portanto, a urina não diluída foi usada para evitar problemas com a diluição do analito em outras amostras de urina e não afetar os limites envolvidos no método.

#### 4.3.3 Otimização do Solvente de Dessorção

A etapa de dessorção foi realizada após a avaliação da urina e antes da otimização da extração afim de obter as melhores condições para romper a ligação da fase extratora-analito e evitar o efeito memória, reduzindo possíveis erros (RSD). Primeiramente, 200  $\mu\text{L}$  foram fixados como volume de solvente, por ser o menor volume de dessorção capaz de preencher toda a fase extratora. Um *simplex centroide* foi aplicado para otimização da dessorção do solvente, compreendendo 12 experimentos com triplicata no ponto central, usando ACN, MeOH e AcEt, sendo a matrix de experimentos apresentadas na Tabela 1-A do Anexo. Todos os solventes podem ser injetados no GC-FID. A Figura 13 mostra a superfície ternária obtida para esta etapa.

**Figura 13** - Superfície ternária obtida para a escolha do solvente ou mistura de solventes de dessorção. Condições da DPX: 20 mg de cortiça, 700  $\mu\text{L}$  de amostra, 3 ciclos de extração com 30 s. cada, pH da matriz ajustado para 2-3, 2 ciclos de dessorção de 10 s. cada (Fonte: Autoria Própria, 2020).

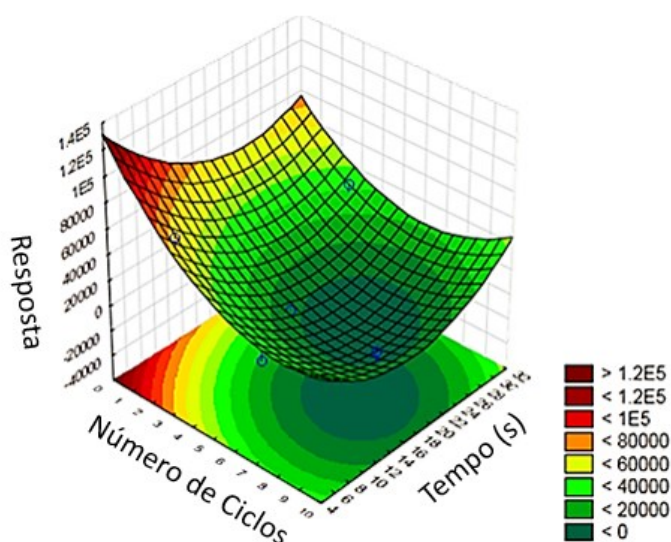


A superfície ( $R^2 = 0,7100$ ) foi construída pelo modelo cúbico completo e mostrou que uma mistura entre ACN e MeOH na proporção de 50:50 (v/v) de cada solvente apresentou a melhor eficiência para dessorção do analito. Esses solventes apresentam uma boa mistura dinâmica com a cortiça, promovendo muitas bolhas por terem baixa viscosidade, proporcionando uma alta área superficial, além de poder interagir por ligação de hidrogênio com THC-COOH, proporcionando uma boa dessorção e explicando o resultado.

#### 4.3.4 Otimização dos Ciclos de Dessorção e Tempo

Em DPX, o tempo é uma variável pouco estudada devido a mistura dinâmica ser eficiente para extrair/dessorver o analito sem a necessidade de um período para isto ocorrer. Entretanto, dependendo das condições empíricas de uma metodologia, pode ser estudado para aumentar a eficiência (CARASEK *et al.*, 2022). Baseando-se nisto, foi realizado um planejamento Doehlert entre o tempo e o número de ciclos necessários para dessorver o analito da fase de cortiça. O experimento contou com 9 pontos, sendo uma triplicata do ponto central, estudando faixas de 5 a 30 segundos para o tempo e de 1 a 10 ciclos, e a matriz de experimentos e a ANOVA é apresentada na Tabela 2-A e 3-A do Anexo, respectivamente. Na Figura 14 é apresentada a superfície de resposta obtida para este planejamento.

**Figura 14** - Superfície de resposta obtida do planejamento Doehlert para número de ciclos e tempo para a dessorção. Condições da DPX: 20 mg de cortiça, 700 µL de amostra, pH da matriz ajustado para 2-3, 3 ciclos de extração de 30 s. cada, ACN/MeOH (1:1) como solvente de dessorção (Fonte: Autoria Própria, 2020).



Como pode ser observado pela superfície de resposta ( $R^2 = 0,8927$ ), os dados apontam para as maiores repostas considerando apenas um ciclo de dessorção com tempos mínimos. Isto ocorre, pois, a etapa de dessorção com o solvente já otimizado se mostra eficiente o suficiente para retirar quase todo o analito da fase extratora de cortiça, mostrando a efetividade entre a mistura dinâmica e as interações entre analito/fase/solventes.

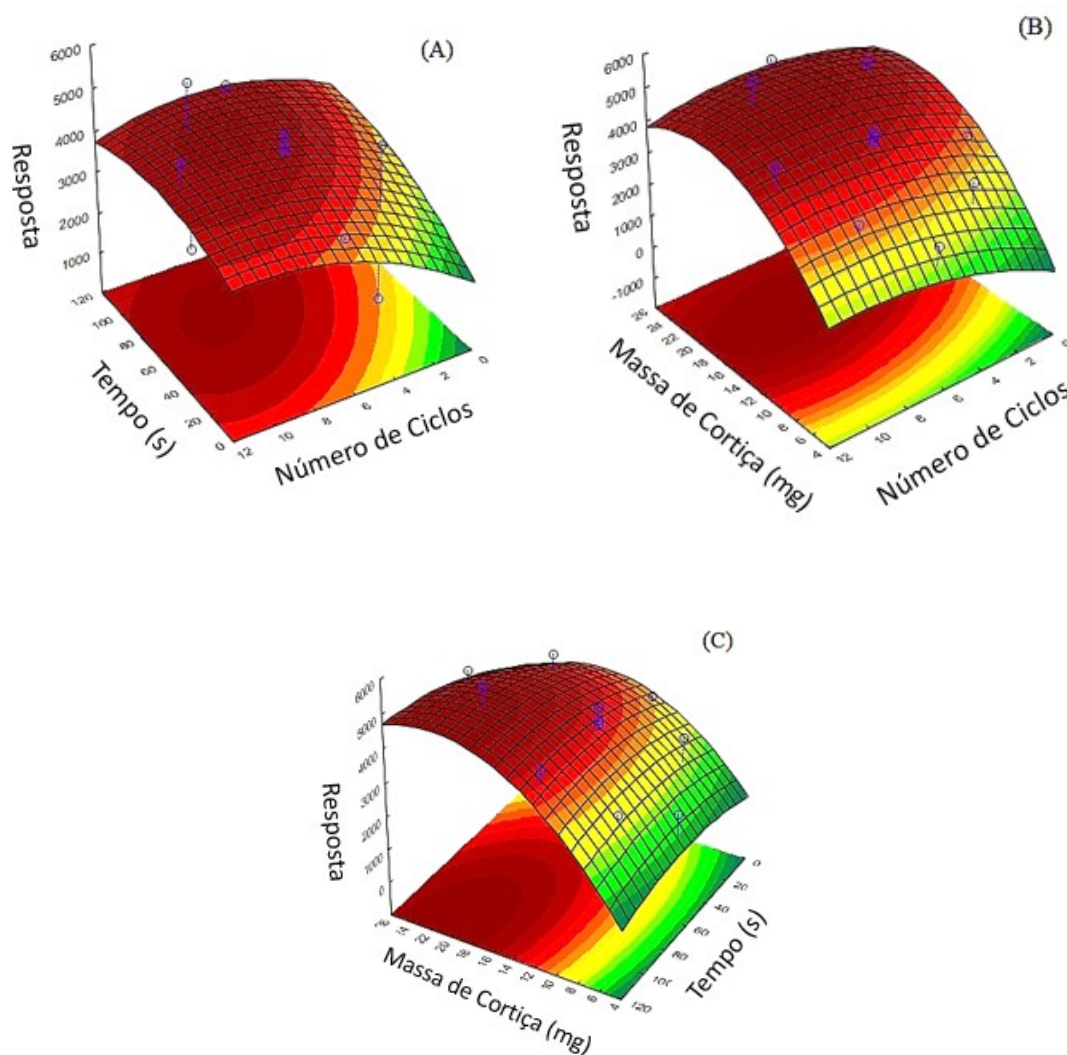
#### 4.3.5 Otimização dos Parâmetros de Extração para Tempo, Ciclos e Massa de Cortiça

Da mesma maneira que para a etapa de dessorção, alguns parâmetros também influenciam a eficiência da extração na DPX, como número de ciclos, pH da amostra, tempo e massa do sorvente. Em relação ao pH da amostra, ele foi ajustado entre 2-3, após a etapa de desproteinização com solução de NaOH, com o auxílio de uma solução de HCl (3 mol L<sup>-1</sup>), sendo adicionadas algumas gotas para atingir esta faixa. Desta maneira, o analito estará majoritariamente em sua forma neutra pois o pH estará abaixo do seu valor de pKa (4,02) (ELLER *et al.*, 2014; SOUZA-SILVA *et al.*, 2015). Para otimizar as outras variáveis foi realizado um planejamento composto central com 19 experimentos e triplicata no ponto central. As faixas estudadas foram de 1 a 12 ciclos, 5 a 120 segundos cada ciclo e 5 a 25 mg de cortiça adicionado a ponteira de DPX-Branco. As superfícies de resposta obtidas são apresentadas na Figura 15 e, a matriz de experimentos e ANOVA é apresentada na Tabela 4-A e 5-A do Anexo, respectivamente.

Como pode ser visto nas superfícies de resposta ( $R^2 = 0,8406$ ), foram obtidas regiões de máximo em todas as imagens. Em relação ao número de ciclos, como pode ser visto nas imagens A e B, são necessários 8 ciclos para que se obtenha uma pré-concentração significativa do analito e gere um sinal satisfatório nas análises. Associado a isto, o tempo apresentado em A e C mostra que são necessários alguns segundos para que ocorra boa interação entre a fase e a matriz, visto que, na mistura dinâmica, a formação de bolhas promove o aparecimento de uma espuma, esta proveniente de proteínas que ainda estão presentes na matriz de urina, portanto, dificultam a interação do analito com a fase para ser extraído. Sendo assim, 60 segundos foram estabelecidos para garantir que a espuma se desfaça e ocorra a extração eficientemente. Para a massa de cortiça, uma faixa é destacada em B e C, entre 16 e 25 mg. Quanto maior a quantidade de material, maior a massa de analito extraído, considerando a capacidade sortiva e a saturação dos sítios de interação, entretanto, como a cortiça apresenta uma hidrofobicidade acentuada, massas muito grandes dificultam a mistura dinâmica com a matriz aquosa e necessitaria de mais tempo e ciclos para que pudessem garantir uma boa eficiência de extração. Sendo assim, 16 mg foi estabelecida para este parâmetro como condição compromisso.



**Figura 15** - Superfícies de resposta obtidas para o composto central: (A) Tempo vs Ciclos; (B) Massa vs Ciclos; (C) Tempo vs Massa. Condições da DPX: pH da matriz ajustado para 2-3, 700  $\mu\text{L}$  de amostra, 1 ciclo de 5 s. para dessorção com ACN/MeOH (1:1) como solvente de dessorção (Fonte: Autoria Própria, 2020).

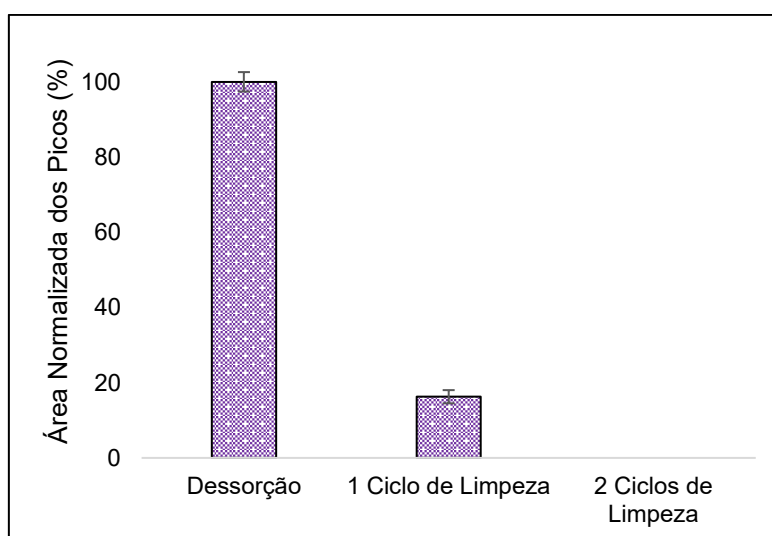


#### 4.3.6 Otimização de uma Etapa de Limpeza entre Ciclos de Experimentos

Um teste de limpeza entre os experimentos também foi realizado para verificar efeito de memória e poder se reutilizar as ponteiras para mais de um ciclo de experimentos. Esta etapa foi realizada usando as mesmas condições otimizadas na dessorção, sendo 200  $\mu\text{L}$  de ACN/MeOH (50:50, v/v) e 1 ciclo de 5 segundos. Na Figura 16 é mostrado o gráfico de barras construído para a resposta da etapa de dessorção ( $100 \pm 2,5\%$ ), 1 ciclo ( $16 \pm 1,8\%$ ) e 2 ciclos da etapa de limpeza. Avaliando os resultados, comparando a dessorção com 1 ciclo de limpeza, a resposta já tem um

decréscimo de quase 85%, indicando que quase todo o analito é liberado da fase extratora na etapa de dessorção. Sendo assim, 1 ciclo de limpeza foi estabelecido para que a ponteira pudesse ser reutilizada para mais ciclos de experimentos.

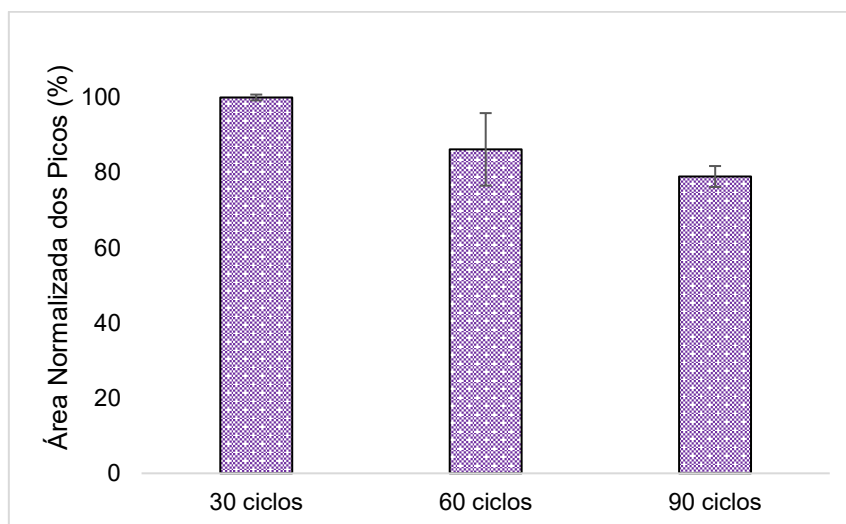
**Figura 16** - Gráfico de barras para limpeza da DPX-Cortiça entre experimentos. Condições da DPX: pH da matriz ajustado para 2-3, 700  $\mu$ L de amostra, 8 ciclos de 60 s. para extração, 15 mg de cortiça, 1 ciclo de 5 s. para dessorção com ACN/MeOH (1:1) como solvente de dessorção (Fonte: Autoria Própria, 2020).



#### 4.3.7 Avaliação da Estabilidade da Ponteira de DPX-Cortiça para o THC-COOH

Ao se estudar novas metodologias com fases alternativas, estudos de estabilidade dessa fase precisam ser realizados para mostrar o comportamento frente as diferentes condições e parâmetros (MORÉS *et al.*, 2019). Três ponteiras foram utilizados para fazer o estudo com 90 ciclos de experimentos (considerando condicionamento, extração, dessorção e limpeza) para cada uma. Na Figura 17 está apresentado um comparativo entre 30, 60 e 90 ciclos de experimentos destas ponteiras. Observando os dados obtidos, para 30 ciclos de experimentos ( $100 \pm 0,8\%$ ) a resposta é considerada a máxima e sendo a base para o comparativo com 60 ciclos ( $86 \pm 9\%$ ) e 90 ciclos ( $79 \pm 2,8\%$ ). Pode inferir que até 90 ciclos de experimentos a DPX-Cortiça apresenta uma eficiência de aproximadamente 80% do seu uso inicial, indicando uma boa estabilidade e seu possível reuso sem o descarte após uma análise, como é recomendando para fases comerciais.

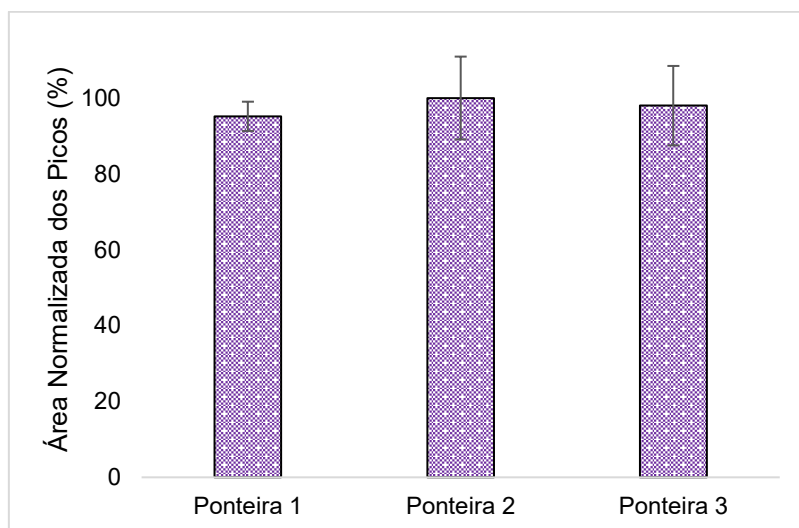
**Figura 17** - Gráfico de barras com as respostas obtidas entre 30, 60 e 90 ciclos para as três ponteiros de DPX-Cortiça em  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ . Condições da DPX: pH da matriz ajustado para 2-3,  $700 \text{ }\mu\text{L}$  de amostra, 8 ciclos de 60 s. para extração, 15 mg de cortiça, 1 ciclo de 5 s. para dessorção com ACN/MeOH (1:1) como solvente de dessorção e 1 ciclo de limpeza com as condições de dessorção (Fonte: Autoria Própria, 2020).



#### 4.3.8 Avaliação da Reprodutibilidade entre DPX-Cortiça

Além da estabilidade, a reprodutibilidade entre diferentes ponteiros de DPX com materiais alternativos deve ser avaliado para garantir que as respostas sejam as mais próximas, ou seja, boas precisões, principalmente quando a produção é feita de maneira manual. Assim, três ponteiros foram preparados e experimentos realizados em triplicata (condicionamento, extração, dessorção e limpeza), com amostra de urina fortificada em  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ . As respostas com os erros são apresentadas na Figura 18. Para a ponteira 1 ( $95,2 \pm 3,8\%$ ), ponteira 2 ( $100 \pm 10,9\%$ ) e ponteira 3 ( $98 \pm 10,6\%$ ) apresentaram respostas muito próximas entre elas, além de erros embutidos satisfatórios. Sendo assim, a produção e aplicação das ponteiros de DPX-Cortiça são fáceis, eficazes e robustas para aplicação nesta metodologia e em outras que podem ser estudadas.

**Figura 18** - Gráfico de barras produzido a partir da resposta entre as ponteiros de DPX-Cortiça com urina fortificada em  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ . Condições da DPX: pH da matriz ajustado para 2-3,  $700 \mu\text{L}$  de amostra, 8 ciclos de 60 s. para extração, 15 mg de cortiça, 1 ciclo de 5 s. para dessorção com ACN/MeOH (1:1) como solvente de dessorção e 1 ciclo de limpeza com as condições de dessorção (Fonte: Autoria Própria, 2020).



#### 4.3.9 Parâmetros Analíticos de Mérito e Aplicação do Método Proposto em Matrizes de Urina

Após otimização da metodologia, foi construída uma curva de calibração com 6 pontos, todos em triplicata, e a validação foi realizada com os parâmetros limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), coeficiente de determinação ( $R^2$ ), faixa linear de trabalho e a equação linear da curva. A urina utilizada para construção da curva analítica foi de um não usuário de *Cannabis sativa* L., bem como o não uso de medicamentos que possam conter em sua composição canabinóides. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7** - Parâmetros analíticos de mérito obtidos para o THC-COOH (Fonte: Autoria Própria, 2020).

<b>Analito</b>	<b>LOD (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Faixa Linear de Trabalho (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Equação Linear</b>
THC-COOH	0,22	0,73	0,9905	5 - 100	$y = 74,54x + 4499,7$

Avaliando-se os dados obtidos, a curva apresentou um  $R^2 = 0,9905$  o que indica que o modelo linear da curva explica 99,05% dos dados ajustados, ou seja, a variância do parâmetro dependente (resposta) a partir das variáveis independentes (média da área do pico cromatográfico de cada ponto e concentração do analito). A faixa linear de trabalho estudada foi de 5 a 100 ng mL<sup>-1</sup> com equação linear descrita em  $y = 74,54x + 4499,7$ . Para os limites calculados como descrito na seção “4.2.5 Parâmetros Analíticos de Mérito e Aplicação nas Amostras de Urina”, obtiveram-se valores de 0,22 ng mL<sup>-1</sup> para o LOD e 0,73 ng mL<sup>-1</sup> para o LOQ. Também foram realizados ensaios de precisão e exatidão, sendo as precisões intradia (n = 3) feita em um dia e, a interdia (n = 9) feita em três dias seguidos, bem como, a exatidão calculada pela recuperação relativa à fortificação do analito na matriz de urina de uma voluntária. Os dados tratados são expressos na Tabela 8.

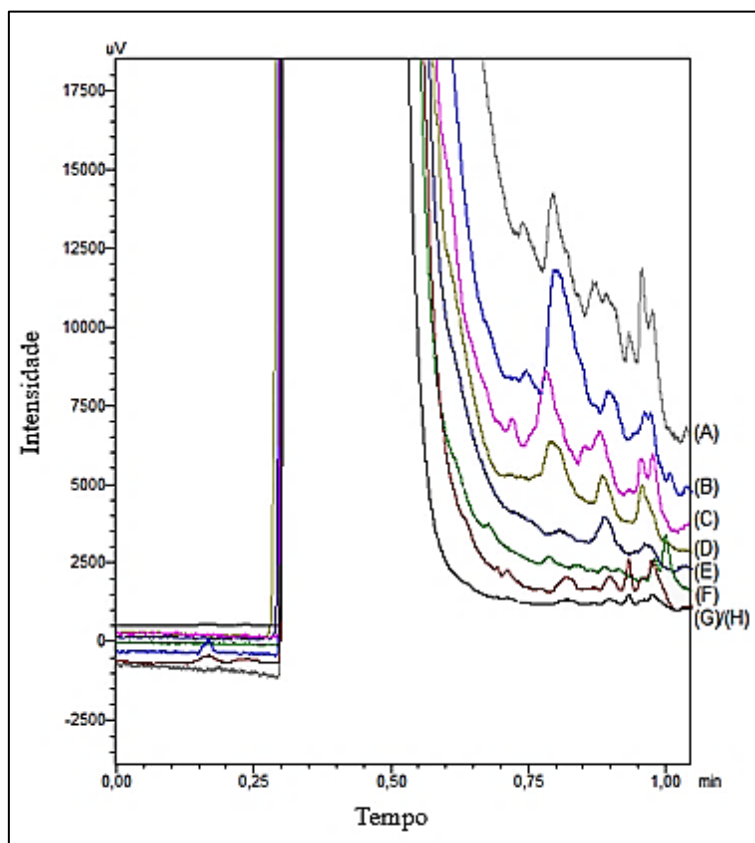
**Tabela 8** - Recuperação relativa, precisão intradia e interdia em diferentes urinas (voluntário masculino para precisões e feminina para recuperações) (Fonte: Autoria Própria, 2020).

<b>Analito</b>	<b>Recuperação Relativa (%)</b>		<b>Precisão Intradia (n = 3)</b>		<b>Precisão Interdia (n = 9)</b>	
	<b>Adicionado (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperado (%)</b>	<b>Adicionado (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>RSD %</b>	<b>Adicionado (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>RSD %</b>
THC- COOH	10	108	10	14	10	12
	50	96	50	11	50	8
	100	101	100	4	100	7

Para recuperação relativa ( $n = 3$ ), são obtidos resultados satisfatórios nos três níveis, sendo 108% para  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ , 96% para  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  e 101% para  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ . Para precisão intradia ( $n = 3$ ), o RSD foi menor que 14% em  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  e para precisão interdia, os valores de RSD foram menores que 12% para  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ . Os parâmetros foram considerados ideais e adequados de acordo com normativas seguidas para elaboração deste projeto, como a Orientação de Validação de Métodos Bioanalíticos para Indústria (BMVGI, 2018) e pela Associação Oficial dos Químicos Analíticos (AOAC, 2016).

Para a aplicação do método desenvolvido, foram obtidas 8 amostras de urinas, sendo 4 de voluntários não usuários e/ou usuários passivos e 4 amostras cedidas em colaboração com o Instituto Geral de Perícias do Rio Grande do Sul, onde 1 destas foi atribuída a um fumante passivo e as outras 3 a fumantes ativos da planta *Cannabis*. Um cromatograma, onde foi empregado o método de DPX-Cortiça totalmente otimizado e validado, é apresentado para todas as amostras analisadas na Figura 19.

**Figura 19** - Cromatograma comparativo entre as 8 amostras de urinas analisadas, correspondendo: (A, B, C) fumante ativo; (D) fumante passivo; (E, F, G, H) fumantes passivos ou não-usuários (Fonte: Autoria Própria, 2020).



Para a amostra A (linha cinza) e amostra D (amarelo queimado), os resultados estão abaixo da faixa linear de trabalho, próximos a  $5 \text{ ng mL}^{-1}$ . No entanto, para as amostras B (linha azul) e C (linha rosa), os resultados obtidos são  $42$  e  $6 \text{ ng mL}^{-1}$ , respectivamente. Para a amostra F (linha verde escura) existe um sinal muito baixo, porém não quantificável pelo método ( $\text{LOD} \leq \text{Sinal} \leq \text{LOQ}$ ). Para as amostras E (linha azul escura), G (linha marrom) e H (linha preta) não foi encontrado o sinal de THC-COOH, confirmando a ausência do analito ou estando abaixo do LOD do método. Vale ressaltar que as amostras coletadas são de dias diferentes e podem apresentar respostas menores que as coletadas no mesmo dia. A confirmação do “*cutoff*” de THC-COOH na urina humana é de  $15 \text{ ng mL}^{-1}$ , de acordo com o Departamento de Saúde e Serviços Humanos (do inglês, *Department of Health and Human Services*), e os valores encontrados acima desse limite são considerados usuários positivos de maconha (MOFFAT *et al.*, CROCKET *et al.*, 2000). Considerando as amostras analisadas, apenas o indivíduo da amostra C é um usuário ativo crônico de cannabis levando-se em consideração as condições de coleta e armazenamento pelo IGP-RS, bem como a não presença de interferentes que podem surgir por diferentes dietas ou uso de medicamentos pelos indivíduos.

#### *4.3.10 Comparação do Método Proposto com outros Reportados na Literatura para Determinação de THC-COOH em Urina Humana*

Foram selecionados trabalhos descritos e publicados por outros autores em diversas revistas de grande impacto científico, onde foi possível identificar vantagens e aperfeiçoamento de alguns aspectos, bem como limitações noticiadas. Pela DPX ser uma técnica relativamente nova e ainda sendo desenvolvida na literatura para determinação de THC-COOH em urina humana, foram adicionadas outras técnicas para um comparativo mais abrangente e relevante, como estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9** - Tabela comparativa para diferentes métodos na extração de THC-COOH em urina humana.

<b>Técnica</b>	<b>Fase Sorvente</b>	<b>Instrumento de Análise</b>	<b>Tempo da Técnica/Análise Instrumental</b>	<b>Faixa Linear de Trabalho (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOD (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Volume de Amostra/Solvente</b>	<b>Ref.</b>
DPX	Cortiça	<i>Fast</i> -GC-FID	~10 min	5 - 100	0,21	~ 6 mL	Este Trabalho
SPE	C18	HPLC-UV	~ 60 min	20 – 2500	0,30	~2 mL	Mercolini <i>et al.</i> 2008
LLE	Éter/Acetato de Etila	LC-MS/MS	~ 60 min	20 – 4000	2,50	~10,1 mL	Jung <i>et al.</i> 2007
μ-SPE	C18	LC-MS/MS	~ 120 min	6 - 250	2,00	~350 μL	Montesano <i>et al.</i> 2014
HF-LPME	di-n-Hexil Éter e NaOH	GC-MS	~ 41 min	2 – 170	1,50	~1,5 mL	Eller <i>et al.</i> 2014
SPE	Cerex Polycrom	GC-MS	~ 60 min	2 – 2000	2,00	~4,5 mL	Crocket <i>et al.</i> 2000
DPX	Divinilbenzeno com Grupos Sulfonados	GC-MS	~ 20 min	1 – 500	3,38	~1,2 mL	Ellison <i>et al.</i> 2009
DPX	Estireno Divinilbenzeno	GC-MS	~ 30 min	2 - 500	3,00	~2,5 mL	Schroeder <i>et al.</i> 2008



A partir das informações retirada dos trabalhos publicados, o presente estudo foi o primeiro a aplicar um material natural, renovável e biodegradável, a cortiça, para extração do composto ácido-11-nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinólico em matrizes de urina, trazendo uma nova abordagem forense e utilização em amostras biológicas deste dispositivo, sem a necessidade de utilizar derivatizantes e a enzima  $\beta$ -glucuronidase para etapa de desproteíntização.

A análise instrumental foi realizada em um equipamento de menor custo, de fácil operação e manutenção simples, o GC-FID, possuindo uma coluna que permite uma rápida separação do analito com outros componentes naturalmente presentes na matriz de urina, gerando cromatogramas com apenas 1 min de corrida. Além disso, a resposta analítica do instrumento foi satisfatória se comparada aos outros aplicados, como LC-MS/MS ou GC-MS.

O tempo para o uso da técnica de DPX-Cortiça em conjunto com o tempo de análise necessário para ser realizado no GC-FID é baixo, quando comparado a métodos que podem variar até 2 horas (120 min) para sua finalização, assim, tornando esta metodologia interessante para aplicação em laboratórios de rotina.

A faixa linear de trabalho foi relativamente curta neste estudo, porém, considerando a aplicação do *cutoff* em  $15 \text{ ng mL}^{-1}$ , o emprego da metodologia se faz eficiente para valores próximos a esta região de estudo sem comprometer informações precisas e exatas para usuários, ou não, de plantas *Cannabis*.

O LOD foi o menor apresentado entre os demais apresentados, visto que, foram utilizados cálculos estabelecidos por guias oficiais e cada metodologia pode ter utilizado diferentes formatos para determinação deste parâmetro. Entretanto é válido afirmar a eficiência da metodologia em obter estes valores para detectar o analito.

O volume de amostra e solvente aplicados são um dos maiores apresentados entre os 8 trabalhos descritos, considerando que cada ciclo de extração é uma alíquota nova de amostra para ser extraída. Ainda assim, considerando que a matriz de urina é de fácil coleta, não-invasiva e obtida em quantidades elevadas para uma matriz biológica, é considerado um volume baixo ( $\sim 5,8 \text{ mL}$  de amostra +  $\sim 200 \mu\text{L}$  de solvente de dessorção).

Diversos pontos positivos e vantagens foram obtidas e comparadas por esta metodologia, entretanto vale ressaltar algumas limitações encontradas como a automação da metodologia para que resultados mais precisos e exatos possam ser obtidos, reduzindo variações e erros. A possibilidade de acoplamento com sistemas

simultâneos, como os 96 poços profundos (do inglês, *96-Well Plate System*) para que a frequência analítica seja maior, bem como a injeção automática nos sistemas instrumentais, reduzindo a manipulação humana e melhorando resolução dos picos cromatográficos. A aplicação de um padrão interno para melhorar a reprodutibilidade da metodologia, um possível uso de um agente antiespumante para diminuir o tempo necessário nas etapas de extração, aumentando a sua eficiência e frequência analítica, bem como padronizar o tamanho de partículas do material para que eventuais partículas menores não estejam presentes para entupir os filtros de DPX e diminuir a vida útil do dispositivo.

#### *4.4 Conclusão Parcial*

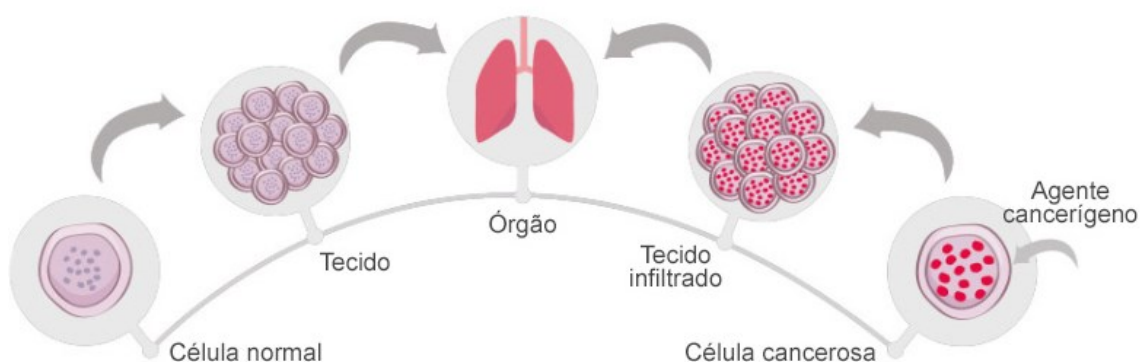
O método proposto de DPX-Cortiça para extração de 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-ácido carboxílico foi devidamente otimizado e validado de acordo com publicações prévias de outros estudos e guias de validação aceitos internacionalmente, para amostras de urina com detecção por *fast*-GC-FID. A cortiça se mostrou a mais eficiente quando comparada com outros biossorventes e materiais comerciais aplicados na técnica de DPX para este analito. A metodologia se apresentou como uma boa alternativa frente aos métodos de bioanálise de órgãos oficiais para este composto. Um biossorvente foi utilizado pela primeira vez na aplicação forense para determinação de THC-COOH em urina humana, obtendo parâmetros de validação que permitem confirmar a presença do analito em amostras de usuários da planta *Cannabis*, como as matrizes analisadas nesta metodologia. O instrumento foi de grande relevância quando comparado a outros que apresentam melhores sinais analíticos, entretanto, necessitam de um maior custo de aquisição e manutenção. As quantidades apresentadas para realização mostram a pequena necessidade de material utilizado, amostra e solventes, gerando poucas quantidades de resíduos, pouca utilização de energia para realização do trabalho e descarte facilitado do material, por ser natural, indo de encontro com os princípios da química analítica verde. Portanto, o método proposto pode ser considerado eficiente pelos parâmetros de validação obtidos, apresentando alta frequência analítica, custo muito baixo e é uma inovação em relação ao conjunto de cortiça biossorvente, técnica rápida de GC-FID e microextração (DPX) em aplicação forense para THC-COOH na urina humana.

## CAPÍTULO V – APLICAÇÃO DE DPX-CORTIÇA EM PARALELO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOMARCADORAS COMO PRÉ-DIAGNÓSTICO DE CÂNCER EM AMOSTRAS DE URINA E QUANTIFICAÇÃO POR GC-MS

### 5.1 Introdução

O câncer é considerado a segunda doença em mortalidade mundial, atingindo cerca de 9 milhões de mortes somente em 2018. Esta doença se origina de células saudáveis do organismo, que se dividem para manter o corpo em equilíbrio e saudável, entretanto, se alguma mutação ocorre no interior da célula, células anormais começam a se reproduzir descontroladamente, gerando o tumor. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO do inglês, *World Health Organization*), o câncer pode ser originado de várias doenças, iniciando em órgãos e/ou tecidos, tendo um crescimento rápido, podendo se espalhar para todo o corpo, e chegando à metástase. Essa por sua vez, é o estágio mais avançado e principal causador de óbitos (WHO, 2018). Um esquema representativo é apresentado na Figura 20 do desenvolvimento de um tumor.

**Figura 20** - Esquema representativo para o desenvolvimento de cânceres em órgãos. (Adaptado de: INCA, 2020).

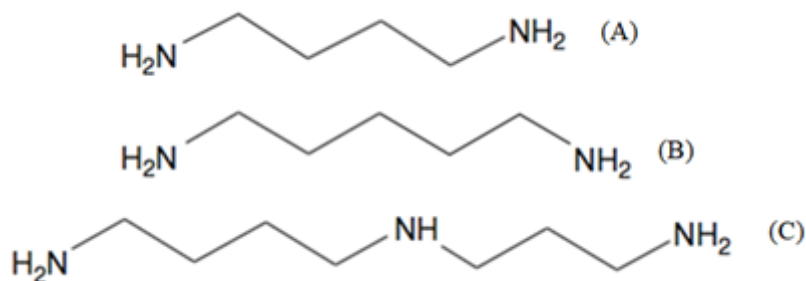


Com o intuito de se tratar esta doença, diagnósticos prévios podem ser realizados, podendo garantir um tratamento no início do desenvolvimento onde o percentual de cura é maior. Desta forma, existe a necessidade de avaliar biomarcadores para substituir exames dispendiosos que envolvem diferentes tipos de câncer. Essas

análises podem ser feitas através do sangue, saliva, tecidos, líquido espinhal etc. e através da urina (SRINIVAS *et al.*, 2001). A urina é uma das amostras mais fáceis de se obter e apresenta a vantagem de não ser invasiva ao indivíduo (KIRCHMANN e PETTERSSON, 1994).

Com o crescimento desenfreado de células anômalas, estudos indicam um aumento significativo da produção e concentração de poliaminas. Essas poliaminas possuem cadeias alifáticas e são denominadas amins biogênicas, formadas pela descarboxilação de aminoácidos, sendo de ocorrência natural, degradadas e formadas pelo metabolismo de seres vivos e atuam em diversas funções importantes no crescimento e regeneração celular, hipertrofia muscular, hormônios, neurotransmissores, controle da pressão arterial etc. (PAPAGEORGIU *et al.*, 2018; PAPAGEORGIU *et al.* 2018). Na Figura 21 são apresentadas estruturas de algumas das principais amins biogênicas produzidas no organismo.

**Figura 21** – Estruturas químicas das principais amins biogênicas encontradas no organismo humano, sendo: (A) Putrescina; (B) Cadaverina; e (C) Espermidina (Adaptado de: Sethi *et al.*, 2011).



Com o aumento da concentração dessas poliaminas no organismo, gera a proliferação de células, ou seja, o aumento significativo na produção celular, o que pode indicar o desenvolvimento de um tumor. Essas amins biogênicas estão relacionadas com alguns tipos de câncer, podendo ser coração, pulmão, pâncreas, colorretal, entre outros. (KIRCHMANN e PETTERSSON, 1994; PAPAGEORGIU *et al.*, 2018).

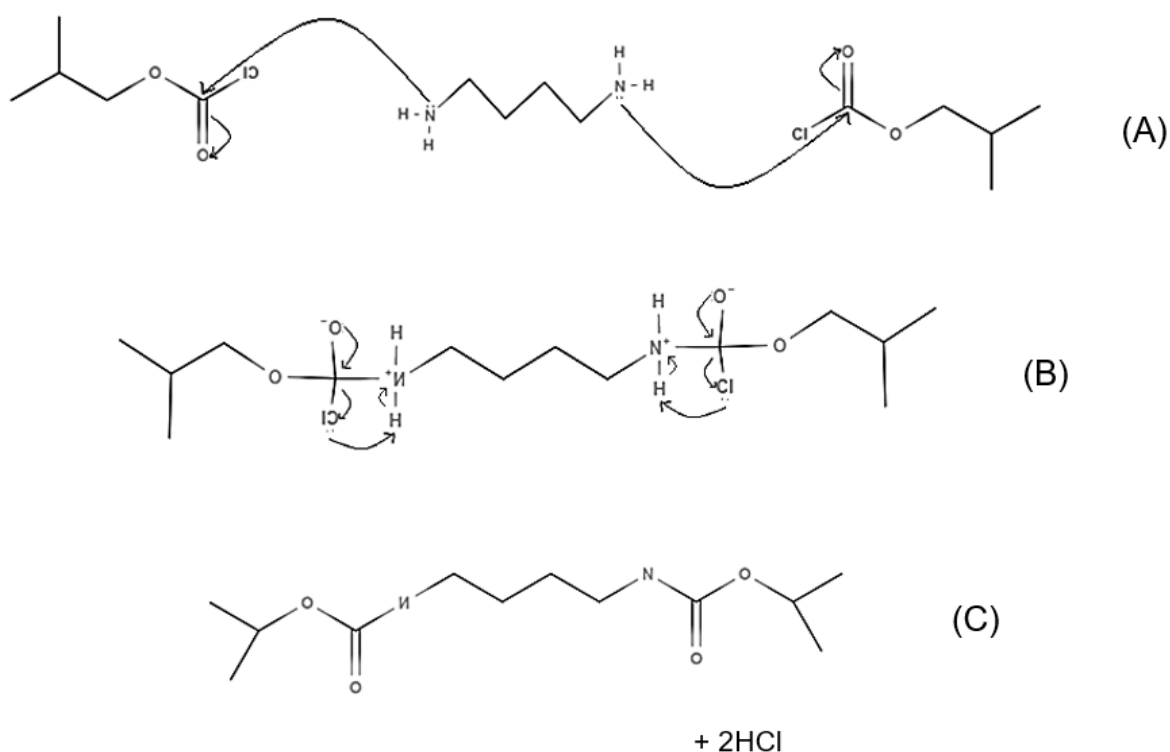
Poliaminas apresentam um desafio para os cientistas pois são compostos leves, geralmente em quantidades baixas, mesmo com o “aumento significativo da produção celular”, e por serem encontradas em matrizes biológicas que são muito complexas, dificultando sua quantificação (BALCERZAK *et al.*, 2017). Na Tabela 10 são apresentadas algumas propriedades físico-químicas das amins selecionadas.

**Tabela 10** - Propriedades físico-químicas para as 3 aminas biogênicas selecionadas (Fonte: DrugBank, 2022).

<b>Analito</b>	<b>Nome IUPAC</b>	<b>Fórmula Química</b>	<b>log P</b>	<b>pKa</b>	<b>Solubilidade (mg mL<sup>-1</sup>)</b>
Cadaverina	1,5-diaminopentano	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	-0,27	10,51	89,1
Putrescina	1,4-diaminobutano	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	-0,98	10,51	236,0
Espermidina	N-(3-aminopropil)-butano-1,4-diamina	C <sub>7</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	-0,62	10,68	32,7

Esses compostos não apresentam grupos cromóforos, o que reduz a possibilidade de uso de detectores que necessitem de ultravioleta e são termicamente instáveis em detectores com altas temperaturas, portanto, necessitam de derivatizações para serem identificadas (DAI *et al.*, 2014). Na Figura 22 é apresentado um esquema para uma reação de derivatização com a putrescina e com o agente cloroformato de isobutila (IBCF) para aplicação em técnicas de separação em cromatografia gasosa. As aminas primárias e secundárias reagem de forma eficaz com o IBCF em meio básico (pH  $\geq$  10-12) em temperaturas ambientes, sendo denominada de reação de Schoetten-Baumann, para formação de carbamatos (grupos amidas, R-CO-N-R'R''). Através deste procedimento, as aminas biogênicas ficam suscetíveis a serem identificadas e quantificadas, por apresentarem uma melhor estabilidade térmica, em cromatógrafos gasosos (HUŠEK, 1998; KATAOKA, 2014; NACCARATO *et al.*, 2018).

**Figura 22** - Reação de derivatização para a putrescina com o agente cloroformato de isobutila seguindo as etapas: (A) reação inicial com ataque do par de elétrons dos dois nitrogênios da amina com o carbono da carbonila e duas moléculas do derivatizantes com rearranjo da ligação dupla com o oxigênio da carbonila; (B) rearranjo eletrônico na molécula entre ligações químicas após incorporação das duas moléculas de derivatizantes na amina; e (C) formação do carbamato final com liberação de duas moléculas de HCl (Adaptado de: Hušek, 1998; Kataoka, 2014).



As aminas são detectadas em exames de sangue ou saliva, e são excretadas na urina, uma matriz com maior disponibilidade e com armazenamento mais simples, porém, é uma matriz complexa, sendo geralmente necessário um tratamento prévio a análise em equipamentos analíticos (PAPAGEORGIOU *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2012). As técnicas de SPE e LLE ainda são as mais utilizadas em preparo de amostras na urina, entretanto, visando princípios da GAC, técnicas miniaturizadas que empreguem menos solventes, gerem menos resíduos e substituam solventes tóxicos por solventes menos prejudiciais aos seres vivos vem ganhando espaço em órgãos oficiais e na comunidade científica (CARASEK e MERIB, 2015).

Sendo assim, uma nova metodologia é proposta para viabilizar novos métodos de análise destas aminas biogênicas em matrizes de urina, aplicando a extração em ponteira descartável como técnica de preparo, juntamente com a cortiça como sorvente natural que permite interações de ligação de hidrogênio e forças de Van der Waals. Uma nova configuração para a DPX será estudada utilizando um dispositivo que permite a aplicação de mais de uma ponteira para extração em paralelo, realizando ciclos de experimentos de forma simultânea e com uma frequência analítica alta.

## 5.2 Metodologia

### 5.2.1 Reagentes, Materiais e Amostras

Soluções estoque de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram preparadas a partir de padrões analíticos dos 3 analitos (cadaverina, putrescina e espermidina) e foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Um MIX dos analitos foi preparado em metanol (MeOH) com grau HPLC obtido de J.T. Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA). Os solventes acetonitrila (ACN) e acetato de etila (AcEt) são de grau HPLC, utilizados na etapa de dessorção e obtidos da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e Sigma Aldrich, respectivamente. A água ultrapura (UP) foi obtida de um sistema de purificação com resistividade de  $18,3 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  (Mega Purity, Billerica, EUA). O sulfato de sódio anidro foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Soluções de NaOH foram preparadas em concentração de  $2 \text{ mol L}^{-1}$  para ajuste de pH das amostras e obtidos da Vetec. O agente derivatizante cloroformato de isobutila (IBCF) foi obtido da Sigma Aldrich. Ponteiras de DPX-Branco de 5 mL foram obtidas na DPX Labs (Columbia, SC, EUA). A cortiça foi obtida de rolhas de estabelecimentos comerciais em São José, SC, Brasil, sendo o pó obtido em 200 *mesh* ( $75 \mu\text{m}$ ). A amostra de urina branco utilizada no desenvolvimento do método foi obtida de um voluntário do sexo masculino, utilizando frascos PTFE, selados e mantidos refrigerados a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para avaliar a metodologia desenvolvida, foram obtidas cinco amostras de urina de indivíduos anônimos entre 20 e 50 anos. O Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina aprovou este estudo com o número 11300913718.3.0000.0121.

### 5.2.2 Instrumentação e Condições Cromatográficas

Um cromatógrafo a gás modelo GC-MS QP 2010 Plus acoplado a um espectrometro de massas (Shimadzu, Kyoto, Japan) foi utilizado. A separação

cromatográfica foi realizada em uma coluna capilar Zebron™ Zb-5MS (Phenomenex, Torrance, USA) (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme). Hélio ultrapuro foi usado como gás de arraste a 1,2 mL min<sup>-1</sup> (White Martins, São Paulo, Brasil). O programa de temperatura do forno foi definido da seguinte forma: de 0 a 1 min mantido em 100°C; de 100°C até 160°C sendo aumentado a uma taxa de 10°C min<sup>-1</sup>; de 160°C até 280°C sendo aumentado a uma taxa de 25°C min<sup>-1</sup>; e mantido a 280°C por 14 minutos, fechando um tempo total de 25,5 min (PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2016). As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 270°C e 280°C, respectivamente. Uma injeção manual no modo *splitless* foi realizada com injeção de 1,5 µL. Uma chapa de aquecimento (AREC, Velp Scientifica, Brasil) foi aplicada para a etapa de hidrólise. Uma centrífuga modelo 80-2b 12 tubos/15 mL (Centrilab, Brasil) para centrifugação das proteínas da matriz de urina foi utilizada e agitadores magnéticos (Fisatom, SP, Brasil) para a etapa de reação de derivatização foram utilizadas. O modo de ionização por electron foi mantido em 70 eV. Monitoramento por ion seletivo foi utilizado (SIM) e os fragmentos selecionados para identificação e quantificação estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11** - Abreviações e informações das razões m/z para quantificação e identificação dos analitos (Fonte: Płotka-Wasyłka *et al.*, 2016).

<b>Analito</b>	<b>Abreviação</b>	<b>Íon para Quantificação (m/z)</b>	<b>Íons para Identificação (m/z)</b>
Cadaverina	CAD	130	84, 129, 130, 302
Putrescina	PUT	130	130, 170, 288
Espermidina	ESP	130	130, 172, 173, 345

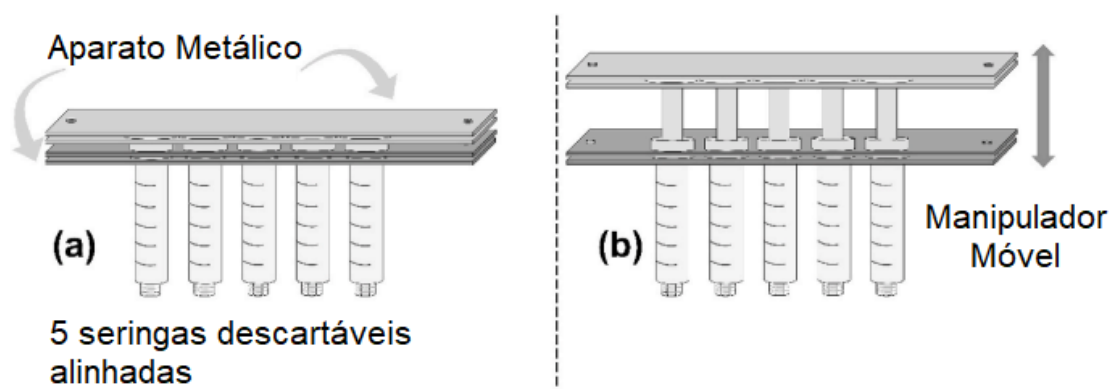
### 5.2.3 Preparação das Ponteiros para DPX-Cortiça em Paralelo

A cortiça utilizada neste estudo foi produzida conforme descrito por Dias *et al.* 2013. As rolhas utilizadas foram obtidas de descartes e doadas para fins científicos. Inicialmente foram sonicadas em água ultrapura em béquer e sistema de ultrassom, por um período de duas horas. Este procedimento foi repetido até que a água ultrapura fosse descartada de forma límpida. Após, uma estufa foi utilizada para secagem a 110°C por 12 horas. As rolhas secas foram submetidas a um processo em lixa de madeira, obtendo-se o pó bruto da cortiça. Com uma peneira, foram separadas as partículas com diâmetros



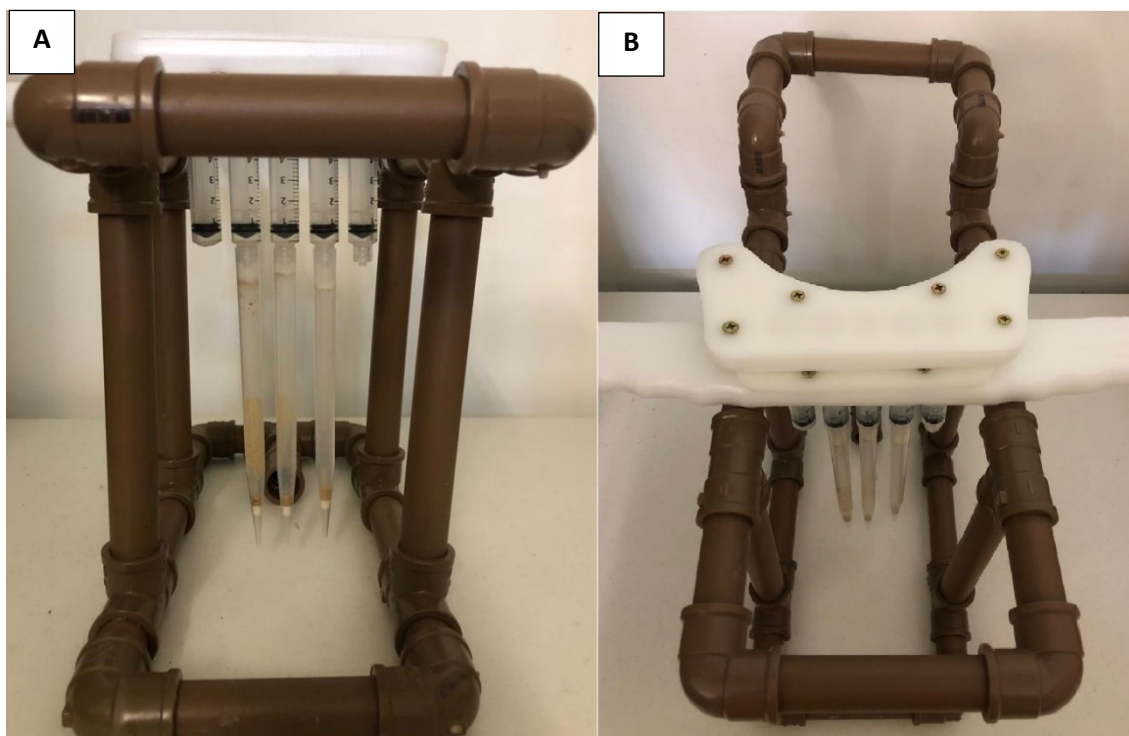
$\leq 75 \mu\text{m}$  (200 mesh) para serem aplicadas na técnica de DPX. As massas foram pesadas em ponteiras de 5 mL e condicionadas com 300  $\mu\text{L}$  de uma mistura de ACN e MeOH em proporção 1:1 com 10 ciclos cada e com 1 mL de água ultrapura e 10 ciclos cada. Para montagem do aparato de DPX-Paralela foram utilizadas 5 ponteiras como é apresentado no esquema representativo da Figura 23, desenvolvido por Huelsmann *et al.*, 2021.

**Figura 23** - Representação esquemática do dispositivo para uso em paralelo de 5 ponteiras de DPX usadas simultaneamente: (A) aparato metálico contendo 5 seringas acopladas e (B) demonstração do manipulador móvel metálico (Huelsmann *et al.*, 2021).



Através desse dispositivo, é possível aspirar a matriz pelo manipulador móvel e descartar após a etapa de extração, ocorrendo o mesmo processo para condicionamento, dessorção e limpeza. Outro desenvolvimento para melhorar a mobilidade e facilidade no procedimento foi desenvolvido por Huelsmann e é apresentado numa imagem real do aparato contendo 3 ponteiras de DPX-Cortiça já acopladas de acordo com a Figura 24, sendo o empregado neste estudo.

**Figura 24** - Aparato polimérico com suporte para apoio com 5 seringas descartáveis acopladas e 3 ponteiros de DPX contendo cortiça no seu interior: (A) Imagem frontal com aparato plástico para suporte do dispositivo; (B) Imagem superior apresentando o aparato polimérico; (Fonte: Autoria Própria, 2022).



#### 5.2.4 Otimização do Procedimento de DPX-Cortiça em Paralelo

Para realização das otimizações do projeto, a concentração dos analitos foi mantida em  $500 \text{ ng mL}^{-1}$ , com 2 mL da amostra tratada e  $300 \mu\text{L}$  de volume para o solvente de dessorção. Inicialmente, urinas coletadas e fornecidas pelo voluntário foram submetidas a aquecimento em chapa com a adição de uma solução de  $\text{NaOH } 2 \text{ mol L}^{-1}$  (1:8) (v/v) em relação a matriz, para ajuste de pH em aproximadamente 12. O aquecimento e agitação foram mantidos por 5 minutos em  $60^\circ\text{C}$ . Esta etapa foi realizada para diminuir a presença de proteínas que dificultam a mistura dinâmica na DPX e para suavizar a formação de espuma no processo de aspiração. Em seguida, foi transferido para tubos Falcon de 15 mL e submetidas a centrifugação por 10 min, à temperatura ambiente, em 3500 rpm (ELLER *et al.*, 2014). Após, transferiu-se a amostra basificada para um béquer, adicionando-se o derivatizante (IBCF) e deixando reagir por 15 min, à temperatura ambiente, com o auxílio de agitadores magnéticos (PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2016). Ao final deste processo, os analitos estão ligados ao derivatizante e a matriz está pronta para ser submetida ao procedimento da DPX.

Para a otimização dos parâmetros, foi realizado um planejamento fatorial fracionário  $2^{6-1}$  com triplicata no ponto central, totalizando 35 experimentos. As variáveis selecionadas foram ciclos de dessorção (1, 3 e 5), solvente de dessorção (ACN, MeOH e AcEt), tempo de dessorção (5, 15 e 30 s.), ciclos de extração (1, 3 e 6), massa de cortiça (10, 15 e 20 mg) e tempo de extração (5, 15 e 30 s.). Após seleção dos parâmetros pelos resultados obtidos pelo gráfico de paretos gerado pelo fatorial fracionário, foram realizadas as otimizações. Iniciou-se pela avaliação da diluição da urina em sua matriz original, 15x e 30x diluída, seguido do solvente de dessorção com os mesmos selecionados no planejamento inicial e um planejamento composto central para avaliação da massa de cortiça (20 a 26 mg) e ciclos de extração (5 a 9), com 10 experimentos. Também foram avaliados o tempo de derivatização (0 a 25 min) e o volume de IBCF adicionado à matriz (20 a 180  $\mu$ L). Uma etapa de limpeza foi realizada utilizando o solvente de dessorção para máxima limpeza e retirada de analito e outros compostos que ainda permaneceram na cortiça. Para o final do experimento, o substrato foi transferido para tubos de vidro de 2 mL e adicionado sulfato de sódio anidro para secagem de moléculas de água presentes. Todos os planejamentos multivariados e univariados foram tratados utilizando os softwares Statsoft Statistica 10 (Statsoft, EUA) e o Microsoft Excel 2010.

#### 4.2.5 Parâmetros Analíticos de Mérito e Aplicação nas Amostras de Urina

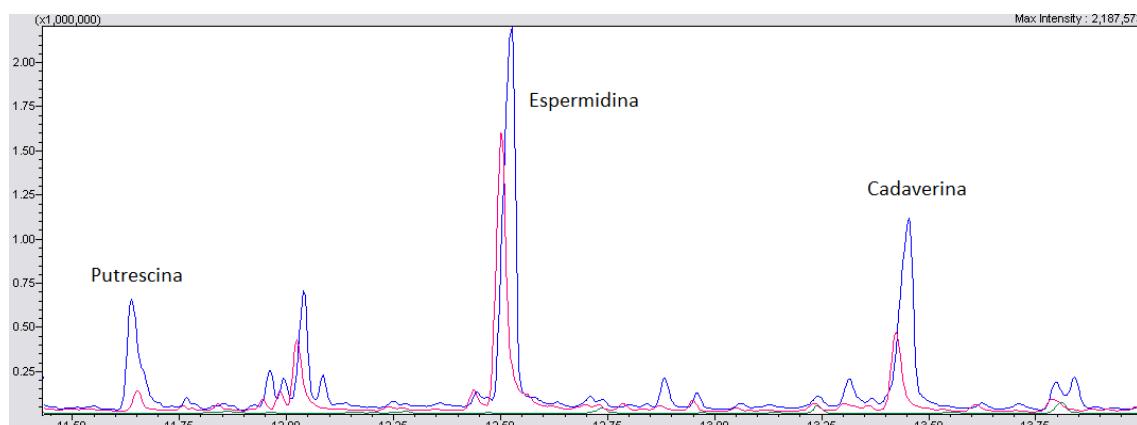
A curva analítica foi obtida através de uma amostra de urina de um voluntário masculino e foram calculados e conseguidos os parâmetros de limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e faixa linear de trabalho. O LOD foi calculado usando 3 vezes o desvio padrão da primeira concentração da curva de calibração dividida pela inclinação da equação da reta e o LOQ foi calculado como 3,3 vezes o LOD (MORÉS *et al.*, 2019; MAFRA *et al.*, 2019). Recuperação relativa e precisão intradia ( $n = 3$ ) e interdia ( $n = 9$ ) foram obtidas em diferentes amostras de urina, sendo avaliadas em três concentrações diferentes (BMVGI, 2018; AOAC, 2016). Para aplicação do método proposto, 5 amostras de urina de voluntários entre 20 e 50 anos foram analisadas.

### 5.3 Resultados e Discussão

#### 5.3.1 Separação Cromatográfica e Diluição da Matriz de Urina

Inicialmente foi realizada a separação cromatográfica dos analitos derivatizados conforme descrito na seção “5.2.2 Instrumentação e Condições Cromatográficas”, com o cromatograma comparativo entre injeção direta dos analitos derivatizados em  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  em metanol, uma extração da ponteira de DPX-Cortiça com amostra de urina branco, e uma amostra de urina fortificada em  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo apresentadas na Figura 25.

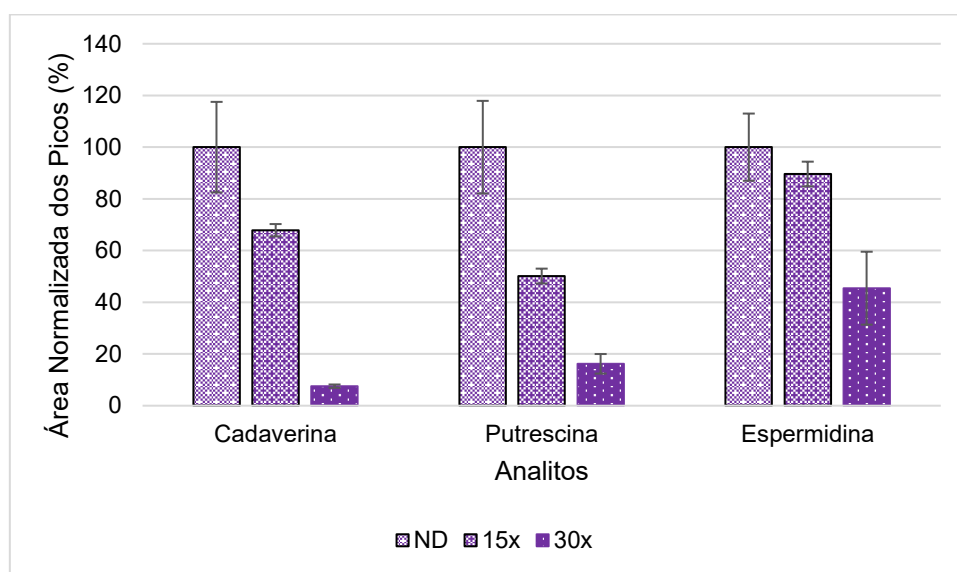
**Figura 25** - Cromatograma comparativo entre: (Azul) Extração com DPX-Cortiça em  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; (Vermelho) Injeção Direta com Derivatização em  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; e (Verde) Branco da Urina com Extração e Derivatização. Condições: sem diluição da urina, 15 min de hidrólise, 10 min de centrifugação, 5 min de derivatização com IBCF ( $40 \mu\text{L}$ ), 15 mg de cortiça, pH da amostra ajustado para 12, 4 ciclos de extração com 2 mL de amostra cada, 2 ciclos de dessorção em  $300 \mu\text{L}$  de solvente ACN/MeOH (1:1) (Fonte: Autoria Própria, 2022).



Os tempos de retenção ficaram próximos ao publicado por Plotka-Wasyłka *et al.*, 2016, com valores aproximados em  $t_r = 11,6$  min para putrescina,  $t_r = 12,50$  min para espermidina e  $t_r = 13,40$  min para cadaverina. As amostras branco não apresentaram picos referentes as amins biogênicas, entretanto, o derivatizante IBCF reage com amins primárias e secundárias que naturalmente estão presentes no organismo humano e são excretadas na urina, explicando o aparecimento de outro picos. Para verificar uma possível redução dos picos cromatográficos e conseqüentemente, da competição entre os compostos derivatizados pela fase de cortiça, uma diluição da matriz foi estudada. Desta forma, a urina foi fortificada e um comparativo entre a matriz

de urina sem diluição, diluída 15x e 30x em água ultrapura foi realizada, sendo os dados tratados e apresentados na Figura 26.

**Figura 26** - Gráfico de barras para a comparação dos resultados da matriz não diluída (ND), diluída 15x e 30x em água ultrapura. Condições: 500 ng mL<sup>-1</sup> de fortificação, 15 min de hidrólise, 10 min de centrifugação, 5 min de derivatização com IBCF (40 µL), 15 mg de cortiça, pH da amostra ajustado para 12, 4 ciclos de extração com 2 mL de amostra cada e 30 s., 2 ciclos de dessorção com 30 s. cada em 300 µL de solvente ACN/MeOH (1:1) (Fonte: Autorial Própria, 2022).



Pelos dados obtidos das áreas normalizadas dos picos cromatográficos para cada analito nas diferentes condições, é possível observar que conforme se dilui a urina fortificada, diminui a resposta dos analitos, visto que a concentração também acaba diminuindo, então para garantir a máxima resposta e como não houve interferências significativas no  $t_r$  dos compostos estudados, e boa resolução entre os picos, foi estabelecido utilizar a urina sem diluição com água ultrapura, apenas ajustes, com solução de NaOH, para do pH.

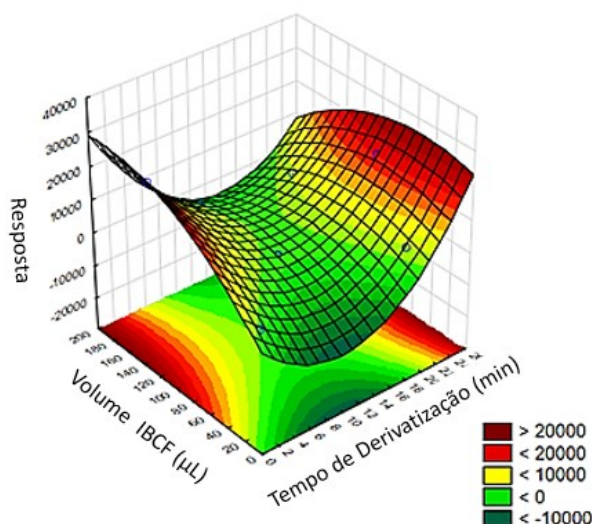
### 5.3.2 Tempo de Derivatização e Volume de Derivatizante IBCF/Aminas

A reação de derivatização entre aminas primárias e secundárias é eficaz e ocorre em temperatura ambiente, em pH básico, com o agente clorofornato de isobutila. Entretanto, é necessário avaliar o tempo necessário para que tenha um rendimento alto na formação dos produtos desta reação. Arelado a isto, a urina é uma matriz que contém diversos compostos que apresentem nitrogênio em sua estrutura que podem

reagir com o derivatizante, desta forma, também foi avaliado o volume necessário que se deve utilizar do IBCF para reagir efetivamente com os compostos alvo (NACCARATO *et al.*, 2018). Na Figura 27 esta apresentada a superfície de resposta para um delineamento experimental denominado Composto Central para duas variáveis, gerando 10 experimentos e abrangendo o tempo de derivatização na faixa de 2 a 24 min, e para o volume de IBCF adicionado entre 20 e 180  $\mu\text{L}$ , sendo a matriz apresentada na Tabela 6-A e a ANOVA na Tabela 7-A no Anexo.

A superfície de resposta ( $R^2 = 0,9985$ ) apresenta duas tendências, uma utilizando um volume maior de IBCF (180  $\mu\text{L}$ ) em 2 minutos de reação e para um volume menor de IBCF (60  $\mu\text{L}$ ) com 25 minutos para reação ter um bom resultado. Entretanto, observando os dois máximos apresentados, o que apresenta em 180  $\mu\text{L}$  de derivatizante e 2 minutos de reação tem uma maior resposta se comparado ao outro. Como a quantidade de derivatizante é afetada pela presença de outros compostos nitrogenados na matriz, foi selecionado utilizar 180  $\mu\text{L}$  de derivatizante e 5 minutos de reação para garantir um bom rendimento, visto que a reação é espontânea nas condições de temperatura ambiente e pH básico ( $\geq 11$ ).

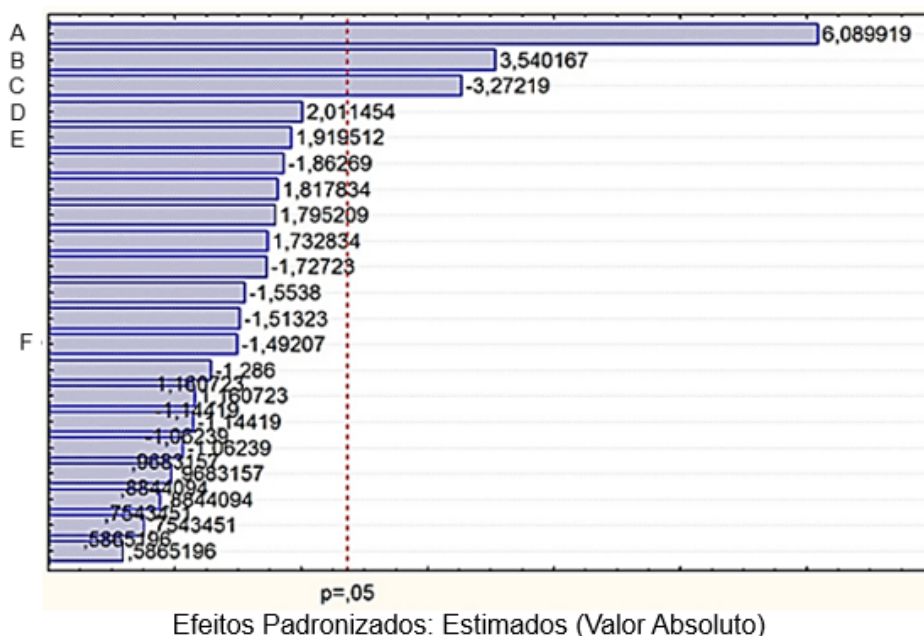
**Figura 27** - Superfície de resposta pelo planejamento composto central entre tempo para reação de derivatização e volume de IBCF. Condições: 500  $\text{ng mL}^{-1}$  de fortificação, 15 min de hidrólise, 10 min de centrifugação, 15 mg de cortiça, pH da amostra ajustado para 12, 4 ciclos de extração com 2 mL de amostra cada e 30 s., 2 ciclos de dessorção com 30 s. cada em 300  $\mu\text{L}$  de solvente ACN/MeOH (1:1) (Fonte: Autoria Própria, 2022).



### 5.3.3 Fatorial Fracionário $2^{6-1}$ para Definição das Variáveis Significativas

Previamente a otimização das variáveis para a DPX-Cortiça, foi realizado um estudo das principais variáveis que seriam significantes para serem otimizadas na técnica. As variáveis selecionadas foram os ciclos de dessorção (1, 3 e 5), solvente de dessorção (ACN, MeOH e AcEt), tempo de dessorção (5, 15 e 30 s.), ciclos de extração (1, 3 e 6), massa de cortiça (10, 15 e 20 mg) e tempo de extração (5, 15 e 30 s.). O planejamento aplicado foi um fatorial fracionário  $2^{6-1}$ , gerando 32 experimentos, com acréscimo de uma triplicata no ponto central, totalizando 35 experimentos, com a matriz apresentada na Tabela 8-A e a ANOVA na Tabela 9-A do Anexo. A realização do planejamento gerou um gráfico de paretos que é apresentado na Figura 28.

**Figura 28** - Gráfico de paretos gerados a partir dos dados obtidos no planejamento fatorial fracionário  $2^{6-1}$ , sendo: (A) Ciclos de Extração; (B) Massa de Cortiça; (C) Solvente de Dessorção; (D) Tempo de Dessorção; (E) Tempo de Extração; e (F) Ciclos de Dessorção. Condições: 500 ng mL<sup>-1</sup> de fortificação, 15 min de hidrólise, 10 min de centrifugação, 5 min de reação de derivatização com IBCF (180 µL), pH da amostra ajustado para 12, 2 mL de amostra para cada ciclo e 300 µL de solvente de dessorção. (Fonte: Autoria Própria, 2022).



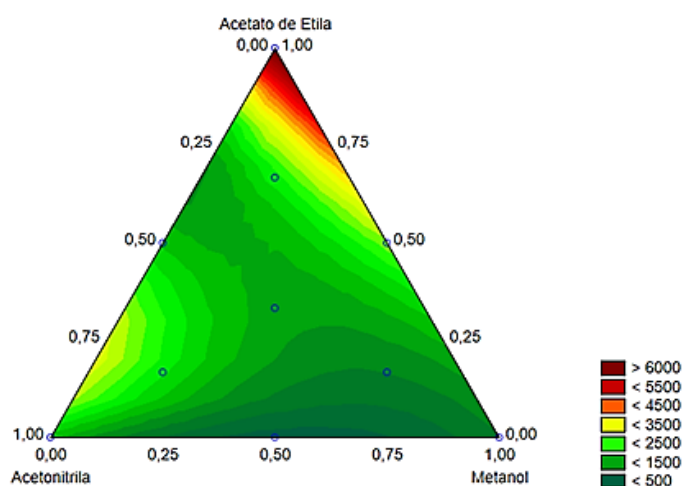
Pelo gráfico de paretos obtido ( $R^2 = 0,9567$ ), as variáveis que ultrapassaram a linha de  $p = 0,05$  que indicam um intervalo de confiança de 95% e a significância sobre o método foram, ciclos de extração (6,0899), massa de cortiça (3,5401) e solvente de

dessorção (-3,2721). Avaliando as demais variáveis abaixo da linha tracejada, estão os tempos de extração e dessorção, e ciclos de dessorção. Como esperado, os tempos não foram significativos para estudo nesta metodologia, desta forma, foi estabelecido apenas o tempo necessário para se aspirar e descartar a amostra na etapa de extração, e o solvente na etapa de dessorção. Para ciclos de dessorção, foram selecionados 2 ciclos para retirar o máximo de analito e outros compostos da cortiça, e garantir que não houvesse possível efeito de memória entre experimentos utilizando a mesma ponteira.

#### 5.3.4 Otimização do Solvente de Dessorção

O solvente de dessorção foi um dos parâmetros com resultados significativos pelo planejamento fatorial fracionário. Além disto, é uma variável importante para que as interações entre analito e fase extratora sejam menores que as interações analito e solvente, após etapa de extração. Assim, três solventes foram estudados, sendo acetonitrila, metanol e acetato de etila, todos selecionados de acordo com suas propriedades físico-químicas que permitem interações com os analitos e que podem ser injetados no cromatógrafo. Um planejamento *Simplex Lattice* foi aplicado, gerando 10 experimentos, com uma triplicata no ponto central e é apresentado na Figura 29, com a matriz de experimentos apresentada na Tabela 10-A do Anexo.

**Figura 29** - Superfície de resposta gerada pelo planejamento *Simplex Lattice* para os 3 solventes selecionados. Condições: 500 ng mL<sup>-1</sup> de fortificação, 15 min de hidrólise, 10 min de centrifugação, 5 min de reação de derivatização com IBCF (180 µL), pH da amostra ajustado para 12, 2 mL de amostra para cada ciclo, 4 ciclos de extração, 20 mg de cortiça, 2 ciclos de dessorção e 300 µL de solvente. (Fonte: Autoria Própria, 2022).





Pela superfície de resposta gerada ( $R^2 = 0,9651$ ), utilizando um modelo cúbico, é possível determinar que a melhor região ficou em acetato de etila puro. Isto pode ser justificado pois a estrutura do acetato de etila e do derivatizante IBCF são muito semelhantes, como mostrada na Figura 30, permitindo uma melhor interação com os analitos derivatizados, justificando a sua resposta.

**Figura 30** – Estruturas químicas do acetato de etila e cloroformato de isobutila, respectivamente (Fonte: Aatoria Própria, 2022).



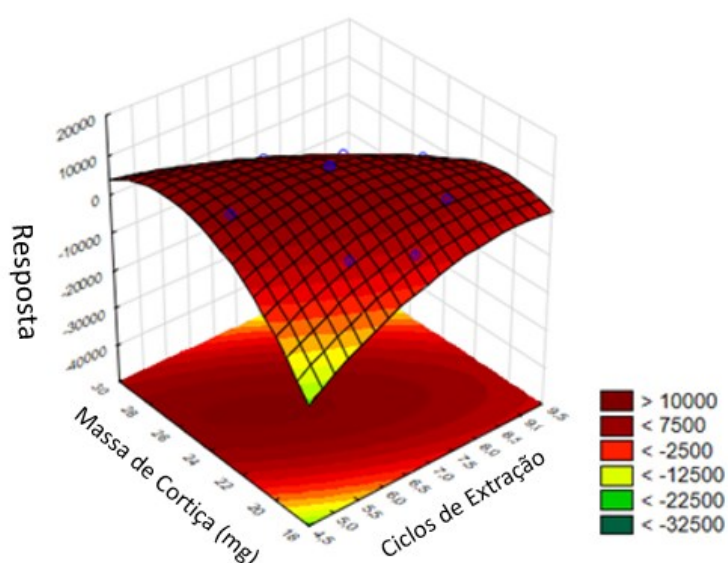
### 5.3.5 Otimização dos Ciclos de Extração pela Massa de Cortiça na DPX

Os dois outros parâmetros significativos observados no gráfico de paretos, foram os ciclos de extração e a massa de cortiça. Estes parâmetros são importantes pois ambos estão relacionados com a melhor pré-concentração do analito. Quanto mais ciclos, mais analito é extraído na mistura dinâmica e quanto mais sorvente, mais sítios estão presentes para extrair uma maior quantidade dos compostos alvo. Assim, foi estabelecida uma nova faixa de estudo sendo de 5 a 9 ciclos de extração e de 20 a 26 mg de cortiça. Um planejamento Composto Central foi aplicado, totalizando 10 experimentos, e a superfície de resposta está apresentada na Figura 31, com a matriz de experimentos apresentada na Tabela 11-A e a ANOVA na Tabela 12-A do Anexo.

Como é possível observar, a superfície de resposta ( $R^2 = 0,9896$ ) apresentou uma região de máximo em 25 mg de cortiça e 6 ciclos de extração. Maiores massas de cortiça, apesar da ponteira ter um volume maior (5 mL), acabam dificultando a mistura dinâmica por conta de se utilizar um volume alto de urina, e promover a formação da espuma que dificulta o processo de extração, visto que, não foi utilizado um tempo mínimo de permanência da amostra dentro da ponteira, para ocorrer a extração. Além disso, em 6 ciclos o material já apresenta uma certa saturação dos sítios de interação, por conta da competição existente entre os analitos derivados e outros compostos presentes, sendo verificado um decréscimo da resposta quando se aumentam o número de ciclos, pois pode ocorrer um processo de re-extração da matriz pelo meio estar

menos concentrado. Sendo assim, a condição compromisso foi de 25 mg de cortiça adicionadas a ponteira de DPX e 6 ciclos de extração.

**Figura 31** - Superfície de resposta obtida para o composto central para avaliação de ciclos de extração e massa de cortiça adicionada a ponteira de DPX. Condições: 500 ng mL<sup>-1</sup> de fortificação, 15 min de hidrólise, 10 min de centrifugação, 5 min de reação de derivatização com IBCF (180 µL), pH da amostra ajustado para 12, 2 mL de amostra para cada ciclo, 2 ciclos de dessorção e 300 µL de solvente AcEt. (Fonte: Autoria Própria, 2022).



### 5.3.6 Parâmetros Analíticos de Mérito obtidos para DPX-Cortiça e Aplicação em Matrizes de Urina

As curvas de calibração para cada analito foram construídas com 10 pontos em triplicata, variando de 50 ng mL<sup>-1</sup> até 900 ng mL<sup>-1</sup>. Foi utilizada esta faixa pois, indivíduos que possam ter câncer apresentam uma concentração inicial, como possível diagnóstico, em 100 ng mL<sup>-1</sup> até um máximo de 1000 ng mL<sup>-1</sup> (NACCARATO *et al.*, 2018). Sendo assim, os dados obtidos dos parâmetros analíticos de mérito são apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12** - Parâmetros analíticos de mérito do método de DPX-Cortiça para as 3 aminas biogênicas derivatizadas (Fonte: Autoria Própria, 2022).

<b>Analito</b>	<b>LOD (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Faixa Linear de Trabalho (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Equação da Reta</b>
Put	6,6	21,7	0,9955	50 - 900	$y = 182,31x + 7628,4$
Esp	2,1	6,9	0,9891	50 - 900	$y = 1201,9 + 30943$
Cad	2,7	8,8	0,9949	50 - 900	$y = 331,86x + 1501,7$

Analisando os dados, os coeficientes de determinação apresentaram valores maiores que 0,9891 para a espermidina, indicando um bom ajuste do modelo linear entre as variáveis. A faixa linear de trabalho ficou entre 50 e 900 ng mL<sup>-1</sup>, o que demonstra a viabilidade do método em ser aplicado para matrizes de urina em exames pré-diagnósticos para possíveis cânceres, visto que, a faixa estudada é de 100 a 1000 ng mL<sup>-1</sup>. Apesar do último ponto de a curva estar em 900 ng mL<sup>-1</sup> ainda se mantém próximo considerando a faixa teórica de avaliação de 1000 ng mL<sup>-1</sup>. Os LODs variaram de 2,1 ng mL<sup>-1</sup> para espermidina a 6,6 ng mL<sup>-1</sup> para a putrescina e os LOQs variaram de 6,9 ng mL<sup>-1</sup> para a espermidina a 21,7 ng mL<sup>-1</sup> para a putrescina. Estes dados foram calculados e tratados conforme descrito na seção “4.2.5 Parâmetros Analíticos de Mérito e Aplicação nas Amostras de Urina”. Ensaio de precisão intradia e interdia também foram estudados em três níveis de concentração. A recuperação foi aplicada em uma matriz de uma voluntária feminina, isenta da presença dos analitos. Os dados são apresentados na Tabela 13.

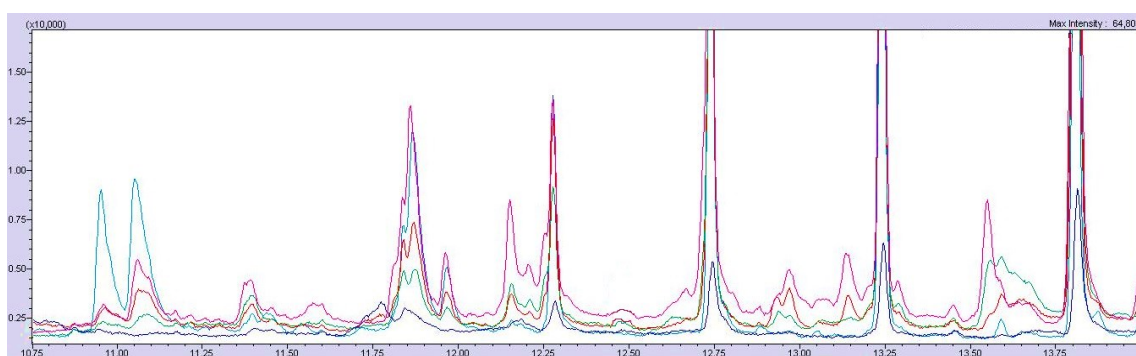
**Tabela 13** - Recuperação relativa, precisão intradia e interdia em diferentes urinas (voluntário masculino para precisões e feminina para recuperações) (Fonte: Autoria Própria, 2022).

Analito	Recuperação Relativa (%)		Precisão Intradia (n = 3)		Precisão Interdia (n = 9)	
	Adicionado (ng mL <sup>-1</sup> )	Recuperado (%)	Adicionado (ng mL <sup>-1</sup> )	RSD %	Adicionado (ng mL <sup>-1</sup> )	RSD %
PUT	100	62	100	2	100	21
	500	80	500	13	500	22
	900	130	900	22	900	12
ESP	100	104	100	15	100	19
	500	86	500	11	500	9
	900	72	900	11	900	24
CAD	100	63	100	12	100	18
	500	110	500	13	500	16
	900	90	900	6	900	28

Pelos dados obtidos, as precisões apresentaram-se adequadas e satisfatórias com  $RSD \leq 15\%$  para a espermidina na intradia e  $RSD \leq 19\%$  para a espermidina na precisão interdia. Para as recuperações, valores compreendidos entre 80% para 500 ng mL<sup>-1</sup> da putrescina a 110% para 500 ng mL<sup>-1</sup> da espermidina, são considerados aceitos. Ressalta-se que, urina é uma matriz variável, levando-se em consideração a saúde do organismo, dieta e uso de substâncias externas, como medicamentos que afetam a sua composição, além de se utilizar uma derivatização com um agente (IBCF) que reage com aminas primárias e secundárias, naturalmente presentes nessa matriz, explicando a variação de alguns resultados, bem como os erros envolvidos nas análises (RSD de 22% na intradia e de 21 a 28% na interdia, e Recuperações de 62 a 72% e 130%) (PERON *et al.* 2020; NACCARATO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2012; KIRCHMANN e PETTERSSON, 1994). De maneira geral, os dados apresentados se enquadram em normativas e guias de validação utilizados para comparação neste estudo (BMVGI, 2018; AOAC, 2016).

Para aplicação do método otimizado e validado, 5 amostras de voluntários masculinos e femininos, com idades entre 20 e 50 anos, foram utilizadas e analisadas. Na Figura 32 é apresentado o cromatograma da análise das amostras.

**Figura 32** - Cromatograma comparativo entre todas as amostras utilizadas na aplicação do método proposto: (Rosa) Indivíduo masculino (30 anos); (Azul) indivíduo feminino (25 anos); (Verde) indivíduo masculino (25 anos); (Vermelho) indivíduo masculino (55 anos); (Azul Claro) indivíduo feminino (30 anos). (Magnificação x10.000) (Fonte: Autoria Própria, 2022).



Pela análise dos cromatogramas, existem picos das aminas biogênicas para as três estudadas, entretanto todos estão abaixo do LOD do método. Aminas estão naturalmente presente no organismo e muitas vezes podem aparecer em matrizes biológicas por diversos fatores. Os demais picos presentes são compostos excretados na urina naturalmente ou que estão relacionados com a dieta, medicação ou outras circunstâncias de cada indivíduo. Como a análise de pré-diagnóstico se inicia em  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ , evidencia-se a não presença de possíveis cânceres nos 5 indivíduos e suas respectivas urinas analisadas (NACCARATO *et al.*, 2018).

### 5.3.7 Comparação do Método Proposto com outros Reportados na Literatura para Determinação de Aminas Biogênicas em Urina Humana.

A determinação de aminas biogênicas no organismo humano vem sendo estudado como uma ferramenta muito interessante para o tratamento prévio de cânceres em diversos órgãos do corpo. Assim, trabalhos foram desenvolvidos e reportados na literatura, e na Tabela 14 são apresentados alguns destes, comparando-se com o método proposto neste estudo.

**Tabela 14** - Tabela comparativa entre diferentes metodologias descritas na literatura para aminas biogênicas em urina humana.

Técnica	Derivatizante	Matriz	Fase Sorvente	LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	Faixa Linear (ng mL <sup>-1</sup> )	Tempo de Preparo (min)	Instrumento de Análise	Referência
DPX	Cloroformato de Isobutila	Natural	Cortiça	Put – 6,6 Esp – 2,1 Cad – 2,7	50 - 900	~35	GC-MS	Este estudo
NLPNE <sup>a</sup>	Anidrido Pentafluoropropiônico	Natural	Nanofibras de Carbono	Put – 0,2 Esp – 0,01 Cad – 0,08	Put - 0.05-50 Esp - 0.005-5 Cad - 0.01-10	~6	GC-MS	Yu <i>et al.</i> , 2022
SPME	Cloroformato de propila	Sintética	DVB/Car/PDMS	Put* – 10 Esp* – 10 Cad* - 30	Put e Esp – 10 – 10000 Cad – 30 - 10000	~30	GC-MS/MS	Naccarato <i>et al.</i> , 2018  Continua...

Técnica	Derivatizante	Matriz	Fase Sorvente	LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	Faixa Linear (ng mL <sup>-1</sup> )	Tempo de Preparo (min)	Instrumento de Análise	Referência
Solução de TCA, centrifugação e Acetato de Amônio	-	Natural	-	Put – 0,8 Esp – 1,5 Cad – 0,8	Put – 2,8 – 2000 Esp – 5 – 2000 Cad – 2,6 - 2000	~1.450	HPLC-MS/MS	Gosetti <i>et al.</i> , 2013
SLM <sup>b</sup>	Cloreto de 4-toluenosulfonila	Natural	D2EHPA 20% em éter dihexílico (v/v)	-	-	~120	HPLC-DAD	Balcerzak <i>et al.</i> , 2017

\*LOQs: Apenas limites de quantificação presente no manuscrito.

<sup>a</sup> NLNPE: Extração em Nanofase Líquida Nanoconfinada.

<sup>b</sup> SLM: Membrana Líquida Suportada.

Os dados comparativos apresentados na tabela mostram diferentes formas de se determinar e identificar as aminas estudadas. Dentre as técnicas apresentadas, este estudo foi o primeiro a propor a extração em ponteira descartável como técnica de preparo de amostras. Além disso, foi possível realizar o procedimento na matriz de urina original, o que demonstra uma vantagem frente a metodologias que fazem uso de uma matriz sintética onde não se verifica as possíveis interações e interferências da composição física e química da matriz normal, que podem acarretar diferentes respostas nas análises.

O presente trabalho também sugere o uso de um material natural frente a outros sintéticos, que geram custos maiores e mais energia para sua produção. Além disto, o descarte é mais facilitado e gera menos resíduos, sólidos e líquidos. O uso de um derivatizante ajudou tanto na etapa de extração, quanto na quantificação e identificação, pois a adição dos grupos de cloroformato de isobutila permitiram interações de Van der Waals com os componentes da suberina e os polissacarídeos, bem como, os grupos carbonila e éster que permitem interações por ligações de hidrogênio com o polímero da lignina. Associado a isto, permitiu uma estabilização térmica para serem identificadas por GC-MS.

Os LODs foram muito próximos aos trabalhos mencionados, mostrando a sua potencialidade na determinação dos analitos. Ressaltando que, para estudo de possíveis concentrações no diagnóstico de câncer, todos apresentam uma qualificação para aplicação como pré-diagnóstico, com valores  $\leq 100 \text{ ng mL}^{-1}$ . Para as faixas lineares de trabalho, foi possível obter respostas analíticas satisfatórias, sendo trabalhadas em valores entre 100 e 1000  $\text{ng mL}^{-1}$ , e em alguns casos, apresentando faixas de aplicação maiores do que trabalhos reportados.

O tempo total de preparo de amostras, considerando desproteinização, centrifugação, derivatização e aplicação na técnica de preparo foi de 35 min, aproximadamente. Apenas um trabalho apresentou uma frequência analítica superior ao método proposto, sendo os demais muito próximos ou com valores muito maiores, porém, sem o uso de derivatizante, que neste caso, seu uso é mais importante do que comparando-se a uma adição de etapa no preparo de amostras. O uso da DPX-Paralelo permitiu acoplar até 5 ponteiras contendo o material extrator, gerando uma frequência de até 2 min por experimento, aproximadamente, sendo, portanto, mais rápida.



A instrumentação aplicada é sensível e com uma eficiência relatada em diversos trabalhos. Apenas outro trabalho foi utilizado o mesmo equipamento analítico, mas comparando-se a GC-MS/MS e LC-MS/MS, ainda apresenta um menor custo e uma manutenção mais simples, sendo uma vantagem em laboratórios de rotina.

A presente proposta foi inovadora e eficaz na aplicação de amins biogênicas, sendo relatadas as diversas vantagens que a metodologia apresenta. Porém, algumas dificuldades são pontuadas, como o uso de possíveis padrões internos, o que acarretariam menores erros (precisão e exatidão), quando utilizada para diferentes matrizes. Uma possível purificação da matriz de urina, prévia a etapa de derivatização, para reduzir possíveis compostos que competiriam pelo agente derivatizante e, conseqüentemente, pelos sítios de interação do material, reduzindo a presença de picos e interferentes na análise, bem como, melhorando o sinal analítico.

#### *5.4 Conclusões Parciais*

A metodologia proposta utilizando um biossorvente como material extrator, cortiça, com a técnica de DPX, foi inédita e inovadora na área de aplicação para determinação de amins biogênicas em amostras de urina humana como possível ferramenta de pré-diagnóstico de câncer. Com otimizações e validação realizadas e definidas, os parâmetros para execução do método foram simples, rápidos e eficientes, bem como, satisfatórios para aplicação em diferentes matrizes de urina humana para identificação dos compostos alvo utilizando a instrumentação de GC-MS. O estudo foi de grande importância em aplicações clínicas, além de, se obter benefícios que vão de encontro com a química analítica verde, como uso de material natural, emprego de pequenas quantidades de solventes orgânicos, além de, pouco volume de amostra necessário, gerando pequenas quantidades de resíduos. O uso do dispositivo em paralelo permitiu a utilização de até 5 ponteiros de DPX, que, proporciona uma frequência analítica alta da técnica. Em vista disso, a metodologia se apresenta como um procedimento alternativo aos métodos de bioanálise oficiais, trazendo resultados confiáveis e satisfatórios para esta aplicação, vai ao encontro a conceitos da GAC e se demonstra importante dentro da área clínica como diagnóstico precoce para cânceres, permitindo aos pacientes um tratamento prévio e maior possibilidade de cura.

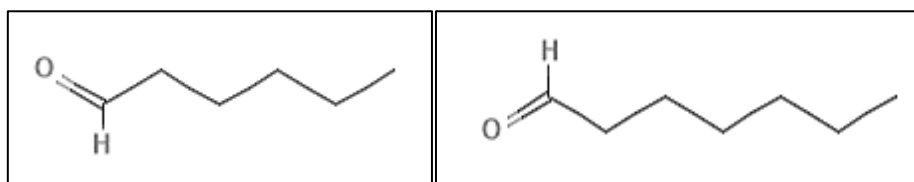
## CAPÍTULO VI – DERIVATIZAÇÃO *IN-SITU* DE ALDEÍDOS BIOMARCADORES DE CÂNCER PULMONAR POR DPX-CORTIÇA-PARALELA E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC-DAD

### 6.1 Introdução

Aldeídos são compostos presentes naturalmente no organismo humano. São formados principalmente por processos de oxidação de lipídios componentes das membranas de células, através de reações com radicais livres, hidroxilas e superóxidos, gerando aldeídos saturados e insaturados. Estes eventos são marcados por estresses oxidativos envolvidos no metabolismo das células quando ocorre alguma desordem biológica. Diversos aldeídos de baixa massa molecular podem ser formados, dentre eles podemos citar, formaldeído, benzaldeído, acetaldeído, hexanal e heptanal (LIU *et al.*, 2015; TOYOKUNI *et al.*, 1995; GHASVAND *et al.*, 2018).

Destacando-se o hexanal e o heptanal, são dois compostos diretamente relacionados a indivíduos que estejam com problemas carcinogênicos envolvidos com os pulmões. Essas duas moléculas são aldeídos de cadeia alifática, contendo um grupo carbonila ligado a cadeia carbônica e a um hidrogênio (PHILLIPS *et al.*, 1999; TABIBPOUR *et al.*, 2020). Na Figura 33 são apresentadas as estruturas destes dois compostos.

**Figura 33** - Estruturas químicas dos compostos hexanal e heptanal, respectivamente (Fonte: Autoria Própria, 2022).



O câncer é relacionado ao crescimento incontrolado e rápido de células que apresentam mutações em seu código genético, invadindo órgãos e tecidos do corpo, gerando tumores e levando a sérios problemas de saúde. Essa doença está relacionada com fatores tanto internos, quanto externos ao organismo, sendo fatores externos como alimentação, hábitos e ao meio em que o indivíduo está inserido, e os internos se relacionam com os externos, gerando mudanças genéticas no corpo e dificultando o

mecanismo de defesa em atuar na preservação da saúde (INCA, 2022; SRINIVAS *et al.*, 2001).

Dentre os inúmeros cânceres que já foram descritos, um deles são os relacionados ao pulmão. O câncer de pulmão é o segundo de maior incidência entre a população brasileira, com um percentual de 13% em comparação aos outros tipos existentes. No mundo, a última estatística realizada foi no ano de 2012, com aproximadamente 1,8 milhão de casos novos entre homens e mulheres. Dentre as principais causas do câncer de pulmão está o uso ativo ou passivo do tabagismo. Cerca de 85% dos casos são causados pelo consumo associado a produtos que contêm tabaco em sua composição, como cigarros, charutos, cachimbos e outros derivados. Outros 15% podem estar relacionados a fatores externos, como inalação de poeira e poluição atmosférica, condição genética familiar com outras pessoas que possuam essa doença, além de contato com outros agentes químicos tóxicos, como amianto e arsênio. Quando o indivíduo apresentar sintomas de tosse, falta de ar, dor no tórax e começar a expelir sangue principalmente quando tosse, deve ser realizado um diagnóstico o mais breve para iniciar o tratamento da doença (INCA, 2022; PZIFER, 2020).

Existem diversas formas de diagnóstico do câncer de pulmão, dentre o principal, a radiografia torácica. Associado a este exame, pode ser retirada uma parte da região danificada e ser realizada uma autópsia, procedimento para a confirmação do tumor. Estes procedimentos são bem estabelecidos e muito utilizados em clínicas e hospitais, entretanto, além de ser invasivo para retirada de uma pequena quantidade do possível tumor e o custo ser caro para realizar a radiografia, é muito difícil fazer um diagnóstico anterior a isto, pois, estes métodos são geralmente aplicados em pacientes que já estão com sintomas mais avançados (PIZER, 2020; LIU *et al.*, 2015).

Uma das formas de se identificar a doença é através de análise de amostras para determinação dos aldeídos, hexanal e heptanal, e pode ser realizada através de saliva, sangue, plasma ou urina. Todas essas matrizes são complexas em suas propriedades físicas e químicas, sendo que variam de indivíduo para indivíduo. Destacando-se a urina, é uma matriz menos invasiva do que plasma e sangue, e pode ser obtida em maior quantidade se comparada a urina, o que facilita a aplicação de várias replicatas para confirmação em testes laboratoriais (TABIBPOUR *et al.*, 2020; GHIASVAND *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2015).

A análise destas matrizes é dificultada por não se injetar a matriz em sua forma original nos instrumentos de análise, por mais avançada que esteja a tecnologia nos tempos atuais. Assim, uma etapa para preparar a amostra é realizada dentro de todo o procedimento, sendo crucial para separar, concentrar e transferir os compostos alvo para uma matriz mais adequada para análise. Dentre técnicas que já foram aplicadas, temos principalmente a SPE e SPME, com poucas aplicações para outras como, HF-LPME e BA $\mu$ E. Para contornar algumas limitações destas técnicas, como tempos de extração e volumes de amostra significativos, uma nova abordagem pode ser aplicada, como a extração em ponteira descartável (LIU *et al.*, 2015; GHIASVAND *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2011; GUADAGNI *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2014; OENNING *et al.*, 2017).

A DPX é uma técnica rápida, simples e de fácil aplicação, que permite uma versatilidade entre a escolha do material sorvente. Materiais sintéticos são muitos utilizados na extração destes compostos, entretanto, quando há a necessidade de descarte, os resíduos devem seguir uma sequência de tratamentos, muitas vezes demandando energia e produtos químicos. Desta forma, fases extratoras mais verdes devem ser exploradas para adequar essas metodologias de bioanálise aos princípios da química analítica verde. A cortiça é um biossorvente que apresenta estes benefícios, além de, já ter sido aplicada anteriormente em outra técnica, a BA $\mu$ E, com uma diferente configuração (CARASEK *et al.*, 2022; OENNING *et al.*, 2017; ARMENTA *et al.*, 2015).

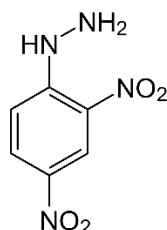
Técnicas cromatográficas são aplicadas para a identificação destes compostos, dentre elas, pode-se destacar a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC). Uma das formas de detecção mais empregadas é através de comprimentos de onda específicos com o uso de um detector de arranjo de diodos. Entretanto, existem limitações e dificuldades para se utilizar este tipo de instrumento, pois o hexanal e heptanal apresentam uma baixa massa molar, que implicam em propriedades físico-químicas como alta volatilidade, baixa estabilidade, alta reatividade e a falta de grupos cromóforos que apresentam comprimentos de onda específicos para serem identificados (LIU *et al.*, 2015; ALI *et al.*, 2013; GHIASVAND *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2017; OENNING *et al.*, 2017). Algumas propriedades destes compostos são apresentadas na Tabela 15.

**Tabela 15** - Propriedades físico-químicas dos compostos hexanal e heptanal (Fonte: PubChem, 2022).

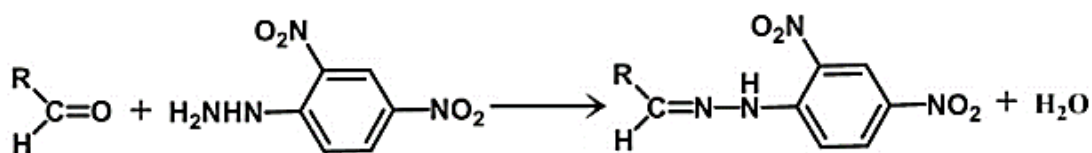
Analito	Fórmula Estrutural	Log P	P.E.	Solubilidade (mg mL <sup>-1</sup> )
Hexanal	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	1,78	129 °C	5,64
Heptanal	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O	2,29	152,8 °C	1,00

Para contornar essas dificuldades, reações de derivatização podem ser aplicadas para tornar o analito mais estável para serem identificados nestes equipamentos. O agente derivatizante mais aplicado na literatura para reação com os aldeídos é a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). A reação de formação dos produtos se dá pela formação de uma ligação entre o carbono carbonílico do aldeído com o nitrogênio do grupo hidrazina (NHNH<sub>2</sub>) presente no derivatizante, gerando hidrazonas (LILI *et al.*, 2010; UCHIYAMA *et al.*, 2011; VOGEL *et al.*, 2000). Uma representação esquemática da estrutura do DNPH e das etapas de reação são apresentadas nas Figuras 34 e 35.

**Figura 34** - Estrutura química da 2,4-dinitrofenilhidrazina (Fonte: Autoria Própria, 2022).



**Figura 35** - Etapas envolvidas no processo da reação entre aldeídos e o DNPH (Adaptado de: Liu *et al.*, 2015).



Essa reação é efetiva e pode ser realizada a temperatura ambiente, entretanto, ela precisa ocorrer em pH ácido para que haja a substituição entre os grupos, na faixa entre 4 e 5. O produto apresenta um anel aromático que permite a detecção por instrumentos que envolvam grupos cromóforos para identificação (LILI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2007).

Uma consequência da reação de derivatização gerando a ligação dupla C=N, é a formação de isômeros E e Z, que gera uma variação no comprimento de onda dos produtos que podem ser na faixa de 5 a 8 nm entre os dois isômeros. Na literatura é descrito formas de contornar este problema para que apenas um composto seja formado, como o uso de agentes redutores da ligação dupla para ligação simples, ou, para não se adicionar uma etapa a mais que podem acarretar erros, é fazer estudos na composição da fase móvel para que os compostos saiam no mesmo tempo de retenção, sem que haja essa pequena variação e gerando respostas mais precisas e exatas (LILI *et al.*, 2010; UCHIYAMA *et al.*, 2011).

Partindo destes fundamentos, uma nova aplicação é proposta para determinação de hexanal e heptanal em amostras de urina, utilizando a separação e identificação em HPLC-DAD, empregando pela primeira vez a técnica de extração em ponteira descartável em paralelo, permitindo extrações/dessorções simultâneas e com um novo formato para a cortiça, em forma de pó, trazendo resultados satisfatórios e características que vão de encontro com os preceitos da química analítica verde.

## 6.2 Metodologia

### 6.2.1 Reagentes, Materiais e Amostras

Padrões analíticos de hexanal e heptanal foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e soluções foram preparadas em um MIX de 100 µg mL<sup>-1</sup> de cada analito, em solvente metanol (MeOH) grau HPLC (J.T. Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA)). O derivatizante 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) foi adquirido da Sigma Aldrich, utilizando uma solução de 2,8 g L<sup>-1</sup>. Para as otimizações, foram utilizados solventes acetonitrila (ACN), acetato de etila (AcEt), ambos comercializados pela Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), soluções de ácido cítrico e fosfato de sódio dibásico, obtidos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil) para preparo da solução tampão e ajuste de pH, e água ultrapura (UP) foi obtida de um sistema de purificação com resistividade de 18,3

M $\Omega$  cm<sup>-1</sup> (Mega Purity, Billerica, EUA). As ponteiras utilizadas foram DPX-Branco de 5 mL, adquiridas pela empresa DPX Labs (Columbia, SC, EUA). A cortiça foi preparada e utilizada no formato de um pó, com granulometria de 75  $\mu$ m, sendo utilizada uma lixa de madeira e peneira para o seu preparo. Para o desenvolvimento da metodologia, urinas isentas dos analitos foram obtidas de um voluntário masculino, sendo guardadas em frascos PTFE, mantidas sob refrigeração a 4°C, até o período de seu uso. A aplicação do método proposto foi realizado em quatro amostras de voluntários anônimos entre 20 e 30 anos, sendo homens e mulheres. O Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina aprovou este estudo com o número 11300913718.3.0000.0121.

### 6.2.2 Instrumentação e Condições Cromatográficas

Um cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo LC-20AT (Shimadzu, Japão), equipado com um detector por arranjo de diodos, modelo SPD-M20A foi empregado no desenvolvimento e análise. Um injetor manual, modelo Rheodyne 7725i (Rohnert Park, EUA) e loop de injeção de 20  $\mu$ L foram utilizados. Fase móvel de metanol e água ultrapura foram aplicadas no modo isocrático em proporção 88:12, respectivamente, com tempo total de 11 min e fluxo de 1,5 mL min<sup>-1</sup>. O comprimento de onda monitorado foi de 360 nm. A separação cromatográfica foi realizada em fase reversa com uma coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent, 250 mm x 4,6 mm e tamanho da partícula de 5  $\mu$ m). Uma centrífuga modelo 80-2b 12 tubos/15 mL (Centrilab, Brasil) para centrifugação da matriz de urina foi utilizada. Um dispositivo para DPX-Paralela com 5 ponteiras acopladas de 5 mL cada foi empregado para realização da técnica.

### 6.2.3 Preparo das Ponteiras de Cortiça para o Sistema DPX-Paralelo

O pó de cortiça utilizado na ponteria de DPX foi previamente preparado utilizando rolhas descartadas, conforme Dias *et al.*, 2013. Estas rolhas passaram por um processo de limpeza com água ultrapura e banho ultrassônico, durante 2 horas, com repetidos processos de lavagem até a água sair límpida. Para secagem, foram colocadas em estufa a 110°C por 12 horas e retiradas para lixar em lixa de madeira. O pó formado foi então peneirado para obtenção de partículas com tamanhos  $\leq$  75  $\mu$ m (200 mesh).

Foram adicionadas as ponteiros de DPX-Branco nas massas estudadas e inseridas no sistema de DPX-Paralelo. Para condicionamento, foram utilizados solventes acetonitrila e metanol, em proporção 1:1, com volume final de 300  $\mu\text{L}$  e água ultrapura com volume de 1 mL. Foram realizados 10 ciclos para cada um.

#### 6.2.4 Otimização do Procedimento de DPX-Cortiça em Paralelo

As urinas do indivíduo voluntário foram centrifugadas para se sedimentar possíveis proteínas e material orgânico para que as etapas de DPX tivessem menos problemas com formação de espuma e os filtros não entupissem facilmente, aumentando a vida útil do dispositivo. Em seguida, a urina foi fortificada com 300  $\text{ng mL}^{-1}$  dos analitos, o pH ajustado com solução tampão de ácido cítrico/fosfato de sódio dibásico para 4,0, diluída em 10 vezes com água ultrapura e utilizado 2 mL de amostra para cada ciclo de extração. Para dessorção foram estabelecidos 300  $\mu\text{L}$  de volume, preenchendo toda a fase nesta etapa.

Para otimização da metodologia, inicialmente foi realizada a diluição da matriz de urina, com a matriz sem diluir e diluindo 10, 20 e 40x. Para fazer a etapa *in-situ* da derivatização, foram avaliados o tempo de impregnação do DPNH pelo volume de derivatizante, sendo 0 a 6 min e de 30 a 170  $\mu\text{L}$ , respectivamente, por um planejamento multivariado composto central. Em seguida, foi otimizado o tempo de extração pelo número de ciclos, sendo de 17 a 102 s. e 1 a 7 ciclos, respectivamente, aplicando um composto central. Para a massa de cortiça, foram avaliados univariadamente de 10 a 30 mg. Para o solvente de dessorção foi realizado um planejamento *Simplex Lattice* entre acetonitrila, metanol e acetato de etila e de 1 a 5 ciclos avaliados nesta etapa. Todos os planejamentos multivariados e univariados foram tratados utilizando os softwares Statsoft Statistica 10 (Statsoft, EUA) e o Microsoft Excel 2010.

#### 6.2.5 Parâmetros Analíticos de Mérito e Aplicação nas Amostras de Urina

Para obtenção dos parâmetros analíticos de mérito, curvas de calibração foram construídas para os dois analitos em uma matriz de urina de um voluntário masculino, isento dos compostos estudados. Foram obtidos os seguintes parâmetros: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e faixa linear de trabalho. O LOD foi calculado usando 3 vezes o desvio padrão da primeira concentração da curva de calibração dividida pela inclinação obtida na equação



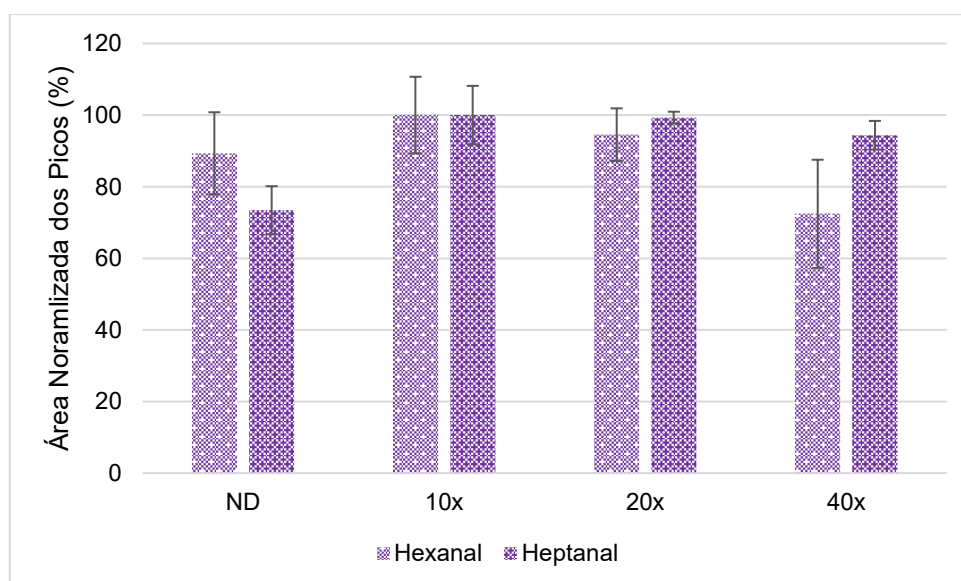
linear da reta e o LOQ foi calculado como 3,3 vezes o LOD (MORÉS *et al.*, 2019; MAFRA *et al.*, 2019). Para aplicação do método foi utilizada uma urina de voluntário feminina, aplicando-se a recuperação em 3 níveis de concentração e as precissões intradia e interdía em 3 níveis de concentração (BMVGI, 2018; AOAC, 2016). Para avaliação da aplicabilidade da proposta, 4 amostras de urina de voluntários masculinos e femininos (20 e 30 anos) foram coletadas e analisadas.

### 6.3 Resultados e Discussões

#### 6.3.1 Avaliação da diluição da urina

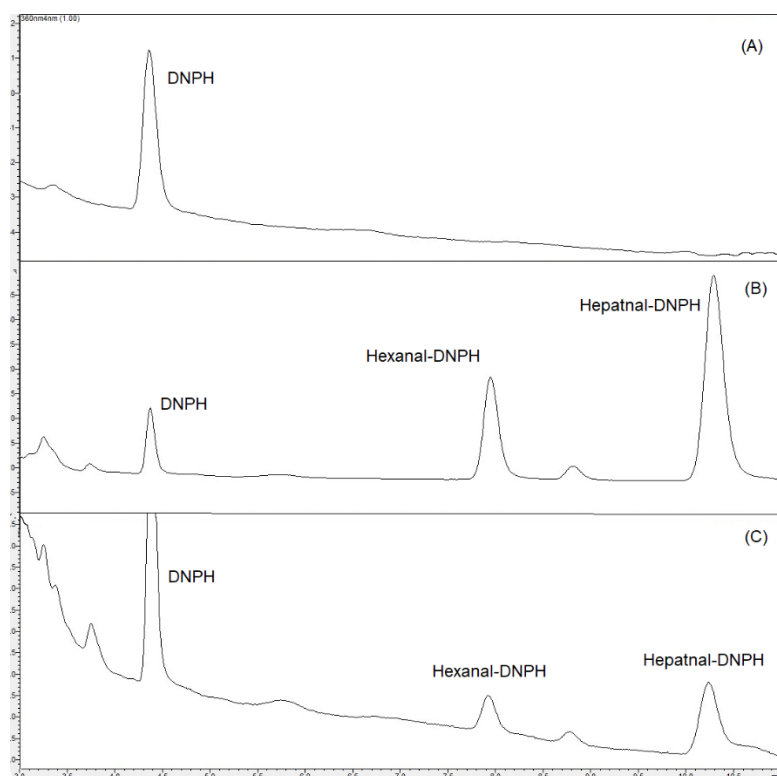
A urina é uma matriz que apresenta diversos compostos que podem acarretar interferências na análise e competir pelos sítios de interação com o sorvente. Sendo assim, uma das formas de minimizar estes problemas é diluindo para diminuir a concentração destas substâncias e permitir que os analitos estejam mais disponíveis para serem extraídos. Foram feitos testes fortificando a matriz previamente para a diluição da urina, com o pH ajustado em 4,0, sendo a matriz original, diluída em água ultrapura em 10, 20 e 40 vezes. Os resultados estão apresentados na Figura 36.

**Figura 36** - Gráfico de barras correspondente a diluição realizada na matriz de urina nas diferentes condições. Condições: Derivatização com 50  $\mu\text{L}$  de DNPH e 5 min em agitação, 300  $\text{ng mL}^{-1}$  de fortificação, 15 mg de cortiça, pH ajustado para 4,0, 3 ciclos de extração, 2 ciclos de dessorção, solvente de dessorção acetonitrila com 300  $\mu\text{L}$ . (Fonte: Autoria Própria, 2022).



Pelos dados obtidos através da normalização das áreas dos picos cromatográficos para os dois analitos, percebe-se que a resposta em diluições maiores (60% de água ultrapura), existe um decréscimo da resposta do hexanal ( $72\% \pm 15\%$ ) e para o heptanal ( $94\% \pm 4\%$ ). Para a urina não diluída apresentaram resultados para o hexanal ( $89\% \pm 11\%$ ) e heptanal ( $73\% \pm 7\%$ ) relativamente menores que em 10 e 20x, indicando que possa existir uma competição pelos sítios da cortiça. Nestes dois últimos, os resultados foram muito próximos, começando a haver uma leve diluição dos analitos em 20x. Desta forma, a condição compromisso estabelecida foi de 10x diluída em água ultrapura, diluindo os interferentes presentes e garantindo uma disponibilidade maior para a cortiça extrair os aldeídos. Assim a separação cromatográfica foi realizada e comparada na Figura 37.

**Figura 37** - Cromatograma comparativo, em 360 nm, para: (A) Extração branco da urina com a derivatização com DNPH; (B) Extração em  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  dos aldeídos nas amostras de urina; e (C) Injeção direta de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  dos aldeídos derivatizados com DNPH. Condições: Derivatização com  $50 \mu\text{L}$  de DNPH e 5 min de impregnação, urina 10x diluída em água U.P., 15 mg de cortiça, pH ajustado para 4,0, 3 ciclos de extração, 2 ciclos de dessorção, solvente de dessorção acetonitrila com  $300 \mu\text{L}$  (Fonte: Autoria Própria, 2022).

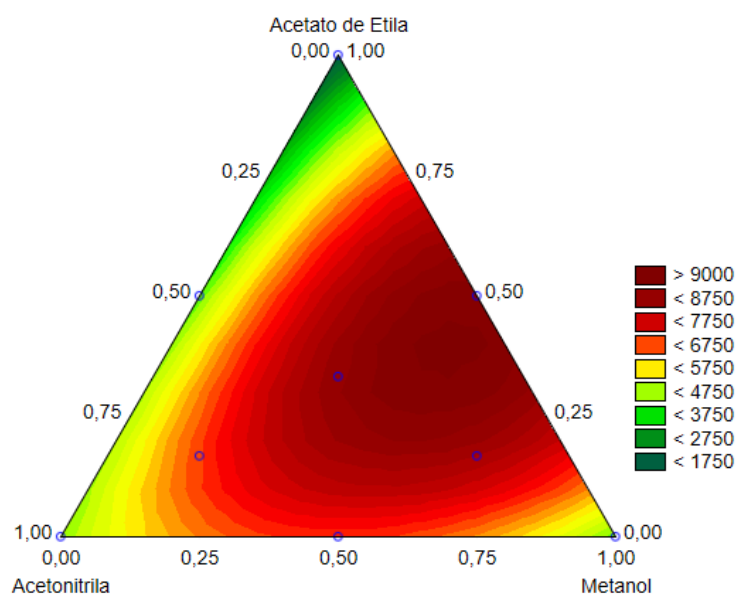


Pelos cromatogramas obtidos é possível observar que não há picos interferentes nos sinais cromatográficos dos aldeídos e foi possível extrair os analitos, com  $t_r = 8,0$  min para o hexanal,  $t_r = 10,25$  min para o heptanal e  $t_r = 4,4$  min para o DNPH.

### 6.3.2 Otimização do Solvente de Dessorção

Para garantir a máxima eficiência em retirar os analitos, o solvente deve quebrar as interações entre os compostos e a fase extratora. Neste estudo foi aplicado um planejamento *Simplex Lattice*, gerando uma superfície ternária com 10 pontos e uma triplicata no ponto central, com a matriz de experimentos apresentada na Tabela 13-A no Anexo. Na Figura 38 está apresentada a superfície gerada através dos dados com acetonitrila, metanol e acetato de etila como solventes de dessorção, puros e misturas.

**Figura 38** - Superfície ternária gerada a partir do planejamento *Simplex Lattice* para avaliação do solvente de dessorção. Condições: Derivatização com 50  $\mu\text{L}$  de DNPH e 5 min de impregnação, urina 10x diluída em água U.P., 15 mg de cortiça, pH ajustado para 4,0, 3 ciclos de extração, 2 ciclos de dessorção, solvente de dessorção em 300  $\mu\text{L}$  (Fonte: Autoria Própria, 2022).



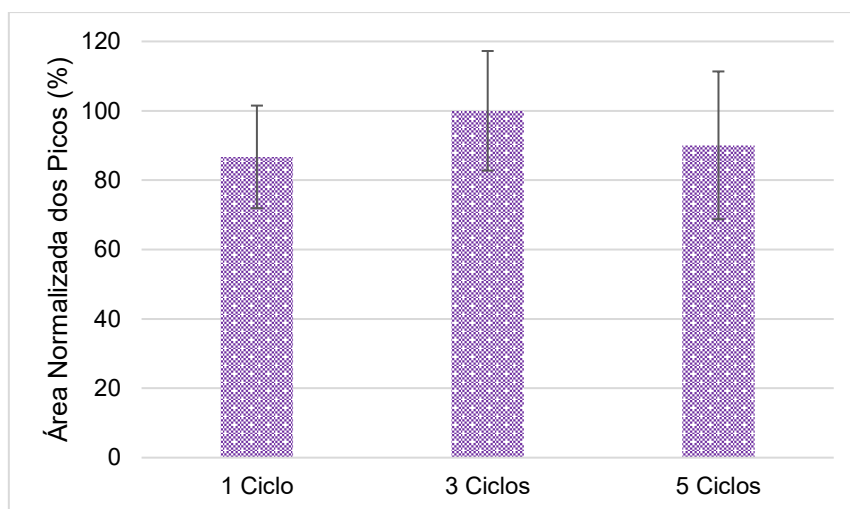
O modelo aplicado para realizar o planejamento *Simplex Lattice* e tratar os dados obtidos foi o cúbico especial, ( $R^2 = 0,9968$ ), gerando uma resposta de máximo em aproximadamente 50% de acetato de etila e 50% de metanol. Isto pode ocorrer pois o acetato de etila pode interagir com sua cadeia carbônica com as cadeias dos aldeídos por interações de Van der Waals, além de poder fazer ligações de hidrogênio entre os grupos

funcionais do DNPH. O metanol permite fazer interações de hidrogênio, além de a mistura entre os dois facilitar o processo da mistura dinâmica com a cortiça, permitindo uma melhor área superficial para retirar os analitos da fase extratora. Sendo assim, foi estabelecido uma condição de AcEt/MeOH (1:1).

### 6.3.3 Otimização dos Ciclos de Dessorção

Para garantir a máxima dessorção, associada a mistura dos solventes AcEt/MeOH (1:1), também foi estudada o número de ciclos para retirar todo ou a maior parte dos analitos da fase extratora. Desta forma, foram avaliados 1, 3 e 5 ciclos de dessorção e os dados tratados estão apresentados na Figura 39.

**Figura 39** - Gráfico de barras obtidos para a otimização do número de ciclos de dessorção. Condições: Derivatização com 50  $\mu$ L de DNPH e 5 min de impregnação, urina 10x diluída em água U.P., 15 mg de cortiça, pH ajustado para 4,0, 3 ciclos de extração, solvente de dessorção AcEt/MeOH (1:1) em 300  $\mu$ L. (Fonte: Autoria Própria, 2022).

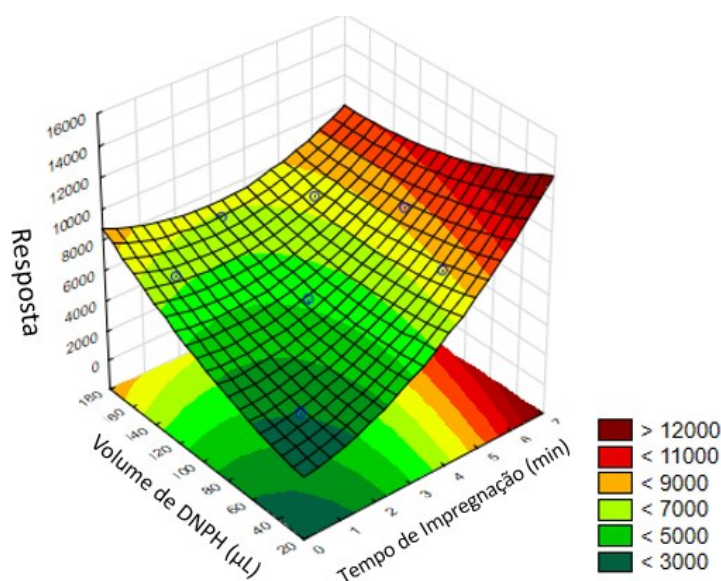


Através da área normalizada dos picos cromatográficos, a resposta compromisso entre hexanal e heptanal foi para 3 ciclos de dessorção. Para 1 e 5 ciclos, as respostas foram muito próximas, sendo 1 ciclo ( $87 \pm 15\%$ ) e 5 ciclos ( $90 \pm 21\%$ ). Além disso, na de 3 ciclos ( $100 \pm 17\%$ ) os erros foram melhores do que em 5 ciclos, portanto, para garantir que todo ou quase todo os analitos fossem retirados da cortiça, 3 ciclos foram selecionados, sem que houvesse a necessidade de uma etapa de limpeza e garantir que não houvesse efeitos de memória entre ciclos de experimentos.

### 6.3.4 Otimização do Tempo de Impregnação e Volume de DNPH para Derivatização *In-Situ*

Para ocorrer o processo de derivatização *in-situ*, a solução do agente derivatizante foi aspirada pela ponteira de DPX contendo cortiça. Para que este processo ocorresse, foram estudados o tempo necessário para a impregnação do DNPH na cortiça e o volume adicionado para que a reação fosse a mais efetiva. Na Figura 40 está apresentada a superfície de resposta obtida através de um planejamento composto central realizado em tempos de 0, 1, 3, 5 e 6 min e volumes de DNPH de 30, 50, 100, 150 e 170  $\mu\text{L}$ , com a matriz de experimentos e ANOVA apresentadas nas Tabelas 14-A e 15-A, respectivamente.

**Figura 40** - Superfície de resposta para o composto central entre tempo de impregnação e volume de DNPH. Condições: Fortificação de  $300 \text{ ng mL}^{-1}$  dos analitos, urina 10x diluída em água U.P., 15 mg de cortiça, pH ajustado para 4,0, 3 ciclos de extração, 2 ciclos de dessorção, solvente de dessorção acetonitrila com 300  $\mu\text{L}$ . (Fonte: Autoria Própria, 2022).



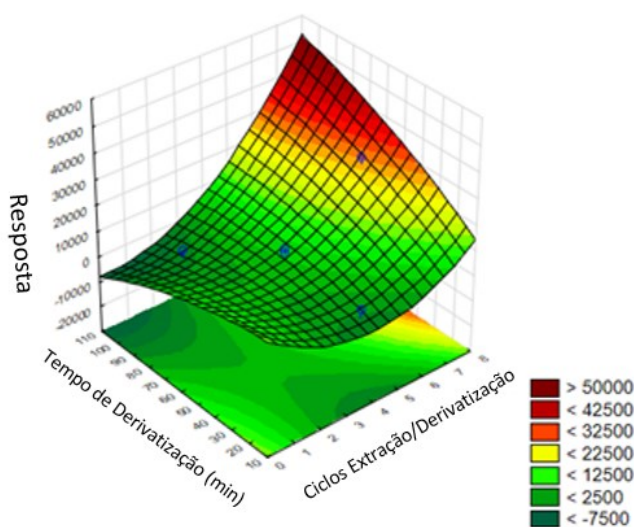
Pelos dados obtidos da superfície ( $R^2 = 0,98628$ ), observa-se que com o aumento do tempo para impregnação e pequenos volumes adicionados de DNPH, aumentam a resposta. Isso pode ocorrer pois o derivatizante é aspirado e mantido em contato com a cortiça em apenas um ciclo, dessa forma, mais moléculas interagem com a fase para realizar a reação *in-situ* com os analitos. Para não aumentar mais o tempo e garantir uma frequência analítica boa, maiores tempos não foram estudados e os resultados obtidos

neste planejamento foram satisfatórios, sendo assim, foi mantido um volume de 30  $\mu\text{L}$  de DNPH (para 300  $\text{ng mL}^{-1}$  dos analitos) e 6 min de tempo de impregnação.

### 6.3.5 Otimização dos Ciclos de Extração (Reação *In-Situ*) pelo Tempo

Após avaliar a impregnação do agente derivatizante, foi estudado o número de ciclos e o tempo necessário para que ocorra a reação em cada ciclo. O delineamento experimental aplicado foi um composto central com 10 experimentos, onde para os ciclos de extração foram estabelecidos de 1, 2, 4, 6 e 7, e para o tempo de 17, 30, 60, 90 e 102 segundos. Na Tabela 16-A está apresentada a matriz experimental e na Tabela 17-A a ANOVA obtida. Na Figura 41 está apresentada a superfície de resposta obtida através dos dados tratados.

**Figura 41** - Superfície de resposta para a otimização dos ciclos de extração (reação *in-situ*) pelo tempo de reação. Condições: 30  $\mu\text{L}$  e 6 min de impregnação de DNPH, 300  $\text{ng mL}^{-1}$  de fortificação dos analitos, urina 10x diluída em água U.P., 15 mg de cortiça, pH ajustado para 4,0, 2 ciclos de dessorção, solvente de dessorção acetonitrila com 300  $\mu\text{L}$ . (Fonte: Autoria Própria, 2022).

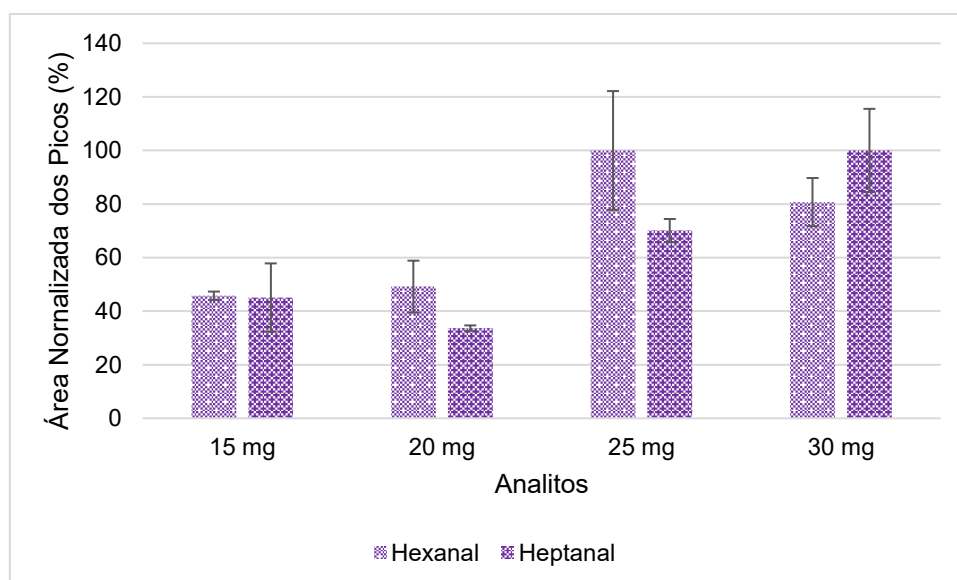


Através da superfície gerada pelo planejamento composto central ( $R^2 = 0,89785$ ), é possível observar um aumento da resposta conforme aumenta-se o número de ciclos e de tempo de reação. Isto ocorre, pois, mais moléculas acabam interagindo para que ocorra a reação e em tempos maiores permite que o rendimento seja maior, aumentando assim a resposta analítica. Para manter uma resposta compromisso e satisfatória e não prejudicar a frequência analítica, foram estabelecidos como 7 ciclos de extração e 1 min e 30 s. para cada ciclo de reação.

### 6.3.6 Otimização da Massa de Cortiça adicionada à DPX

A fase extratora está diretamente relacionada com a quantidade de analito extraído. Maiores massas indicam mais sítios de interação, para tanto, é necessário se avaliar a quantidade de sorvente para que se tenham extrações significativas com resultados satisfatórios. Assim sendo, foram avaliadas massas de 15, 20, 25 e 30 mg de cortiça adicionada a ponteira de DPX. No gráfico de barras da Figura 42, está apresentados os dados para os dois aldeídos nas diferentes massas estudadas.

**Figura 42** - Gráfico de barras para as diferentes massas de cortiça adicionadas a ponteiras de DPX-Branco. Condições: 30  $\mu\text{L}$  e 6 min de impregnação de DNPH, 300  $\text{ng mL}^{-1}$  de fortificação dos analitos, urina 10x diluída em água U.P., pH ajustado para 4,0, 7 ciclos de extração com 1min e 30 s. cada, 2 ciclos de dessorção, solvente de dessorção acetoneitrila com 300  $\mu\text{L}$ . (Fonte: Autoria Própria, 2022).



Através das áreas normalizadas dos picos, é possível observar que as melhores respostas foram obtidas com massas maiores, em 25 mg para o hexanal ( $100 \pm 22\%$ ) e heptanal ( $70 \pm 4,3\%$ ) e 30 mg para hexanal ( $81 \pm 9\%$ ) e heptanal ( $100 \pm 15\%$ ). Comparando-se essas duas condições, foi estabelecido a de 30 mg, mesmo obtendo uma resposta um pouco menor para o hexanal do que em 25 mg, mas ainda assim, com uma diferença pequena entre os dados.

### 6.3.7 Parâmetros Analíticos de Mérito e Aplicação das Amostras de Urina

Com a metodologia devidamente otimizada, foram construídas curvas analíticas para os dois aldeídos derivatizados. Foram realizados 7 pontos em triplicata, sendo

utilizada uma urina isenta da presença dos analitos. Na Tabela 16 estão apresentados os principais parâmetros analíticos de mérito obtidos para o hexanal e o heptanal.

**Tabela 16** - Parâmetros analíticos de mérito obtidos para o hexanal e o heptanal pelo método proposto. (Fonte: Autoria Própria, 2022).

Analito	LOD (nmol mL <sup>-1</sup> )	LOQ (nmol mL <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	Faixa Linear de Trabalho (ng mL <sup>-1</sup> )	Faixa Linear de Trabalho (nmol mL <sup>-1</sup> )	Equação Geral da Reta
Hexanal	0,13	0,41	0,9900	50 – 800	0,49 – 7,99	y = 3636,2x + 5609,8
Heptanal	0,13	0,40	0,9911	50 – 800	0,44 – 7,00	y = 1444,9x + 6661,6

A partir dos dados, as curvas apresentam bons ajustes ao modelo linear, com R<sup>2</sup> de 0,9900 e 0,9911, para o hexanal e heptanal, respectivamente. As faixas de trabalho são apresentadas em dois formatos, a primeira variando de 50 a 800 ng mL<sup>-1</sup> para ambos os analitos e de 0,49 – 7,99 e 0,44 – 7,00, para o hexanal e o heptanal, respectivamente. O segundo formato de faixa é utilizado na literatura para se comparar a faixa de 0,12 – 0,97 nmol L<sup>-1</sup> de hexanal e 0,09 – 1,30 nmol L<sup>-1</sup> para o heptanal em pacientes saudáveis. Já para pacientes que apresentem câncer pulmonar, as faixas compreendem entre 0,99 e 6,70 nmol mL<sup>-1</sup>, e 2,50 e 6,40 nmol mL<sup>-1</sup> para hexanal e heptanal, respectivamente. A partir das faixas obtidas pelo método proposto, pode se avaliar a faixa para pacientes afetados por câncer de pulmão, bem como atingir concentrações que indiquem que o indivíduo está saudável. Os LODs foram de 0,13 nmol mL<sup>-1</sup> para ambos e os LOQs foram de 0,41 nmol mL<sup>-1</sup> para o hexanal e 0,40 nmol mL<sup>-1</sup> para o heptanal (SONG *et al.*, 2011; OENNING *et al.*, 1965). Também foram realizados ensaios de recuperações e precisões em urinas diferentes. As recuperações foram feitas em urina de voluntária em três concentrações, em triplicata cada. As precisões foram feitas em três concentrações, em triplicata cada, sendo a intradia (n = 3) no mesmo dia e interdia (n = 9) em três dias diferentes. Os dados estão apresentados na Tabela 17.



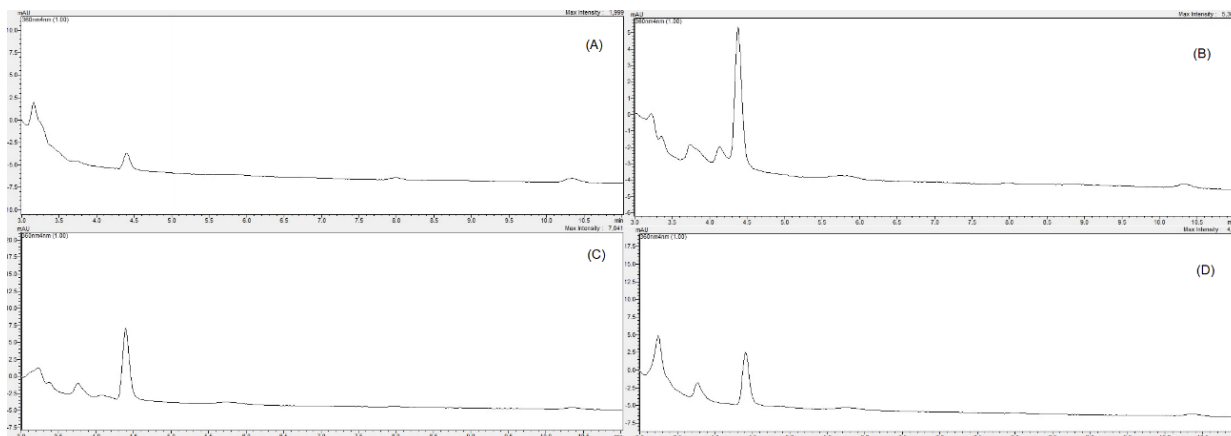
**Tabela 17** - Ensaio de recuperação e precisão para os analitos em diferentes concentrações. (Fonte: Autoria Própria, 2022).

Analito	Recuperação Relativa (%)		Precisão Intradia (n = 3)		Precisão Interdia (n = 9)	
	Adicionado (ng mL <sup>-1</sup> )	Recuperado (%)	Adicionado (ng mL <sup>-1</sup> )	RSD %	Adicionado (ng mL <sup>-1</sup> )	RSD %
Hexanal	50	86	50	4	50	9
	400	92	400	17	400	17
	800	103	800	9	800	21
Heptanal	50	107	50	15	50	9
	400	103	400	9	400	8
	800	106	800	11	800	12

As recuperações relativas foram realizadas em 50, 400 e 800 ng mL<sup>-1</sup>, compreendendo de 86 a 103% para o hexanal e de 103 a 107% para o heptanal. As precisões intradia foram ≤ 17% para o hexanal e ≤ 15% para o heptanal, e para as interdia foram ≤ 21% e ≤ 12%. Os dados apresentaram variações consideráveis, em sua maioria, de acordo com estabelecidos por guias de validação. Além disso, amostras de urina variam de indivíduos para indivíduos, podendo haver efeitos de matriz, que explicam as variações de dados na recuperação e precisões (BMVGI, 2018; AOAC, 2016).

A aplicação do método proposto foi realizada em 4 amostras de urina de voluntários masculinos e femininos, com idades entre 20 e 30 anos. Cromatogramas são apresentados na Figura 43.

**Figura 43** - Cromatogramas obtidos da análise de 4 amostras de urina aplicando-se o método proposto, em 360 nm. (A) Amostra 1; (B) Amostra 2; (C) Amostra 3; (D) Amostra 4 (Fonte: Aatoria Própria, 2022).



Pela análise dos cromatogramas, apenas o pico do DNPH ( $t_r = 4,5$  min) é possível observar, nenhum pico referente ao hexanal e ao heptanal foi encontrado, indicando que os indivíduos estão saudáveis, pois os picos podem estar abaixo do LOD do método, ou seja, a faixa de concentração dos analitos pode estar em concentrações que impliquem que estejam saudáveis e sem a presença de câncer de pulmão.

### 6.3.8 Comparação do Método Proposto de DPX-Cortiça-Paralela com outros Reportados na Literatura

A metodologia desenvolvida é um importante estudo para indicar testes precoces de aldeídos que apresentem concentrações relativas de hexanal e heptanal, dois compostos indicativos de câncer de pulmão. Outros trabalhos são reportados na literatura e apontam a importância desse tipo de aplicação como diagnóstico precoce para esta doença. Na Tabela 18 estão apresentados alguns estudos publicados e comparados com o proposto.

**Tabela 18** - Comparação entre o método proposto com outros reportados na literatura para determinação de hexanal e heptanal em urinas humanas.

Técnica	Fase Extratora	Derivatização	Tempo de Preparo (min)	LOD (nmol mL <sup>-1</sup> )	Faixa Linear de Trabalho (nmol mL <sup>-1</sup> )	Instrumentação	Ref.
DPX	Cortiça	<i>in-situ</i> -DNPH	~5	0,13	Hex. – 0,49 – 7,99 Hept. – 0,44 – 7,00	HPLC-DAD	Este estudo
BA $\mu$ E	Cortiça	<i>In-situ</i> -DNPH	~70	Hex. – 1,00 Hept – 0,73	Hex – 3,00 – 8,00 Hept – 2,19 – 7,00	HPLC-DAD	Oenning <i>et al.</i> , 2017
SPME	Poli(MAA- <i>co</i> -EDMA)	HAHC <sup>a</sup>	~35	Hex. – 15,00 Hept. – 9,00	Hex. – 50 – 500 Hept. – 30 - 500	LC-MS	Chen <i>et al.</i> , 2017
SPME	Poli(MAA- <i>co</i> -EDMA)	DNPH	~15	Hex. – 0,81 Hept. – 0,76	0,02 – 5,00	HPLC-UV	Xu <i>et al.</i> , 2011
SPE	(Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /P(MAA- <i>co</i> -EDMA)	<i>In-situ</i> -DNPH	~9	Hex. – 1,7 Hept. – 2,5	Hex. – 6 – 5000 Hept. – 9 - 5000	HPLC-UV	Liu <i>et al.</i> , 2015
SPME	Óxido de Grafeno	-	~10	Hex. – 0,004 Hept.- 0,0026	Hex. – 0,01 – 0,50 Hept. – 0,08 – 0,43	GC-MS	Tabibpour <i>et al.</i> , 2020
							Continua...

<b>Técnica</b>	<b>Fase Extratora</b>	<b>Derivatização</b>	<b>Tempo de Preparo (min)</b>	<b>LOD (nmol mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Faixa Linear de Trabalho (nmol mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Instrumentação</b>	<b>Ref.</b>
SPME	PDMS/DVB	-	~20	Hex. – 0,11 Hept. – 0,10	1,56 - 50	GC-MS	Guadagni <i>et al.</i> , 2011
SPME	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> / Polipirrol	<i>In-situ</i> -DNPH	~10	Hex. – 0,10 Hept – 0,50	Hex. – 10 – 15000 Hept. – 10 – 15.000	GC-FID	Ghiasvand <i>et al.</i> , 2018
HF-LPME	1-octanol	Ácido 2-Tiobarbitúrico	~70	Hex. 2,7 Hept. – 0,97	Hex. – 4,00 – 100 Hept. – 3,5 - 88	CZE-AD <sup>b</sup>	Chen <i>et al.</i> , 2014

<sup>a</sup>HAHC – Cloridrato de Hidroxilamina;

<sup>b</sup>CZE-AD – Eletroforese de zona capilar com detecção amperométrica.

A tabela comparativa traz dados de diferentes trabalhos reportados para aplicação na determinação dos dois aldeídos, hexanal e heptanal, em matrizes de urina. Apenas um trabalho havia sido reportado anteriormente utilizando um bioissorvente, a cortiça, sendo desenvolvido e aplicado pelo grupo de pesquisa do Professor Dr. Eduardo Carasek. Entretanto, o método proposto foi o primeiro a empregar a cortiça no formato de um pó e com a técnica de DPX, sendo uma metodologia inédita nesta aplicação, além de ir de encontro com os princípios da química verde.

A derivatização ocorreu de forma simples, com apenas aspiração, sem descarte de solução pelo volume ser muito pequeno, além de ocorrer *in-situ* a reação através da aspiração da amostra nos diferentes ciclos. O tempo de preparo quando avaliado de maneira única, foi aproximadamente em 25 min, mas como foi utilizado o dispositivo de DPX-Paralelo que permite o uso de até 5 ponteiros simultaneamente, permitiu uma frequência analítica de 5 min, o que torna uma vantagem frente alguns métodos que empregam a centrifugação/derivatização/extração/dessorção em tempos de até 70 min.

Os LODs foram satisfatórios, sendo menores que alguns trabalhos, e maiores que outros. Importante destacar que, diferentes formas são utilizadas para se estabelecer os valores de LODs pela literatura, bem como, as instrumentações utilizadas que permitem respostas mais sensíveis, como GC-MS e LC-MS. Além disto, foi utilizado um HPLC-DAD, um instrumento mais simples, barato e de fácil manutenção se comparado aos demais.

As faixas lineares estudadas foram significativas para aplicação de pacientes que apresentem câncer de pulmão, sendo, em comparação com alguns projetos descritos, maior e melhor para esta finalidade.

A metodologia desenvolvida apresentou-se como inédita com o uso de um material renovável em conjunto com a técnica de DPX, utilizada pela primeira vez na aplicação dos aldeídos, com o uso do dispositivo em paralelo, permitindo uma frequência analítica alta. Dificuldades que podem ser corrigidas são, o uso de padrões internos para melhores curvas de calibração, permitindo ampliar as faixas de trabalho. Automatização do dispositivo de DPX-Paralelo, permitindo realizar todas as etapas de derivatização/extração/dessorção, diminuindo a manipulação humana e gerando menores erros de precisão e exatidão.

#### *6.4 Conclusões Parciais*

Uma metodologia simples, rápida e eficaz permitiu derivatizar e extrair os dois aldeídos marcadores de câncer pulmonar simultaneamente, através da extração em ponteira descartável com o biossorvente cortiça. Os parâmetros foram otimizados e validados, com resultados satisfatórios para aplicação em matrizes de urina, demonstrando ser uma ferramenta promissora para métodos de bioanálise. Com a aplicação inédita de DPX em paralelo, permitiu aumentar a frequência analítica da metodologia, permitindo a execução de 5 ponteiras ao mesmo tempo, tornando a aplicabilidade para laboratórios de rotina. As faixas obtidas para análise dos analitos permitem a avaliação de pacientes que estão com câncer de pulmão, além de, identificar concentrações para pacientes saudáveis e que apresentem naturalmente os compostos no organismo. A miniaturização permite que conceitos da química verde sejam aplicados ao estudo proposto, utilizando um material natural para extração, diminuindo o uso de energia para realização do procedimento, gerando menos resíduos pelo baixo uso de amostra e solventes. O método permite a determinação de hexanal e heptanal como possível diagnóstico precoce de câncer pulmonar, implicando em tratamentos com antecedência ao agravamento da doença.

## CAPÍTULO VII – CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

O presente estudo descreve a aplicação da extração em ponteira descartável (DPX) utilizando o biossorvente cortiça como fase extratora em amostras de urina humana. O emprego dessa configuração na área biológica ainda é sucinto, com poucos trabalhos relatados. O conjunto DPX-Cortiça permite uma extração eficiente, para uma série de compostos polares e apolares, de maneira rápida pela mistura dinâmica promovida na técnica, simplicidade do dispositivo ser apenas uma ponteira contendo um material entre dois filtros, e de fácil preparação e manuseio. A cortiça apresenta boas estabilidades química e física, frente a diferentes condições empíricas, como faixa ampla para trabalho em diferentes pHs, durabilidade a concentração salina das matrizes de urina, composição heterogênea que permite interações  $\pi$ - $\pi$ , ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, além de ser um material natural, renovável e biodegradável, com fácil obtenção e descarte. A comparação entre os 3 estudos com outros já publicados apresentaram aplicações equivalentes, satisfatórias e eficientes, em relação a maioria.

Para o primeiro projeto proposto, a cortiça foi comparada com outros materiais, naturais e sintéticos (comerciais), mostrando sua melhor eficiência para extração do metabólito THC-COOH em amostras de urina humana. As otimizações apresentaram boas relações entre os dados, permitindo verificar as melhores condições de aplicação do método, além de, demonstrar uma boa validação através dos parâmetros analíticos de mérito, com boa estabilidade e reprodutibilidade das ponteiras de DPX-Cortiça. Essa composição foi a primeira a ser relatada para extração do THC-COOH em amostras de urina humana, utilizando um material natural. As faixas lineares de trabalho, LOD e LOQ permitiram a avaliação de usuários que façam uso da planta *Cannabis Sativa* L., sendo confirmada em amostras disponibilizadas pelo IGP-RS.

A segunda metodologia foi inédita na aplicação de DPX-Cortiça para determinação de amins biogênicas em amostras de urina. O uso de um dispositivo em paralelo desenvolvido pelo grupo permitiu o emprego de até 5 ponteiras de forma simultânea, apresentando uma maior rapidez para obtenção dos resultados, gerando uma alta frequência analítica do método. Etapas de derivatização, centrifugação, extração e dessorção foram realizadas de maneira sequencial, entretanto, os resultados apresentaram dados confiáveis e significativos em concordância com guias oficiais de validação. Foi possível obter faixas de trabalho que permitam a avaliação de pacientes

que possam ter a presença de cânceres em seu organismo, proporcionando a viabilidade de tratamentos precoces.

O terceiro estudo proposto foi uma expansão da aplicação da cortiça com uma nova configuração para extração de aldeídos em matrizes de urina humana. O uso do pó de cortiça na DPX permitiu que a frequência analítica fosse boa, sendo associada ao dispositivo em paralelo, aumentando a velocidade da técnica. A derivatização *in-situ* é uma vantagem pois reduz o número de etapas, diminuindo possíveis erros associados. Pelas faixas lineares obtidas, foi possível identificar a concentração de hexanal e heptanal em pacientes saudáveis e com a presença de cânceres de pulmão, sendo uma ferramenta interessante em exames que possam determinar a presença do estágio inicial do câncer, gerando prevenção e uma cura mais assegurada.

Diante do exposto, temos que todas as metodologias apresentaram uma aplicação eficiente, segura e confiável utilizando a DPX-Cortiça como tema central. As aplicações foram de encontro com preceitos da química analítica verde, reduzindo o impacto ambiental, proporcionando o uso de menores quantidades de solventes orgânicos, amostras, materiais e resíduos gerados. Estes projetos abrem novas fronteiras para estudos que utilizem materiais alternativos verdes em técnicas de microextração, para que possam substituir métodos oficiais que empreguem materiais sintéticos e quantidades significativas de amostras e solventes, além de, permitir a automatização que suporte a demanda mundial para exames clínicos e forenses.



## REFERÊNCIAS

Abdolali, A. Guo, W. S., Ngo, H. H., Chen, S. S., Nguyen, N. C., Tung, K. L. Typical lignocellulosic wastes and by-products for biosorption process in water and wastewater treatment: A critical review. *Bioresource Technology*, 2014, 160, 57-66.

Abraham, T. T., Lowe, R. H., Pirnay, S. O., Darwin, W. D., Huestis, M., A., Simultaneous GC-EI-MS determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, 1-Hidroxy- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in human urine following tandem enzyme-alkaline hydrolyses. *Journal of Analytical Toxicology*, 2007, 31, 477-485.

Aizpurua-Olaizola, O., Omar, J., Navarro, P., Olivares, M., Etxebarria, N., Usobiaga, A. Identification and quantification of cannabinoids in *Cannabis sativa L.* plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406, 7549-7560.

Ali, M.F.B., Kishikawa, N., Ohyama, K., Mohamed, H.A.M., Abdel-Wadood, Mohamed, A.M., Kurodab, N. Chromatographic determination of aliphatic aldehydes in human serum after pre-column derivatization using 2,2'-furyl, a novel fluorogenic reagent. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1300, 199–203.

Anastas, P. T., Warner, J. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press: Oxford, 1998.

AOAC/ Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis: Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*. AOAC International: Maryland, 2016.

Armenta, S., Garrigues, S., de la Guardia, M. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 71, 2-8.

Balcerzak, W., Pokajewicz, K., Wieczorek, P. P. A useful procedure for detection of polyamines in biological samples as a potential diagnostic tool in cancer diagnosis. *Applied Cancer Research*, 2017, 37, 1-7.

Barbosa, A. Q., Da Silva, L. F. M., Abenojar, J., Figueiredo, M., Öchsner, A. Toughness of brittle epoxy resin reinforced with micro cork particles: Effect of size, amount and surface treatment. *Composites Part B*, 2017, 114, 299-310.

Battista, N., Sergi, M., Montesano, C., Napoletano, S., Compagnone, D., Maccarrone, M. Analytical approaches for the determination of phytocannabinoids and endocannabinoids in human matrices. *Drug Testing and Analysis*, 2013, 6, 7-16.

Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2018, Biopharmaceutics.

Borges, K. B. F., Queiroz, M. E. C. *Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos*, Ed. LTC, 1ª edição, 2015, Brasil.

Boyaci, E., Rodríguez-Lafuente, Á., Gorynski, K., Mirnaghi, F., Souza-Silva, É. A., Hein, D., Pawliszyn, J. Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 873, 14-30.

Bordin, D. C., Alvez, M. N., de Campos, E. G., de Martinis, B. S. Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art. *Journal of Separation Science*, 2016, 39, 1168-1172.

Brewer, W. E. Disposable pipette extraction. Patent of U.S. 2003.

Carasek, E., Bernardi, G., do Carmo, S. N., Viera, C. M. S. Alternative green extraction phases Applied to microextraction techniques for organic compound determination. *Separations*, 2019, 6, 35.

Carasek, E., Merib, J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. *Analytical Chimica Acta*, 2015, 880, 8-25.

Carasek, E., Morés, L., Merib, J. Basic principles, recent trends and future directions of microextraction techniques for the analysis of aqueous environmental samples. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2018, 19, 1-18.

Carasek, E., Bernardi, G., Morelli, D., Merib, J. Sustainable green solvents for microextraction techniques: Recent developments and applications. *Journal of Chromatography A*, 2021, 1640, 461944.

Carasek, E., Morés, L., Huelsmann, R. D. Disposable pipette extraction: A critical review of concepts, applications and concepts. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1192, 339383.

Chaves, A. R., Moura, B.H.F., Caris, J. A., Rabelo, D., Queiroz, M. E. C. The development of a new disposable pipette extraction phase based on polyaniline composites for the determination of levels of antidepressants in plasma samples. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1399, 1-7.

Chen, D., Ding, J., Wu, M. K., Zhang, T. Y., Qi, C. B., Feng, Y. Q. A liquid chromatography-mass spectrometry method based on post column derivatization for automated analysis in urinary hexanal and heptanal. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1493, 57-63.

Chen, F., Wang, C., Zhang, M., Zhang, X., Liu, Y., Ye, J., Chu, Q. Sensitive determination of endogenous hexanal and heptanal in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to capillary electrophoresis with amperometric detection. *Talanta*, 2014, 119, 83-89.

Citti, C., Braghiroli, D., Vandelli, M. A., Cannazza, G. Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 147, 565-579.

Crockett, D. K., Nelson, G., Dimson, P., Urry, F. M. Solid-phase extraction of 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid from urine drug-testing specimens with the Cerex PolyCrom-THC<sup>TM</sup> column. *Journal of Analytical Toxicology*, 2000, 24, 245-249.

Dai, Z., Wu, Z., Wang, J., Wang, X., Jia, S., Bazer, F. W., Wu, G. Analysis of polyamines in biological samples by HPLC involving pre-column derivatization with o-phthalaldehyde and *N*-acetyl-*L*-cysteine. *Amino Acids Protocols*, 2014, 46, 1557-1564.

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*, 2013, 772, 33–39.

Dias, A. N., Simão, V., Merib, J., Carasek, E. Use of green coating (cork) in solid-phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in water by gas chromatography-electron capture detection. *Talanta*, 2015, 134, 409–414.

Dias, A. N., da Silva, A. C., Simão, V., Merib, J., Carasek, E. A novel approach to bar adsorptive microextraction: Cork as extractor phase for determination of benzophenone, triclocarban and parabens in aqueous samples. *Analytica Chimica Acta* 2015, 888, 59–66.

Ding, S.-Y.; Himmel, M. E. The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A New Model Derived from Direct Visualization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 597-606.

do Carmo, S. N., Damásio, F. Q., Alves, V. N., Marques, T. L., Coelho, N. M. M. Direct determination of copper in gasoline by flame atomic absorption spectrometry after sorption and preconcentration on *Moringa oleifera* husks. *Microchemical Journal*, 2013, 110, 320-325.

do Carmo, S. N., Merib, J., Dias, A. N., Stolberg, J., Budziak, D., Carasek, E. A low-cost biosorbent-based coating for the highly sensitive determination of organochlorine pesticides by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1525, 23-31.

DPX Technologies, INTPTM Solid Phase Extraction (SPE), DPX Technologies, 2021. Disponível em: <http://dpxtechnologies.com/xtr/>. Acesso em: 01 de Julho de 2022.

Eller, S. C. W. S., Flaiban, L. G., Paranhos, B. A. P. B., da Costa, J. L., Lourenço, F. R., Yonamine, M. Analysis of 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in urine samples by hollow fiber-liquid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry in consideration of measurement uncertainty. *Forensic Toxicology*, 2014, 32, 282-291.

Ellison, S. T., Brewer, W. E., Morgan, S. L. Comprehensive analysis of drugs of abuse in urine using disposable pipette extraction. *Journal of Analytical Toxicology*, 2009, 33, 356-365.

Fernandes, E. M., Correlo, V. M., Mano, J. F., Reis, R. L. Cork-polymer biocomposites: Mechanical, structural and thermal properties. *Materials and Design*, 2015, 82, 282-289.

Ferreira, V. F., da Rocha, D. R. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. *Química Nova*, 2009, 32, 623-938.

Filippou, O., Bitas, D., Samanidou, V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. *Journal of Chromatography B*, 2017, 1043, 44-62.

Gałaszka, A., Migaszewski, Z., Namieśnik, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. *Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 50, 78-84.

Gallardo-Chacón, J. J., Karbowiak, T. Sorption of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol by suberin from cork. *Food Chemistry*, 2015, 181, 222-226.

Garcia, A.R., Lopes, L.F., Barros, R.B.d., Ilharco, L.M. The Problem of 2,4,6-Trichloroanisole in Cork Planks Studied by Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy: Proof of Concept, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63, 128-135.

Ghiasvand, A., Heidari, N., Abdolhosseini, S. Iron oxide/silica/polypyrrole nanocomposite sorbent for the comparison study of direct-immersion and headspace solid-phase microextraction of aldehyde biomarkers in human urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 159, 37-44.

Gil, Luis Manuel C. C. *Química da Cortiça: ponto da situação*. *Química, Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, 1993.

Gomes, H. O., Freire, P. T. C., Nascimento, R. F. Teixeira, R. N. P. Removal of contaminants from water using *Moringa oleifera* Lam. As biosorbent: Na overview of the last decade. *Journal of Water Process Engineering*, 2022, 46, 102576.

Gosetti, F., Mazzucco, E., Gennaro, M. C., Marengo, E. Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405, 2-3.

Guadagni, R., Miraglia, N., Simonelli, A., Silvestre, A., Lamberti, M., Feola, D., Acampora, A., Sannolo, N. Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method validation for the determination of endogeneous substances: Urinary hexanal and heptanal as lung tumor biomarkers. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 701, 29-36.

Hinz, J. S., Morés, L., Carasek, E. Exploring the use of cork pellets in bar adsorptive microextraction for the determination of organochloride pesticides in water samples with gas chromatography/electron capture detection quantification. *Journal of Chromatography A*, 2021, 1645, 462099.

Hofrichter, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 30, 454-466.

Huelsmann, R., Turazzi, F., Barra, G., Carasek, E. Exploring polypyrrole as extraction phase for disposable pipette extraction method for multiclass organic micro-pollutant determination in river and tap water using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 2020, 2164-2173.

Huelsmann, R., Will, C., Carasek, E. Novel strategy for disposable pipette extraction (DPX): Low-cost parallel-DPX for determination of phthalate migration from common plastic materials to saliva simulant with GC-MS. *Talanta*, 2021, 221, 121443.

Hung, C. H., Zukowski, J., Jense, D. S., Miles, A. J., Sulak, C., Dadson, A. E., Linford, M. R. Separation of cannabinoids on three different mixed-mode columns containing carbon/nanodiamond/amine-polymer superficially porous particles. *Journal of Separation Science*, 2015, 38, 2968-2974.

Hušek, P. Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *Journal of Chromatography B Biomedical Science Applied*, 1998, 717, 57-91.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). O que é câncer? Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322). Acesso em: 21 de Julho de 2022.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). Câncer de Pulmão. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pulmao>. Acesso em: 25 de Julho de 2022.

Iuvone, T., Esposito, G., Filippis, D. D., Scuderi, C. Steardo, L. Cannabidiol: A promising drug for neurodegenerative disorders? *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2009, 15, 65-75.

Jung, J., Kempf, J., Mahler, H., Weinmann, W. Detection of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid A in human urine and blood serum by LC-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 2007, 42, 354-360.

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

Ken, J., Chen, S. Thermal decomposition of lignin structural modification in termite digested softwood (II). *Fuel*, 2013, 104, 781-787.

Kirchmann, H., Pettersson, S. Human urine - Chemical composition and fertilizer use efficiency. *Fertilizer Research*, 1994, 40, 149-154.

Kole, P.L., Venkatesh, G., Kotecha, J., Sheshala, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods, *Biomedical Chromatography*, 2011, 25, 199–217.

Krug, F. J., Rocha, F. R. P. Métodos de Preparo de Amostras – Fundamentos sobre Preparo de Amostras Orgânicas e Inorgânicas para Análise Elementar. Ed. EDIT-SBQ, 1ª edição, 2016, Brasil.

Kulig, K. Interpretation of workplace tests of cannabinoids. *Journal of Medical Toxicology*, 2017, 13, 106-110.

Ligresti, A., Moriello, A. S., Starowicz, K., Matias, I., Pisanti, S., de Petrocellis, L., Laezza, C., Portella, G., Bifulco, M., di Marzo, V. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2006, 318, 1375-1387.

Lili, L., Xu, H., Song, D., Cui, Y., Hu, S., Zhang, G. Analysis of volatile aldehyde biomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217, 2365–2370.

Liu, J. F., Yuan, B. F., Feng, Y. Q. Determination of hexanal and heptanal in urine using magnetic solid phase extraction coupled with in-situ derivatization by high performance liquid chromatography. *Talanta*, 2015, 136, 54-59.

Lowe, R. H., Abraham, T. T., Darwin, W. D., Hering, R., Cadet, J. L., Huestis, M. A. Extended urinary  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol excretion in chronic cannabis users precludes use as biomarker of new drug exposure. *Drug and Alcohol Dependence*, 2009, 105, 24-32.

Mafra, G., Spudeit, D., Brognoli, R., Merib, J., Carasek, E. Expanding the applicability of cork as extraction phase for disposable pipette extraction in multiresidue of pharmaceuticals in urine samples. *Journal of Chromatography B*, 1102-1103, 2019, 159-166.

Meier, U., Dussy, F., Scheurer, E., Mercer-Chalmers-Bender, K., Hangartner, S. Cannabinoid concentrations in blood and urine smoking cannabidiol joints. *Forensic Science International*, 2018, 291, 62-67.

Merck, HybridSPE® DPX Tip, Merck – SigmaAldrich, 2021.

Mercolini, L., Musenga, A., Comin, I., Baccini, C., Conti, M., Raggi, M. A. Determination of plasma and urine levels of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and its main metabolite by liquid chromatography after solid-phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 47, 156-163.

Metabolite 11-Nor-9-carboxyl-THC (THC-COOH) – DrugBank. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/metabolites/DBMET02064> Acesso: 20 de Julho de 2022.

Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., Watts, J. Clarke's analysis of drugs and poisons. Pharmaceutical Press, London, 3rd Edition.

Montesano, C., Sergi, M., Odoarni, S., Simeoni, M. C., Compagnone, D., Curini, R. A  $\mu$ -SPE procedure for the determination of cannabinoids and their metabolites in urine by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 91, 169- 175.

Morés, L., Dias, A. N., Carasek E. Development of a high throughput method based on thin-film microextraction using a 96-well plate system with a cork coating for the



extraction of emerging contaminants in river water samples. *Journal of Separation Science*, 2018, 41, 697-703.

Morés, L., da Silva, A. C., Merib, J., Dias, A. N., Carasek, E. A natural and renewable biosorbent phase as a low-cost approach in disposable pipette extraction technique for the determination of emerging contaminants in lake water samples. *Journal of Separation Science*, 2019, 42, 1404-1411.

Morelli, D. C., Mafra, G., Santos, A. V., Merib, J., Carasek, E. Designing a green device to BAμE: Recycled cork pellet as extraction phase for the determination of parabens in river water samples. *Talanta*, 2020, 219, 121369.

Naccarato, A., Elliani, R., Cavaliere, B., Sindona, G., Tagarelli, A. Development of a fast and simple gas chromatographic protocol based on the combined use of alkyl chloroformate and solid phase microextraction for the assay of polyamines in human urine. *Journal of Chromatography A*, 2018, 1549, 1-13.

Namieśnik, J. Green Analytical Chemistry – Some Remarks. *Journal of Separation Science*, 2001, 24, 151-153.

Neto, C. P., Rocha, J., Gil, A., Cordeiro, N., Esculcas, A. P., Rocha, S., Delgadillo, I., de Jesus, J. D. P., Correia, A. J. F. <sup>13</sup>C solid-state nuclear magnetic resonance and Fourier transform infrared studies of the thermal desorption of cork. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 1995, 4, 143-151.

Nováková, L. Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1292, 25-37.

Nováková, L., Vlčková, H. A review of current trends and advances in modern bioanalytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 656, 8-35.

Oenning, A. L., Merib, J., Carasek, E. An effective and high-throughput analytical methodology for pesticide screening in human urine by disposable pipette extraction and gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2018, 1092, 459-465.

Oenning, A. L., Morés, L., Dias, A. N., Carasek, E. A new configuration for bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E) for the quantification of biomarkers (hexanal and heptanal) in human urine by HPLC providing an alternative for early lung cancer diagnosis. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 965, 54–62.

Ollivelá, M. À., Bazzicalupi, C., Bianchi, A., Fiol, N., Villaescusa, I. New insights into the interactions between cork chemical components and pesticides. The contribution of  $\pi$ - $\pi$  interactions, hydrogen bonding and hydrophobic effect. *Chemosphere*, 2015, 119, 863-870.

Olivellá, M. À., Fernandes, I., Cano, L., Jové, P., Oliveras, A. Role of chemical components of cork on sorption of aqueous polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Journal of Environmental Research*, 2013, 7, 225-234.

Palmer, S. L., Thakur, G. A., Makriyannis, A. Cannabinergic ligands. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2002, 121, 3-19.

Papageorgiou, M., Lambropoulou, D., Morrison, C., Kłodzińska, E., Namieśnik, J., Płotka-Wasyłka, J. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 98, 128-142.

Papageorgiou, M., Lambropoulou, D., Morrison, C., Namieśnik, J., Płotka-Wasyłka, J. Direct solid phase microextraction combined with gas chromatography – Mass spectrometry for the determination of biogenic amines in wine. *Talanta*, 2018, 183, 276-282.

Pawliszyn, A. C. L. Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 1990, 62, 2145-2148.

Peron G., Sut, S., Ben, S. D., Voinovich, D., Dall'Acqua, S. Untargeted UPLC-MS metabolomics reveals multiple changes of urine composition in healthy adult volunteers after consumptions of *curcuma longa* L. extract. *Food Research International*, 2020, 127, 108730.

Pzifer. Câncer de Pulmão. Disponível em: <https://www.pfizer.com.br/sua-saude/oncologia/cancer-de-pulmao>. Acesso em: 25 de Julho de 2022.

Phillips, M., Gleeson, K., Hughes, J. M., Greenberg, J., Cataneo, R. N., Baker, L., McVay, W. P. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-section study. *Lancet*, 1999, 353, 1930-1933.

Pierri, M. E., Morés, L., Bernardi, G., Carasek, E. Multiclass determination of endocrine disruptors in urine by hollow fiber microporous membrane and liquid chromatography. 2022, 652, 114725.

Pintor, A.M.A., Ferreira, C.I.A., Pereira, J.C., Correia, P., Silva, S.P., Vilar, V.J.P., Botelho, C.M.S., Boaventura, R.A.R. Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: A review. *Water Research*, 2012, 46, 3152-3166.

Płotka-Wasyłka, J., Simeonov, V., Namieśnik, J. An in-situ derivatization – dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas-chromatography – mass spectrometry for determining biogenic amines in home-made fermented alcoholic drinks. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1453, 10-18.

PubChem. Hexanal. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexanal>. Acesso em: 25 de Julho de 2022.

PubChem. Heptanal. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8130>. Acesso em: 25 de Julho de 2022.

Ramrakhiani, L., Halder, A., Majunder, A., Mandal, A. K., Majumdar, S. Ghosh, S. Industrial waste derived biosorbent for toxic metal remediation: Mechanism studies and spent biosorbent management. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 308, 1048-1064.

Raharjo, T. J., Verpoorte, R. Methods for the analysis of cannabinoids in biological matrices: A review, 2004, 15, 79-94.

Russo, E. B. History of Cannabis and Its Preparations in Saga, Science and Sobriquet. *Chemistry & Biodiversity*, 2007, 4, 1614-1648.

Sethi, R., Chava, S. R., Bashir, S., Castro, M. E. An improved high performance liquid chromatography method for identification and quantification of polyamines as benzoylated derivatives. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 2, 456-469.

Schroeder, J. L., Marinetti, L. J., Smith, R. K., Brewer, W. E., Clelland, B. L., Morgan, S. L. The analysis of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and metabolite in whole blood and 11-

nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using disposable pipette extraction with confirmation and quantification by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 2008, 32, 659-666.

Silva, A. C., Dias, A. N., Carasek, E. Exploiting cork as biosorbent extraction phase for solid-phase microextraction to determine 3-(4-methylbenzylidene) camphor and 2-ethylhexyl 4-(dimethylamino)benzoate in river water by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 2017, 28, 2341–2347.

Silva, A. C. P., Jorgetto, A. O., Wondracek, M. H. P., Galera, R. M. Properties, characteristics and application of grinded *Malpighia emarginata* seeds in the removal of toxic metals from water. *Groundwater for Sustainable Development*, 2018, 6, 50-56.

Song, D., Gu, Y., Liang, L., Ai, Z., Zhang, L., Xu, H. Magnetic solid-phase microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of hexanal and heptanal in human urine. *Analytical Methods*, 2011, 3, 1418-1423.

Souza-Silva, E. A., Reyes-Garcés, N., Gómez-Ríos, G. A., Boyaci, E., Bojko, B., Pawliszyn, J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications. *Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 71, 249-264.

Spietelun, A., Marcinkowski, L., de la Guardia, M., Namieśnik, J. Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1321, 1-13.

Srinivas, P. R., Kramer, B. S., Srivastava, S. Trends in biomarker research for cancer detection. *The Lancet Oncology*, 2001, 2, 698-704.

Souza-Silva, E. A., Reyes-Garcés, N., Gómez-Ríos, G. A., Boyaci, E., Bojko, B., Pawliszyn, J. A critical review of the state of art of solid phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications, *Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 71, 249-267.

Strimbu, K., Tavel, J. A. What are biomarkers? Current opinion in HIV and AIDS. 2010, 5, 463-466.

Tabibpour, M., Yamini, Y., Ahmadi, S. H., Esrafil, A., Heydar, K. T., Mousavi, S. A. J., Baharfar, M. Microextraction on a screw for determination of trace amounts of hexanal and heptanal as lung cancer biomarkers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 191, 113528.

Tobiszewski, M., Mechlinska, A., Zygmunt, B., Namiesnik, J. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28, 943-951.

Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., Hiai, H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* 1995, 1, 1-3.

Tran, V. S., Ngo, H. H., Guo, W., Zhang, J., Liang, S., Ton-that, C., Zhang, X. Typical low cost biosorbents for adsorptive removal of specific organic pollutants from water. *Bioresource Technology*, 2015, 182, 353-363.

Turoňová, D., Krčmová, L. K., Švec, F. Application of microextraction in pipette tips in clinical and forensic toxicology. *Trends in Analytical Chemistry*. 2021, 143, 116404.

Uchiyama, S., Inaba, Y., Kunugita, N. Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high performance liquid Chromatography. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879, 1282-1289.

UNODC, 2017. *World Drug Report, 2017*. United Nations Publications.

Vieira, C. M. S., Mazurkiewicz, M., Lopez, A., Debatin, V., Micke, G., Richter, P., Rosero Moreano, M., Carasek, E. Exploiting green sorbents in rotating-disk sorptive extraction for the determination of parabens by high performance liquid chromatography tandem electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 2018, 41, 4047–4054.

Vieira, C. M. S., Mafra, G., Brognoli, R., Richter, P., Rosero-Moreano, M., Carasek, E. A high throughput approach to rotating-disk sorptive extraction (RDSE) using laminar cork for the simultaneous determination of multiclass organic micro-pollutants in aqueous samples by GC-MS. *Talanta*, 2020, 208, 120459.

Vieira, C. M. S., Mafra, G., Bernardi, G., Carasek, E. Rotating sorptive Extraction (RSE) as a green approach for determining pesticides from fruit and vegetable wash-water using GC-MS. *Advances in Sample Preparation*, 2022, 1, 100003.

Vogel, M., Büldt, A., Karst, U. Hydrazine reagents as derivatizing agents in environmental analysis – a critical review. *Frenesius Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 366, 781-791.

World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. Biomarkers in risk assessment: validity and validation. Geneva, 2001.

World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. *Environmental Health Criteria* 155. Geneva, 1993.

World Health Organization: Cancer. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/en>. Acesso: 21 de Julho de 2022.

World Health Organization. Health Topics. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/#H> Acesso: 14 de Março de 2022.

Xu, H., Wang, S., Zhang, G., Huang, S., Song, D., Zhou, Y., Long, G. A novel solid-phase microextraction method based on polymer monolith frit combining with high-performance liquid chromatography for determination of aldehydes in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 690, 86-93.

Yamini, Y.; Rezazadeh, M.; Seidi, S. Liquid-phase microextraction – The different principles and configurations. *Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 112, 264–272.

Yu, C., Wang, L., Zheng, L., Jiang, X., Zhang, Q., Zhang, Y., Bi, K., Li, D., Li, Q. Nanoconfinement effect based in-fiber extraction and derivatization method for ultrafast analysis of twenty amines in human urine by GC-MS: Application of cancer diagnosis biomarker's screening. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1217, 339985.

Zhang, Q., McGuigan, C. F., Lew, K., Chris Le, X. 3.06 – Urine Sample Collection and Handling. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation. Analytical Techniques for Scientists*. 2012, 3, 123-142.

Zhang, H.J., Huang, J.F., Lin, B., Feng, Y.Q. Polymer monolith microextraction with in situ derivatization and its application to high-performance liquid chromatography determination of hexanal and heptanal in plasma. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1160, 114-119.

## ANEXOS

**Tabela 1-A:** Planejamento experimental para aplicação do *Simplex Centroide* para escolha do solvente de dessorção (Fonte: Autoria Própria, 2020).

Experimento	Acetonitrila		Metanol		Acetato de Etila	
	N-Cod.	Cod.	N-Cod.	Cod.	N-Cod.	Cod.
1	1.00	200 µL	0.00	-	0.00	-
2	0.00	-	1.00	200 µL	0.00	-
3	0.00	-	0.00	-	1.00	200 µL
4	0.50	100 µL	0.50	100 µL	0.00	-
5	0.50	100 µL	0.00	-	0.50	100 µL
6	0.00	-	0.50	100 µL	0.50	100 µL
7	0.66	133 µL	0.16	33,5 µL	0.16	33,5 µL
8	0.16	33,5 µL	0.66	133 µL	0.16	33,5 µL
9	0.16	33,5 µL	0.16	33,5 µL	0.66	133 µL
10, 11, 12	0.33	66,7 µL	0.33	66,7 µL	0.33	66,7 µL

**Tabela 2-A:** Planejamento experimental para aplicação do *Doehlert* para escolha do número de ciclos vs tempo (Fonte: Autoria Própria, 2020).

Experimento	Número de Ciclos		Tempo de Des. (s.)	
	Cod.	N-Cod.	Cod.	N-Cod.
1	-0,866	3	+1	30
2	+0,866	7	+1	30
3	-1	1	0	15
4, 5, 6	0	5	0	15
7	+1	9	0	15
8	-0,866	3	-1	5
9	+0,866	7	-1	5

**Tabela 3-A:** ANOVA obtida para o planejamento *Doehlert* entre número de ciclos vs tempo de dessorção (Fonte: Autoria Própria, 2020).

Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) Número de Ciclos (L)	2,789276E+07	1	2,789276E+07	0,77170	0,472343
Número de Ciclos (Q)	9,203103E+07	1	9,203103E+07	2,54620	0,251620
(2) Tempo de Dess (s.) (L)	3,411727E+09	1	3,411727E+09	94,39133	0,010429
Tempo de Dess (s.) (Q)	3,498709E+08	1	3,498709E+08	9,67979	0,089635
Interação entre 1L e 2L	3,375106E+08	1	3,375106E+08	9,33782	0,092476
Falta de Ajuste	5,241530E+08	1	5,241530E+08	14,50160	0,062557
Erro Puro	7,228898E+07	2	3,614449E+07		
Total SS	5,208141E+09	8			



**Tabela 4-A:** Planejamento experimental para aplicação do Composto Central para tempo de extração vs número de ciclos vs massa de cortiça (Fonte: Autoria Própria, 2020).

Experimento	Núm. Ciclos		Tempo Ext (s.)		Massa de Cortiça (mg)	
	N-Cod.	Cod.	N-Cod.	Cod.	N-Cod.	Cod.
1	3	-1	30	-1	7,5	-1
2	9	+1	90	+1	7,5	-1
3	9	+1	30	-1	20	+1
4	3	-1	90	+1	20	+1
5	6	0	60	0	12,5	0
6	9	+1	30	-1	7,5	-1
7	3	-1	90	+1	7,5	-1
8	3	-1	30	-1	20	+1
9	9	+1	90	+1	20	+1
10	6	0	60	0	12,5	0
11	6	0	60	0	5	-1,673
12	6	0	60	0	25	+1,673
13	6	0	10	-1,673	12,5	0
14	6	0	110	+1,673	12,5	0
15	1	-1,673	60	0	12,5	0
16	11	+1,673	60	0	12,5	0
17	6	0	60	0	12,5	0

**Tabela 5-A:** ANOVA obtida para o planejamento Composto Central entre número de ciclos vs tempo de extração vs massa de cortiça (Fonte: Autoria Própria, 2020).

Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) Número de Ciclos (L)	4022137	1	4022137	7,49796	0,040877
Núm. De Ciclos (Q)	1098	1	1098	0,002048	0,965660
(2) Tempo de Ext. (s.) (L)	3221694	1	3221694	6,005800	0,057888
Tempo de Ext. (s.) (Q)	4863	1	4863	0,009065	0,927844
(3) Massa de Cortiça (mg) (L)	3286077	1	3286077	6,125822	0,056182
Massa de Cortiça (mg) (Q)	257104	1	257104	0,479287	0,519575
Interação entre 1L e 2L	445855	1	445855	0,831152	0,403752
Interação entre 1L e 3L	814043	1	814043	1,517518	0,272765
Interação entre 2L e 3L	347446	1	347446	0,647701	0,457481
Erro Puro	2682152	5	536430		
Total SS	16831769	14			

**Tabela 6-A:** Planejamento experimental para aplicação do Composto Central entre tempo para reação de derivatização vs volume de IBCF (Fonte: Autoria Própria, 2022).

Experimento	Tempo de Reação (min)		Volume IBCF ( $\mu\text{L}$ )	
	Cod.	N-Cod.	Cod.	N-Cod.
1	-1	2	-1	20
2	-1	2	+1	150
3	+1	20	-1	20
4	+1	20	+1	150
5	-1,41421	1,72	0	85
6	+1,41421	23,73	0	85
7	0	11	-1,41421	7
8	0	11	+1,41421	177
9, 10	0	11	0	85

**Tabela 7-A:** ANOVA obtida para o planejamento Composto Central entre tempo para reação de derivatização vs volume de IBCF (Fonte: Autoria Própria, 2022).

Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) Tempo de Der. (min) (L)	78006	1	78006	2,76	0,344805
Tempo de Deriv. (min) (Q)	318755670	1	318755670	11289,25	0,005991
(2) Volume IBCF ( $\mu\text{L}$ ) (L)	32040842	1	32040842	1134,78	0,018893
Volume IBCF ( $\mu\text{L}$ ) (Q)	37538296	1	37538296	1329,48	0,017455
Interação entre 1L e 2L	96652729	1	96652729	3423,11	0,010880
Falta de Ajuste	640597	1	640597	22,69	0,131741
Erro Puro	28235	1	28235		
Total SS	472199400	7			

**Tabela 8-A:** Planejamento experimental para o Fatorial Fracionário  $2^{6-1}$  para obtenção do gráfico de Paretos (Fonte: Autoria Própria, 2022).

Experim.	Ciclos Des.		Solv. Des.		Tempo Des. (s.)		Ciclo Ext.		Massa Cort. (mg)		Tempo Ext. (s.)	
	N-C.	Cod.	N-C.	Cod.	N-C.	Cod.	N-C.	Cod.	N-C.	Cod.	N-C.	Cod.
1	1	-1	ACN	-1	5	-1	1	-1	10	-1	5	-1
2	1	-1	ACN	-1	5	-1	1	-1	20	+1	30	+1
3	1	-1	ACN	-1	5	-1	6	+1	10	-1	30	+1
4	1	-1	ACN	-1	5	-1	6	+1	20	+1	5	-1
5	1	-1	ACN	-1	30	+1	1	-1	10	-1	30	+1
6	1	-1	ACN	-1	30	+1	1	-1	20	+1	5	-1
7	1	-1	ACN	-1	30	+1	6	+1	10	-1	5	-1
8	1	-1	ACN	-1	30	+1	6	+1	20	+1	30	+1
9	1	-1	MeOH	+1	5	-1	1	-1	10	-1	30	+1
10	1	-1	MeOH	+1	5	-1	1	-1	20	+1	5	-1
11	1	-1	MeOH	+1	5	-1	6	+1	10	-1	30	+1
12	1	-1	MeOH	+1	5	-1	6	+1	20	+1	5	-1

13	1	-1	MeOH	+1	30	+1	1	-1	10	-1	5	-1
14	1	-1	MeOH	+1	30	+1	1	-1	20	+1	30	+1
15	1	-1	MeOH	+1	30	+1	6	+1	10	-1	30	+1
16	1	-1	MeOH	+1	30	+1	6	+1	20	+1	5	-1
17	5	+1	ACN	-1	5	-1	1	-1	10	-1	30	+1
18	5	+1	ACN	-1	5	-1	1	-1	20	+1	5	-1
19	5	+1	ACN	-1	5	-1	6	+1	10	-1	5	-1
20	5	+1	ACN	-1	5	-1	6	+1	20	+1	30	+1
21	5	+1	ACN	-1	30	+1	1	-1	10	-1	30	+1
22	5	+1	ACN	-1	30	+1	1	-1	20	+1	5	-1
23	5	+1	ACN	-1	30	+1	6	+1	10	-1	30	+1
24	5	+1	ACN	-1	30	+1	6	+1	20	+1	5	-1
25	5	+1	MeOH	+1	5	-1	1	-1	10	-1	5	-1
26	5	+1	MeOH	+1	5	-1	1	-1	20	+1	30	+1
27	5	+1	MeOH	+1	5	-1	6	+1	10	-1	30	+1
28	5	+1	MeOH	+1	5	-1	6	+1	20	+1	5	-1
29	5	+1	MeOH	+1	30	+1	1	-1	10	-1	30	+1
30	5	+1	MeOH	+1	30	+1	1	-1	20	+1	5	-1
31	5	+1	MeOH	+1	30	+1	6	+1	10	-1	5	-1
32	5	+1	MeOH	+1	30	+1	6	+1	20	+1	30	+1
33,34,35	3	0	AcEt	0	15	0	3	0	15	0	15	0

**Tabela 9-A:** ANOVA obtida para o planejamento Fatorial Fracionário  $2^{6-1}$  para obtenção do gráfico de Paretos (Fonte: Autoria Própria, 2022).

Fator	SS	df	MS	F	p
(1) Ciclo de Dessorção	1539902	1	1539902	2,22626	0,179312
(2) Solvente de Dessorção	7406172	1	7406172	10,70723	0,013633
(3) Tempo de Dessorção	393602	1	393602	0,56904	0,475248
(4) Ciclo de Extração	25653089	1	25653089	37,08711	0,000496
(5) Massa de Cortiça	8668905	1	8668905	12,53278	0,009468
(6) Tempo de Extração	2548581	1	2548581	3,68453	0,096399
Falta de Ajuste	1733651	1	1733651	96,795	0,010174
Erro Puro	4841888	7	691698		
Total SS	111888746	28			

**Tabela 10-A:** Planejamento experimental para aplicação do *Simplex Lattice* para escolha do solvente de dessorção (Fonte: Autoria Própria, 2022).

Experimento	Acetonitrila		Metanol		Acetato de Etila	
	N-Cod.	Cod.	N-Cod.	Cod.	N-Cod.	Cod.
1	1.00	300 µL	0.00	-	0.00	-
2	0.00	-	1.00	300 µL	0.00	-
3	0.00	-	0.00	-	1.00	300 µL
4	0.50	150 µL	0.50	150 µL	0.00	-
5	0.50	150 µL	0.00	-	0.50	150 µL
6	0.00	-	0.50	150 µL	0.50	150 µL
7	0.66	200 µL	0.16	50 µL	0.16	50 µL
8	0.16	50 µL	0.66	200 µL	0.16	50 µL
9	0.16	50 µL	0.16	50 µL	0.66	200 µL
10	0.33	100 µL	0.33	100 µL	0.33	100 µL

**Tabela 11-A:** Planejamento experimental para aplicação do Composto Central entre ciclos de extração vs massa de cortiça (Fonte: Autoria Própria, 2022).

Experimento	Ciclos de Extração		Massa de Cortiça (mg)	
	Cod.	N-Cod.	Cod.	N-Cod.
1	-1	6	-1	20
2	-1	6	+1	26
3	+1	8	-1	20
4	+1	8	+1	26
5	-1,41421	5	0	24
6	+1,41421	9	0	24
7	0	7	-1,41421	19
8	0	7	+1,41421	28
9, 10	0	7	0	24

**Tabela 12-A:** ANOVA obtida para o planejamento Composto Central entre ciclos de extração vs massa de cortiça (Fonte: Autoria Própria, 2022).

Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) Ciclos de Extração (L)	7847924	1	7847924	462,952	0,029566
Ciclos de Extração (Q)	18453851	1	18453851	1088,599	0,019289
(2) Massa de Cortiça (mg) (L)	7007916	1	7007916	413,399	0,031286
Massa de Cortiça (mg) (Q)	69263282	1	69263282	4085,864	0,009959
Interação entre 1L e 2L	24879320	1	24879230	1467,634	0,016614
Falta de Ajuste	1121967	2	560983	33,093	0,122001
Erro Puro	16952	1	16952		
Total SS	109862477	8			

**Tabela 13-A:** Planejamento experimental para aplicação do *Simplex Lattice* para escolha do solvente de dessorção (Fonte: Autoria Própria, 2022).

Experimento	Acetonitrila		Metanol		Acetato de Etila	
	N-Cod.	Cod.	N-Cod.	Cod.	N-Cod.	Cod.
1	1.00	300 µL	0.00	-	0.00	-
2	0.00	-	1.00	300 µL	0.00	-
3	0.00	-	0.00	-	1.00	300 µL
4	0.50	150 µL	0.50	150 µL	0.00	-
5	0.50	150 µL	0.00	-	0.50	150 µL
6	0.00	-	0.50	150 µL	0.50	150 µL
7	0.66	200 µL	0.16	50 µL	0.16	50 µL
8	0.16	50 µL	0.66	200 µL	0.16	50 µL
9	0.16	50 µL	0.16	50 µL	0.66	200 µL
10	0.33	100 µL	0.33	100 µL	0.33	100 µL

**Tabela 14-A:** Planejamento experimental para aplicação do Composto Central entre tempo de impregnação vs volume de DNPH (Fonte: Autoria Própria, 2022).

Experimento	Tempo de Impreg. (min)		Volume DNPH (µL)	
	Cod.	N-Cod.	Cod.	N-Cod.
1	-1	1	-1	50
2	-1	1	+1	150
3	+1	5	-1	50
4	+1	5	+1	150
5	-1,41421	0	0	100
6	+1,41421	6	0	100
7	0	3	-1,41421	30
8	0	3	+1,41421	170
9, 10	0	3	0	100

**Tabela 15-A:** ANOVA obtida para o planejamento Composto Central entre tempo de impregnação vs volume de DNPH (Fonte: Autoria Própria, 2022).

Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) Tempo de Impreg. (min) (L)	16437267	1	16437267	61,16608	0,080961
Tempo de Impreg. (min) (Q)	1527064	1	1527064	5,68248	0,252867
(2) Volume DNPH (µL) (L)	2194863	1	2194863	8,16749	0,214283
Volume DNPH (µL) (Q)	641991	1	641991	2,38897	0,365581
Interação entre 1L e 2L	3366498	1	3366498	12,52736	0,175297
Falta de Ajuste	73584	2	36792	0,13961	0,886026
Erro Puro	268732	1	268732		
Total SS	24954853	8			

**Tabela 16-A:** Planejamento experimental para aplicação do Composto Central entre ciclos de extração/derivatização vs tempo de derivatização (Fonte: Autoria Própria, 2022).

Experimento	Ciclos Ext/Derivatização		Tempo Deriv. (s.)	
	Cod.	N-Cod.	Cod.	N-Cod.
<b>1</b>	-1	2	-1	30
<b>2</b>	-1	2	+1	90
<b>3</b>	+1	6	-1	30
<b>4</b>	+1	6	+1	90
<b>5</b>	-1,41421	1	0	60
<b>6</b>	+1,41421	7	0	60
<b>7</b>	0	4	-1,41421	17
<b>8</b>	0	4	+1,41421	102
<b>9, 10</b>	0	4	0	60

**Tabela 17-A:** ANOVA obtida para o planejamento Composto Central entre ciclos de extração/derivatização vs tempo de derivatização (Fonte: Autoria Própria, 2022).

Fatores	SS	df	MS	F	p
<b>(1) Ciclos Ext./Derivatiz. (L)</b>	369464219	1	369464219	18,56376	0,023018
<b>Ciclos Ext./Derivatiz. (Q)</b>	87737184	1	87737184	4,40836	0,126612
<b>(2) Tempo Derivatiz. (s.) (L)</b>	35289451	1	35289451	1,77312	0,275132
<b>Tempo Derivatização (s.) (Q)</b>	7881208	1	7881208	0,39599	0,573824
<b>Interação entre 1L e 2L</b>	50119992	1	50119992	2,51828	0,210727
<b>Falta de Ajuste</b>	210306645	3	70102215	80,5258	0,081693
<b>Erro Puro</b>	870556	1	870556		
<b>Total SS</b>	582990059	8			

## APÊNDICES

### Atividades Realizadas no Período do Doutorado (2018 – 2022)

#### ➤ Produção Científica

- I) Turazzi, F. C., **Morés, L.**, Carasek, E., Merib, L., Barra, G. M. O. A rapid and environmentally friendly analytical method based on conductive polymer as extraction phase for disposable pipette extraction for the determination of hormones and polycyclic aromatic hydrocarbons in river water samples using high-performance liquid chromatography/diode array detection. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, 2019, p. 103156.
- II) **Morés, L.**, da Silva, A. C., Merib, J., Dias, A. N., Carasek, E. A natural and renewable biosorbent phase as a low-cost approach in disposable pipette extraction technique for the determination of emerging contaminants in lake water samples. **Journal of Separation Science**, v. 42, 2019, p. 1404-1411.
- III) Morelli, D. C., Bernardi, G., **Morés, L.**, Pierri, M. E., Carasek, E. A green - high throughput -extraction method based on hydrophobic natural deep eutectic solvent for the determination of emerging contaminants in water by high performance liquid chromatography - diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1626, 2020, p. 461377.
- IV) Cancellier, M., **Morés, L.**, Corazza, G., Carasek, E. Application of bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E) for the determination of pesticides and emerging contaminants in water used for rice cultivation in southern Brazil. **SN Applied Science**, v. 2, 2020, p. 942.
- V) Coelho, M. P., **Morés, L.**, Elias, W. C., Bascunan, V. L. A. F., Madureira, L. A. S. Development of hollow fiber-membrane microporous liquid-liquid extraction (HF-MMLLE) procedure based on palladium nanoparticles for determination of PAH in leached extracts. **Microchemical Journal**, v. 169, 2021, p. 106562.
- VI) Hinz, J. S., **Morés, L.**, Carasek, E. Exploring the use of cork pellets in bar adsorptive microextraction for the determination of organochloride pesticides in water samples with gas chromatography/electron capture

detection quantification. **Journal of Chromatography A**, v. 1645, 2021, p.462099.

- VII)** Morés, L.; Borges, G. R., Kitamura, R. O. S., Eller, S., de Oliveira, T. F., Carasek, E., Merib, J. Assessment of a natural extraction phase in disposable pipette extraction coupled with the sub-minute determination of 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine by fast-GC-FID. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 20, 2021, p. 100390. (Publicação referente ao Capítulo IV desta tese).
- VIII)** Pierri, M. E., Morés, L., Bernardi, G., Carasek, E. Multiclass determination of endocrine disruptors in urine by hollow fiber microporous membrane and liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 652, 2022, p. 114725.
- IX)** Lopes, D., Morés, L., Bernardi, G., Campedelli, R., Pinheiro, G., de Souza, B.; Carasek, E. A new approach for histamine functionalized nanoparticles as sorbent phase for bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E) and determination of parabens in water by HPLC-DAD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 00, 2022, p. 1-8.
- X)** Carasek, E., Morés, L., Huelsmann, R. D. Disposable pipette extraction: a critical review of concepts, applications, and directions. **Analytica Chimica Acta**, v. 1192, 2022, p. 339383.
- XI)** Cruz, J. C., Rosa, M. A., Morés, L., Carasek, E., Crippa, J. A. S., Figueiredo, E. C., Queiroz, M. E. C. Magnetic restricted-access carbon nanotubes for SPME to determine cannabinoids in plasma samples by UHPLC-MS/MS. **Analytica Chimica Acta**, 2022, p. 340360.
- XII)** Lopes, D., Morés, L., da Silva, M., Schneider, M., Merib, J., Carasek, E. 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**, 2022, 1207, p. 123406.

➤ **Capítulo de Livro**

- I)** Carasek, E., Merib, J. O., Morés, L. Microextraction Techniques in Analytical Toxicology. 1ªed. Flórida: CRC PRESS, 2022. 268p.



➤ **Coorientação no Período do Doutorado**

- I) Maria Eduarda Pierri.** Otimização de um método rápido e de baixo custo combinando HF-MMLLE e sistema de 96-WEELL PLATE para determinação de desreguladores endócrinos em urina humana. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC-II). Graduação em Bacharelado em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina. Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha.
- II) Francielle Crocetta Turazzi.** Aplicação de fase extratora à base de polipirrol para a determinação de hormônios e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de água pela técnica de extração em ponteira descartável. 2019. Trabalho de Conclusão para obtenção do Título de Mestre (Mestrado). Mestrado em Engenharia de Materiais. Orientador: Guilherme M. O. Barra.

➤ **Participação em Congressos.**

- I) XVII COLACRO** – Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas. 2019.
- II) XIV LASEAC** – Simpósio Latino-Americano de Química Analítica Ambiental. 2019.