

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA**

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Carolina Silveira Dalanhol

**Desenvolvimento de metodologia
analítica baseada em microextração
em fase homogênea com solventes
de hidrofobicidade comutável para
determinação de cortisol e
testosterona em amostras de fluido
oral**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2023

Carolina Silveira Dalanhol

Desenvolvimento de metodologia analítica baseada em microextração em fase homogênea com solventes de hidrofiliabilidade comutável para determinação de cortisol e testosterona em amostras de fluido oral

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Dr. Josias de Oliveira Merib

Porto Alegre

2023

Catálogo na Publicação

Dalanhol, Carolina

Desenvolvimento de metodologia analítica baseada em microextração em fase homogênea com solventes de hidrofiliabilidade comutável para determinação de cortisol e testosterona em amostras de fluido oral / Carolina Dalanhol. -- 2023.

59 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2023.

Orientador(a): Josias Merib.

1. preparo de amostra. 2. solvente de hidrofiliabilidade comutável. 3. fluido oral. 4. cortisol. 5. testosterona.
I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFCSPA e o PPG Biociências por possibilitarem a realização deste trabalho, com toda a estrutura necessária para o mesmo. Obrigada por sempre lutarem pela garantia de um ensino público de qualidade.

Agradeço ao professor Josias, que foi muito mais do que um orientador nessa trajetória. Agradeço por ter me apoiado em todas as minhas decisões. Sem esse apoio não seria possível abraçar tantas oportunidades, que me permitiram crescer tanto pessoalmente quanto profissionalmente. Obrigada por acreditar em uma educação afetiva e respeitosa, isso fez toda a diferença.

Agradeço à Camila Scheid que vem sendo minha companhia de laboratório de longa data. Te acompanho desde a graduação, como técnica, como colega e como amiga. Saiba que aprendi muito contigo, obrigada por tanto.

Agradeço a todos os colegas do Grupo de Estudos em Preparo de Amostras e Cromatografia pelas trocas de conhecimento que tivemos durante as reuniões.

Agradeço aos meus pais, Fernando e Denise, por me apoiarem nos momentos mais difíceis, e em todos outros momentos também. Agradeço a todas as caronas, lanchinhos e mensagens perguntando se estava tudo bem. Sem vocês esse caminho teria sido muito mais difícil. Obrigada por acreditarem em mim.

Agradeço também a Gabriela Peixoto, minha quase irmã, que sempre acreditou no meu potencial, mais do que eu mesma. Obrigada por ser meu suporte.

Agradeço ao Arthur, meu companheiro, pelo suporte e encorajamento Obrigada por estar junto comigo em mais essa etapa, com muita paciência e compreensão.

Agradeço a todos os meus amigos e familiares pelo apoio. Sei que vocês ouviram muitos não nos últimos dois anos, mas obrigada por sempre serem compreensíveis com as minhas ausências e estarem sempre do meu lado.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

A presente pesquisa foi conduzida na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), mais especificamente nos laboratórios da Central Analítica, localizada no Prédio 1. Para sua realização, foram utilizados recursos financeiros provenientes do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da UFCSPA.

RESUMO

Novas técnicas estão sendo desenvolvidas para a determinação de substâncias endógenas em amostras de fluido oral. Este tipo de amostra permite uma coleta conveniente e não invasiva, sendo que a mesma pode ser realizada fora do ambiente laboratorial. O cortisol e a testosterona são biomarcadores importantes para o diagnóstico de doenças complexas, como a síndrome dos ovários policísticos (SOP) e a Síndrome de Cushing (SC), em que a sintomatologia é semelhante à de outros distúrbios prevalentes. Este trabalho propõe, pela primeira vez, um método baseado em solvente de hidrofiliabilidade comutável (SHS) como fase extratora para determinação de cortisol e testosterona em amostras fluido oral por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD). A otimização dos principais parâmetros que podem influenciar a eficiência da extração foi realizada por meio de estratégias multivariadas. As condições ótimas de extração consistiram na utilização de 1000 µL de fluido oral, 100 µL de solução de ácido decanoico (65 mg mL^{-1}), 170 µL de Na_2CO_3 (2 mol L^{-1}) e, 900 µL de H_2SO_4 (3 mol L^{-1}) e 150 µL de acetonitrila para ressuspensão. O método proposto foi validado, com R^2 superior a 0,99 para ambos os analitos, acompanhado de limite de detecção (LOD) de $4,55 \text{ ng mL}^{-1}$ e limite de quantificação (LOQ) de 15 ng mL^{-1} . A precisão intradia variou de 5,65% a 11,88% e a precisão interdia variou de 6,13% a 13,51%; a exatidão variou de 98,89% a 104,62% para cortisol e de 89,07% a 103,95% para a testosterona. Esta metodologia foi aplicada com sucesso na análise de amostras de saliva de voluntários normais. Além disso, as características sustentáveis da metodologia foram avaliadas de acordo com as métricas do sistema AGREEprep (0,53).

Palavras-chave: Cortisol; testosterona; solvente de hidrofiliabilidade comutável; fluido oral;

ABSTRACT

Alternative and more sustainable analytical methodologies are gaining attention for the determination of endogenous compounds in oral fluid. This matrix can be collected using a convenient and non-invasive workflow that can be easily followed. Cortisol and testosterone are important biomarkers for diagnosis of complex disorders, including polycystic ovary syndrome (PCOS) and Cushing's syndrome (CS), where symptomatology usually overlaps with other prevalent disorders. This work proposes, for the first time, an analytical method based on switchable hydrophilicity solvent as extraction phase for the determination of cortisol and testosterone in oral fluid by high-performance liquid chromatography with diode-array detector (HPLC-DAD). The optimization of the main parameters that can influence on the extraction efficiency was performed through multivariate approaches. The optimized extraction conditions consisted of using 1000 μL of oral fluid, 100 μL of decanoic acid solution (65 mg mL^{-1}), 170 μL of Na_2CO_3 (2 mol L^{-1}), 900 μL of H_2SO_4 (3 mol L^{-1}) and 150 μL of acetonitrile for resuspension. The method was validated, and determination coefficients higher than 0.9926, limit of detection (LOD) of 4.55 ng mL^{-1} and limit of quantification (LOQ) of 15 ng mL^{-1} were obtained for both analytes. Moreover, intraday precision varied from 5.6% to 11.9%, interday precision ranged from 6.1% to 13.5%, and accuracy ranged from 98.9% to 104.6% for cortisol and 89.1% to 103.9% for testosterone. This methodology was successfully applied for the analysis of five oral fluid samples from volunteers. Moreover, AGREEprep metrics (0,53) was utilized to assess the greenness of this analytical approach.

Keywords: Cortisol, testosterone, switchable hydrophilicity solvents, oral fluid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do funcionamento do sistema de ativação/desativação de homogeneidade do SHS

Figura 2 - Esquema genérico da microextração homogênea líquido-líquido com separação de fases

Figura 3 - Os dez princípios do preparo de amostra verde

Figura 4 - Esquema genérico do procedimento de preparo de amostra utilizado no Planejamento Fatorial Fracionário e no Planejamento do Composto Central

Figura 5 - Resultado dos cromatogramas obtidos a partir da análise dos padrões dos analitos obtidos com o método analítico desenvolvido no comprimento de onda de 245 nm

Figura 6 - Gráfico de Pareto para otimização das condições de extração

Figura 7 - Superfície de resposta gerada para a otimização da extração dos analitos a partir do resultado das análises do Planejamento Composto Central

Figura 8 - Esquema do procedimento de preparo de amostra otimizado no estudo

Figura 9 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD de uma amostra de saliva artificial fortificada com 750 ng mL^{-1} dos analitos

Figura 10 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD de uma amostra real de saliva

Figura 11 - Cromatograma da extração de uma amostra branca por HPLC-DAD

Figura 12 - Pictograma obtido a partir da análise do software AGREEprep para o método proposto

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas do Cortisol e da Testosterona

Tabela 2 - Características físico-químicas do Ácido Decanóico

Tabela 3 - Composição da saliva artificial utilizada neste estudo

Tabela 4 - Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1} com os níveis estabelecidos e variáveis estudadas para a da eficiência de extração dos analitos de amostras fluido oral com a utilização de SHS

Tabela 5 - Planejamento do Composto Central com os níveis estabelecidos e variáveis estudadas para a da eficiência de extração dos analitos de amostras fluido oral com a utilização de SHS

Tabela 6 - Valores analíticos de mérito obtidos através da metodologia proposta

Tabela 7 - Resultados obtidos através das análises para a avaliação da exatidão e precisão intra e interdia do método desenvolvido

Tabela 8 - Comparação entre metodologias propostas na literatura para análises de cortisol e/ou testosterona em amostras de saliva

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLO E UNIDADES

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico, do inglês: <i>adrenocorticotropic Hormone</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CRH	Hormônio hipotalâmico liberador de corticotropina, do inglês: <i>corticotropin-releasing hormone</i>
DAD	Detector de Arranjo de Diodos, do inglês <i>Diode Array Detector</i>
DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês: <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
DMCHA	N,N-dimetilciclohexilamina
DPA	Dipropilamina
EIA	Imunoensaio enzimático, do inglês: <i>Enzyme Immunoassay</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês: <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HLLME	Microextração Líquido-Líquido Homogênea, do inglês: <i>Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês: <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos, do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector</i>

HPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de à Espectrometria de Massas, do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i>
HPLC-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Ultravioleta, do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet detector</i>
LC/MS-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial, do inglês: <i>Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry</i>
LLE	Extração Líquido-Líquido, do inglês: <i>Liquid-Liquid Extraction</i>
LOD	Limite de Detecção, do inglês: <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês: <i>Limit of Quantitation</i>
MeCN	Acetonitrila
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
R ²	Coefficiente de determinação
SC	Síndrome de Cushing
SDME	<i>Microextração em Gota Única, do inglês: Single Drop Microextraction</i>
RIA	Radioimunoensaio, do inglês: <i>Radioimmunoassay</i>
rpm	Rotação por minuto
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês: <i>Relative Standard Deviation</i>
SHS	Solvente de Hidrofilicidade Comutável, do inglês: <i>Switchable Hydrophilicity Solvent</i>
SOP	Síndrome dos ovários policísticos, do inglês: <i>Polycystic Ovary</i>

Syndrome

SPE	Extração em Fase Sólida, do inglês: <i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	Microextração em Fase Sólida, do inglês: <i>Solid Phase Micro Extraction</i>
TR	Tempo de retenção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Hormônios esteroides: características e doenças relacionadas	15
1.2 Matrizes biológicas.....	18
1.3 Técnicas de preparo de amostras.....	20
1.4 Solventes de hidrofobicidade comutável (SHS)	22
1.5 Técnicas de determinação	25
1.6 AgreePREP.....	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Reagentes.....	29
3.2 Padrões analíticos	29
3.3 Amostras de fluido oral	29
3.4 Equipamento e condições analíticas.....	30
3.5 Otimização do preparo de amostra	31
3.5.1 Triagem das variáveis na etapa de extração	32
3.5.2 Otimização dos volumes de Na ₂ CO ₃ , amostra e H ₂ SO ₄	33
3.5.6 Validação e aplicação do método desenvolvido	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
4.1 Separação Cromatográfica dos analitos por HPLC-DAD.....	36
4.2 Otimização da etapa de preparo de amostras	37
4.2.1 Triagem das variáveis de extração	37
4.2.2 Otimização dos volumes de Na ₂ CO ₃ , amostra e H ₂ SO ₄	39
4.3 Procedimento otimizado para a determinação de cortisol e testosterona na saliva usando SHS.....	41
4.4 Determinação dos parâmetros analíticos de mérito e análise de amostras reais	43

4.4.1 Limites de Detecção e Quantificação	43
4.4.2 Linearidade	43
4.4.3 Precisão e Exatidão	45
4.4.4 Carryover	45
4.4.5 Amostra real	46
4.5 Resultados do AGREEprep para o método proposto	48
4.6 Comparação com outros estudos da literatura	49
5 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hormônios esteroides: características e doenças relacionadas

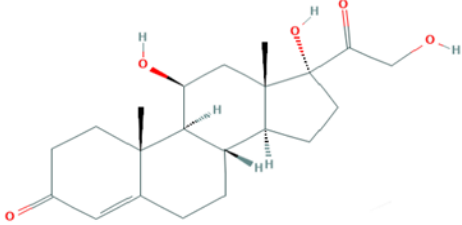
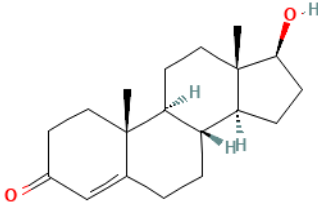
Biomarcadores são produtos ou substâncias utilizados como marcadores do estado biológico, podendo ser utilizado para determinar tanto processos fisiológicos quanto patológicos, assim como para o diagnóstico ou monitoramento de doenças (CHOO; HUESTIS, 2004; PALACIOS *et al.*, 2015). O sistema endócrino regula funções internas do organismo, buscando manter o estado de homeostasia, em reflexo a mudanças tanto internas quanto externas (CONSTANZO, 2011). Os hormônios atuam como mensageiros químicos e são produzidos de acordo com a necessidade metabólica, podendo ser sintetizados por células ou por órgãos específicos (HALL, 2017)

O cortisol, ou hidrocortisona, é um hormônio secretado pela glândula adrenal, na região do córtex adrenal. É o principal glicocorticoide, sendo responsável por aproximadamente 95% da atividade total, enquanto a corticosterona representa apenas 4% (HALL, 2017). Para que a sua liberação ocorra, é necessário a ativação de uma cascata de sinalizadores. O primeiro estímulo ocorre pelo hormônio hipotalâmico liberador de corticotropina (CRH), que ativa a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que regula outras glândulas endócrinas que secretam hormônios específicos. A ativação do córtex adrenal pelo ACTH resulta na secreção do cortisol. Ao final da cascata, ocorre a retroalimentação negativa, na qual a liberação do cortisol leva a diminuição da secreção de ACTH, que por sua vez, inibe a liberação de CRH (BARCELOS *et al.*, 2018).

Outro hormônio esteroide relevante é a testosterona, no qual a sua síntese varia durante o ciclo ovariano. Os androgênios femininos derivam dos ovários (androstenediona e testosterona) e das glândulas suprarrenais (deidroepiandrosterona e androstenediona), ou da conversão destes em testosterona. A produção diária de testosterona pelo ovário é de aproximadamente 300 µg, com cerca de 50% sendo convertida em estradiol (HALL, 2023).

A estrutura química do cortisol e da testosterona, assim como as suas características físico-químicas, estão apresentados na **Tabela 1**. Ambos os hormônios apresentam a sua estrutura química derivada da molécula de colesterol, apresentando características lipossolúveis (BURTIS; BRUNS; ASHWOOD, 2016).

Tabela 1 - Características físico-químicas do Cortisol e da Testosterona

Substância	Estrutura Química	Massa Molar (g mol ⁻¹)	pKa	logP
Cortisol		362,5 ^a	12,6 ^b	1,6 ^a
Testosterona		288,4 ^a	18,5 ^b	3,3 ^a

Fonte: ^a Pubchem, 2023; ^b Drugbank, 2023;

O logP é um parâmetro utilizado para descrever a solubilidade de uma molécula, e é obtido através da análise do coeficiente de partição octanol/água das moléculas que caracteriza a solubilidade. Quanto maior o valor de logP, mais lipossolúvel a molécula é (DORTA *et al.*, 2018). O pKa é definido como o log negativo da constante de dissociação ácida (Ka) das moléculas. O seu valor permite prever se as moléculas irão permanecer na forma ionizada ou não ionizada no meio. Quando o pH da solução é superior ao valor do pKa da molécula, a substância estará preferencialmente na sua forma ionizada. O inverso também é verdade, pH menor que o valor de pKa da molécula, a substância estará predominantemente na forma não ionizada, uma vez que a

concentração de íons H^+ na solução é maior, inibindo a ionização do ácido (BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2018).

Ambos os hormônios apresentam níveis de secreção superiores no início da manhã, com seus níveis reduzindo ao longo do dia (BURTIS; BRUNS; ASHWOOD, 2016; HALL, 2017). Tanto o cortisol sérico quanto a testosterona costumam ser transportados ligados de forma reversível às proteínas plasmáticas, representando cerca de 90-98% dos níveis séricos totais. O restante costuma ser encontrado na forma livre (ativa) (BARROU *et al.*, 1996; PEROGAMVROS; RAY; TRAINER, 2012; BURTIS; BRUNS; ASHWOOD, 2016). A ligação às proteínas plasmáticas funciona como reservatório temporário. Quando a concentração se encontra muito elevada, a capacidade de transporte das proteínas é ultrapassada, resultando no aumento da sua fração livre, tanto no sangue quanto na saliva (BURTIS; BRUNS; ASHWOOD, 2016; HALL, 2017).

Existem diversas doenças relacionadas com distúrbios no sistema endócrino nas quais os hormônios são liberados de forma desordenada, podendo apresentar secreção acima ou abaixo dos níveis normais, como, por exemplo, a Síndrome de Cushing (SC), que apresenta uma prevalência global estimada variando de 0,3 a 6,2 casos por 100.000 pessoas (GIUFFRIDA *et al.*, 2022). A SC ocorre em razão da secreção excessiva de cortisol pelas glândulas adrenais, podendo ser ACTH dependente ou independente (BOSCARO; ARNALDI, 2009; PIVONELLO *et al.*, 2015). O diagnóstico da SC é complexo, assim como o da SOP, uma vez que os sintomas mais comuns associados à SC são semelhantes aos relacionados a outros distúrbios comuns. Alguns dos sintomas apresentados são obesidade, “cara de lua cheia” e hipertensão (BOSCARO; ARNALDI, 2009). *Late-night salivary cortisol* é a análise de cortisol de uma amostra de saliva coletada próximo à meia-noite e é uma das análises recomendadas como teste de triagem para SC pela *Endocrine Society Guidelines* (NIEMAN *et al.*, 2008). Com isso, enfatiza-se o potencial dos biomarcadores salivares como suporte para diagnósticos complexos. As amostras de saliva podem ser auto coletadas fora do ambiente laboratorial, além de ser uma coleta simples e não invasiva (BARROU *et al.*, 1996).

Outra síndrome ocasionada pelo distúrbio endócrino é a síndrome dos ovários policísticos (SOP). Essa doença frequentemente se apresenta em

mulheres durante a vida reprodutiva, com a prevalência estimada em mais de 116 milhões de mulheres no mundo, pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (BULSARA *et al.*, 2021). Ela é caracterizada pela produção excessiva de androgênios pelos ovários (CADORE *et al.*, 2008) e apresenta manifestações clínicas como oligomenorreia ou amenorreia, hirsutismo e infertilidade frequente (SIRMANS; PATE, 2013).

O diagnóstico do distúrbio hormonal causado pela SOP é complexo, entretanto uma das ferramentas diagnósticas utilizadas é a avaliação dos níveis salivares de testosterona. A SOP pode ser identificada por níveis mais elevados de testosterona livre (não ligada à proteínas plasmáticas) em comparação com mulheres saudáveis (MÜNZKER *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2023).

1.2 Matrizes biológicas

O cortisol e a testosterona podem ser detectados em múltiplas matrizes biológicas, incluindo sangue, urina, cabelo e fluido oral. As amostras de soro, saliva e urina refletem os níveis dos hormônios a curto prazo, com as alterações ocorridas no intervalo de minutos a horas (WANG *et al.*, 2015). Embora a amostra de sangue seja amplamente utilizada devido à sua capacidade de refletir os níveis fisiológicos no organismo, é importante destacar que o processo de coleta invasiva e a exigência de profissionais capacitados representam uma desvantagem significativa do uso dessa matriz (BARROU *et al.*, 1996; CADORE *et al.*, 2008). Por outro lado, amostras de cabelo apresentam a capacidade de refletir retrospectivamente os níveis dos analitos em um intervalo de meses. Essa matriz biológica é menos suscetível a alterações relacionadas a fatores como o estado fisiológico e as alterações ambientais (WANG *et al.*, 2015).

Novas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de aprimorar técnicas de detecção e quantificação de biomarcadores na saliva, tanto para fins de diagnóstico quanto para o monitoramento (CUI *et al.*, 2022). As técnicas de coleta de amostras de fluido oral oferecem uma abordagem simples e não invasiva, podendo ser auto coletada e facilmente realizada fora do ambiente laboratorial. A coleta pode ser feita por meio da expectoração ou salivação direta em um tubo apropriado, ou por meio da utilização de materiais absorventes,

como o coletor *Salivette* (BARROU *et al.*, 1996; INDER; DIMESKI; RUSSELL, 2012).

O fluido oral como uma matriz alternativa para análises hormonais se mostra viável, vantajosa e promissora, oferecendo conforto e praticidade quando comparada a outras matrizes biológicas. Além disso, estudos têm mostrado uma correlação significativa nos níveis de cortisol e testosterona entre amostras de sangue e saliva (CADORE *et al.*, 2008; CASALS; HANZU, 2020).

A saliva é um fluido altamente diluído, sendo composta por mais de 99% de água. Contém na sua composição componentes orgânicos e inorgânicos, como uma grande variedade de eletrólitos, imunoglobulinas, proteínas, enzimas, mucinas e produtos nitrogenados. Apresenta o pH entre 6 e 7, podendo aumentar ou diminuir esse valor de acordo com o fluxo salivar (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). Essa matriz apresenta uma variação interindividual e uma bioquímica complexa. Um dos fatores que pode influenciar na variação das amostras entre os indivíduos é a saúde gengival. Outro fator associado a variação, é a necessidade de que as orientações de coleta sejam seguidas corretamente, podendo vir a interferir no resultado das análises (HELMERHORST; DAWES; OPPENHEIM, 2018).

Hormônios esteroides, como o cortisol e a testosterona, podem ser detectados em amostras de saliva devido às suas características físico-químicas previamente mencionadas. Esses analitos são lipossolúveis, o que permite sua migração passiva dos capilares sanguíneos para as glândulas salivares, independentemente do fluxo salivar (LEE; KIM; CHOI, 2015).

1.3 Técnicas de preparo de amostras

A saliva é uma amostra biológica complexa, com suas características já descritas anteriormente. Por esta razão, o preparo de amostra é um passo crucial para a análise de amostras biológicas. A ausência de um preparo adequado pode vir a interferir diretamente na qualidade dos resultados, assim como no tempo total de análise (KANU, 2021). O principal objetivo do preparo de amostra é extrair os analitos da matriz, eliminar ou reduzir os interferentes e garantir a

compatibilidade entre a amostra e a técnica de determinação empregada (PENA-PEREIRA *et al.*, 2022). Além disso, muitas vezes, permite a pré-concentração do analito, sendo uma etapa essencial quando se trabalha com amostras que apresentam baixas concentrações dos analitos (MERIB *et al.*, 2018). A seleção da técnica de preparo de amostras deve ser embasada na compreensão dos princípios que regem a transferência de massa dos analitos em sistemas multifásicos. Essa escolha é fundamentada em características dos componentes da matriz, como polaridade, solubilidade, estabilidade química e térmica, coeficiente de partição, lipofilicidade, entre outros aspectos (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Métodos clássicos de preparo de amostra costumam ser utilizados para a extração de cortisol e/ou testosterona em fluido oral, como extração líquido/líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE) (ANTONELLI *et al.*, 2015; BAKUSIC *et al.*, 2019; SAITO-ABE *et al.*, 2020; LOOD *et al.*, 2021). Apesar de serem muito eficientes, essas técnicas apresentam alguns aspectos negativos a serem considerados, como o uso de grandes volumes de amostra e solventes orgânicos tóxicos. Como consequência, um grande volume de resíduos é gerado, demandando uma atenção especial, uma vez que pode acarretar em sérios problemas ambientais (OCAÑA-GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

Em decorrência disso, há um interesse crescente no desenvolvimento de novos métodos de extração que sejam mais sustentáveis, ao mesmo tempo que mantenham a eficiência de extração das técnicas tradicionais. Os métodos de microextração surgiram como uma alternativa promissora, permitindo a utilização de menores volumes de amostra e de reagentes. Para as amostras, poucos mililitros são necessários, e para os solventes, alguns microlitros são tipicamente utilizados (PENA-PEREIRA *et al.*, 2022).

Assim como as técnicas extração clássicas, as técnicas de microextração podem ser classificadas em dois grupos distintos, sendo eles: técnicas de microextração em fase sólida e em fase líquida. A técnica de microextração em fase sólida (SPME) é uma das técnicas mais utilizadas, uma vez que diferentes sorventes podem ser aplicados como fases extratoras (SPIETELUN *et al.*, 2013). Enquanto isso, as principais técnicas de microextração em fase líquida, incluem a microextração em gota única (SDME), a microextração líquido-líquido

dispersiva (DLLME) e a microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME) (CARASEK; MORÉS; MERIB, 2018). Além disso, mais recentemente, foi introduzida com sucesso a microextração líquido-líquido em fase homogênea (HLLME). As técnicas de microextração apresentam vantagens significativas, como menor consumo de solventes, menor tempo de extração e maior sensibilidade analítica, o que permite a extração seletiva e eficiente dos analitos de diferentes tipos de amostras.

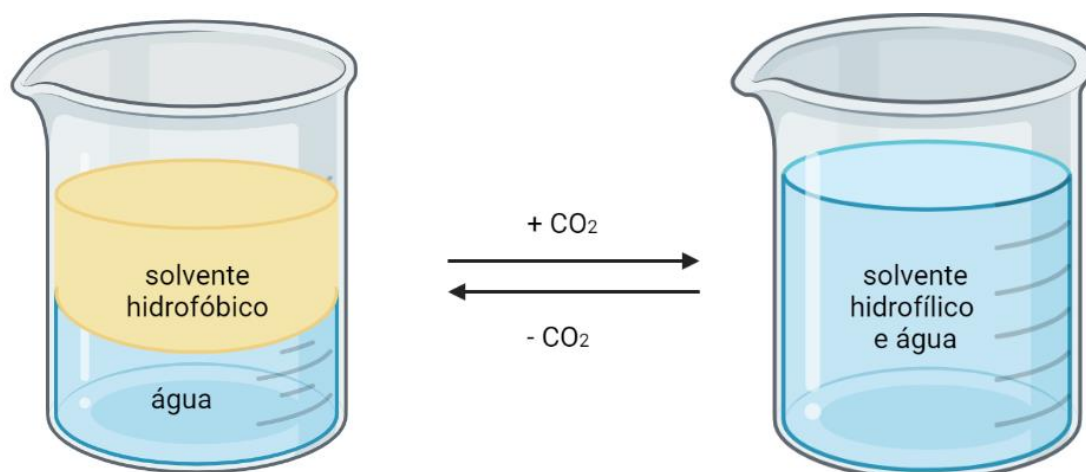
A HLLME é uma técnica de extração baseada no processo de separação de fases a partir de uma solução inicialmente homogênea. Na primeira etapa da técnica, ocorre a miscibilidade da amostra (aquosa) na fase orgânica (solvente extrator), favorecendo uma extração rápida dos analitos devido ao aumento da superfície de contato entre o solvente e a amostra. A ativação de homogeneidade ocorre através de alterações no equilíbrio químico do meio ou com a utilização de energias externas. Na segunda etapa, ocorre a separação de fases, com a adição ou remoção de reagentes específicos. A separação de fase permite a transferência do analito para a fase orgânica (AHMAR *et al.*, 2018; MUSARURWA; TAVENGWA, 2021). Neste sentido, alguns solventes com a característica específica de modificarem sua hidrofiliicidade dependendo das condições do meio vêm ganhando destaque, sendo tipicamente chamados de solventes de hidrofiliicidade comutável, derivado do inglês *switchable hydrophilicity solvents*.

1.4 Solventes de hidrofiliicidade comutável (SHS)

Os solventes de hidrofiliicidade comutável (SHS) surgiram como uma alternativa à utilização dos solventes orgânicos comumente utilizados nas técnicas tradicionais de preparo de amostra. Os SHS, são substâncias químicas ionizáveis, como aminas e ácidos graxos, as quais podem ter a sua miscibilidade alternada entre a forma hidrofílica e hidrofóbica. A mudança da ionização ocorre em razão da alteração do pH do meio, como consequência da adição de dióxido de carbono (CO₂), um ácido ou uma base (CARASEK *et al.*, 2021; KOKOSA; PRZYJAZNY, 2022).

A utilização dos SHS foi descrita pela primeira vez por Jessop (2010), no qual é apresentada a utilização do solvente N, N, N'-tributil pentanamida, que é hidrofóbico em condições normais. A **Figura 1** apresenta o funcionamento do sistema de ativação/desativação de homogeneidade do SHS.

Figura 1 - Esquema do funcionamento do sistema de ativação/desativação de homogeneidade do SHS



Fonte: Adaptado de JESSOP *et al.*, 2010

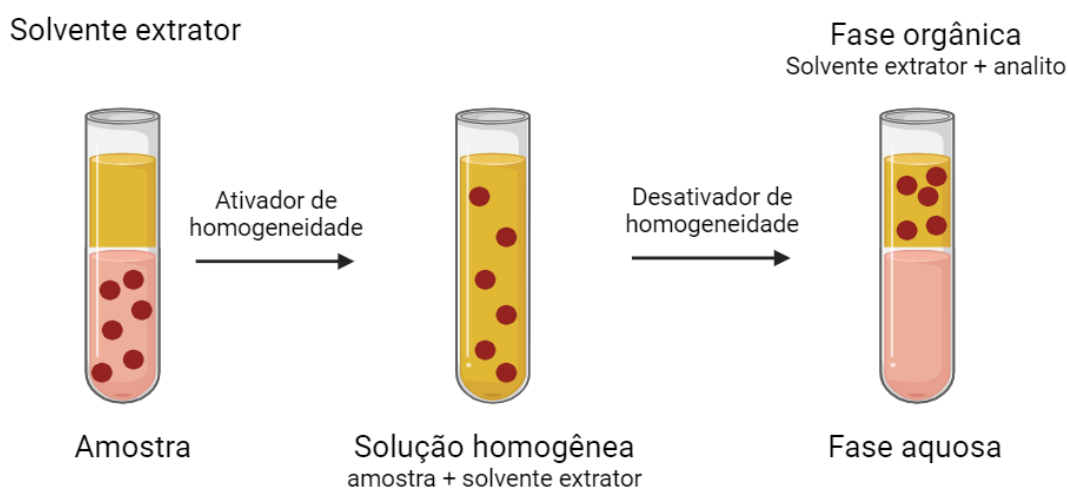
Ao adicionar o solvente em uma fase aquosa, observa-se que ocorre a separação de duas fases. Com a adição de CO₂, a solução se torna homogênea e o SHS se apresenta na forma hidrofílica. Após a remoção do CO₂, o equilíbrio químico retorna ao estado inicial, e a solução se torna heterogênea novamente. Com isso o SHS volta a apresentar suas características iniciais, com o comportamento hidrofóbico. A reversibilidade da reação surge como uma possibilidade de metodologia para a extração em duas fases.

A microextração líquido-líquido homogênea (HLLME) com a utilização dos SHS funciona de maneira semelhante à LLE, uma vez que o analito é extraído baseando-se na solubilidade no solvente extrator conforme o coeficiente de partição. Porém, no caso do SHS, um mesmo líquido extrator alterna a sua solubilidade, permitindo a utilização de um menor volume para a extração. A

Figura 2 apresenta um esquema genérico da HLLME. Desta forma, a substituição dos solventes orgânicos tradicionais por SHS permite um preparo

de amostra miniaturizado e com a utilização de solventes menos tóxicos, resultando em uma abordagem mais sustentável (ERYTHROPEL *et al.*, 2018).

Figura 2 - Esquema genérico da microextração homogênea líquido-líquido com separação de fases



Fonte: A autoria própria (2023)

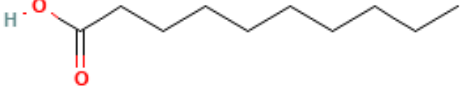
Os principais compostos utilizados como ativadores de homogeneidade são: CO_2 (LASARTE-ARAGONÉS *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2018), carbonato de sódio (Na_2CO_3) (ABDI *et al.*, 2022) e ácido clorídrico (HCl) (SHAHVANDI; BANITABA; AHMAR, 2018; OENNING *et al.*, 2020). Para retornar ao estado inicial, ou seja, desativação da homogeneidade, os principais componentes utilizados são: hidróxido de sódio (NaOH) (LASARTE-ARAGONÉS *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2018; OENNING *et al.*, 2020; SCHEID *et al.*, 2022) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) (ABDI *et al.*, 2022).

A ativação da homogeneidade permite que o solvente se torne miscível na fase aquosa, resultando na interação e extração do analito pelo SHS. Com a adição do desativador de homogeneidade, o solvente volta a ser imiscível, mas agora enriquecido com os analitos (ALSHANA *et al.*, 2020).

Frequentemente, os artigos descrevem o emprego de solventes à base de amina, como a dipropilamina (DPA) e N,N-dimetilciclohexilamina (DMCHA). Observa-se que eles têm sido amplamente utilizados como solventes extratores em amostras de urina (BAZEL; REČLO; CHUBIRKA, 2020), podendo ser empregado para a extração de metanfetamina (SHAHVANDI; BANITABA; AHMAR, 2018), antidepressivos (OENNING *et al.*, 2020) e drogas de abuso (XU *et al.*, 2018). Ácidos graxos de cadeia média também têm sido empregados como SHS em alguns estudos. O ácido hexanóico pode ser empregado para a extração de tetraciclinas (LEBEDINETS *et al.*, 2020), assim como o ácido octanóico para extração de metabólitos de monohidroxi hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (WANG *et al.*, 2020). Observa-se um número limitado de artigos publicados acerca da utilização de SHS como solvente extrator em amostras de fluido oral. Com isso, fica evidente a necessidade de mais estudos a respeito da aplicabilidade dos SHS para extração de analitos nestas amostras.

O SHS escolhido para ser utilizado neste trabalho foi o ácido decanóico por ser um composto ácido como as substâncias estudadas e por apresentar logP próximo aos dos analitos, facilitando o processo de extração. As estruturas químicas, valores de pKa, logP e ponto de fusão do ácido decanóico estão dispostos na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Características físico-químicas do Ácido Decanóico

Solvente	Estrutura Química	pKa	Log P	Ponto de fusão (°C)
Ácido Decanóico ou Ácido Cáprico		4,90	4,09	31,5

Fonte: Pubchem, 2023

1.5 Técnicas de determinação

Diversos métodos analíticos para análise de cortisol e testosterona em fluido oral são descritos na literatura. Estes métodos incluem radioimunoensaio (RIA) (DLUGASH; SCHULTHEISS, 2021), imunoensaio enzimático (EIA)

(CREWETHER *et al.*, 2013; WELKER *et al.*, 2016), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (HAYES *et al.*, 2014; CREWETHER *et al.*, 2023), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD) (SARACINO *et al.*, 2014) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS) (JENSEN *et al.*, 2011; WELKER *et al.*, 2016).

Imunoensaios como RIA, EIA e ELISA são frequentemente utilizados por serem métodos simples, rápidos e sensíveis. Entretanto, os resultados podem ser afetados por efeito matriz e/ou reações cruzadas com metabólitos do cortisol, moléculas sintéticas de glicocorticoides e outros esteroides, podendo interferir na análise e na interpretação dos resultados (NIEMAN *et al.*, 2008; INDER; DIMESKI; RUSSELL, 2012; BURTIS; BRUNS; ASHWOOD, 2016; GIACOMELLO; SCHOLTEN; PARR, 2020).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica utilizada para separação, identificação e quantificação de compostos de misturas líquidas. A técnica se baseia na separação dos componentes através da interação da amostra tanto com a fase móvel quanto com a fase estacionária presente na coluna cromatográfica. Com isso, idealmente, cada analito irá apresentar uma afinidade diferente com estas fases, sendo posteriormente identificados por um detector em diferentes tempos de retenção (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Um dos detectores que pode ser acoplado ao HPLC é o detector por arranjo de diodos (DAD), que opera com base na medição da absorção da radiação eletromagnética em diversos comprimentos de onda na região do UV-Vis de forma simultânea. A análise resulta em espectros de absorção, que permitem a obtenção de informações acerca dos componentes presentes na amostra, além da possibilidade de quantificação dos analitos com a análise da área sob o pico (PRAGST; HERZLER; ERXLEBEN, 2004). Tanto o HPLC-DAD quanto o HPLC-UV são técnicas robustas e adequadas para análise de amostras biológicas, como fluido oral. Com a devida preparação de amostra, é possível obter resultados precisos e confiáveis para a determinação de cortisol e testosterona nesse tipo de técnica (SARACINO *et al.*, 2014; ABUJABER *et al.*, 2019; NISHIJO *et al.*, 2021).

Com isso, torna-se relevante o desenvolvimento de uma metodologia rápida, eficiente, fácil, de baixo custo e com pouca geração de resíduos para o meio ambiente, capaz de detectar cortisol e testosterona em amostras de fluido oral com determinação por HPLC-DAD. Cabe ressaltar que, até o momento, não há trabalhos publicados utilizando esta técnica de extração para a determinação desses analitos em fluido oral.

1.6 AgreePREP

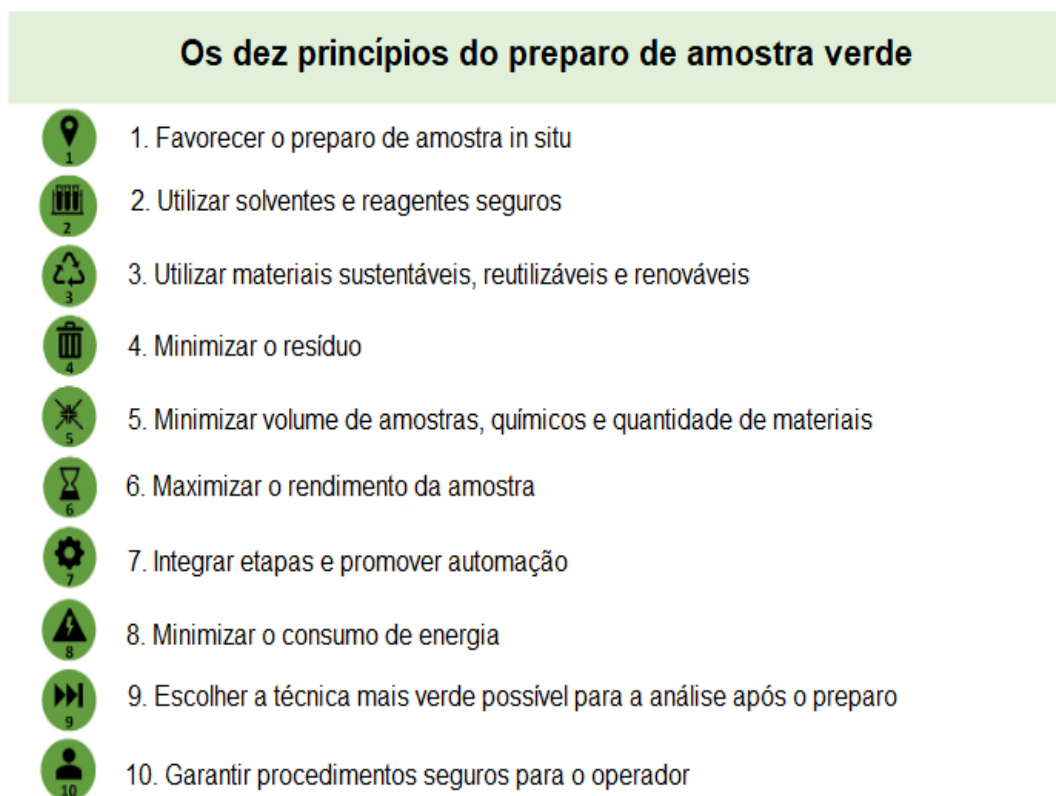
A química analítica verde se inicia em 2000, orientando os analistas a tornarem as práticas laboratoriais mais ecológicas. A aplicação dos princípios da Química Analítica Verde nos ambientes laboratoriais tem como objetivo a mitigação dos impactos negativos das análises químicas no meio ambiente. No entanto, um dos desafios da implementação reside no equilíbrio entre o aumento da qualidade dos resultados analíticos e a garantia de uma maior compatibilidade ambiental. (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013)

Dentre os princípios da Química Analítica Verde, é proposta a eliminação da etapa de preparo de amostra. Apesar do propósito de desenvolver metodologias com maior sustentabilidade ambiental, esses princípios não abordam o impacto ambiental associado ao preparo de amostras. (LÓPEZ-LORENTE *et al.*, 2022). Como mencionado anteriormente, a ausência dessa etapa pode afetar a qualidade dos resultados e nem sempre há compatibilidade entre a amostra e a técnica de determinação (KANU, 2021) (PENA-PEREIRA *et al.*, 2022).

Com esta lacuna, emergem os princípios do Preparo de Amostras Verde, os quais seguem com o objetivo da preservação ambiental. A **Figura 3** apresenta os dez princípios do Preparo de Amostras Verde (LÓPEZ-LORENTE *et al.*, 2022). O AGREEprep é uma ferramenta métrica fundamentada nos princípios do Preparo de Amostras Verde e permite a avaliação do impacto ambiental relacionado aos métodos de preparo de amostras. A métrica permite a avaliação ponderada dos princípios, podendo ser adaptada às particularidades da análise a ser realizada. Ademais, essa ferramenta possibilita a identificação dos pontos

fortes e fracos do método, contribuindo para a identificação dos princípios que demandam aprimoramento, visando garantir uma abordagem mais ecológica à técnica. (PENA-PEREIRA *et al.*, 2022).

Figura 3 - Os dez princípios do preparo de amostra verde



Fonte: Adaptado de LÓPEZ-LORENTE *et al.*, 2022

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver uma metodologia analítica utilizando a extração em fase homogênea com solvente de hidrofiliabilidade comutável (SHS) para a determinação de cortisol e testosterona em amostras de fluido oral por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por arranjo de diodos

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e otimizar a separação cromatográfica dos compostos cortisol e testosterona por HPLC-DAD.
- Otimizar, mediante ferramentas quimiométricas, um método de extração em fase homogênea utilizando solventes de hidrofiliabilidade comutável para a extração de cortisol e testosterona de amostras de fluido oral simulado.
- Validar o método desenvolvido, avaliando parâmetros como linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.
- Avaliar a sustentabilidade do método de extração desenvolvido por meio da ferramenta AGREEprep.
- Aplicar o método desenvolvido na análise de amostras reais de fluido oral.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

O ácido decanóico foi obtido da marca Neon (São Paulo, Brasil) e foi preparada uma solução de 65 mg mL⁻¹ em acetonitrila. O carbonato de sódio (Na₂CO₃) e o ácido sulfúrico (H₂SO₄) PA foram obtidos da Alphatec (São Paulo, Brasil), e foram preparadas soluções aquosas na concentração de 2 mol L⁻¹ e 3 mol L⁻¹, respectivamente. A acetonitrila (MeCN) utilizada em todos os experimentos apresenta grau HPLC e foi obtida da Merck (Darmstadt, Germany).

3.2 Padrões analíticos

O padrão analítico de hidrocortisona (cortisol) foi obtido da Sigma-Aldrich (Missouri, United States) e o 17-alfa-metiltestosterona (testosterona) foi obtido da DR Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) ambos com pureza acima de 99,5%. Os padrões encontravam-se em estado sólido e foram preparados na concentração de 1 mg mL⁻¹ em MeCN. Soluções estoque dos analitos foram preparados com a diluição apropriada no mesmo solvente dos padrões. Todas as soluções foram armazenadas a -20°C.

3.3 Amostras de fluido oral

Considerando que o cortisol e a testosterona são compostos endógenos, para obtermos uma amostra branco foi necessário o preparo de uma saliva artificial. A amostra foi preparada de acordo com o método descrito pela *European Commission Joint Research Centre* (JRC) (SIMONEAU *et al.*, 2001). Os dados referentes aos sais e as concentrações utilizadas para o preparo estão descritos na **Tabela 3**. Todos os sais foram diluídos em água tipo I, ultra purificada em sistema Milli-Q® (com resistividade de 18,2 MΩ cm a 25 °C), da marca Millipore. A saliva artificial foi utilizada para a otimização e validação dos experimentos.

Tabela 3 - Composição da saliva artificial utilizada neste estudo

Composto	Fórmula	mg L⁻¹	Marca
Cloreto de magnésio	MgCl ₂	166,7	Merck
Cloreto de cálcio	CaCl ₂	147,0	Merck
Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	753,1	Merck
Carbonato de potássio	K ₂ CO ₃	525,2	Sigma
Cloreto de sódio	NaCl	327,3	Neon
Cloreto de potássio	KCl	745,5	CRQ

Fonte: Adaptado de Simoneau (2001)

Para os demais experimentos, amostras reais de fluido oral foram utilizadas. As amostras foram fornecidas voluntariamente pelos membros do nosso grupo de pesquisa - Grupo de Estudos em Preparo de Amostras e Cromatografia (GEPAC). O protocolo de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA (CAAE 09022919.2.0000.5345), sob o parecer número 3.319.035.

Para garantir a integridade das amostras, os voluntários foram instruídos a não comer, beber ou escovar os dentes pelo menos 30 minutos antes da coleta. As orientações são fundamentais para evitar a contaminação. As amostras foram obtidas através da salivação direta em um tubo de polipropileno de 5 mL, durante a manhã. Em seguida, as amostras foram armazenadas por um dia a 4°C em geladeira até a análise.

3.4 Equipamento e condições analíticas

As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), marca Shimadzu modelo Prominence, equipado com uma bomba quaternária de mistura de baixa pressão e degaseificação a vácuo em linha, controlada por um módulo de interface CBM-20A, um injetor automático (SIL-

20A), forno (CTO-20A) e detector por arranjo de diodos (DAD) modelo SPDM20A.

O desenvolvimento do método foi realizado através da investigação da separação cromatográfica do cortisol e da testosterona a partir de soluções individuais dos analitos com concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada em MeCN. Após, analisou-se uma solução contendo ambos os analitos. O método cromatográfico foi estabelecido com base nas condições que possibilitaram a separação eficiente dos picos dos compostos de interesse.

A separação cromatográfica dos analitos foi realizada utilizando uma coluna C18 da marca Promosil (4,6 x 250 mm; 5 μm) com a temperatura do forno mantida a 40°C . A fase móvel foi constituída de água ultra pura (A) e MeCN (B), com a aplicação de gradiente variando de 60 a 65% v/v de fase B (0 - 12 min) e de 65 a 60% v/v (12,1 - 18 min). O Fluxo da fase móvel foi mantido em 0,8 mL/min e o volume de injeção foi de 20 μL . O tempo de corrida total foi de 18 minutos e os analitos foram detectados no comprimento de onda de 245 nm. A análise de dados foi realizada utilizando o software LabSolutions da marca Shimadzu.

3.5 Otimização do preparo de amostra

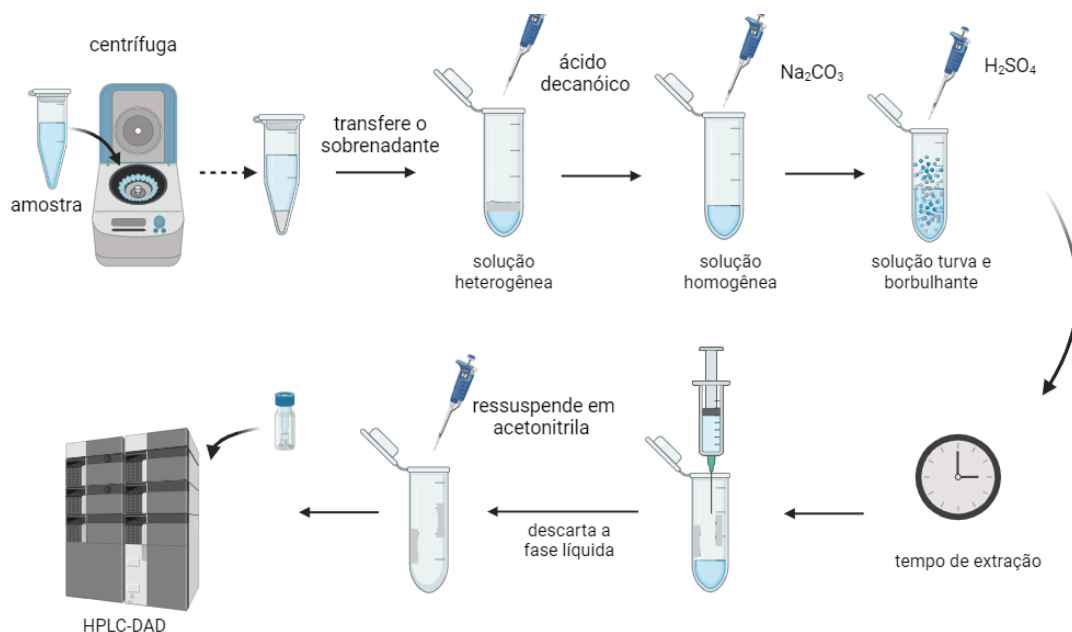
A otimização das melhores condições experimentais foi conduzida por meio da aplicação de técnicas multivariadas, com a análise do Cortisol e da Testosterona simultaneamente. Durante essas análises, foram exploradas as variáveis que poderiam impactar na eficiência de extração dos analitos. Em todas as etapas, os dados analíticos foram submetidos à análise estatística utilizando Statsoft Statistica 10 (Statsoft, USA) e o Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA). A avaliação foi realizada através da extração dos analitos a partir de amostras de saliva simulada, previamente fortificadas com 500 ng mL^{-1} de cada analito. A otimização foi conduzida utilizando o Planejamento Fatorial Fracionário, seguido do Planejamento Composto Central.

3.5.1 Triagem das variáveis na etapa de extração

Na primeira etapa, realizou-se uma análise de triagem para verificar as variáveis que afetam a eficiência da extração de cortisol e testosterona na amostra de fluido oral. As variáveis que se mostraram significativas, posteriormente foram estudadas mais detalhadamente. Para isso, foi realizado um planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{5-1} , ou seja, com cinco variáveis e em dois níveis, resultando em 16 experimentos. As variáveis foram volume de Na_2CO_3 , volume de ácido decanóico, volume de H_2SO_4 , volume de amostra e tempo de extração. Os níveis mínimos (-1) e máximos (+1) foram os seguintes: o volume de Na_2CO_3 de 200 e 600 μL , volume de ácido decanóico de 100 e 200 μL , volume de H_2SO_4 de 400 e 800 μL e o tempo de extração de 1 e 4 minutos.

As amostras do Planejamento Fatorial Fracionário foram preparadas de acordo com o esquema apresentado na **Figura 4**. Os valores codificados e reais dos níveis e das variáveis analisadas estão apresentados na **Tabela 4**.

Figura 4 - Esquema genérico do procedimento de preparo de amostra utilizado no Planejamento Fatorial Fracionário e no Planejamento do Composto Central



Fonte: Autoria própria (2023)

Tabela 4 - Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1} com os níveis estabelecidos e variáveis estudadas para a da eficiência de extração dos analitos de amostras fluido oral com a utilização de SHS

Análise	Volume de Na_2CO_3 (μL)	Volume de Ácido Decanóico (μL)	Volume de H_2SO_4 (μL)	Volume de amostra (μL)	Tempo de extração (min)
1	200 (-)	100 (-)	400 (-)	500 (-)	4 (+)
2	600 (+)	100 (-)	400 (-)	500 (-)	1 (-)
3	200 (-)	200 (+)	400 (-)	500 (-)	1 (-)
4	600 (+)	200 (+)	400 (-)	500 (-)	4 (+)
5	200 (-)	100 (-)	800 (+)	500 (-)	1 (-)
6	600 (+)	100 (-)	800 (+)	500 (-)	4 (+)
7	200 (-)	200 (+)	800 (+)	500 (-)	4 (+)
8	600 (+)	200 (+)	800 (+)	500 (-)	1 (-)
9	200 (-)	100 (-)	400 (-)	1000 (+)	1 (-)
10	600 (+)	100 (-)	400 (-)	1000 (+)	4 (+)
11	200 (-)	200 (+)	400 (-)	1000 (+)	4 (+)
12	600 (+)	200 (+)	400 (-)	1000 (+)	1 (-)
13	200 (-)	100 (-)	800 (+)	1000 (+)	4 (+)
14	600 (+)	100 (-)	800 (+)	1000 (+)	1 (-)
15	200 (-)	200 (+)	800 (+)	1000 (+)	1 (-)
16	600 (+)	200 (+)	800 (+)	1000 (+)	4 (+)

Observação: As extrações foram realizadas em amostra simulada contendo 500 ng mL^{-1} de cada analito. Fonte: Autoria própria (2023)

3.5.2 Otimização dos volumes de Na_2CO_3 , amostra e H_2SO_4

Após a definição das variáveis significativas através do Planejamento Fatorial Fracionário, o Planejamento Composto Central foi aplicado. Para este

planejamento, três variáveis significativas foram avaliadas em 5 níveis cada, com um total de 17 experimentos.

As variáveis do Planejamento do Composto Central foram preparadas de acordo com o esquema apresentado na **Figura 4**. Os valores codificados e reais dos níveis e das variáveis analisadas estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Planejamento do Composto Central com os níveis estabelecidos e variáveis estudadas para a da eficiência de extração dos analitos de amostras fluido oral com a utilização de SHS

Análise	Bloco	Volume de Na ₂ CO ₃ (µL)	Volume de amostra (µL)	Volume de H ₂ SO ₄ (µL)
1	1	200 (-1)	950 (-1)	700 (-1)
2	1	200 (-1)	1050 (+1)	900 (+1)
3	1	300 (+1)	950 (-1)	900 (+1)
4	1	300 (+1)	1050 (+1)	700 (-1)
5	1	250 (0)	1000 (0)	800 (0)
6	2	200 (-1)	950 (-1)	900 (+1)
7	2	200 (-1)	1050 (+1)	700 (-1)
8	2	300 (+1)	950 (-1)	700 (-1)
9	2	300 (+1)	1050 (+1)	900 (+1)
10	2	250 (0)	1000 (0)	800 (0)
11	3	166 (-1,67)	1000 (0)	800 (0)
12	3	334 (+1,67)	1000 (0)	800 (0)
13	3	250 (0)	916 (-1,67)	800 (0)
14	3	250 (0)	1084 (+1,67)	800 (0)
15	3	250 (0)	1000 (0)	636 (-1,67)
16	3	250 (0)	1000 (0)	968 (+1,67)
17	3	250 (0)	1000 (0)	800 (0)

Fonte: Autoria própria (2023)

3.5.6 Validação e aplicação do método desenvolvido

Após a determinação da condição otimizada da metodologia analítica, seguiu-se para a determinação dos parâmetros analíticos de mérito. O limite de quantificação (LOQ) do método foi estabelecido como a primeira concentração da faixa linear da curva de calibração que atende aos critérios de precisão e exatidão. Já o limite de detecção (LOD) foi calculado mediante a divisão do LOQ por 3,3, representando o menor valor diferente de zero. A linearidade foi determinada através da curva de calibração, constituída pela análise de três medidas em 6 concentrações diferentes, em amostras fortificadas de saliva simulada. As concentrações utilizadas para a elaboração da curva de calibração do cortisol foi de 15, 100, 200, 350, 500 e 750 ng mL⁻¹. Já para a curva de calibração da testosterona, as concentrações foram de 15, 30, 100, 200, 350 e 750 ng mL⁻¹.

A homoscedasticidade foi avaliada através da aplicação do teste F para cada um dos analitos. Para as curvas que apresentaram heterocedasticidade, um fator de ponderação foi aplicado para correção da linearidade. O coeficiente de determinação (R²) foi calculado com base na curva de calibração com o ajuste da linearidade, quando aplicável.

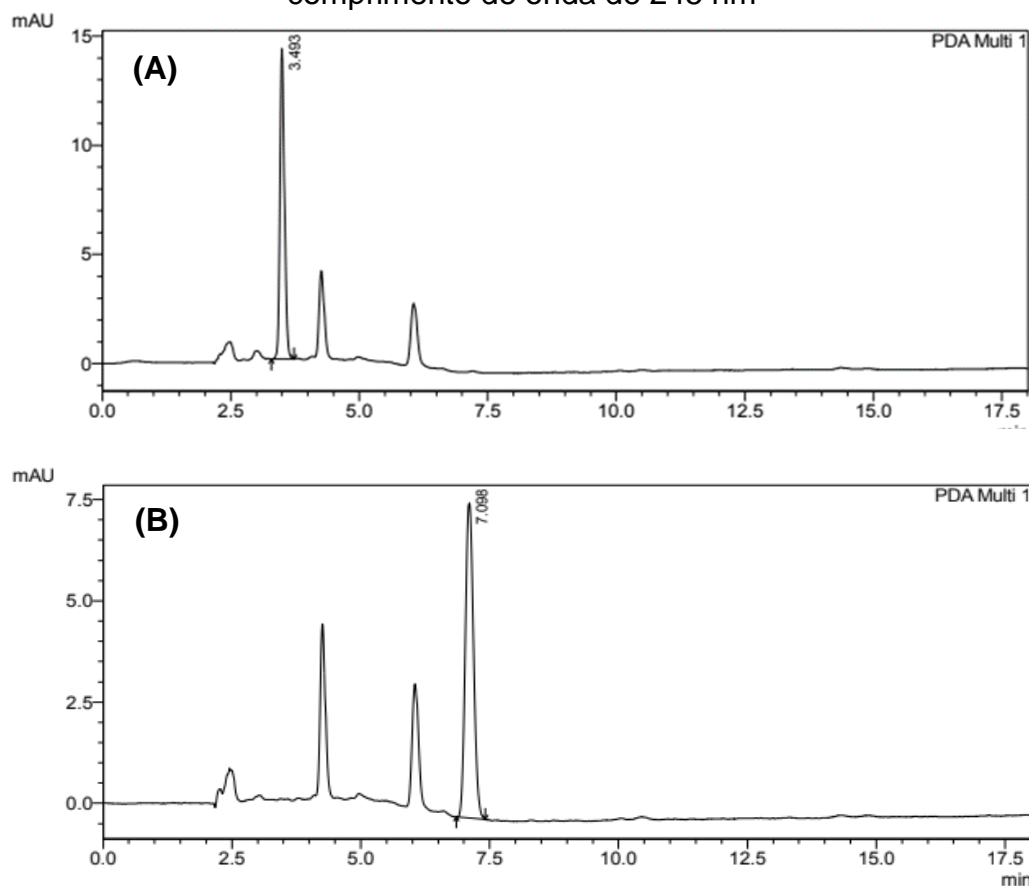
A exatidão do método e a precisão intradia e interdia foram avaliados em três concentrações: baixa (15 ng mL⁻¹), média (100 ng mL⁻¹) e alta (750 ng mL⁻¹). Três replicatas foram analisadas em três corridas diferentes. A precisão foi aceita com desvio padrão ≤ 20% e recuperação foi aceita dentro de ± 20% da concentração esperada. Efeito de memória (*carryover effect*) foi avaliado através da injeção de cinco amostras branco extraídas, logo após a análise do ponto mais concentrado da curva de calibração. A aplicabilidade do método foi avaliada através da extração de amostras de saliva obtidas de voluntários do nosso grupo de pesquisa.

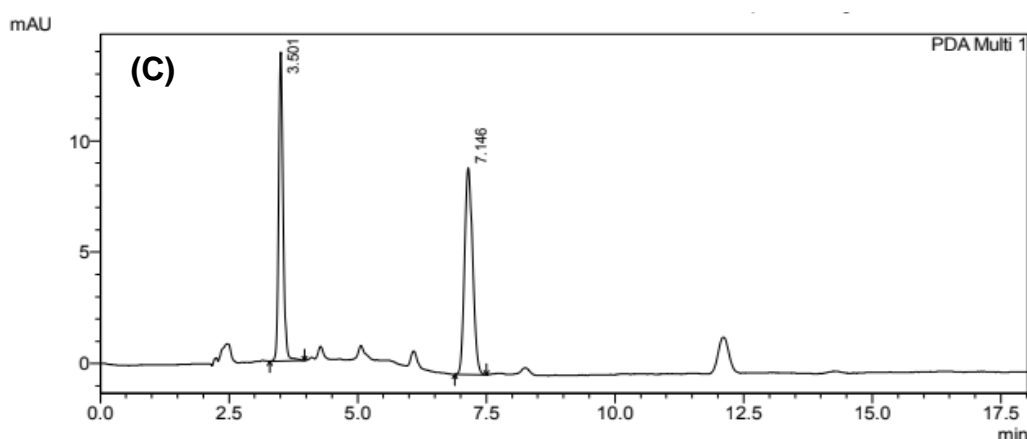
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Separação Cromatográfica dos analitos por HPLC-DAD

As condições cromatográficas foram otimizadas para garantir a eficiente separação dos picos dos analitos no método estabelecido. A separação cromatográfica dos compostos está apresentada na **Figura 5**. O cortisol (A) apresentou tempo de retenção (TR) de 3,5 min, enquanto a testosterona (B) apresentou TR de 7,1 min. A análise simultânea dos analitos (C), demonstra que houve uma separação satisfatória dos analitos. Também é possível observar que não houve outros picos nos tempos de retenção dos analitos nas análises individuais. Nenhuma interferência foi detectada, o que possibilitou prosseguir com as otimizações do método.

Figura 5 - Resultado dos cromatogramas obtidos a partir da análise dos padrões dos analitos obtidos com o método analítico desenvolvido no comprimento de onda de 245 nm





Legenda: (A) Cortisol com TR = 3,5 min; (B) Testosterona com TR = 7,1 min; (C) Análise simultânea dos dois analitos. Fonte: Autoria própria (2023)

4.2 Otimização da etapa de preparo de amostras

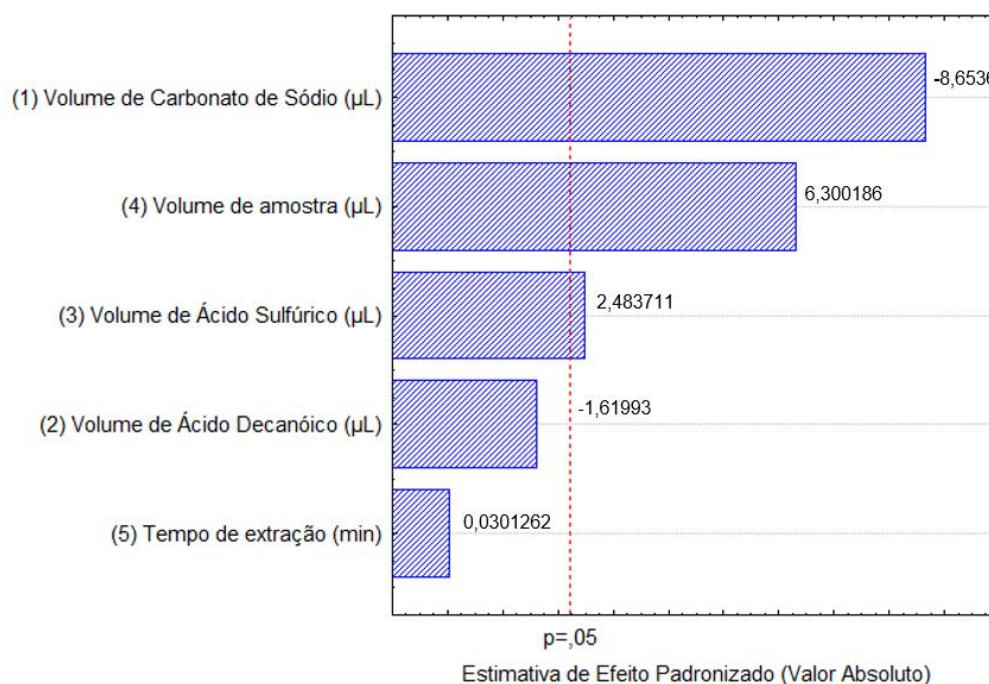
4.2.1 Triagem das variáveis de extração

Na primeira etapa do processo de otimização, foi realizado o Planejamento Fatorial Fracionário para identificar as variáveis significativas no processo de extração. As extrações foram conduzidas de acordo com o planejamento descrito anteriormente e a resposta instrumental (área cromatográfica) foi utilizada para gerar o gráfico de Pareto, baseado na média geométrica das áreas dos picos cromatográficos dos analitos em cada experimento. Após o tratamento dos dados, obteve-se o gráfico de Pareto, que é apresentado na **Figura 6**. A análise apresentou R^2 de 0,9250, demonstrando que os resultados do experimento se encontram adequados com o modelo estatístico selecionado.

Com base nos dados apresentados, considerando o nível de confiança de 95%, podemos concluir que as variáveis significativas na eficiência de extração foram: volume de Na_2CO_3 , volume de amostra e volume de H_2SO_4 . A variável volume de Na_2CO_3 apresentou efeito negativo, indicando que um menor volume (200 μL) resulta em uma melhor resposta cromatográfica. Por outro lado, as variáveis volume de H_2SO_4 e volume de amostra apresentam efeito positivo, com melhores respostas cromatográficas em maiores volumes. Com isso, optou-se

por uma análise mais detalhada destas variáveis a fim de definir mais adequadamente a condição otimizada. As demais variáveis não apresentaram resultados significativos na eficiência de extração. As variáveis significativas foram estudadas posteriormente com a aplicação do Planejamento do Composto Central.

Figura 6 - Gráfico de Pareto para otimização das condições de extração



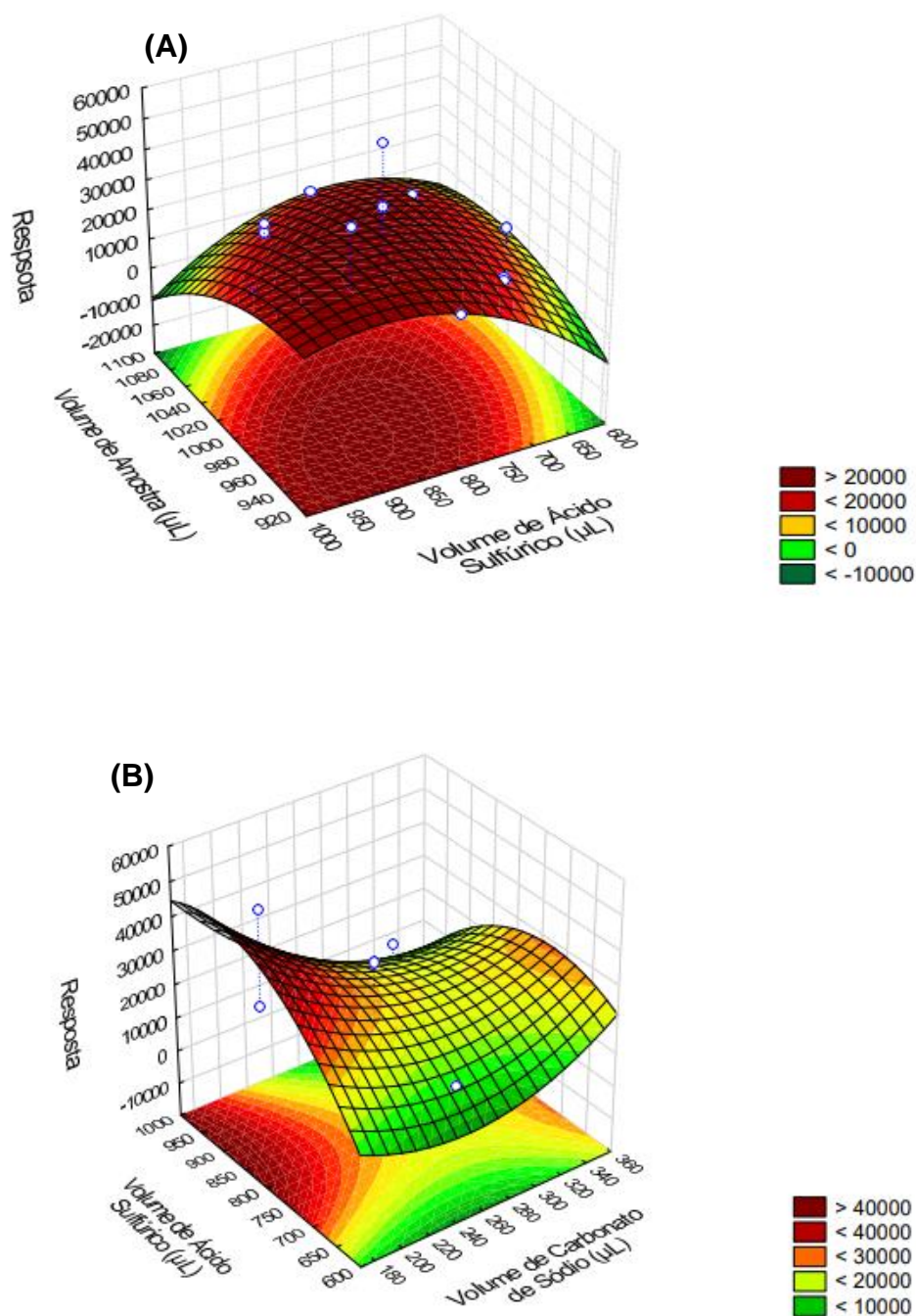
Fonte: Autoria própria (2023)

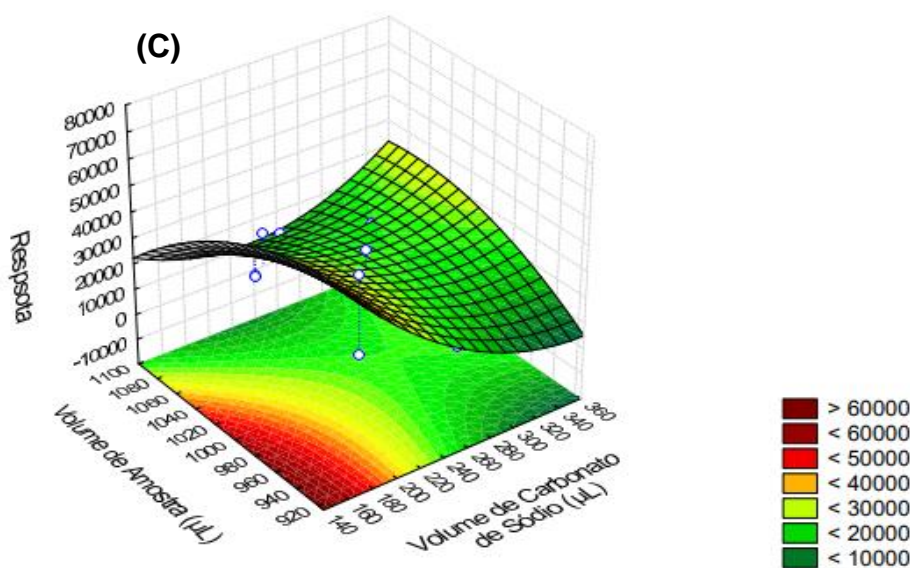
4.2.2 Otimização dos volumes de Na_2CO_3 , amostra e H_2SO_4

Nesta última etapa de otimização, foi empregado o Planejamento Composto Central para uma avaliação mais detalhada das variáveis consideradas previamente significativas pelo Gráfico de Pareto. Neste planejamento, são obtidas superfícies de resposta a partir de um modelo estatístico geralmente quadrático no qual a região que exibe a maior intensidade de coloração vermelha indica uma melhor resposta analítica.

Através desta análise, é possível avaliar a relação entre duas variáveis e como elas afetam a intensidade da resposta instrumental em diversos níveis (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). As superfícies de resposta obtidas na otimização estão apresentadas na **Figura 7**.

Figura 7 - Superfície de resposta gerada para a otimização da extração dos analitos a partir do resultado das análises do Planejamento Composto Central





Legenda: (A) otimização do volume de H_2SO_4 e volume de amostra; (B) otimização do volume de H_2SO_4 e Na_2CO_3 ; (C) otimização do volume de amostra e volume de Na_2CO_3 . Fonte: autoria própria (2023)

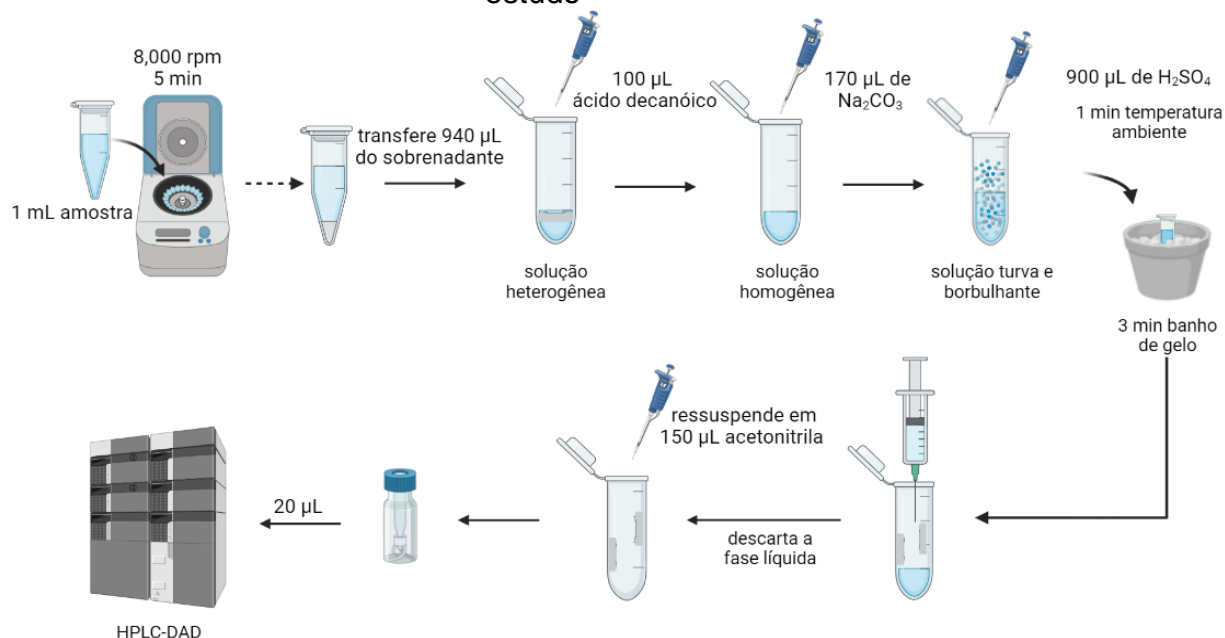
Avaliando o item (A) da **Figura 7**, é possível verificar que a combinação de 900 μL de H_2SO_4 e 940 μL de amostra gerou uma intensa resposta cromatográfica. Com base no item (B), a condição ótima estabelecida foi de 900 μL de H_2SO_4 e 166 μL de Na_2CO_3 . No item (C), o resultado encontrado vai de acordo com as conclusões descritas anteriormente, onde a maior intensidade de resposta ocorre com a utilização de aproximadamente 960 μL de amostra e 140 μL de Na_2CO_3 . Ao final da análise, conclui-se que os volumes que apresentaram uma melhor superfície de resposta foi de 166 μL de Na_2CO_3 , 960 μL de amostra e 900 μL de H_2SO_4 . Como a primeira etapa do preparo de amostra envolve a centrifugação, optou-se por utilizar o volume inicial de 1000 μL e posteriormente realizar a transferência de 940 μL para ser utilizado na análise.

Através da aplicação da análise multivariada foi possível otimizar a etapa de preparo de amostras através da realização de um número pequeno de experimentos. Os resultados obtidos por meio dessas análises permitiram a obtenção de uma quantidade significativa de informações sobre as melhores condições experimentais (FERREIRA *et al.*, 2018; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

4.3 Procedimento otimizado para a determinação de cortisol e testosterona na saliva usando SHS

O fluxograma do preparo de amostra otimizado está apresentado na **Figura 8**. Para realizar o procedimento, deve-se primeiramente transferir 1000 μL da amostra de fluido oral coletada previamente para um tubo de polipropileno de 1,5 mL. Em seguida, a amostra deve ser centrifugada a 8.000 rpm por 5 minutos. Depois, é necessário transferir 940 μL do sobrenadante para um tubo de polipropileno de 5 mL. Neste tubo, adiciona-se 100 μL da solução de ácido decanóico (65 mg mL^{-1}). Em seguida, acrescenta-se 170 μL de Na_2CO_3 , resultando em uma solução homogênea. Posteriormente, adiciona-se 900 μL de H_2SO_4 para promover a separação de fase. Nessa etapa, observa-se a formação de uma solução turva e efervescente. A mistura é deixada por 1 minuto em temperatura ambiente e, em seguida, durante 3 minutos em banho de gelo. A seguir, a fase líquida é descartada e a amostra é ressuspensa em 150 μL de acetonitrila. Finalmente, 20 μL da amostra é injetada no sistema HPLC-DAD.

Figura 8 - Esquema do procedimento de preparo de amostra otimizado no estudo



Fonte: Autoria própria (2023)

Após transcorrido esse tempo, torna-se visível a separação da solução em duas fases, sendo uma sólida e outra líquida. A fase líquida deve ser aspirada e descartada com o auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha. A fase sólida, contendo os analitos, é ressuspensa em 150 μL de acetonitrila. O extrato resultante é transferido para um vial, e 20 μL são injetados no HPLC-DAD para a análise.

Devido à sua viscosidade, o uso de SHS como solvente extrator pode resultar em um aumento da pressão no sistema HPLC. Para contornar esse problema, uma alternativa encontrada foi a ressuspensão do SHS em MeCN, uma abordagem já descrita anteriormente na literatura (PALASAK *et al.*, 2022). Essa estratégia visa reduzir a viscosidade do solvente, ajudando a evitar o aumento excessivo da pressão durante a análise. Essa metodologia tem se mostrado eficaz para manter o desempenho adequado do sistema HPLC.

A aplicação de SHS no preparo de amostras tem se demonstrado como uma técnica valiosa para a aplicação em diferentes tipos de amostras (ALSHANA *et al.*, 2020). No entanto, ácidos graxos de cadeia média, como o ácido decanóico, ainda têm sido pouco utilizados como solvente de extração para aplicação em amostras biológicas. A ausência de dados da literatura demonstra que esta área ainda é pouco explorada, mas apresenta uma grande possibilidade de expansão.

4.4 Determinação dos parâmetros analíticos de mérito e análise de amostras reais

Após as otimizações, as condições experimentais foram definidas e a validação foi realizada. Parâmetros analíticos de mérito foram estabelecidos para a determinação de cortisol e testosterona em amostras de fluido oral.

4.4.1 Limites de Detecção e Quantificação

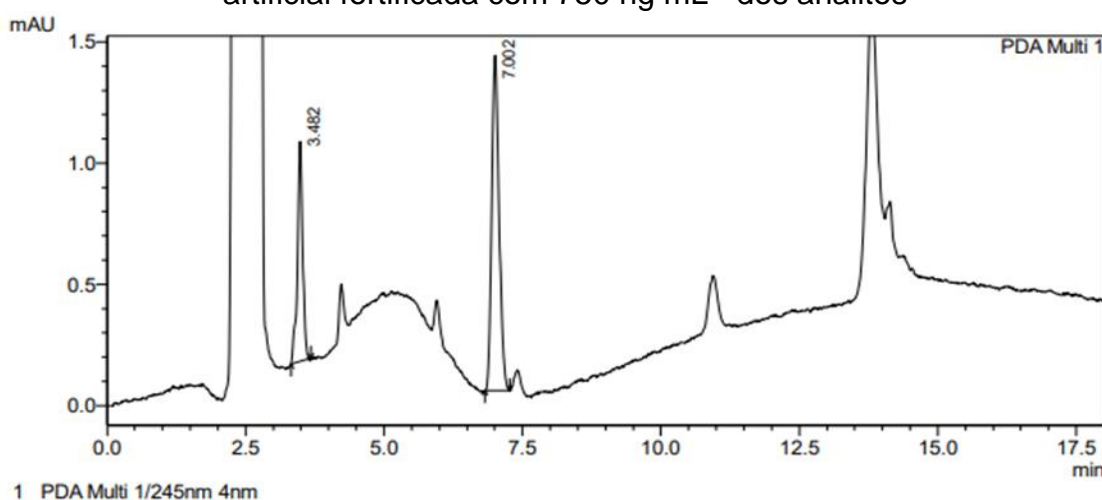
Os valores de LOQ e LOD do método estão apresentados na **Tabela 6**. O LOQ foi determinado como sendo a primeira concentração da faixa linear da

curva de calibração, sendo a concentração de 15 ng mL^{-1} . O LOD foi calculado através da divisão do LOD por 3,3 resultando na concentração de $4,55 \text{ ng mL}^{-1}$. Os valores de LOD e LOQ foram iguais para ambos os analitos.

4.4.2 Linearidade

Os dados da equação linear, fator de ponderação, faixa linear, e R^2 também podem ser encontrados na **Tabela 6**. A linearidade foi determinada através da curva de calibração, variando a faixa linear de entre 15 e 750 ng mL^{-1} para ambos os analitos. As curvas de calibração apresentaram valores de R^2 superiores a $0,99$. A partir da obtenção das curvas analíticas, observou-se o fenômeno de heterocedasticidade para ambos os analitos, sendo o mesmo ajustado e corrigido com a aplicação de fatores de peso por mínimos quadrados ponderados de regressão linear. O fator de ponderação de $1/X^2$ foi aplicado para o cortisol e de $1/Y^{1/2}$ para a testosterona. A **Figura 9** apresenta um cromatograma obtido por HPLC-DAD de uma amostra salivária artificial fortificada com 750 ng mL^{-1} dos analitos.

Figura 9 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD de uma amostra de saliva artificial fortificada com 750 ng mL^{-1} dos analitos



Fonte: Autoria própria (2023)

Tabela 6 - Valores analíticos de mérito obtidos através da metodologia proposta

Analito	Equação linear	Fator de ponderação	Faixa linear (ng mL ⁻¹)	R ²	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)
Cortisol	$y = 8.2074x + 167,2573$	1/X ²	15 - 750	0,9926	4,55	15
Testosterona	$y = 13.8505x + 365,8446$	1/Y ^{1/2}	15 - 750	0,9942	4,55	15

Fonte: Autoria própria (2023)

4.4.3 Precisão e Exatidão

Os dados de precisão intradia (repetibilidade), precisão interdia (reprodutibilidade) e de recuperação (exatidão) estão apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Resultados obtidos através das análises para a avaliação da exatidão e precisão intra e interdia do método desenvolvido

Analito	Precisão Intradia			Precisão Interdia			Recuperação		
	Baixa ^a	Média ^b	Alta ^c	Baixa ^a	Média ^b	Alta ^c	Baixa ^a	Média ^b	Alta ^c
	(% , n = 3)			(% , n = 15)			(% , n = 15)		
Cortisol	11,37	7,66	9,75	12,73	7,98	11,60	98,89	104,62	100,49
Testosterona	5,56	11,88	7,26	6,13	13,51	10,05	89,07	100,63	103,95

^a15 ng mL⁻¹; ^b100 ng mL⁻¹; ^c 750 ng mL⁻¹; Fonte: Autoria própria (2023).

A exatidão baseada nas recuperações relativas variou de 98,89% a 104,62% para o cortisol e de 89,07% a 103,95% para a testosterona. A precisão intradia variou de 5,65% a 11,88% e a precisão interdia variou de 6,13% a 13,51%. Os resultados foram considerados satisfatórios para ambos os analitos, com um desvio padrão relativo (RSD) ≤ 20% e uma precisão dentro da faixa de ± 20,0%.

4.4.4 Carryover

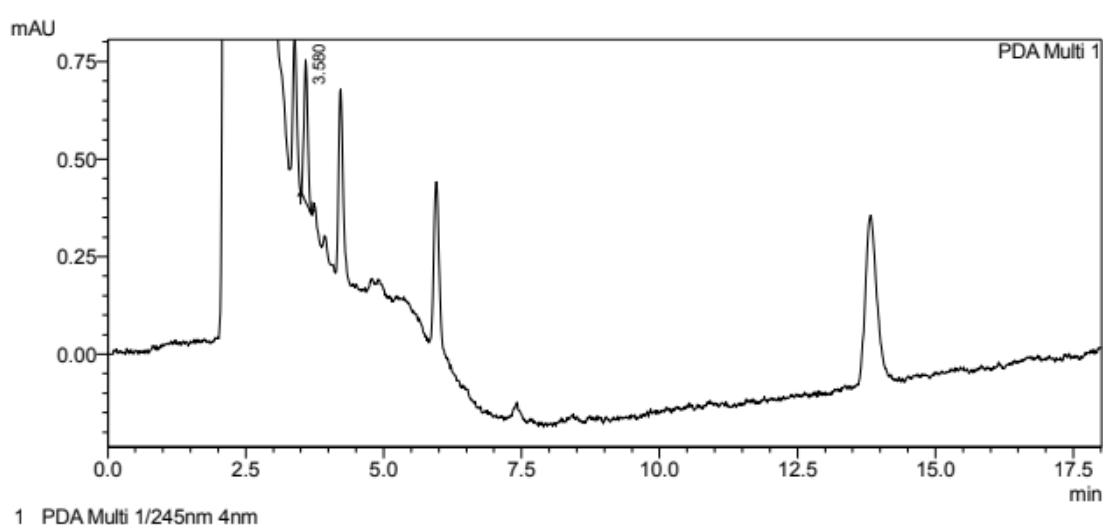
Não foi detectado nenhum efeito de *carryover* em seis cromatogramas obtidos após a injeção da amostra de extração do ponto de maior concentração de analitos da faixa linear.

4.4.5 Amostra real

A aplicabilidade do método de microextração HLLME foi investigada para determinar cortisol e testosterona em cinco amostras de fluido oral. Uma amostra apresentou resultado superior ao LOQ para testosterona ($152,1 \text{ ng mL}^{-1}$). O cortisol foi detectado em todas as amostras, variando de $63,6 \text{ ng mL}^{-1}$ a $182,4 \text{ ng mL}^{-1}$.

A **Figura 10** apresenta o cromatograma da análise de uma amostra de saliva real, com a detecção do cortisol. Os resultados demonstraram esse método como uma possível alternativa para o preparo de amostras de fluidos orais, auxiliando no diagnóstico de distúrbios hormonais associados aos níveis de cortisol e testosterona, como a SC e a SOP.

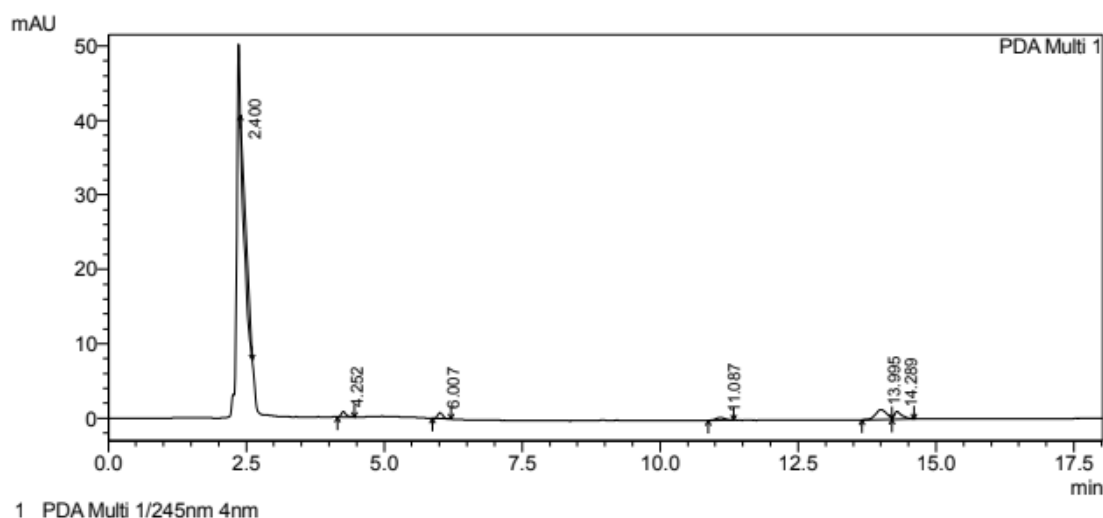
Figura 10 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD de uma amostra real de saliva



Fonte: Autoria própria (2023)

A **Figura 11** apresenta um cromatograma da aplicação da extração em uma amostra branca (amostra de água). A amostra branca foi preparada seguindo o mesmo procedimento otimizado para as amostras de fluido oral. O resultado obtido com essa análise contribui com a validade do método, já que nenhum outro analito foi detectado no tempo de retenção dos analitos de interesse.

Figura 11 - Cromatograma da extração de uma amostra branca por HPLC-DAD



Fonte: Autoria própria (2023)

Os imunoenaios permanecem sendo uma das análises mais comuns para a detecção de biomarcadores esteroides, devido à facilidade de técnica e pelo baixo custo. No entanto, esta análise apresenta uma seletividade limitada, devido à reatividade cruzada de anticorpos com compostos estruturalmente semelhantes (GIACOMELLO; SCHOLTEN; PARR, 2020).

É fundamental ressaltar a relevância da técnica proposta, que utiliza HPLC-DAD, como uma alternativa viável para a realização da determinação de biomarcadores esteroides. Essa técnica pode se apresentar mais seletiva em comparação com os imunoenaios, oferecendo resultados mais confiáveis. Além disso, a abordagem com HPLC-DAD é economicamente vantajosa em relação a outras metodologias mais sofisticadas, como o LC-MS/MS.

4.5 Resultados do AGREEp prep para o método proposto

O software AGREEp prep permite a avaliação de sustentabilidade do método proposto, de acordo com os princípios do Preparo de Amostras Verde, gerando uma métrica que considera dez aspectos envolvidos no preparo de amostras (apresentados na **Figura 3**). O valor resultante da métrica varia o resultado de 0 a 1, onde 1 representa o valor ótimo (PENA-PEREIRA *et al.*, 2022). Cada aspecto tem um peso diferente, variando de 1 a 5, podendo ser determinado pelo analista. Para estabelecer o peso, é fundamental levar em consideração a importância de cada aspecto do método proposto, comparando com outras metodologias propostas na literatura.

O pictograma obtido pela análise AGREEp prep para o método proposto é apresentado na **Figura 12**, assim como a pontuação resultante da análise (0,53). Para o método proposto, foram considerados de maior peso (5) os seguintes aspectos: geração de resíduos (zona 4) e o rendimento da análise (zona 6). Outros aspectos considerados relevantes são: sustentabilidade, renovabilidade e reutilização de materiais (zona 3), volume de amostra (zona 5) e consumo de energia por amostra (zona 8).

Figura 12 - Pictograma obtido a partir da análise do software AGREEp prep para o método proposto



Fonte: Autoria própria (2023)

Este método pode ser considerado sustentável de acordo com a ferramenta AGREEp^{rep}. A principal limitação do método proposto é o preparo da amostra (zona 1), pois esta etapa é realizada após a coleta e transporte da amostra. Em contrapartida, o método proposto caracteriza-se pelo baixo consumo de reagentes, pequeno número de etapas de preparação da amostra e simplicidade da técnica de microextração utilizada.

4.6 Comparação com outros estudos da literatura

A **Tabela 8** apresenta alguns trabalhos selecionados na revisão da literatura acerca de publicações que contemplassem o tema da análise de cortisol e/ou testosterona em amostras de fluido oral. Os estudos selecionados apresentam diferentes métodos de preparo de amostra, assim como diferentes técnicas de separação e detecção dos analitos.

O limite de detecção variou entre 0,098 – 4,55 ng mL⁻¹ para o cortisol e de 0,0031 – 4,55 ng mL⁻¹ para a testosterona. Já o limite de detecção variou entre 0,03 – 15 ng mL⁻¹ para ambos os analitos. Diferentes técnicas de preparo de amostra foram encontradas, como a microextração líquido-líquido dispersiva, microextração com sorvente compactado, extração líquido-líquido e microextração líquido-líquido em fase homogênea. As principais técnicas de detecção utilizadas foram LC-UV, HPLC-DAD e LC-MS/MS. Diferentes fases extratoras foram utilizadas como solventes eutéticos profundos, líquidos iônicos, sorventes e solventes orgânicos. O volume de amostra variou entre 50 – 1500 µL tempo de preparo de amostra variou entre 9 -170 minutos. O tempo de corrida das análises variou entre 5 - 36 minutos.

Técnicas de detecção mais robustas e sensíveis, como o LC-MS/MS e LC-ESI-MS/MS, permitem alcançar menores limites de detecção e de quantificação, assim como costumam apresentar um menor tempo de corrida. Por outro lado, estas técnicas são mais caras, e costumam envolver um maior tempo de preparo de amostras, sendo comum a necessidade de secagem e ressuspensão da amostra. A secagem permite uma maior concentração da amostra, auxiliando a alcançar menores limites de quantificação e detecção.

Dentre os estudos selecionados, a técnica de preparo de amostra encontrada foi a extração líquido-líquido, que apresentou entre 1 – 2 mL de fase extratora.

Dentre as outras técnicas de detecção frequentemente encontradas, temos a LC-UV e a HPLC-DAD. Estas técnicas costumam ser mais baratas que as descritas anteriormente. A faixa linear trabalhada costuma ser de maiores concentrações do que a técnica de LC-MS/MS assim como o tempo de corrida costuma ser maior. A etapa de secagem da amostra não costuma ser necessária, reduzindo o tempo de preparo, mas conseqüentemente torna mais difícil atingir baixos limites de detecção e quantificação. O tempo de preparo e tempo de corrida costumam variar de acordo com o método escolhido.

Observa-se um aumento no número de estudos que buscam a miniaturização das técnicas de extração. Com isso, identifica-se a busca por técnicas que permitam o uso de um menor volume de solventes e de amostra, mas que garantam a obtenção de resultados concisos. A técnica escolhida tanto para o preparo de amostra quanto de detecção varia de acordo com fatores como a disponibilidade de equipamentos e reagentes do laboratório, objetivo de análise e tempo disponível para realização da técnica.

O método proposto, apresenta um tempo de corrida semelhante a outros trabalhos que utilizam a técnica de detecção por HPLC-DAD. O tempo de extração foi inferior a 10 minutos e o volume de 100 µL de ácido decanóico demonstrou-se suficiente para a extração dos analitos na amostra. Os valores obtidos na faixa linear estão de acordo com a concentração encontrada na análise das amostras de saliva, demonstrando estar de acordo com a necessidade do método.

Tabela 8 - Comparação entre metodologias propostas na literatura para análises de cortisol e/ou testosterona em amostras de saliva

Analito	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	Faixa linear (ng/mL)	Técnica de preparo de amostra	Técnica de separação/ detecção	Volume de amostra (µL)	Fase extratora	Tempo de preparo de amostra (min) ^a	Etapa de secagem	Tempo de corrida (min)	Ref.
Cortisol Cortisona	0,76 0,65	2,5 2,2	3,6 - 72,5 3,6 - 72,1	DES	LC-UV	500	10 µL DES	170	-	36	1
Cortisol Cortisona	0,16 0,11	0,54 0,37	5 - 500	IL-DLLME	LC-UV/Vis	1000 - 1500	90 mg IL	19	-	6	2
Cortisol Cortisona Corticosterona	1,5	5	5 - 100	MEPS	HPLC-DAD	400	4 mg C8 (sorvente)	<10	sim	20	3
Cortisol Cortisona	-	0,039	0,00019 - 40	LLE	LC-MS/MS	50	2 mL diclorometano	27	sim	7,5	4
DHEA Progesterona testosterona	0,013	0,03	0,03 - 1,6 0,03 - 1-6 0,03 - 0,5	LLE	LC-MS/MS	1000	1 mL hexano/ acetato de etila (1:1)	93	sim	5	5
Melatonina Cortisol Testosterona	0,00095 0,098 0,0031	-	0,0035 - 0,135 0,18 - 32,6 3,06 - 179,6	LLE	LC-ESI-MS/MS	250	1 mL acetato de etila	90	sim	6,5	6
Cortisol Testosterona	4,55	15	15 - 750	HLLME	HPLC-DAD	1000	100 µL ácido decanóico	9	-	18	Este trabalho

^a tempo de secagem não considerado no tempo do preparo de amostra

1 - NISHIJO et al., 2021; 2 - ABUJABER et al., 2019; 3 - SARACINO et al., 2014; 4 - MEZZULLO et al., 2016; 5 - HAN et al., 2021; 6 - JENSEN et al., 2011;

DHEA - Dehidroepiandrosterona; DES - Solvente eutético profundo; IL-DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva com líquidos iônicos; MEPS - Microextração por sorvente compatado; LLE - Extração líquido-líquido; HLLME - Microextração líquido-líquido em fase homogênea;

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi proposto um método empregando SHS como solvente extrator na técnica de HLLME para a determinação de testosterona e cortisol em amostras de fluido oral. O método desenvolvido é uma alternativa aos métodos tradicionais que são laboriosos, caros e que empregam grandes volumes de solventes orgânicos tóxicos, os quais geralmente são empregados neste tipo de análise. Podemos também destacar a simplicidade e segurança do procedimento de extração proposto.

Os principais parâmetros que podem influenciar no procedimento de HLLME foram otimizados de forma multivariada, permitindo a obtenção da máxima eficiência de extração com um número reduzido de experimentos.

Os parâmetros analíticos de mérito foram determinados, e após, foram analisadas cinco amostras de fluido oral provenientes de voluntários do Grupo de Estudos em Preparo de Amostras e Cromatografia (GEPAC). Cabe ressaltar que, até o momento, não há trabalhos publicados utilizando esta técnica de extração para a determinação destas substâncias em fluido oral.

Sendo assim, o método proposto representa uma abordagem promissora e pioneira na área, apresentando potencial para ser amplamente utilizado em estudos relacionados ao diagnóstico de distúrbios hormonais e na pesquisa de biomarcadores em fluido oral. A utilização do HLLME representa um avanço significativo na análise de testosterona e cortisol, oferecendo uma alternativa eficiente e sustentável em comparação aos métodos convencionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI, K. *et al.* Development of in-situ produced CO₂ switchable fatty acid microextraction based solidification of floating organic droplet for quantification of morin and quercetin in tea, vegetable and fruit juice samples by HPLC. **Microchemical Journal**, v. 175, p. 107197, 2022.

ABUJABER, F. *et al.* Ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with LC-UV-Vis for the fast and simultaneous determination of cortisone and cortisol in human saliva samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 165, p. 141–146, 2019.

AHMAR, H. *et al.* Switchable Hydrophilicity Solvent-Based Homogenous Liquid–Liquid Microextraction (SHS-HLLME) Combined with GC-FID for the Quantification of Methadone and Tramadol. **Chromatographia**, v. 81, n. 7, p. 1063–1070, 2018.

ALSHANA, U. *et al.* Switchable-hydrophilicity solvent liquid-liquid microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 131, p. 116025, 2020.

ANTONELLI, G. *et al.* Salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS: validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing's syndrome. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 451, n. Pt B, p. 247–251, 2015.

BAKUSIC, J. *et al.* Study of temporal variability of salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS using a new atmospheric pressure ionization source. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 19313, 2019.

BARCELOS, L. F. *et al.* **Tratado de Análises Clínicas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2018.

BARROU, Z. *et al.* Overnight dexamethasone suppression test: comparison of plasma and salivary cortisol measurement for the screening of Cushing's syndrome. **European Journal of Endocrinology**, v. 134, n. 1, p. 93–96, 1996.

BAZEL, Y.; REČLO, M.; CHUBIRKA, Y. Switchable hydrophilicity solvents in analytical chemistry. Five years of achievements. **Microchemical Journal**, v. 157, p. 105115, 2020.

BORGES, K.; FIGUEIREDO, E.; QUEIROZ, M. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

BOSCARO, M.; ARNALDI, G. Approach to the patient with possible Cushing's syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 9, p. 3121–3131, 2009.

BRUNTON, L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 13. ed.: Artmed, 2018.

BULSARA, J. *et al.* A review: Brief insight into Polycystic Ovarian syndrome. **Endocrine and Metabolic Science**, v. 3, p. 100085, 2021.

BURTIS, C.; BRUNS, D.; ASHWOOD, E. **TIETZ: Fundamentos de Química Clínica**. 7. ed. Philadelphia: Saunders, 2016.

CADORE, E. *et al.* Correlations between serum and salivary hormonal concentrations in response to resistance exercise. **Journal of Sports Sciences**, v. 26, n. 10, p. 1067–1072, 2008.

CARASEK, E. *et al.* Sustainable green solvents for microextraction techniques: Recent developments and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1640, p. 461944, 2021.

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**, v. 19, p. e00060, 2018.

CASALS, G.; HANZU, F. A. Cortisol Measurements in Cushing's Syndrome: Immunoassay or Mass Spectrometry? **Annals of Laboratory Medicine**, v. 40, n. 4, p. 285–296, 2020.

CHOO, R. E.; HUESTIS, M. A. Oral fluid as a diagnostic tool. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 42, n. 11, p. 1273–1287, 2004.

CONSTANZO, L. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

CREWETHER, B. T. *et al.* Day-to-day coordination of the stress and reproductive axes: A continuous-time analysis of within-person testosterone and cortisol relationships in athletic and healthy men. **Physiology & Behavior**, v. 263, p. 114104, 2023.

CREWETHER, B. T. *et al.* Monitoring salivary testosterone and cortisol concentrations across an international sports competition: Data comparison using two enzyme immunoassays and two sample preparations. **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 354–358, 2013.

CUI, Y. *et al.* Developments in diagnostic applications of saliva in human organ diseases. **Medicine in Novel Technology and Devices**, v. 13, p. 100115, 2022.

DLUGASH, G.; SCHULTHEISS, O. C. Suitability of saliva stimulants for valid assessment of steroid hormones via radioimmunoassay. **Psychoneuroendocrinology**, v. 127, p. 105175, 2021.

DORTA, D. J., Organizador *et al.* **Toxicologia forense**. 2018. *E-book*. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/books/9788521213680>. Acesso em: 12 jan. 2021.

DRUGBANK. **Testosterone**. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00624>. Acesso em: 3 jul. 2023.

ERYTHROPEL, H. C. *et al.* The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles. **Green Chemistry**, v. 20, n. 9, p. 1929–1961, 2018.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. **Microchemical Journal**, v. 140, p. 176–182, 2018.

GIACOMELLO, G.; SCHOLTEN, A.; PARR, M. K. Current methods for stress marker detection in saliva. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 191, p. 113604, 2020.

GIUFFRIDA, G. *et al.* Global Cushing's disease epidemiology: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 45, n. 6, p. 1235–1246, 2022.

HALL, J. E. **Guyton & Hall Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2017. *E-book*. Disponível em: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsmib&AN=edsmib.00016768&lang=pt-br&site=eds-live&scope=site&authtype=ip,guest&custid=s5837110&groupid=main>. Acesso em: 17 mar. 2021.

HALL, J. E.; HALL, M. E. **Guyton & Hall Fundamentos de fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023.

HAN, L. *et al.* Noninvasive detection of human dehydroepiandrosterone, progesterone and testosterone using LC-MS/MS revealed effects of birth control pills/devices and body weight on ovulatory prediction. **Journal of Chromatography B**, v. 1174, p. 122716, 2021.

HAYES, L. D. *et al.* Critical difference applied to exercise-induced salivary testosterone and cortisol using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): distinguishing biological from statistical change. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 4, p. 991–996, 2014.

HELMERHORST, E. J.; DAWES, C.; OPPENHEIM, F. G. The Complexity of Oral Physiology and its Impact on Salivary Diagnostics. **Oral diseases**, v. 24, n. 3, p. 363–371, 2018.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 85, n. 2, p. 162–169, 2001.

INDER, W. J.; DIMESKI, G.; RUSSELL, A. Measurement of salivary cortisol in 2012 - laboratory techniques and clinical indications. **Clinical Endocrinology**, v. 77, n. 5, p. 645–651, 2012.

JENSEN, M. A. *et al.* Development and evaluation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of salivary melatonin, cortisol and testosterone. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 25, p. 2527–2532, 2011.

KANU, A. B. Recent developments in sample preparation techniques combined with high-performance liquid chromatography: A critical review. **Journal of Chromatography A**, v. 1654, p. 462444, 2021.

KOKOSA, J. M.; PRZYJAZNY, A. Green microextraction methodologies for sample preparations. **Green Analytical Chemistry**, v. 3, p. 100023, 2022.

LASARTE-ARAGONÉS, G. *et al.* Use of switchable hydrophilicity solvents for the homogeneous liquid–liquid microextraction of triazine herbicides from environmental water samples. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 6, p. 990–995, 2015.

LEBEDINETS, S. *et al.* Stir membrane liquid phase microextraction of tetracyclines using switchable hydrophilicity solvents followed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1615, p. 460743, 2020.

LEE, D. Y.; KIM, E.; CHOI, M. H. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. **BMB Reports**, v. 48, n. 4, p. 209–216, 2015.

LOOD, Y. *et al.* Determination of testosterone in serum and saliva by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: An accurate and sensitive method applied on clinical and forensic samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 195, p. 113823, 2021.

MERIB, J. *et al.* Magnetic ionic liquids as versatile extraction phases for the rapid determination of estrogens in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-diode array detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 19, p. 4689–4699, 2018.

MEZZULLO, M. *et al.* Validation of an LC–MS/MS salivary assay for glucocorticoid status assessment: Evaluation of the diurnal fluctuation of cortisol

and cortisone and of their association within and between serum and saliva. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 163, p. 103–112, 2016.

MÜNZKER, J. *et al.* High salivary testosterone-to-androstenedione ratio and adverse metabolic phenotypes in women with polycystic ovary syndrome. **Clinical Endocrinology**, v. 86, n. 4, p. 567–575, 2017.

MUSARURWA, H.; TAVENGWA, N. T. Homogenous liquid-liquid micro-extraction of pollutants in complex matrices. **Microchemical Journal**, v. 170, p. 106750, 2021.

NETO, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

NIEMAN, L. K. *et al.* The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 5, p. 1526–1540, 2008.

NISHIJO, N. *et al.* Deep eutectic solvent extraction of cortisol and cortisone from human saliva followed by LC-UV analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1179, p. 122828, 2021.

OCAÑA-GONZÁLEZ, J. A. *et al.* New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 905, p. 8–23, 2016.

OENNING, A. *et al.* A green and low-cost method employing switchable hydrophilicity solvent for the simultaneous determination of antidepressants in human urine by gas chromatography - mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1143, p. 122069, 2020.

PALACIOS, G. *et al.* Biomarkers of physical activity and exercise. **Nutricion Hospitalaria**, v. 31 Suppl 3, p. 237–244, 2015.

PALASAK, J. *et al.* Preconcentration of triazole fungicides using effervescent assisted switchable hydrophilicity solvent-based microextraction prior to high-

performance liquid chromatographic analysis. **Microchemical Journal**, v. 182, p. 107882, 2022.

PENA-PEREIRA, F. *et al.* A Tutorial on AGREEprep an Analytical Greenness Metric for Sample Preparation. **Advances in Sample Preparation**, v. 3, p. 100025, 2022.

PEROGAMVROS, I.; RAY, D. W.; TRAINER, P. J. Regulation of cortisol bioavailability--effects on hormone measurement and action. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 8, n. 12, p. 717–727, 2012.

PIVONELLO, R. *et al.* The Treatment of Cushing's Disease. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 4, p. 385–486, 2015.

PRAGST, F.; HERZLER, M.; ERXLEBEN, B.-T. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1325–1340, 2004.

SAITO-ABE, M. *et al.* Reference values for salivary cortisol in healthy young infants by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Pediatrics International**, v. 62, n. 7, p. 785–788, 2020.

SARACINO, M. A. *et al.* Multi-matrix assay of cortisol, cortisone and corticosterone using a combined MEPS-HPLC procedure. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 643–648, 2014.

SCHEID, C. *et al.* Application of Homogeneous Liquid–Liquid Microextraction With Switchable Hydrophilicity Solvents to the Determination of MDMA, MDA and NBOMes in Postmortem Blood Samples. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 776–782, 2022.

SHAHVANDI, S. K.; BANITABA, M. H.; AHMAR, H. Development of a new pH assisted homogeneous liquid-liquid microextraction by a solvent with switchable hydrophilicity: Application for GC-MS determination of methamphetamine. **Talanta**, v. 184, p. 103–108, 2018.

SIMONEAU, C. *et al.* Validation of methodologies for the release of diisononylphthalate (DINP) in saliva simulant from toys. 2001. Disponível em:

<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/1512daae-a4c1-11e7-837e-01aa75ed71a1>. Acesso em: 27 mar. 2023.

SINGH, S. *et al.* Polycystic Ovary Syndrome: Etiology, Current Management, and Future Therapeutics. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 4, p. 1454, 2023.

SIRMANS, S. M.; PATE, K. A. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 1–13, 2013.

SKOOG; HOLLER; NIEMAN. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. São Paulo: Editora Bookman, 2002.

SPIETELUN, A. *et al.* Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry. **Journal of Chromatography A**, v. 1321, p. 1–13, 2013.

WANG, X. *et al.* A novel switchable solvent liquid-phase microextraction technique based on the solidification of floating organic droplets: HPLC-FLD analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon monohydroxy metabolites in urine samples. **New Journal of Chemistry**, v. 44, n. 7, p. 3038–3044, 2020.

WANG, W. *et al.* Hair cortisone level is associated with PTSD's dysphoric arousal symptoms in highly traumatized Chinese females. **Journal of Affective Disorders**, v. 182, p. 18–22, 2015.

WELKER, K. M. *et al.* A comparison of salivary testosterone measurement using immunoassays and tandem mass spectrometry. **Psychoneuroendocrinology**, v. 71, p. 180–188, 2016.

XU, F. *et al.* Development of a Liquid–Liquid Microextraction Method Based on a Switchable Hydrophilicity Solvent for the Simultaneous Determination of 11 Drugs in Urine by GC–MS. **Chromatographia**, v. 81, n. 12, p. 1695–1703, 2018.