



Otimização das condições experimentais para a extração de cortisol e testosterona utilizando solventes de hidrofiliabilidade comutável

DALANHOL, Carolina^{1*}; SCHEID, Camila¹; MERIB, Josias¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS.

* Autor correspondente: cdalanhol@gmail.com

Introdução: Hormônios são produzidos e liberados pelo organismo em resposta a necessidades fisiológicas e estímulos externos. Os níveis de cortisol e testosterona são frequentemente estudados na fisiologia do exercício, podendo ser determinado pela análise de fluido oral. Por ser uma matriz complexa, necessita de um preparo de amostra. A otimização de métodos analíticos busca a obtenção das melhores respostas instrumentais. Para isso, pode-se utilizar ferramentas quimiométricas para estabelecer a relevância e significância estatística dos fatores estudados. Os solventes de hidrofiliabilidade comutável (SHS) apresentam a propriedade de alternar a miscibilidade entre a forma hidrofílica e hidrofóbica, através de deslocamentos de equilíbrio químico.

Objetivo: Aplicar os modelos quimiométricos no desenvolvimento e a validação de uma metodologia analítica para a determinação de cortisol e testosterona utilizando microextração em fase líquida homogênea com solventes de hidrofiliabilidade comutável (SHS).

Método: A otimização do preparo de amostras de fluido oral para análise de cortisol e testosterona foi realizada através da utilização do planejamento fatorial fracionário (2^{5-1}) no qual as variáveis estudadas foram: volume de Na_2CO_3 2 mol/L (200-600 uL), volume de ácido decanoico 62,5 mg/mL (100-200 uL), volume de H_2SO_4 3 mol/L (400-800uL), volume de amostra (500-1000uL) e tempo no banho de gelo (1-4min). A extração foi realizada em amostra simulada de fluido oral, fortificada com 500 ng/mL dos padrões. As amostras foram preparadas na seguinte sequência: adição da amostra, adição do SHS, adição do Na_2CO_3 , adição do H_2SO_4 . Repouso por 1 minuto.

Imersão da amostra no banho de gelo. Extração da fase líquida com o auxílio de uma seringa. Ressuspensão da fase sólida em 40 uL de ACN.

Com as variáveis significativas mediante o planejamento fatorial, na sequência foi realizado um planejamento do composto central (CCD), no qual foram estudadas nos seguintes níveis: Na₂CO₃ (166;200;250;300 e 334 uL), volume de amostra (916; 950; 1000; 1050 e 1084 uL) e H₂SO₄ (632; 700; 800; 900; e 968 uL). A metodologia de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) foi previamente otimizada para os analitos, utilizou-se o fluxo isocrático de 1,0 mL/min com acetonitrila 65% como fase móvel e separação em uma coluna C18. O tempo total de análise foi de 8 minutos.

Resultados: Os resultados obtidos através da análise dos resultados do planejamento fatorial fracionário resultaram em uma análise ANOVA com $r^2 = 0,92502$ indicando que o modelo encontra-se adequado e indicou as variáveis volume de Na₂CO₃, volume de H₂SO₄ e volume de amostra como significativas. Estes fatores foram aplicados no planejamento do composto central, que resultou em uma superfície de resposta que foi utilizada para definir os volumes de reagentes a serem utilizados no preparo de amostra.

Conclusão: A utilização de análises multivariadas para o estudo do preparo de amostra para a extração cortisol e testosterona em amostras de fluido oral permitiu a análise da melhor condição para a extração, com um menor número de experimentos. Os resultados demonstraram que o modelo escolhido se adequa com as variáveis estudadas, garantindo resultados confiáveis.

Palavras-chave: preparo de amostra, solvente de hidrofiliabilidade comutável, fluido oral