



Otimização de metodologia para determinação de 1-hidroxipireno

Letícia S. B. Pereira^{1,2}, Ana P. S. Macedo¹, Larissa de M. Cavalcante^{1,2}, Beatriz C. S. da Cruz^{1,3}, Vanessa E. Dabkiewicz¹, Liliane R. Teixeira¹, Thelma Pavesi¹

1–Centro de Estudo da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH), Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

2- Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

3- Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil

Palavras-Chave: metabólito, HPAs, cromatografia

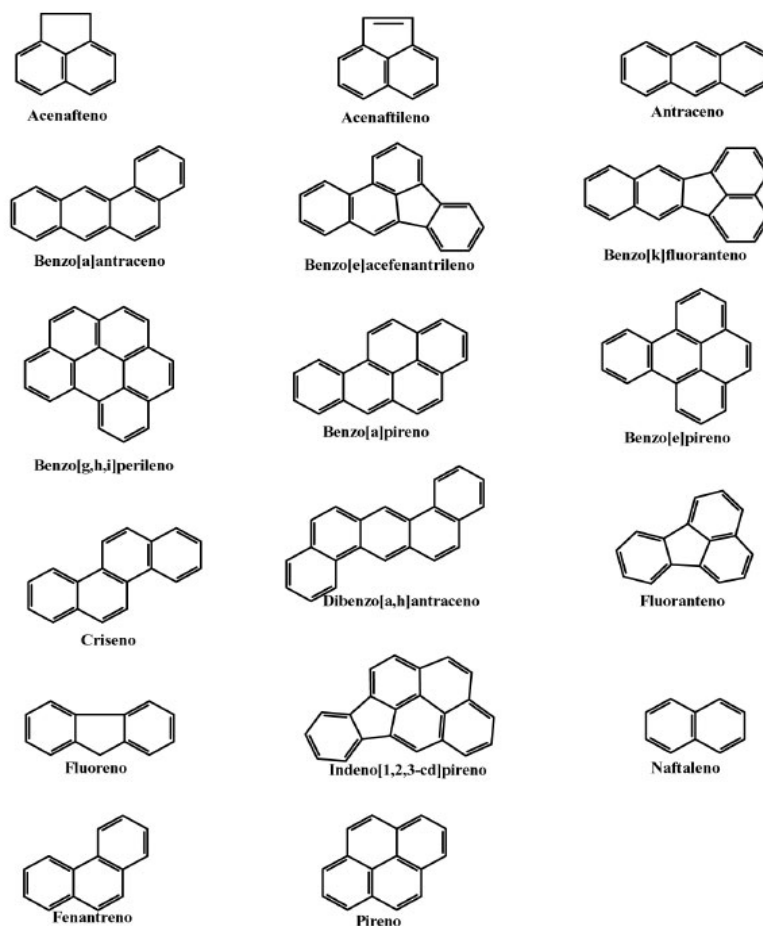
Introdução

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são uma classe de compostos orgânicos que possuem dois ou mais anéis aromáticos condensados, constituídos apenas por carbono e hidrogênio (QUEIROZ MOZANER; PALMA DE ALMEIDA; ALVES DA SILVA, 2019).

A Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) e a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC, 2013), considerando suas características cancerígenas e sua capacidade de alterar o material genético, determinam 16 compostos como prioritários. O Instituto Nacional de Saúde e Segurança Ocupacional (NIOSH), inclui o benzo[e]pireno, como demonstrado na figura 1.

Os HPAs possuem grande influência no meio ambiente, sendo um dos potenciais poluentes do ar, do solo e da água. São provenientes da combustão incompleta e compõem grande parte dos poluentes emitidos na atmosfera, por exemplo, pelas queimadas florestais (MAUAD, [s.d.]). Estima-se que no Brasil e no mundo, a maior parte dessa poluição ambiental é causada por incêndios florestais e queima de biomassa, que aumentam significativamente devido ao aquecimento global (ZHANG et al., 2022).

Figura 1: Estruturas dos HPAs considerados prioritários pelo NIOSH



Fonte: J. Cristale*; FS Silva; MRR Marchi, 2008.

Como os HPAs permanecem grande tempo acumulados no solo e na poeira, sem serem destruídos, são considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs), havendo possibilidade de retornar a suspensão, apresentando risco potencial à saúde humana (MAGALHÃES; BRUNS; VASCONCELLOS, 2007; FUJITA, 2009; SANTOS et al., 2017; ORAZI et al., 2020).

A exposição e contaminação humana pelos HPAs pode ocorrer por diversos meios, como alimentação, tabagismo, poluição ambiental e exposição ocupacional. A absorção no corpo ocorre através, principalmente, da inalação, ingestão e da absorção cutânea (DE QUEIROZ MOZANER; PALMA DE ALMEIDA; ALVES DA SILVA, 2019). Os sintomas são variados e podem ser apresentados como irritação ocular e cutânea, náuseas, vômitos e inflamações (IARC, 2010).



Por serem cancerígenos, organizações competentes, com a IARC e a United States Environmental Protection Agency (EPA), classificam os HPAs de acordo com a tabela 1, que descreve a classificação para cada composto.

Tabela 1: Classificação dos HPAs em relação à sua carcinogenicidade

Composto	Carcinogenicidade	
	IARC	USA-EPA
Naftaleno	2B	C
Acenaftileno	-	D
Acenafteno	3	-
Fenantreno	3	D
Antraceno	2B	D
Fluoranteno	3	D
Pireno	3	D
Benzo(a)antraceno	2B	B2
Criseno	2B	B2
Benzo(e)acefenantrileno	2B	B2
Benzo(k)fluoranteno	2B	B2
Fluoreno	3	D
Benzo(a)pireno	1	A
Indeno(1,2,3-cd)pireno	2B	B2
Dibenzo(a,h)antraceno	2A	B2
Benzo(ghi)perileno	3	D

Fonte: Adaptado de Meniconi (2007)

Legenda: IARC - 1: Carcinogênico ao homem; 2A: Provavelmente carcinogênico ao homem; 2B: Possivelmente carcinogênico ao homem; 3: Não classificado.

USA - EPA - A: Carcinogênico ao homem; B1 e B2: Provavelmente carcinogênico ao homem; C: Possivelmente carcinogênico ao homem; D: Não classificado.

O metabolismo dos HPAs em humanos envolve etapas que contribuem para sua carcinogenicidade. Após a absorção, é metabolizado por enzimas da família do citocromo P450, formando metabólitos reativos, como o epóxidos e fenóis, espécies eletrofílicas que podem se ligar ao DNA, causando mutações e propiciando o câncer (LIN et al., 2024)

O pireno é encontrado em um considerável percentual no ambiente. O 1-hidroxipireno é um metabólito do pireno e é indicado como seu biomarcador de exposição, devido a proporção formada, tempo de meia vida e à sua sensibilidade em métodos analíticos (COSTA, 2001). Por serem potenciais poluentes ambientais, tóxicos a saúde humana, associação as mudanças climáticas no mundo e, pelo crescente efeito das queimadas no Brasil, este estudo tem como objetivo investigar uma metodologia simples, para determinação quantitativa de um metabólito de HPA, o 1-hidroxipireno em solvente, como uma primeira etapa para posterior determinação deste em urina de pessoas expostas ao pireno.



Material e Métodos

Primeiramente, foi preparado um padrão de 100mg/L de 1-hidroxipireno em metanol e homogeneizado.

Posteriormente o padrão foi diluído em acetonitrila para alcançar as concentrações da curva analítica: 0,05 µg/L, 0,1 µg/L, 0,25 µg/L, 0,5 µg/L, 1,0 µg/L e 5 µg/L, além do branco.

A coluna utilizada foi C18, diâmetro 100x3 mm, tamanho da partícula 3 µm, Synchronis da marca Thermo Scientific.

Para a fase móvel foi utilizado o gradiente isocrático de 80% de acetonitrila (B) e 20% de água (A), fluxo 0,8 mL/ min, pressão de 113 kgf/cm². A temperatura da coluna foi de 35°C. Tempo de corrida de 2 minutos. O volume da injeção foi de 10µL. A detecção por fluorescência utilizou excitação em 242 nm e emissão em 388 nm.

Para análise dos dados, foi utilizada uma planilha de linearidade desenvolvida por Fabio Bazilio, da FIOCRUZ – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, que segue os parâmetros solicitados do INMETRO para validação de metodologia (BAZILIO et al., 2012)

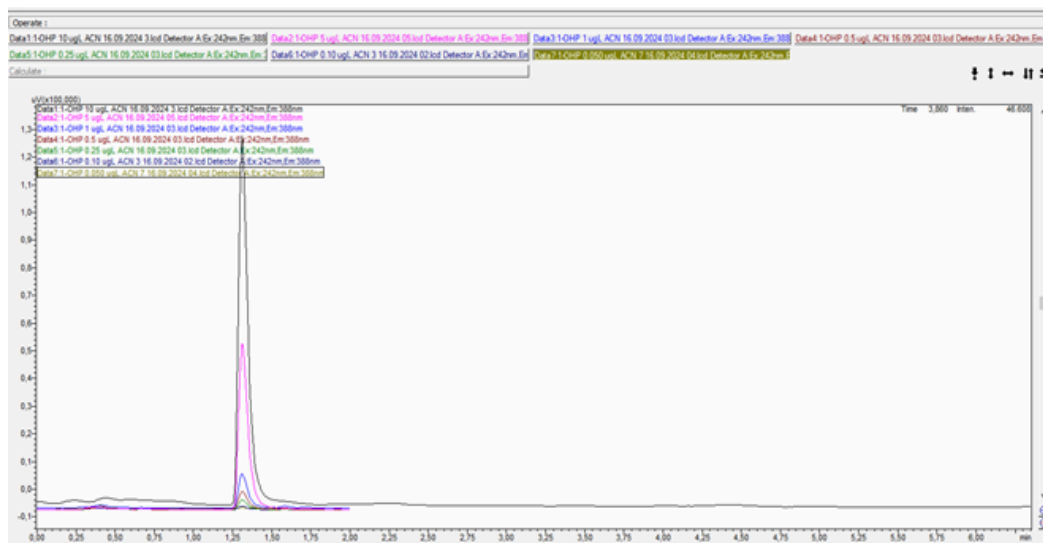
Resultados e Discussão

A metodologia utilizada neste estudo foi otimizada a partir de modificações ao método relatado por Sakiara e colaboradores (SAKIARA *et al.*, 2010). Foi alterado o solvente da fase móvel, foram testadas proporções acetonitrila/ água e variações de fluxo. A condição descrita no item metodologia representa o resultado da otimização. Essas condições permitiram que a curva analítica fosse de acordo como está na figura 3.

O tempo de retenção para o padrão 1-hidroxipireno em acetonitrila, nas condições descritas na metodologia foi de 1,3 minutos. A partir desse resultado, foi possível compreender que o composto possui maior interação com a fase móvel, 80% orgânica, neste caso. Sendo acetonitrila moderadamente polar, o 1-hidroxipireno polar e a coluna apolar, fase reversa, a interação com a coluna é menor, culminando na rápida saída do analito da fase estacionária.

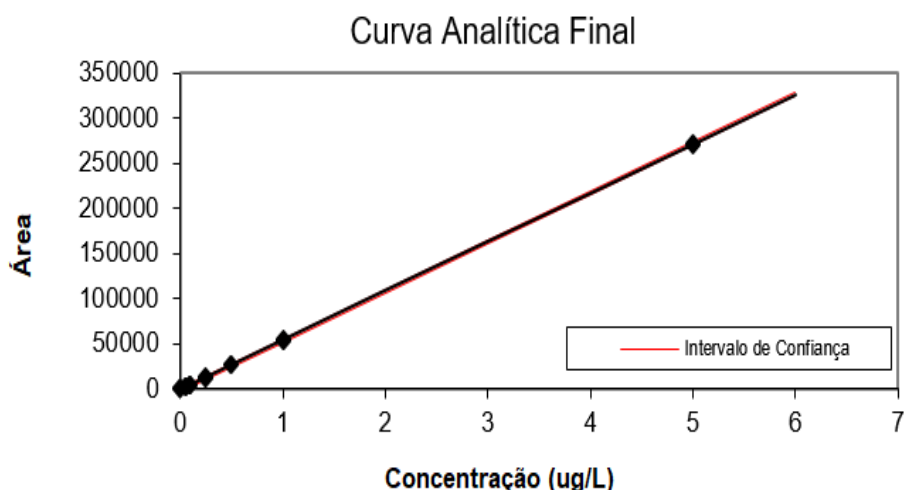
A figura 2 apresenta o cromatograma obtido sob as condições mencionadas na metodologia.

Figura 2: Cromatograma do 1-hidroxiipireno sob as condições mencionadas na metodologia.



Utilizando uma planilha de validação, de acordo com os parâmetros do INMETRO, foram inseridos os resultados de área sob o pico para cada concentração utilizada, como demonstrado na tabela 1. Foi avaliado a linearidade e os pré-requisitos como homoscedasticidade, normalidade dos resíduos, as estatísticas de regressão linear.

Figura 3: Concentração de 1-hidroxiipireno e área obtida



O parâmetro de linearidade da curva foi 0,9999. O limite de detecção alcançado foi 0,030 $\mu\text{g/L}$ e o limite de quantificação foi 0,099 $\mu\text{g/L}$.

O tratamento estatístico dos resultados demonstra que o teste de normalidade cumpre as exigências, ou seja, os resultados seguem a normal, o teste de regressão é significativo, não há desvio de linearidade, não há autocorrelação de resíduos e há homoscedasticidade.



A partir da literatura, todos esses resultados sugerem que as condições são favoráveis para utilizar a matriz urina.

Conclusões

A pesquisa na literatura específica aponta o 1-hidroxipireno como bioindicador de exposição ao pireno.

Os resultados obtidos pelos ensaios realizados sugerem a eficácia das condições cromatográficas testadas, principalmente pela sensibilidade do método otimizado e sua confiabilidade. Os resultados demonstram consistência e estão de acordo com a literatura estudada para o desenvolvimento. Além disso, o método mostrou ser promissor para posterior otimização com amostras em urina como matriz.

Agradecimentos

Ana Macedo agradece a CAPES Brasil (Código de Financiamento 001); Letícia Pereira e Larissa Cavalcante ao CNPq, projeto ENSP-024-Fio-21-2-2e. Agradecemos a Débora Gerônimo e Laryssa dos Anjos.

Referências

BAZILIO, F. S.; BOMFIM, M. V. J.; ALMEIDA, R. J. de; ABRANTES, S. de M. P. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. 2012. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/9141>. Acesso em: 23 set. 2024.

DE FÁTIMA, M. et al. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Centro de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-graduação em Química. tese de Doutorado. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio ambiente: diferenciação de fontes em sedimentos e metabólitos em bile de peixes. Natal-RN Março de 2007. [s.l: s.n.].

DE QUEIROZ MOZANER, L.; PALMA DE ALMEIDA, A.; ALVES DA SILVA, S. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos: uma revisão sobre metodologias de análise e níveis de contaminação em produtos cárneos defumados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 78, p. 1–21, 29 mar. 2019.

FUJITA, C. K. “hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpas) em solo: validação de método e avaliação da influência da queima de cana-deaúcar na região de araraquara”. Araraquara - SP, 6 out. 2009.



63º Congresso Brasileiro de Química

05 a 08 de novembro de 2024

Salvador - BA

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (ED.). **Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures**. Lyon: IARC, 2010.

LIN, Y.; CRAIG, E.; LIU, X. et al. Urinary 1-hydroxypyrene in pregnant women in a Northeastern U.S. city: socioeconomic disparity and contributions from air pollution sources **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology**, v. 34, p. 407–415, 2024.

MAUAD, C. R. Variações Geocronológicas de Carbono Negro e HPAs na Baía de Guanabara como Indicadores de Fontes de Combustão. [s.d.].

SAKIARA, K. A. et al. Otimização e validação de uma metodologia analítica para determinação de 1-hidroxipireno em urina de cortadores de cana-de-açúcar. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p. 113–119, 27 dez. 2010.

WU, M. et al. Effects of African BaP emission from wildfire biomass burning on regional and global environment and human health. **Environment International**, v. 162, p. 107162, abr. 2022.

ZHANG, H. et al. Characteristics and Influencing Factors of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Emitted from Open Burning and Stove Burning of Biomass: A Brief Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 7, p. 3944, 25 mar. 2022.