

## **AValiação de Extração em Diferentes Cartuchos de SPE C18 para 9 Metabólitos dos BTEX**

Ana P. S. Macedo<sup>1</sup>, Larissa de M. Cavalcante<sup>1,2</sup>, Letícia S. B. Pereira<sup>1,2</sup>, Beatriz C. S. da Cruz<sup>1,3</sup>,  
Vanessa E. Dabkiewicz<sup>1</sup>, Liliane R. Teixeira<sup>1</sup>, Thelma Pavese<sup>1</sup>

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:** Vigilância em Saúde do Trabalhador, Exposição Ocupacional, Validação Analítica.

### **Introdução**

Os compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) são solventes orgânicos voláteis oriundos do petróleo e derivados (Kirkeleit *et al.*, 2006). São considerados poluentes ambientais de risco considerável e oferecem risco também no meio laboral, especialmente nos setores industriais como siderúrgicas, petrolíferas, de tintas, combustíveis, entre outros (Mihajlović *et al.*, 2021). Todos os BTEX possuem características neurotóxicas, são depressores do sistema nervoso central e podem induzir reações inflamatórias em todo corpo. O benzeno, além das características já descritas, é um agente conhecido carcinogênico, com toxicidade hematológica comprovada, capaz de provocar síndrome mielodisplásica, leucemia mieloide aguda, anemia aplástica, entre outros (Reynoso-Noverón *et al.*, 2024; Shallis *et al.*, 2021; Sherwood, 1988). Para fins de proteção da saúde da pessoa com risco de exposição, é preconizada a avaliação da exposição a esses agentes por meio da investigação dos metabólitos dessas substâncias em matrizes biológicas. Ao utilizar esse tipo de matriz, etapas de limpeza da amostra são necessárias, a fim de reduzir o efeito matriz. Dentre as técnicas de extração, a extração em fase sólida, ou solid-phase extraction (SPE), é uma das mais utilizadas, pois permite fazer a limpeza, pré-concentração da amostra e troca de solventes. O método avaliado neste estudo para a recuperação dos analitos consistiu na extração e clean-up por SPE do tipo C18 e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD). Este trabalho teve como objetivo otimizar a recuperação de metodologia analítica para a determinação simultânea de 9 metabólitos dos BTEX.

### **Material e Métodos**

A fim de otimizar a recuperação do método, foi feita a comparação entre três marcas de SPE C18 com base no documento orientativo do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), chamado “Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos” do ano de 2020 (INMETRO, 2020). O método de análise foi uma adaptação do método 8326 da NIOSH (NMAM, 2014), desenvolvido para a detecção de SPMA e SBMA, para a determinação dos 9 metabólitos do BTEX, conforme tabela 1 abaixo:

**Tabela 1:** Metabólitos dos BTEX.

Substância	Sigla	Biomarcador de exposição
Benzeno	ATTM	Ácido trans-trans mucônico
	SPMA	Ácido S-fenilmecaptúrico
Etilbenzeno	AFG	Ácido fenilglioxfílico
	AM	Ácido mandélico
Tolueno	AH	Ácido hipúrico
	SBMA	Ácido Benzilmercaptúrico
Xileno	2,3 e 4 MET	Ácidos orto, meta e para-metilhipúricos

Fonte: Autora, 2024.

Três cartuchos comerciais diferentes foram testados para verificação do percentual de recuperação (Chromabond, Applied Separations e Supelco). A escolha foi feita com base nos cartuchos utilizados pelo laboratório, com as seguintes características presentes na tabela 2:

**Tabela 2:** Características das Marcas de SPE utilizadas.

Marca comercial do SPE	Chromabond	Applied Separations	Supelco
Quantidade de sorvente	500 mg	500 mg	500 mg
Carga de carbono	14%	18%	17%
Volume do cartucho	6 mL	3 mL	6 mL
Endcaped	Sim	Sim	sim
Particle size	45 µm	40µm	45 µm
Particle shape	Irregular	irregular	irregular

Fonte: Autora, 2024

Os metabólitos foram divididos em 2 grupos, a depender dos limites de detecção e quantificação do método. Os pontos da curva foram montados a partir de dois grupos de metabólitos. O grupo 1 foi composto por Attm, AFG, Spma, 3 e 4 MET, sendo os pontos da curva: ponto 1, 0,5 mg/L; ponto 2, 1,0 mg/L e ponto 3, 2,0 mg/L. O grupo 2 foi composto por AH, AM, 2 MET e SBMA, sendo as concentrações: ponto 1, 1,0 mg/L; ponto 2, 5,0 mg/L e ponto 3, 10,0 mg/L.

Para o preparo dos padrões, foi realizada uma pré-acidificação da amostra com 2 mL de ácido fórmico, da mesma forma que é realizado para a urina, devido à conversão do pré-SPMA em SPMA. A etapa de extração em SPE foi feita utilizando um *Manifold* a vácuo. A seguir, foi realizado o condicionamento dos cartuchos de SPE com a adição sequencial de 3 mL de acetona grau HPLC, 3 mL de ácido fórmico 0,1% e 3 mL de água Milli Q. A seguir foram adicionados os padrões de cada ponto da curva. A etapa de lavagem utilizou 0,5 mL de água Milli Q, em seguida, foi feita a eluição dos analitos com 10 mL de acetona grau HPLC.

As amostras foram secas em nitrogênio puro, e reconstituídas em solução diluente composta de 90% de ácido fórmico 0,1% e 10% de acetonitrila, com auxílio de vórtex, e em seguida

avolumadas em balões volumétricos. Foram então filtradas com filtro PTFE de 0.22  $\mu\text{m}$  e colocadas em vials para a injeção.

A análise foi realizada em com CLAE e detector de DAD, nas seguintes condições: coluna NST C18, (4,6 mm x 5  $\mu\text{m}$  x 150 mm), fase móvel composta (A: 90% ácido fórmico 0,1% e B: 10% acetonitrila grau HPLC), temperatura da coluna 30°C, fluxo de 1,2 mL/min, em gradiente. Os comprimentos de onda foram os seguintes para cada analito: 262 nm para ATTM, 252 nm para AFG, 240 nm para AH e 210 nm para AM, 2,3 e 4 MET, SBMA e SPMA.

## Resultados e Discussão

Os resultados foram satisfatórios dentro dos parâmetros estabelecidos pelo INMETRO para a maioria dos metabólitos, conforme tabela 3. O preconizado para recuperação de concentrações de 1ppm (mg/Kg) é de 80% a 110% (INMETRO, 2020). Entretanto, alguns apresentaram baixa recuperação, como o AFG; e outros com grande variação de recuperação entre as marcas, em especial o ATTM. Não foi encontrada uma comparação semelhante na literatura para comparação de dados. Entretanto, é possível que a variação na carga de carbono tenha ocasionado essa variação ao aumentar a força de retenção dos analitos a medida que a carga aumenta. Supõe-se que quanto maior a carga, um maior volume de solvente de eluição deve ser utilizado para a extração. A menor carga de carbono da marca Chromabond (14%), sugere que houve uma necessidade de menor volume de eluente para a extração dos analitos, quando comparada com as marcas Supelco (17%) e Applied Separations (18%). A avaliação de aumento de volume de eluente ou troca de solventes para as outras marcas com carga maior de carbono deve ser avaliada. Outros aspectos podem estar envolvidos, como as características de cada analito, processo de fabricação, entre outros.

**Tabela 3:** Resultados da recuperação.

Metabólito	Marca do SPE								
	Supelco			Applied			Chromabond		
	1° Ponto	2° Ponto	3° Ponto	1° Ponto	2° Ponto	3° Ponto	1° Ponto	2° Ponto	3° Ponto
ATTM	80%	76%	60%	69%	74%	43%	94%	95%	82%
PEG	60%	30%	24%	31%	58%	51%	77%	70%	45%
AM	79%	82%	77%	23%	60%	55%	91%	94%	92%
AH	87%	93%	91%	79%	97%	85%	91%	97%	98%
2 MET	92%	92%	94%	84%	96%	95%	90%	97%	99%
SPMA	93%	100%	99%	84%	98%	97%	96%	98%	98%
3,4 MET	76%	102%	109%	76%	93%	99%	82%	96%	102%
SBMA	90%	88%	98%	81%	90%	95%	91%	95%	98%

**Legenda:** SUP: Supelco; APL: Applied; CHR: Chromabond. **Fonte:** Autora, 2024.

## Conclusões

Nas condições avaliadas, os cartuchos apresentaram recuperações distintas, ressaltando que quando houver a substituição de marca de SPE, mesmo que sejam do mesmo tipo de sorvente, é recomendado que se realize uma nova avaliação dos parâmetros de recuperação, como diferentes solventes e volumes de extração para novas avaliações.

## 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.

## Referências

PASSOS, L. M. L.; SOUZA-SARTORI, J. A.; BERGAMIN-LIMA, R.; ZOCCA, T. N.; BAPTISTA, A. S.; AGUIAR, C. L. Extração de proteína total e atividade antioxidante de torta de filtro de cana de açúcar. *Revista de Química Industrial*, 741, 22-28, 2013.

BÖCK, F. C.; HELFER, G. A.; COSTA, A. B.; DESSUY, M. B.; FERRÃO, M. F. Rapid Determination of Ethanol in Sugarcane Spirit Using Partial Least Squares Regression Embedded in Smartphone. *Food Analytical Methods*, 11(4), 1951-1957, 2018.

INMETRO. **ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**. [S. l.: s. n.], jun. 2020.

KIRKELEIT, J. *et al.* Benzene exposure on a crude oil production vessel. **The Annals of Occupational Hygiene**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 123–129, mar. 2006.

MIHAJLOVIĆ, V. *et al.* Assessment of Occupational Exposure to BTEX in a Petrochemical Plant via Urinary Biomarkers. **Sustainability**, [S. l.], v. 13, n. 13, p. 7178, jan. 2021.

NMAM. **Method: 8326, Issue 1: S-Benzylmercapturic acid and S-phenylmercapturic acid in urine**. [S. l.]: NIOSH Manual of Analytical Methods, maio 2014. . Acesso em: 23 set. 2024.

REYNOSO-NOVERÓN, N. *et al.* Benzene exposure and pediatric leukemia: From molecular clues to epidemiological insights. **Toxicology Letters**, [S. l.], 22 ago. 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427424010993>. Acesso em: 22 ago. 2024.

SHALLIS, R. M. *et al.* A clandestine culprit with critical consequences: Benzene and acute myeloid leukemia. **Blood Reviews**, [S. l.], v. 47, p. 100736, 1 maio 2021.

SHERWOOD, R. J. Pharmacokinetics of benzene in a human after exposure at about the permissible limit. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 534, p. 635–647, 1988.