

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**Márcia Meister Barichello**

**DETERMINAÇÃO DE HPAs PRESENTES NA NUTRIÇÃO  
PARENTERAL E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE NEONATOS  
ATRAVÉS DA PRESENÇA DO 1-HIDROXIPIRENO NA URINA**

**Santa Maria, RS  
2016**

**Márcia Meister Barichello**

**DETERMINAÇÃO DE HPAs PRESENTES NA NUTRIÇÃO  
PARENTERAL E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE NEONATOS  
ATRAVÉS DA PRESENÇA DO 1-HIDROXIPIRENO NA URINA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Borher do Nascimento

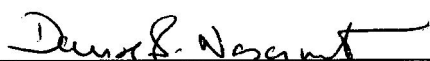
Santa Maria, RS  
2016

Márcia Meister Barichello

**DETERMINAÇÃO DE HPAs PRESENTES NA NUTRIÇÃO PARENTERAL E  
AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE NEONATOS ATRAVÉS DA PRESENÇA DO 1-  
HIDROXIPIRENO NA URINA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 19 de outubro de 2016:**



**Denise Bohrer do Nascimento, Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Presidente/ Orientadora)



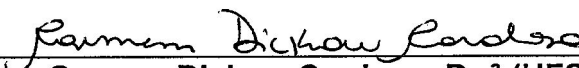
**Flávia Valladão Thiesen, Dr.<sup>a</sup> (PUCRS)**



**Helena Maria Tannhauser Barros, Dr.<sup>a</sup> (UFCSPA)**



**Simone NoreMBERG Kunz, Dr.<sup>a</sup> (UNIPAMPA)**



**Carmen Dickow Cardoso, Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2016

## AGRADECIMENTOS

- a Deus pela permissão de poder voltar ao meio acadêmico depois de tanto tempo afastada.

- a prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Bohrer do Nascimento pela oportunidade, sua valiosa orientação, paciência e por ter acreditado em mim.

- as professoras Dr.<sup>a</sup> Helena Maria Tannhauser Barros, Dr.<sup>a</sup> Flávia Valladão Thiesen, Dr.<sup>a</sup> Simone NoreMBERG Kunz e Dr.<sup>a</sup> Carmen..... pelas colaborações na qualificação e defesa da tese.

- ao professor Dr. Marcelo Barcellos da Rosa pela colaboração na qualificação da tese e incentivo.

- a toda equipe de enfermagem da UTI neonatal, da maternidade e a equipe de farmacêuticos da Farmácia Hospitalar do Hospital Universitário de Santa Maria pelo auxílio na coleta das amostras, pela disponibilidade e compreensão, pois sem elas este trabalho não teria acontecido.

- as minhas amigas Fernanda Pires, Patrícia Mattiazzi, Rejane Cargnin, Diana Muratt, Carolina Dolwitsch, Valéria Dal Prá, Mariana Bortoluzzi e Sandra Ribeiro pelo incentivo, auxílio, aprendizado, confiança e companheirismo, principalmente nas horas em que tudo parecia dar errado.

- ao Luiz Ferraz, Henrique Faccin, Roberta Fabrício Loose, Marcela Schmidt, Lucas Bressan e Luciana Gobo por estarem sempre dispostos a contribuir e auxiliar.

- aos professores do LACHEM pela acolhida, convivência e aprendizado.

- aos colegas do LACHEM pela convivência e aprendizado.

- ao meu esposo Rosemar e meus filhos Lucas e Júlia por entenderem meus longos momentos de ausência, pelo incentivo constante, auxílio e por acreditarem em mim.

- aos meus pais, *in memoriam*, Gerson e Célia, pela criação e amor.

- a CAPES pela bolsa de doutorado.

## RESUMO

### **DETERMINAÇÃO DE HPAs PRESENTES NA NUTRIÇÃO PARENTERAL E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE NEONATOS ATRAVÉS DA PRESENÇA DO 1-HIDROXIPIRENO NA URINA**

AUTORA: Márcia Meister Barichello  
ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Bohrer do Nascimento

O negro de fumo, que possui hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) adsorvidos em sua superfície, é utilizado na composição de borrachas de uso farmacêutico usadas em medicamentos injetáveis e formulações parenterais como soluções de aminoácidos e emulsões lipídicas. Neste estudo avaliou-se a contaminação por HPAs em preparações parenterais administradas a recém-nascidos (RN). Soluções comerciais usadas na composição das bolsas de nutrição parenteral (NP) bem como o conteúdo das próprias bolsas administradas a um grupo de dez RN durante o período de internação na UTI neonatal foram analisados. Foi também analisado o metabólito 1-hidroxipireno na urina desses RN, bem como de um grupo de RN que não estava recebendo NP (grupo controle). Os métodos para determinação dos HPAs e do 1-hidroxipireno por cromatografia líquida de alta eficiência usando detecção por arranjo de fotodiodos e fluorescência, respectivamente, foram desenvolvidos e validados para as amostras do estudo. Os HPAs foram extraídos das amostras utilizando uma coluna de polietileno. Nas amostras de urina, a extração do metabólito foi realizada em um cartucho C-18 após hidrólise enzimática do mesmo. Os resultados mostraram contaminação por HPAs em 56 das 59 amostras analisadas. O total de HPAs variou de 0,013 mg/L a 10,562 mg/L. O pireno esteve presente em 50 das 59 amostras. A análise das urinas revelou a presença do metabólito 1-hidroxipireno para os bebês que receberam NP, com concentração média entre 0,039 µg/L e 0,544 µg/L (0,03 e 0,877 µmol/mol de creatinina). Na urina dos bebês controle o metabólito não foi detectado. Considerando a toxicidade dos HPAs e o grande volume usualmente administrado na NP, os resultados encontrados nesse estudo são preocupantes. A presença de HPAs na NP administrada a recém-nascidos é ainda mais relevante, dado que são os mais vulneráveis a efeitos adversos.

Palavras-chave: HPAs. Nutrição parenteral. 1-hidroxipireno. Recém-nascido. Cromatografia líquida de alta eficiência. Validação.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF EXPOSURE TO PAHs PRESENT IN PARENTERAL NUTRITION ADMINISTERED TO NEWBORNS THROUGH THE PRESENCE OF 1-HYDROXYPYRENE IN URINE

AUTHOR: MÁRCIA MEISTER BARICHELO  
ADVISOR: DENISE BOHRER DO NASCIMENTO

Carbon black, which has polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) adsorbed on its surface, is used in the composition of rubber for pharmaceutical used in injectable drugs and parenteral formulations such as amino acid solutions and lipid emulsions. In this study, the contamination of parenteral preparations administered to newborn infants (NB) by PAHs was evaluated. Commercial solutions used in the composition of parenteral nutrition bags (NP) and the content of the bags administered to a group of ten RN during their period in the neonatal intensive care unit was analyzed. It was also analyzed the metabolite 1-hydroxypyrene in the urine of these infants, as well as in the urine of a group of infants who were not receiving NP (control group). Methods for determination of PAHs and 1-hydroxypyrene by high performance liquid chromatography using detection with DAD and fluorescence, respectively, were developed and validated for the samples of the study. PAHs were extracted from the samples using a polyethylene column. In the urine samples, extraction of metabolite was performed on a C-18 cartridge after its enzymatic hydrolysis. The results showed PAHs contamination in 56 out of 59 samples. Total PAHs concentration ranged from 0.013 mg/L to 10.562 mg/L. Pyrene was present in 50 out of 59 samples. The analysis revealed the presence of the metabolite 1-hydroxypyrene in the urine of babies who received NP, with concentration ranging from 0.039 mg/L to 0.544 mg/L (0.03 and 0.877 mmol/mol creatinine). In the urine of the control group the metabolite was not detected. Considering the toxicity of PAHs and the large volume usually administered in the NP, the results found in this study are worrying. The presence of PAHs in NP administered to newborns is even more important because they are the most vulnerable to adverse effects.

Keywords: PAHs. Parenteral Nutrition. 1-Hydroxypyrene. Newborn. HPLC. Validation.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Níveis de HPAs encontrados em amostras ambientais e biológicas .....	16
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas de alguns HPAs .....	17
Tabela 3 – Dados relativos aos efeitos carcinogênicos, genotóxicos e mutagênicos de alguns HPAs .....	20
Tabela 4 – Classificação dos HPAs estudados quanto a sua carcinogenicidade (IARC), carcinogenicidade e ocorrência (EPA) .....	21
Tabela 5 – Parâmetros cromatográficos para análise dos HPAs.....	30
Tabela 6 – Quantidade de massa pesada de cada padrão de HPA sólido utilizado para preparar as soluções estoque, volume final e concentração das soluções estoque .....	31
Tabela 7 – Quantidade e concentração de cada ampola de padrão de HPA líquido utilizada para preparar as soluções estoque, volume final e concentração das soluções estoque .....	31
Tabela 8 – Concentração dos HPAs (mg/L) em estudo presentes nas soluções usadas para construção das curvas analíticas .....	33
Tabela 9 – Condições cromatográficas para determinação do 1-hidróxipireno .....	39
Tabela 10 – Características dos recém-nascidos selecionados para este trabalho ..	43
Tabela 11 – Parâmetros cromatográficos dos métodos encontrados na literatura para determinação dos HPAs .....	45
Tabela 12 - Perfil do gradiente de fase móvel e de fluxo testado na otimização do método para determinação dos HPAs por CLAE usando fase reversa .....	46
Tabela 13 – Perfil do gradiente de fase móvel e de fluxo do método utilizado para realizar as análises .....	48
Tabela 14 – Faixa de trabalho, equação da reta e valores de r para os HPAs estudados.....	51
Tabela 15 – Precisão intradia do método para determinação dos HPAs estudados utilizando CLAE em fase reversa e detecção por DAD – resultados em (C.V.%) (n=9) .....	52
Tabela 16 – Limites de detecção e quantificação dos HPAs estudados.....	54
Tabela 17 – Fator de retenção (k) para os HPAs estudados .....	57
Tabela 18 – Denominação das amostras de soluções de aminoácidos e emulsões lipídicas utilizadas na preparação das nutrições parenterais.....	59
Tabela 19 – Concentração (em mg/L) de HPA encontrados nas amostras de soluções de aminoácidos analisadas por lotes e datas de utilização na preparação das nutrições parenterais.....	60
Tabela 20 - Concentração (em mg/L) de HPA encontrados nas amostras de emulsões lipídicas analisadas por lotes e datas de utilização na preparação das nutrições parenterais.....	61
Tabela 21 – Concentração (em mg/L) de HPAs encontrados nas amostras dos demais componentes utilizados nas preparações das nutrições parenterais .....	62
Tabela 22 – Concentração de HPAs (mg/L) encontrados nas nutrições parenterais administradas aos recém-nascidos 01, 04 e 07 nos dias 31.01.2015, 15.02.2015 e 16.02.2015, respectivamente.....	63

Tabela 23 – Concentração dos HPAs (mg/L) encontrados nas bolsas de nutrição parenteral administradas ao recém-nascido 01 .....	66
Tabela 24 - Concentração dos HPAs (mg/L) encontrados nas bolsas de nutrição parenteral administradas ao recém-nascido 02 .....	67
Tabela 25 - Concentração dos HPAs (mg/L) encontrados nas bolsas de nutrição parenteral administradas ao recém-nascido 03 .....	68
Tabela 26 - Concentração dos HPAs (mg/L) encontrados nas bolsas de nutrição parenteral administradas ao recém-nascido 04 .....	69
Tabela 27 - Concentração dos HPAs (mg/L) encontrados nas bolsas de nutrição parenteral administradas ao recém-nascido 05 .....	70
Tabela 28 - Concentração dos HPAs (mg/L) encontrados nas bolsas de nutrição parenteral administradas ao recém-nascido 06 .....	71
Tabela 29 - Concentração dos HPAs (mg/L) encontrados nas bolsas de nutrição parenteral administradas ao recém-nascido 07 .....	72
Tabela 30 - Concentração dos HPAs (mg/L) encontrados nas bolsas de nutrição parenteral administradas ao recém-nascido 08 .....	73
Tabela 31 - Concentração dos HPAs (mg/L) encontrados nas bolsas de nutrição parenteral administradas ao recém-nascido 09 .....	74
Tabela 32 - Concentração dos HPAs (mg/L) encontrados nas bolsas de nutrição parenteral administradas ao recém-nascido 10 .....	75
Tabela 33 – Faixa de trabalho, equação da reta e valor de r para o 1-hidróxipireno.....	82
Tabela 34 – Precisão intradia do método para determinação do 1-hidróxipireno (n=9) .....	83
Tabela 35 – Precisão intermediária do método para determinação do 1-hidróxipireno (n=9).....	83
Tabela 36 – Concentrações do metabólito 1-hidróxipireno encontradas nas amostras de urina dos recém-nascidos selecionados para o estudo .....	86



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química de alguns HPAs .....	15
Figura 2 – Amostras utilizadas para este estudo .....	29
Figura 3 – Representação do esquema de diluições sucessivas a partir da solução estoque.....	33
Figura 4 – Cromatograma da separação dos HPAs estudados utilizando o perfil de gradiente de fase móvel e de fluxo descritos na tabela 12 .....	46
Figura 5 – Cromatograma de separação dos HPAs pelo método adaptado utilizando o perfil de gradiente de fase móvel e de fluxo descritos na tabela 13 .....	48
Figura 6 – Cromatograma da separação dos compostos obtido pelo canal 1 (254 nm) .....	49
Figura 7 – Cromatograma da separação dos compostos obtido pelo canal 2 (225 nm) .....	50
Figura 8 – Precisão intermediária do método para determinação dos HPAs estudados utilizando CLAE em fase reversa e detecção por DAD .....	53
Figura 9 – Recuperação (%), na amostra, dos HPAs estudados (n=9) utilizando CLAE em fase reversa e detecção por DAD .....	55
Figura 10 – Resultado do teste de robustez para o método de determinação dos HPAs por CLAE em fase reversa e detecção por DAD .....	56
Figura 11 – Cromatograma de uma amostra de nutrição parenteral analisada pelo canal 1.....	64
Figura 12 – Cromatograma de uma amostra de nutrição parenteral analisada pelo canal 2.....	65
Figura 13 – Comparação entre a concentração calculada do total de HPAs e a concentração total determinada experimentalmente .....	77
Figura 14 – Concentração dos HPAs (mg/L) encontrados na bolsa de nutrição parenteral preparada, após 48h de armazenamento.....	78
Figura 15 – Concentração (mg/L) dos HPAs encontrados na bolsa contendo água ultrapura após 48 h de armazenamento .....	79
Figura 16 – Recuperação dos HPAs na bolsa com água ultrapura após 48 h de armazenamento e dos HPAs extraídos pela ação da acetona .....	80
Figura 17 – Concentração dos HPAs na bolsa de NP e na bolsa com água após 48 h de armazenamento em comparação com a concentração de HPAs adicionada.....	81
Figura 18 – Cromatograma do Padrão do 1-hidróxipireno (1-OHP), na concentração de 10 µg/L, utilizando CLAE em fase reversa e detecção por fluorescência .....	82
Figura 19 – Cromatograma de uma amostra de urina após extração segundo JONGENELEN (1987) utilizando CLAE em fase reversa e detecção por fluorescência .....	84
Figura 20 – Cromatograma de uma amostra de urina após extração e clean-up segundo MARDER (2010) utilizando CLAE em fase reversa e detecção por fluorescência.....	85
Figura 21 – Relação entre o total de HPAs (mg) encontrado nas bolsas de nutrição parenteral e o valor do 1-hidroxipireno encontrado nas urinas dos RN..	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

HPA – Hidrocarboneto Policíclico Aromático

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

HUSM – Hospital Universitário de Santa Maria

IARC – International Agency for Research on Cancer

EPA – Environmental Protection Agency

FDA – Food and Drug Administration

C.E. – Comunidade Européia

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

NP – Nutrição Parenteral

RN – Recém-Nascido

PTFE – Politetrafluoretileno

DAD – Diode Array Detection

EVA – Etil Vinil Acetato

SPE – Solid Phase Extraction

E.C. – European Commission

ICH – International Conference Harmonization

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA – Análise de Variância

$\lambda$  - comprimento de onda

r – coeficiente de correlação

RSD – Relative Standard Deviation

CV – Coeficiente de Variação

L.D. – Limite de Detecção

L.Q. – Limite de Quantificação

1-OHP – 1-hidroxipireno

## LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Exemplos de espectros obtidos no detector UV-DAD dos HPAs presentes nas amostras analisadas .....	101
Apêndice B – Composição das bolsas de nutrição parenteral administradas aos recém-nascidos selecionados para o estudo.....	103
Apêndice C – Composição da nutrição parenteral preparada em nosso laboratório e utilizada para o teste de adsorção dos HPAs .....	113
Apêndice D – Concentração dos HPAs utilizados para preparar o mix do teste de adsorção .....	114
Apêndice E – Protocolo para coleta de dados .....	115
Apêndice F – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	116
Apêndice G – Cromatograma da figura 20 em escala logarítmica.....	119

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	15
2.1	HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	15
2.2	TOXICIDADE DOS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	19
2.3	PRESENÇA DOS HPAS EM TAMPAS DE BORRACHA PARA PRODUTOS PARENTERAIS	22
2.4	PRESENÇA DOS HPAS EM PREPARAÇÕES E NUTRIÇÕES PARENTERAIS	23
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	26
3.1	GERAL	26
3.1	ESPECÍFICOS	26
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	27
4.1	PADRÕES UTILIZADOS	27
4.2	REAGENTES E SOLUÇÕES	27
4.3	INSTRUMENTAÇÃO	28
4.4	AQUISIÇÃO DE AMOSTRAS	29
4.5	MÉTODOS	29
<b>4.5.1</b>	<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos para determinação dos HPAs</b>	29
4.5.1.1	<i>Preparo das soluções analíticas</i>	30
4.5.1.2	<i>Validação do método</i>	32
4.5.1.2.1	Seletividade	32
4.5.1.2.2	Linearidade	32
4.5.1.2.3	Repetitividade	34
4.5.1.2.4	Precisão intermediária	34
4.5.1.2.5	Limite de detecção e de quantificação	34
4.5.1.2.6	Exatidão	35
4.5.1.2.7	Robustez	35
4.5.1.2.8	Conformidade do sistema	36
4.5.1.3	<i>Preparo das amostras de nutrições parenterais e formulações parenterais comerciais para determinação dos HPAs</i>	36
4.5.1.3.1	Extração dos HPAs das nutrições parenterais e formulações parenterais comerciais	37
4.5.1.3.2	Quantificação das amostras de nutrições parenterais e formulações parenterais comerciais	37
4.5.1.4	<i>Teste de adsorção dos HPAs nas paredes das bolsas de EVA utilizadas para envase das nutrições parenterais</i>	38
<b>4.5.2</b>	<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por fluorescência para determinação do metabólito 1-hidróxipireno</b>	38
4.5.2.1	<i>Preparo das soluções analíticas</i>	39
4.5.2.2	<i>Otimização do método cromatográfico</i>	39
4.5.2.2.1	Linearidade	40
4.5.2.2.2	Repetitividade	40
4.5.2.2.3	Precisão Intermediária	40

4.5.2.2.4	Limite de detecção e limite de quantificação.....	40
4.5.2.3	<i>Preparo das amostras de urina para determinação do 1-hidróxipireno</i> .....	41
4.5.2.3.1	Extração do 1-hidróxipireno da urina .....	41
4.5.2.3.2	Quantificação do 1-hidróxipireno em amostras de urina.....	42
4.6	SELEÇÃO DOS PACIENTES .....	42
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
5.1	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DOS HPAS EM NUTRIÇÕES PARENTERAIS E FORMULAÇÕES PARENTERAIS COMERCIAIS.....	45
5.1.1	<b>Otimização do sistema cromatográfico</b> .....	45
5.1.2	<b>Seletividade</b> .....	49
5.1.3	<b>Linearidade do método</b> .....	50
5.1.4	<b>Precisão</b> .....	52
5.1.3.1	<i>Repetitividade</i> .....	52
5.1.3.2	<i>Precisão intermediária</i> .....	53
5.1.5	<b>Limites de detecção e quantificação</b> .....	54
5.1.6	<b>Exatidão</b> .....	55
5.1.7	<b>Robustez</b> .....	56
5.1.8	<b>Conformidade do sistema</b> .....	57
5.2	ANÁLISE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS PARA NUTRIÇÕES PARENTERAIS .....	58
5.3	ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE NUTRIÇÃO PARENTERAL PREPARADAS NA FARMÁCIA HOSPITALAR DO HUSM E QUE FORAM ADMINISTRADAS AOS RECÉM-NASCIDOS DA UTI NEONATAL .....	64
5.4	TESTE DE ADSORÇÃO DOS HPAS NAS PAREDES DAS BOLSAS DE EVA UTILIZADAS PARA ENVASE DAS NUTRIÇÕES PARENTERAIS ....	78
5.5	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO 1-HIDRÓXIPIRENO EM AMOSTRAS DE URINA .....	81
5.5.1	<b>Linearidade</b> .....	82
5.5.2	<b>Repetitividade</b> .....	83
5.5.3	<b>Precisão intermediária</b> .....	83
5.5.4	<b>Limite de detecção e quantificação</b> .....	84
5.5.5	<b>Extração do 1-hidróxipireno das amostras de urina</b> .....	84
5.5.6	<b>Quantificação do 1-hidróxipireno nas amostras de urina</b> .....	85
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>91</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>93</b>
	<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>101</b>
	<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>103</b>
	<b>APÊNDICE C</b> .....	<b>113</b>
	<b>APÊNDICE D</b> .....	<b>114</b>
	<b>APÊNDICE E</b> .....	<b>115</b>
	<b>APÊNDICE F</b> .....	<b>116</b>
	<b>APÊNDICE G</b> .....	<b>119</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem uma grande classe de compostos orgânicos contendo dois ou mais anéis aromáticos fundidos, derivados da combustão incompleta de material orgânico incluindo carvão, óleo, gás, madeira e outras substâncias orgânicas como, por exemplo, tabaco (FARHADIAN et al., 2011).

Os HPAs são importantes contaminantes ambientais e têm despertado interesse crescente no cenário internacional pelo fato de muitos deles serem genotóxicos e prováveis carcinogênicos humanos (IARC, 1983). Estas substâncias, quando absorvidas pelo organismo, são rapidamente distribuídas e, após metabolização, são eliminados pelas fezes e urina (ANGERER; SCHALLER, 1991; IPCS, 1998).

O negro de fumo, também conhecido como negro de carbono (do inglês “carbon black”) é constituído por partículas finamente divididas, obtidas pela decomposição térmica (pirólise) ou combustão parcial de hidrocarbonetos gasosos ou líquidos. Mais de 90% da produção mundial de negro de fumo é usado na fabricação de borrachas, enquanto que a proporção restante é usada em tintas para impressão, tintas, lacas (verniz) e aditivos para indústria (WELLMAN et al., 2006; LING et al., 2011; NEGHAB et al., 2011).

Muitos tipos de negro de fumo possuem pequena quantidade (isto é, < 1%) de compostos orgânicos, incluindo os HPAs, adsorvidos em sua superfície (BAAN et al., 2006). A International Agency for Research on Cancer (IARC, 1996) concluiu que o negro de fumo é possivelmente carcinogênico para humanos.

O negro de fumo está presente na composição das borrachas para uso farmacêutico como preenchimento (carga) e como pigmento. Estas borrachas são amplamente utilizadas em tampas para medicamentos injetáveis, formulações parenterais e êmbolos de seringas (GIL, 2006; REMINGTON, 2012).

O limite estabelecido do total de HPAs no negro de fumo utilizado na composição de borrachas de uso farmacêutico, segundo o Food and Drug Administration (2006), é 0,5 mg/kg e para benzo(a)pireno 5 µg/kg. Já a Comunidade Européia (2007) especifica 250 µg/kg medidos como benzo(a)pireno.

Apesar da existência dessas regulamentações, monografias farmacopéicas mundiais não determinam limites para os aditivos das borrachas, incluindo o negro de fumo, e nem sobre a presença de HPAs. Os testes se limitam a mostrar conteúdo de enxofre, sulfetos voláteis, extraíveis, zinco, amônio e metais pesados (BOHRER, 2013).

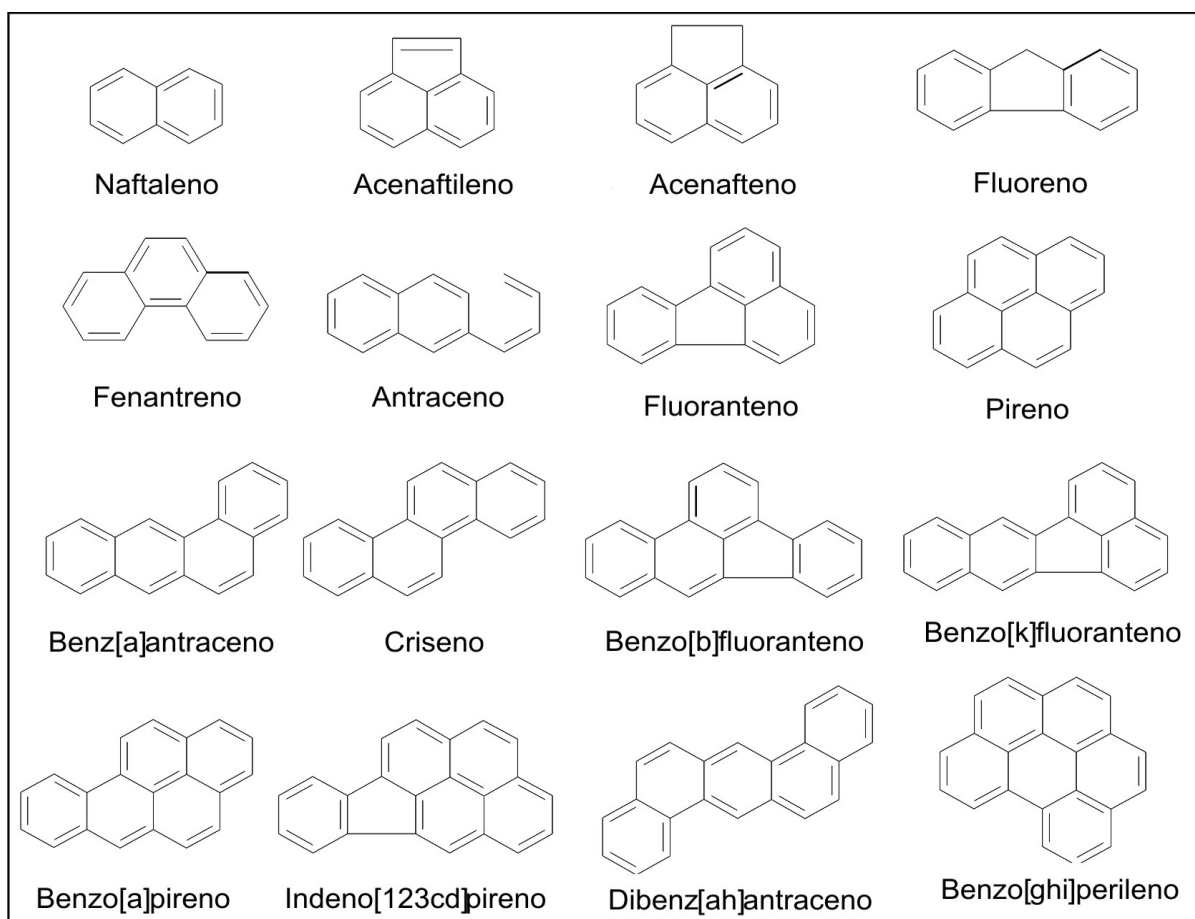
Considerando a possível presença de HPAs nas borrachas para uso farmacêutico e considerando a sua ampla utilização em tampas de recipientes para preparações parenterais, o presente trabalho foi dirigido `a avaliação da contaminação por HPAs em formulações e nutrições parenterais administradas em recém-nascidos da UTI neonatal do Hospital Universitário de Santa Maria, bem como investigar a presença do metabólito 1-hidroxipireno na urina destes pacientes.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem um grande classe de compostos que possuem dois ou mais anéis benzênicos fundidos, constituídos exclusivamente por carbono e hidrogênio (Figura 1) e são derivados da combustão incompleta de matéria orgânica (MARCÉ; BORRULL, 2000; FARHADIAN et al., 2011; DOST, IDELI, 2012).

Figura 1 – Estrutura química de alguns HPAs



HPAs e outros poluentes atmosféricos são produzidos através da queima de combustíveis como petróleo e seus derivados, carvão e madeira, sendo a quantidade e o tipo de HPAs formado dependente das condições específicas do processo e do tipo de combustível. A queima de tabaco, queimadas, calefação e



alguns tipos de processamentos como defumação, torrefação também são fontes de HPAs e derivados (IARC, 1983; CAMARGO; TOLEDO, 2002).

Os HPAs também são produzidos em processos tecnológicos móveis ou estacionários. Entre as fontes móveis destaca-se o motor de combustão interna (utilizado em veículos de transporte de cargas e passageiros), principal emissor destas substâncias para o ambiente. As fontes estacionárias são subdivididas em as utilizadas para geração de energia e calor e as fontes ligadas à atividade industrial (produção de alumínio) e de incineração (principalmente rejeitos químicos) (LOPES; ANDRADE, 1996).

A exposição humana aos HPAs se dá principalmente através da contaminação ambiental. Estudos realizados na Inglaterra estimaram que processos de combustão de matéria orgânica seriam responsáveis pela introdução de 1000 toneladas/ano, das quais os veículos motorizados responderiam por cerca de 80 toneladas/ano. Esta contribuição é mais significativa nas grandes cidades (LATIMER et al., 1990; WILD; JONES, 1995).

A inalação passiva do fumo, ingestão de alimentos ou de água contaminada, contato da pele com solos contaminados e uso de produtos farmacêuticos de uso tópico a base de coaltar tem sido identificados como fontes de exposição e absorção de HPAs (JONGENELEN et al., 1985; IPCS, 1998; IARC, 2010).

A tabela 1 mostra os níveis de HPAs encontrados em amostras ambientais e biológicas (ANGERER; MANNSCHRECK; GÜNDEL, 1997)

Tabela 1 – Níveis de HPAs encontrados em amostras ambientais e biológicas.

Tipo de amostra	Concentração
Ar	1,3 a 500 ng/m <sup>3</sup>
Solo	0,8 ng/kg – 100 mg/kg
Água	2,5 a 500 ng/L
Plantas	< 150 µg/kg
Alimentos	0,1 a 20 µg/kg

Para se entender o comportamento ambiental e biológico destes compostos é necessário conhecer algumas propriedades físico-químicas importantes, que estão mostradas, para alguns HPAs, na tabela 2.

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas de alguns HPAs

Substância	Peso Molecular (g/mol)	Pressão de Vapor (Pa, 25°C)	Log K <sub>(o/a)</sub>	Solubilidade em água (mg/L)
Naftaleno	128	36,8	3,37	31
Acenaftileno	152	4,14	4	16,1
Fluoreno	166	0,71	4,18	1,9
Fenantreno	178	0,113	4,57	1,1
Antraceno	178	0,0778	4,54	0,045
Pireno	202	0,0119	5,18	0,132
Benzo(a)pireno	252	2,13x10 <sup>-5</sup>	6,04	0,0038
Benzo(g,h,i)perileno	276	2,25x10 <sup>-5</sup>	6,5	0,00026

Adaptada de IARC, 2010.

Como pode ser observado na tabela 2, estas substâncias são pouco solúveis em água e, em geral, esta solubilidade diminui com o aumento do número de anéis.

Os HPAs apresentam coeficientes de partição octanol/água superiores a 1000 demonstrando grande afinidade lipofílica que aumenta com o número de anéis aromáticos. Por outro lado a volatilidade diminui com o aumento do peso molecular e assim, HPAs com peso molecular mais baixo são mais voláteis e apresentam maior pressão de vapor que os mais pesados. Como consequência destas propriedades, na atmosfera, estas substâncias podem ser encontradas tanto na fase gasosa quanto adsorvidas no material particulado (IARC, 2010).

Em virtude de suas propriedades físico-químicas e da sua grande distribuição ambiental, o risco de contaminação humana por estas substâncias é significativo. Devido ao seu caráter lipofílico, HPAs podem ser absorvidos tanto pela pele como por ingestão ou inalação, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo (IARC, 2010).

A quantidade absorvida por inalação varia de acordo com o grau de contaminação atmosférica, estando diretamente relacionada com a urbanização, tráfego de veículos e tipo de industrialização (IPCS, 1998; IARC, 2010).

Excluindo as vias ocupacionais, a dieta é, normalmente, a principal fonte de exposição em pessoas não fumantes. HPAs já foram detectados em alimentos brutos e processados. O grau de contaminação depende do modo como os alimentos são processados, preservados e armazenados. Os HPAs são detectados principalmente em carnes defumadas, peixe, frutas, folhas de vegetais, óleos e gorduras vegetais (DENNIS, et al., 1983; DE VOS, et al., 1990; CAMARGO; TOLEDO, 2000, 2002, 2003; GARCÍA-FALCON; CANCHO-GRANDE; SIMAL-GANDARA, 2005; CAMARGO et al., 2006; FARHADIAN et al., 2011; DOST; ÍDELI, 2012).

Os HPAs distribuem-se em quase todos os tecidos e são capazes de atravessar membranas celulares e permanecerem no organismo. No entanto, o metabolismo dos HPAs torna-os mais hidrossolúveis e assim rapidamente excretáveis. O metabolismo dos HPAs é complexo. Eles são metabolizados em todos os tecidos que contém gordura. Os produtos do metabolismo incluem epóxidos intermediários, dihidrodiois, fenóis, quinonas. Estes podem ser conjugados com glucoronídeos e ésteres de sulfato. O metabolismo existe para os tornar mais excretáveis, no entanto, podem ser convertidos a metabólitos mais tóxicos ou carcinogênicos. Após o metabolismo hepático as maiores vias de eliminação destas substâncias são as fezes e, em níveis mais baixos, a urina. (ANGERER; SCHALLER, 1991; IPCS, 1998).

O 1-hidroxipireno, principal metabólito do pireno tem sido usado como um marcador biológico para medir a exposição humana aos HPAs (JONGENELEN et al., 1985; REY-SALGUEIRO et al., 2009; GUO, et al., 2013; JUNG et al., 2015).

Jongeneelen et al. (1985; 1987) desenvolveu um método de monitoramento biológico para medir a exposição humana aos HPAs, explorando como marcador biológico o 1-hidroxipireno. Este método tem sido usado em muitos estudos para avaliar a exposição ocupacional e ambiental aos HPAs (SIWINSKA et al., 1998, 1999; STRIKCLAND; KANG, 1999; VIAU et al., 2002; WILHELM et al., 2008; CAMPO et al., 2010).

Cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

são as técnicas mais usadas para separação e quantificação dos HPAs em diversos tipos de matrizes. CLAE com detecção por fluorescência em matrizes como margarinas, creme vegetal e maionese (CAMARGO; TOLEDO, 2000), em chá mate e café (CAMARGO; TOLEDO, 2002), em vegetais e frutas brasileiras (CAMARGO; TOLEDO, 2003), em café instantâneo (GARCÍA-FALCON; CANCHO-GRANDE; SIMAL-GÁNDARA, 2005), em carnes grelhadas (FARHADIAN, et al., 2011); com detecção UV em lodo de esgoto (OLESZCZUK; BARAN, 2004), em óleos comestíveis e alimentos defumados (DOST; IDELI, 2012); com detecção por UV e fluorescência em águas residuais (EPA, 1984), em água potável (EPA, 1990), em amostrador individual de ar (NIOSH, 1998), em solos (GONG et al., 2010) e cromatografia com detecção por espectroscopia de massas em pinheiro (RATOLA et al., 2006), em ligante asfáltico (PINHEIRO et al., 2009), em óleos comestíveis provenientes da China (WU; YU, 2012) tem sido empregados com sucesso na determinação de HPAs.

## 2.2 TOXICIDADE DOS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

O primeiro indício de carcinogenicidade química de produtos de combustão orgânica foi publicado em 1775, em Londres, por Percival Pott que verificou que os limpadores de chaminés tinham maior incidência de câncer e deduziu que a fuligem seria a responsável pelo dano. Muitos anos depois desta publicação esta atividade foi atribuída à presença de benzo(a)pireno nas amostras. Posteriormente foi comprovado que somente a presença do benzo(a)pireno não justificava toda a atividade carcinogênica, sendo este “excesso de carcinogenicidade” atribuído à presença de outros membros da família dos HPAs (PEREIRA NETTO et al., 2000).

Dados sobre carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de HPAs encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 – Dados relativos aos efeitos carcinogênicos, genotóxicos e mutagênicos de alguns HPAs

HPA	Carcinogenicidade	Genotoxicidade	Mutagenicidade
Fluoreno	I	L	-
Fenantreno	I	L	+
Antraceno	N	N	-
Fluoranteno	N	L	+
Pireno	N	L	+
Benzofluorantenos	S	I	?
Benzo(a)antraceno	S	S	+
Criseno	L	L	+
Benzo(a)pireno	S	S	+
Indeno(1,2,3-cd)pireno	S	I	+
Benzo(g,h,i)perileno	I	I	+

Dados disponíveis para a comprovação do efeito: S = suficientes; I= insuficientes; L = limitados; N = não carcinogênico; Genotoxicidade avaliada através dos testes de deterioração do DNA; aberração cromossômica, mutagenicidade.; Mutagenicidade (teste de Ames): + (positivo); - (negativo); ? (inconclusivo).

Adaptado de PEREIRA NETTO et al., 2000.

A Environmental Protection Agency (US EPA) estabeleceu uma lista de 16 HPAs considerados prioritários para monitoramento ambiental, em função de sua carcinogenicidade e ocorrência (SUN, et al., 1998; SISINNO et al., 2003). Estes HPAs estão listados na tabela 4.

Tabela 4 – Classificação dos HPAs estudados quanto a sua carcinogenicidade (IARC), carcinogenicidade e ocorrência (EPA)

HPAS	IARC	US EPA
Naftaleno	2B	P
Acenaftileno	3	P
Acenafteno	3	P
Fluoreno	3	P
Fenantreno	3	P
Antraceno	3	P
Fluoranteno	3	P
Pireno	3	P
Benzo(a)antraceno	2B	P
Criseno	2B	P
Benzo(b)fluoranteno	2B	P
Benzo(k)fluoranteno	2B	P
Benzo(a)pireno	1	P
Dibenzo(a,h)antraceno	2A	P
Benzo(g,h,i)perileno	3	P
Indeno(1,2,3-cd)pireno	2B	P

IARC = International Agency for Research on Cancer; EPA = Environmental Protection Agency; 1 = Carcinogênico para humanos; 2A = Provável carcinogênico para humanos – limitada evidência em humanos e suficiente em animais (IARC); 2B = Possível carcinogênico para humanos – limitada evidência em humanos e insuficiente em animais (IARC); 3 = Não é classificado como carcinogênico para humanos (IARC); P = Prioritário (EPA).

Não existe na legislação internacional limitação aceita universalmente para os teores de HPAs em água e alimentos. Na falta destes limites legais, alguns países passaram a adotar limites próprios. Por exemplo, na Alemanha, a *German Society for Fat Science* fixou para alimentos defumados o limite de 25 µg/L para HPAs de alto peso molecular. Também na Europa, a Legislação da Comunidade Européia estabelece valores máximos de 1,0 a 10,0 µg/kg de BaP (benzo(a)pireno) para alimentos (cereais, óleos, crustáceos, carnes defumadas, etc) (GALLINARO, C.; FRANCO, D., 2009). No Brasil, a ANVISA (2005) determina, para águas envasadas,

teores de BaP inferiores a 0,7 µg/L. Já para alimentos aromatizados ou com aromas de fumaça, a ANVISA (2007) preconiza o limite de BaP em 0,03 µg/kg.

O negro de fumo, também conhecido como negro de carbono (“carbon black”) é um pó extremamente fino obtido através do processo de combustão parcial de hidrocarbonetos. Mais de 90% da produção mundial de negro de fumo é usada na fabricação de borrachas, enquanto que a proporção restante é usada em tintas para impressão, tintas, lacas (verniz) e aditivos para indústria. (WELLMAN et al., 2006; LING et al., 2011; NEGHAB et al., 2011).

Devido a sua origem, métodos de produção e sua grande área superficial, o negro de fumo contém subprodutos adsorvidos, particularmente compostos aromáticos. As classes químicas mais frequentemente identificadas são HPAs, os seus nitroderivados e HPAs contendo enxofre (IARC, 2010).

Dessa forma, o negro de fumo foi considerado, pelo IARC em 1996, como possível carcinogênico para humanos (WELLMAN et al., 2006).

### 2.3 PRESENÇA DOS HPAS EM TAMPAS DE BORRACHA PARA PRODUTOS PARENTERAIS

Segundo a Farmacopéia Brasileira, embalagem primária é a que está em contato direto com seu conteúdo durante todo o tempo e não deve haver qualquer interação entre o material da embalagem primária e o seu conteúdo capaz de alterar a concentração, qualidade ou a pureza do material acondicionado (BRASIL, 2010). As tampas de borracha para fechamento de produtos injetáveis são embalagens primárias que, por estarem em contato direto com o produto farmacêutico, devem ser consideradas parte integrante do medicamento.

Tampas de borracha podem ser de origem natural ou sintética. Geralmente são uma mistura de muitos ingredientes que incluem o polímero básico, cargas, aceleradores, agentes de vulcanização e pigmentos. É necessário realizar uma avaliação cuidadosa de todos os ingredientes para garantir que, agentes cancerígenos conhecidos ou suspeitos ou outras substâncias tóxicas, não estejam presentes na borracha (USP 31, 2009).

Negro de fumo, um ingrediente usado na composição das borrachas, tende a adsorver níveis potencialmente perigosos de substâncias orgânicas, como os HPAs,

e a possibilidade de eluição de alguns HPAs, considerados carcinogênicos, do negro de fumo é muitas vezes usada como critério para avaliação da sua carcinogenicidade (ZOCCOLILLO et al., 1984). A International Agency of Research on Cancer (IARC) concluiu que o negro de fumo é possivelmente carcinogênico para humanos (grupo 2B). As borrachas para uso farmacêutico também possuem, na sua composição, o negro de fumo como preenchimento (carga) e como pigmento. Estas borrachas são utilizadas tanto em tampas para produtos parenterais como em êmbolos de seringas (GIL, 2006; REMINGTON, 2012).

O contato da tampa de borracha com o conteúdo do recipiente poderia ocasionar a migração de substâncias presentes na borracha, como os HPAs. Estudo anterior mostrou a presença de 12 HPAs nas tampas de borracha de cor cinza, marrom e preta. Sendo que, para tampas de borracha de cor cinza, a maior concentração foi de pireno (3,31 mg/g), enquanto para as de cor marrom a maior concentração foi de fluoreno (2,05 mg/g). Já para as tampas de borracha preta a maior concentração foi de benzo(g,h,i)perileno (6,02 mg/g) (BOHRER et al., 2016).

Não existem nas monografias farmacopêicas nacionais e internacionais limites para os aditivos utilizados nas borrachas de uso farmacêutico e tampouco fazem menção a uma possível presença de HPAs. Elas apenas sugerem pesquisa de extraíveis totais e resíduos de evaporação, sem especificar quais seriam essas substâncias.

## 2.4 PRESENÇA DOS HPAS EM PREPARAÇÕES E NUTRIÇÕES PARENTERAIS

A nutrição parenteral (NP) consiste em uma solução ou emulsão composta basicamente de carboidratos, aminoácidos, lipídeos, vitaminas e minerais, estéril e apirogênica, acondicionada em recipiente de vidro ou plástico, destinada a administração intravenosa em pacientes desnutridos ou não, em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, visando `a síntese ou manutenção dos tecidos, órgãos ou sistemas (BRASIL, 1998). A nutrição parenteral é necessária nos casos em que a alimentação oral normal não é possível, quando a absorção de nutrientes é incompleta, quando a alimentação oral é indesejável e, principalmente, quando as condições mencionadas estão associadas, ou podem evoluir para um estado de



desnutrição (REVISTA PHARMACIA BRASILEIRA, 2009). Portanto, consiste no aporte de substâncias nutritivas essenciais para satisfazer as necessidades nutricionais diárias dos pacientes e são indicadas tanto para adultos quanto para crianças e recém-nascidos nos seguintes casos:

- Adultos – situações pós-operatórias, doentes portadores de desnutrição, doenças obstrutivas do trato gastrointestinal;
- Crianças e recém-nascidos – prematuros de baixo peso, mal formação congênita no trato gastrointestinal, diarreia crônica intensa.

Quando o suporte nutricional complementa a ingestão oral e prevê apenas parte das necessidades nutricionais diárias denomina-se nutrição parenteral parcial (NPP). Entretanto, se o aporte nutricional contém todas as necessidades calóricas requeridas será denominada nutrição parenteral total (NPT) (GUIMARÃES et al., 2012).

A NPT pode ser classificada de acordo com os componentes presentes em sua preparação. Quando é constituída por aminoácidos, glicose, vitaminas e sais minerais em quantidades adequadas para satisfazer as necessidades diárias de um paciente, essa é denominada de mistura 2 em 1 ou sistema glicídico. Quando for acrescida de emulsões lipídicas, em um mesmo recipiente, são conhecidas como misturas 3 em 1 ou sistema lipídico (SAKAMOTO et al., 1999).

As soluções de NPT devem ser mantidas em recipientes apropriados e em temperatura entre 2° e 8°C, durante o armazenamento e/ou transporte. Sua administração deve ser realizada, preferencialmente, com bomba de infusão à temperatura ambiente por um período máximo de 24 h (BRASIL, 1998).

Muitos dos componentes da NP são comercializados em recipientes de vidro com tampas de borracha. Entre eles estão as soluções de aminoácidos e as emulsões lipídicas. A composição destas borrachas inclui ingredientes como o negro de fumo que é usado como preenchimento e como pigmento e que é considerado, segundo a IARC (2010) possivelmente carcinogênico para humanos. O negro de fumo pode conter substâncias orgânicas, como os HPAs, adsorvidos em sua superfície, como demonstrado por Zoccolillo et al. (1984). O contato da borracha com o conteúdo do recipiente poderia acarretar a migração de espécies presentes na borracha, entre elas os HPAs. Estudo anterior mostrou que soluções comerciais

utilizadas para o preparo de nutrições parenterais podem estar contaminadas com HPAs provenientes das tampas de borracha (BOHRER et al., 2016).

Existem limites de HPAs para o negro de fumo usado na composição de borracha para uso farmacêutico que são, segundo o FDA (2006) 0,5 mg/kg e para o benzo(a)pireno 5 µg/kg. Já a Comunidade Européia (2007) especifica 250 µg/kg medidos como benzo(a)pireno, mas não existem limites de HPAs para as borrachas de uso farmacêutico. Os testes farmacopêicos se limitam a mostrar o conteúdo de enxofre, sulfetos voláteis, resíduos de extração, zinco, amônio e metais pesados (BOHRER, 2013). Considerando o grande volume que é usualmente administrado na NP, a migração destas espécies, principalmente se tóxicas, é altamente indesejável.

Os recém-nascidos pré-termo (prematurados) e a termo que não estão fisiologicamente maduros ou que estão instáveis, necessitam de formas alternativas de administração de nutrientes. Neste caso, a nutrição parenteral deverá ser prescrita e conter carboidratos, aminoácidos, lipídeos, glicose, vitaminas e eletrólitos adequados para o crescimento e desenvolvimento do recém-nascido.

Entre todos os pacientes, os mais vulneráveis a efeitos adversos são os recém nascidos pré-termo. A presença de eventuais contaminantes na NP administrada aos prematurados é altamente indesejável devido a forma de administração, diretamente na corrente sanguínea, a prematuridade do paciente e ao grande volume administrado.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar a contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em formulações parenterais comerciais, nutrições parenterais e a presença do metabólito 1-hidróxipireno na urina de recém-nascidos.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar metodologia de determinação dos HPAs por cromatografia líquida de alta eficiência para as formulações parenterais comerciais e nutrições parenterais;
- Adaptar a metodologia de determinação de 1-hidróxipireno por cromatografia líquida de alta eficiência para avaliar e quantificar a presença como metabólito na urina dos recém-nascidos;
- Determinar a contaminação por HPAs em formulações parenterais comerciais armazenadas em recipientes com tampa de borracha;
- Avaliar a presença de HPAs nas nutrições parenterais administradas a um grupo de recém-nascidos da UTI neonatal do HUSM;
- Avaliar e quantificar a presença do metabólito 1-hidróxipireno na urina dos recém-nascidos selecionados para este estudo;
- Avaliar a adsorção dos HPAs nas paredes do polímero que compõe as bolsas de nutrição parenteral.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PADRÕES UTILIZADOS

Padrões analíticos dos HPAs: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno (Sigma-Aldrich);

Padrão analítico do 1-hidróxipireno (Sigma-Aldrich).

### 4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

- Álcool etílico P.A. (Dinâmica);
- Acetona P.A. (Dinâmica);
- Metanol grau HPLC (Tedia);
- Acetonitrila grau HPLC (Panreac);
- Água ultrapura (sistema miliQ - Millipore);
- Ácido acético P.A. (Merck);
- Ácido clorídrico P.A. (Neon);
- Álcool isopropílico P.A. (Dinâmica);
- Hidróxido de sódio P.A. (Merck);
- Polietileno (Sigma-Aldrich);
- Enzima  $\beta$ -glucuronidase/arilsulfatase (Merck);
- Cartuchos para SPE C18 – 500 mg (Applied Separations);
- Cartuchos para SPE C18 E Strata – 500 mg (Phenomenex);
- Filtro para seringa de PTFE de 0,20 $\mu$ m (Chromafil Xtra – Macherey-Nagel)
- Bolsa de EVA capacidade de 250 mL (Laboratórios P. L. Rivero Y Cia. S.A.)

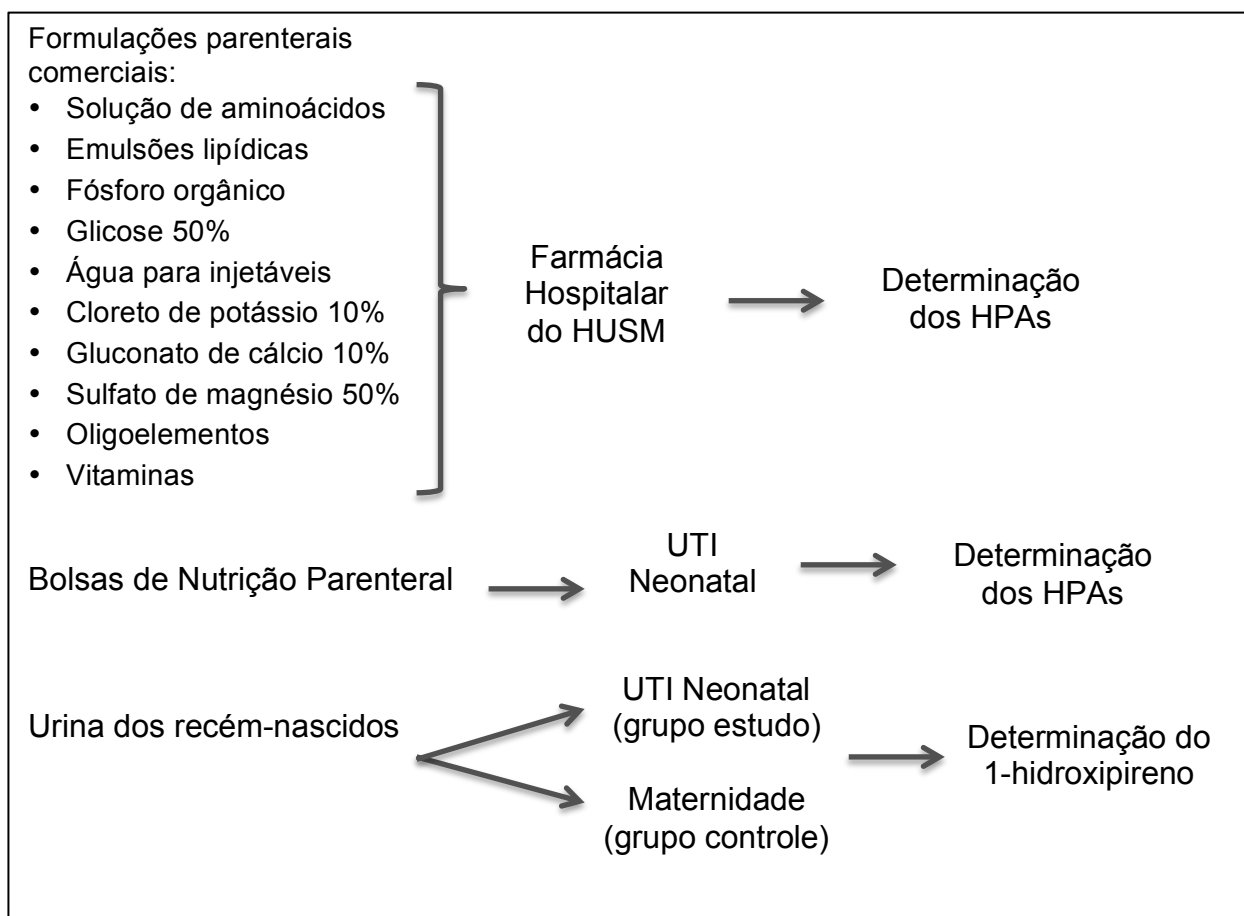
### 4.3 INSTRUMENTAÇÃO

- Cromatógrafo líquido (Dionex) equipado com bomba de fluxo modelo P680, detector de fluorescência HP 1100 (Agilent Technologies), injetor manual (Reodyne), com alça de injeção de 100  $\mu$ L;
- Programa para obtenção dos dados – ChromaDaQ versão 1.0.0.0, 2009 (IG-Tech);
- Cromatógrafo líquido (Knauer) equipado com bomba de fluxo modelo 1000, manager modelo 5000, detector UV modelo 2600, injetor manual (Reodyne), com alça de injeção de 20  $\mu$ L;
- Programa para obtenção dos dados – ChromGate versão 3.1.7/2008 (Knauer);
- Ultrassom (Unique);
- Bomba peristáltica (Ismatec);
- Sistema Manifold (Supelco);
- Bomba de vácuo (Primatec);
- Balança analítica com quatro casas de precisão (Shimadzu);
- Micropipetadores automáticos de volumes variados (10-100 $\mu$ L; 100-1000 $\mu$ L) (Brand);
- Banho termostaticado (Resistec – DeLeo)

#### 4.4 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras utilizadas para este trabalho encontram-se expostas na figura 2 e foram obtidas no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).

Figura 2 – Amostras utilizadas para o estudo.



#### 4.5 MÉTODOS

##### 4.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos para determinação dos HPAs

Utilizou-se um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, desenvolvido conforme condições descritas na tabela 5, com base na literatura (US EPA, 1984; 1986; 1990), porém utilizando detecção por arranjo de fotodiodos (DAD).

Tabela 5 – Parâmetros cromatográficos para análise dos HPAs

Coluna cromatográfica	Coluna Pursuit 3 PAH, 10 cm de comprimento, d.i. de 4,6 mm e tamanho de partícula de 3 µm
Fase móvel (gradiente)	Acetonitrila:água ultrapura (40:60 – 100:0)
Fluxo (gradiente)	1,8 mL/min – 2,2 mL/min
Temperatura	Ambiente (21°C ±2°C)
Comprimento de onda – 225 nm	Naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoranteno, pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno
Comprimento de onda – 254 nm	Fluoreno, fenantreno, antraceno, benzo(a)(antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno e indeno(1,2,3-cd)pireno
Volume de injeção	20 µL

#### 4.5.1.1 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas dos HPAs foram preparadas individualmente, de acordo com a forma de apresentação que foram adquiridos (sólido ou líquido), através da dissolução ou diluição dos padrões analíticos em metanol. Os padrões líquidos estavam armazenados em ampolas de vidro de 1 mL. A relação dos HPAs sólidos, suas massas usadas para a preparação das soluções, o volume final e a concentração das soluções encontram-se na tabela 6. A concentração de cada ampola de padrão líquido, a quantidade de ampolas utilizadas, o volume final das soluções e a concentração das mesmas, encontram-se nas tabelas 7. Estas soluções foram denominadas de solução estoque e foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e sob temperatura de -15°C. A partir destas soluções foram preparadas as soluções de trabalho.

Tabela 6 – Quantidade de massa pesada de cada padrão de HPA sólido utilizado para preparar as soluções estoque, volume final e concentração das soluções estoque

HPA	Massa pesada (g)	Volume final (mL)	Concentração da solução estoque (mg/L)
Naftaleno	0,0040	10	400
Acenafteno	0,0050	10	500
Fluoranteno	0,0040	10	400
Benzo(a)pireno	0,0030	10	300
Dibenzo(a,h)antraceno	0,0030	10	300

Tabela 7 – Quantidade e concentração de cada ampola de padrão de HPA líquido utilizada para preparar as soluções estoque, volume final e concentração das soluções estoque

HPA	Concentração da ampola ( $\mu\text{g/mL}$ )	Nº de ampolas usadas	Volume final (mL)	Concentração da solução estoque (mg/L)
Acenaftileno	5000	01	10	500
Fluoreno	5000	01	10	500
Fenantreno	5000	01	10	500
Antraceno	200	01	10	20
Pireno	100	02	5	40
Benzo(a)antraceno	100	02	5	40
Criseno	1000	01	5	200
Benzo(b)fluoranteno	1000	01	10	100
Benzo(k)fluoranteno	1000	01	10	100
Benzo(g,h,i)perileno	100	04	10	40
Indeno(1,2,3-cd)pireno	200	01	5	40



#### 4.5.1.2 Validação do Método

O método de separação dos HPAs foi avaliado segundo os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

##### 4.5.1.2.1 Seletividade

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras, por exemplo, comparação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada deste analito, análise do composto de interesse por método específico para estrutura como ressonância magnética nuclear e espectroscopia no infravermelho. Uma outra maneira é através da avaliação com detectores modernos como arranjo de fotodiodos que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como indicação da presença do composto puro.

Assim, para avaliar a seletividade do método, empregou-se a detecção por arranjo de fotodiodos (DAD).

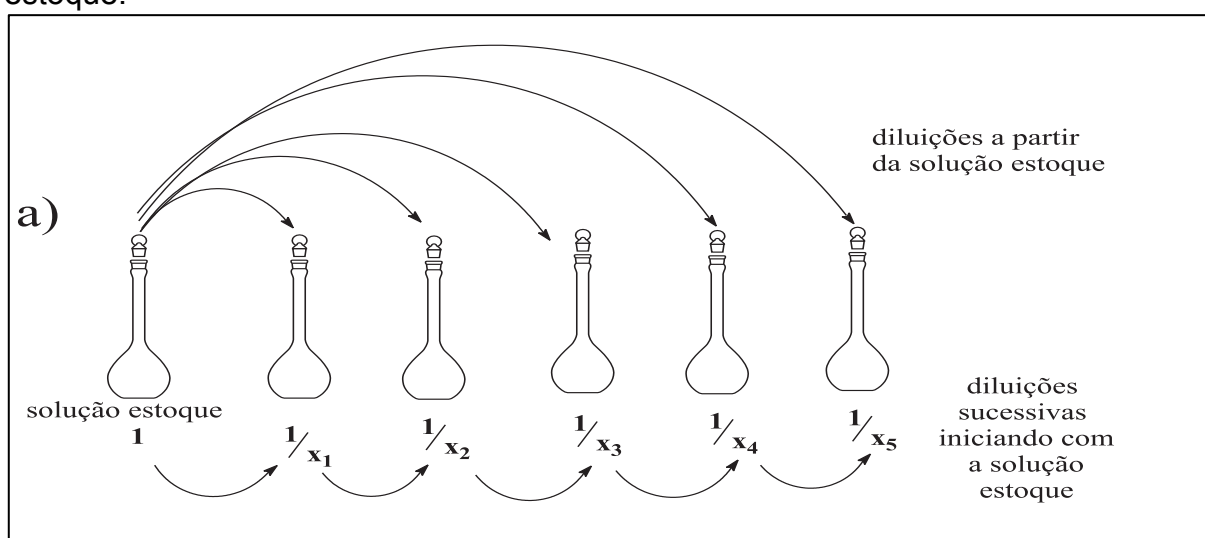
Primeiramente, cada analito foi identificado individualmente para a criação de uma galeria de espectros, determinar seus tempos de retenção e ordem de eluição. Posterior a isso, realizou-se uma varredura nos cromatogramas obtidos das amostras para verificar a presença de espectro dos analitos estudados. Exemplos mostrando o espectro de alguns analitos presentes em uma amostra de nutrição parenteral administrada ao grupo estudo e uma amostra de emulsão lipídica encontram-se no apêndice A.

##### 4.5.1.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da construção de curvas analíticas. As curvas analíticas dos compostos estudados foram obtidas através de diluições sucessivas dos padrões, iniciando com a solução estoque. Transferiu-se, para balão volumétrico de 5 mL, alíquotas da solução estoque de cada padrão e completou-se o volume com metanol. Este balão continha a concentração do último ponto da curva analítica. A partir desta solução, realizou-se diluições sucessivas até

a concentração do primeiro ponto da curva analítica. O esquema da diluição encontra-se representado na figura 3. As concentrações de cada HPA (em mg/L) em estudo, presente nas soluções usadas para a construção das curvas analíticas encontram-se na tabela 8. Injetou-se três vezes ( $n=3$ ), 20  $\mu\text{L}$  das soluções, em ordem crescente de concentração, obtendo-se as áreas com o auxílio do software CromGate. As áreas obtidas foram inseridas em uma planilha do Excel e aplicou-se ANOVA para verificação do desvio de linearidade.

Figura 3 – Representação do esquema de diluições sucessivas a partir da solução estoque.



Adaptado de RIBANI et al. (2004)

Tabela 8 – Concentrações dos HPAs (em mg/L) em estudo presentes nas soluções usadas para construção das curvas analíticas (continua)

HPAs	Sol.1	Sol.2	Sol.3	Sol.4	Sol.5
Naftaleno	0,125	0,250	0,500	1,000	2,000
Acenaftileno	0,125	0,250	0,500	1,000	2,000
Acenafteno	0,125	0,250	0,500	1,000	2,000
Fluoreno	0,250	0,500	1,000	2,000	4,000
Fenantreno	0,125	0,250	0,500	1,000	2,000
Antraceno	0,050	0,100	0,200	0,400	0,800
Fluoranteno	0,500	1,000	2,000	4,000	8,000
Pireno	0,250	0,500	1,000	2,000	4,000
Benzo(a)antraceno	0,180	0,360	0,720	1,440	2,880
Criseno	0,150	0,300	0,600	1,200	2,400

HPAs	(conclusão)				
	Sol.1	Sol.2	Sol.3	Sol.4	Sol.5
Benzo(b)fluoranteno	0,180	0,360	0,720	1,440	2,880
Benzo(k)fluoranteno	0,250	0,500	1,000	2,000	4,000
Benzo(a)pireno	0,300	0,600	1,200	2,400	4,800
Dibenzo(a,h)antraceno	0,500	1,000	2,000	4,000	8,000
Benzo(g,h,i)perileno	0,360	0,720	1,440	2,880	5,760
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,200	0,400	0,800	1,600	3,200

#### 4.5.1.2.3 Repetitividade

A repetitividade também é conhecida como precisão intracorrida ou intraensaio e foi realizada segundo a ICH (2005) e a ANVISA (2003) através de nove determinações utilizando o primeiro, terceiro e quinto pontos da curva analítica (três níveis e três repetições de cada nível), no mesmo dia e foi expressa através do desvio padrão relativo (RSD) também conhecido como coeficiente de variação (C.V.).

$$\text{RSD (\%)} \text{ ou } \text{C.V.(\%)} = (\text{desvio padrão} \div \text{média}) \times 100 \quad (1)$$

#### 4.5.1.2.4 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi realizada utilizando o ponto médio da curva analítica (três repetições) em diferentes dias e foi expressa através do desvio padrão relativo das medidas.

#### 4.5.1.2.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados com base na relação sinal : ruído, segundo INMETRO (2010). Para isso utilizou-se as fórmulas a seguir:

$$\text{L.D} = \text{média} + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s \quad (2)$$

$$L.Q. = \text{média} + 10 \cdot s \quad (3)$$

onde  $t$  é distribuição de Student e depende do tamanho da amostra e do grau de confiança e  $s$  é o desvio padrão amostral dos brancos da amostra. Realizou-se um número de sete replicatas do branco do solvente, conforme recomendado pelo INMETRO (2010).

#### 4.5.1.2.6 Exatidão

A exatidão foi determinada pelo método de recuperação do padrão analítico na amostra, segundo a European Commission (E.C., 2016), nos níveis de adição de 1, 2 e 10 vezes o valor do limite de quantificação. Utilizou-se a seguinte fórmula para o cálculo da recuperação:

$$R (\%) = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \quad (4)$$

onde,

$C_1$  = concentração do analito na amostra fortificada

$C_2$  = concentração do analito na amostra não fortificada

$C_3$  = concentração do analito adicionada à amostra

A recuperação ( $R$ ) ou fator de recuperação foi expressa em porcentagem.

#### 4.5.1.2.7 Robustez

A robustez foi realizada segundo o ICH (2005) e a ANVISA (2003), através da variação da temperatura no ambiente de trabalho (laboratório). Realizou-se cinco injeções das mesmas concentrações dos analitos (ponto médio da curva analítica) em diferentes condições de temperatura que foram monitoradas com o auxílio de um termômetro. As temperaturas variaram entre 19,4°C e 22,9°C. A robustez foi expressa através do desvio padrão relativo.

#### 4.5.1.2.8 Conformidade do sistema

A conformidade do sistema foi determinada avaliando-se os seguintes parâmetros: fator de retenção e números de pratos teóricos da coluna. Os cálculos utilizados para esta determinação foram baseados na literatura (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009; HARRIS, 2012), cujas fórmulas estão abaixo designadas:

$$N = 16 (tr/w)^2 \quad (5)$$

onde,

N = número de pratos teóricos

tr = tempo de retenção do analito

w = medida (em minutos) entre o início e o final do pico cromatográfico

$$k = (tr - t_0) / t_0 \quad (6)$$

onde,

k = fator de retenção

tr = tempo de retenção do analito

t<sub>0</sub> = tempo de retenção do pico do solvente

#### *4.5.1.3 Preparo das amostras de nutrições parenterais e formulações parenterais comerciais para determinação dos HPAs*

As formulações parenterais comerciais e demais componentes da nutrição parenteral foram cedidas pela farmácia hospitalar do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) e as amostras de nutrição parenteral, que foram fornecidas a bebês recém-nascidos que estavam sob regime de nutrição parenteral, foram coletadas na UTI neonatal do Hospital Universitário de Santa Maria. As amostras de nutrição parenteral foram envasadas em frascos de vidro âmbar, rotuladas e armazenadas sob refrigeração para posterior preparo. As formulações comerciais, ou seja, suspensão de lipídeos e solução de aminoácidos, bem como fósforo orgânico, solução de glicose 50%, água para injetáveis, gluconato de cálcio 10%, cloreto de

potássio 10%, sulfato de magnésio 50%, Oligotrat (oligoelementos) e Frutovitam (vitaminas) foram mantidas em suas embalagens originais e sob refrigeração.

#### 4.5.1.3.1 Extração dos HPAs das nutrições parenterais e formulações parenterais comerciais

A extração dos HPAs das amostras foi realizada utilizando-se uma coluna recheada com polietileno preparada em nosso laboratório, segundo BOHRER et al. (2016). Dessa forma, além de extrair os HPAs também ocorreu uma limpeza (clean-up) na amostra.

A preparação das amostras foi realizada como segue: com o auxílio de uma pipeta volumétrica, retirou-se 5 mL do conteúdo e colocou-se em um frasco de vidro de 10 mL, adicionou-se 1 mL de acetona (utilizada como cossolvente), 2 mL de metanol e 2 mL de água ultrapura para perfazer um total de 10 mL. Após a preparação, procedeu-se a extração e clean-up da amostra. Para isso ativou-se uma coluna de polietileno (~ 2 g), preparada previamente em nosso laboratório, com 1 mL de etanol, seguido de 2 mL de água ultrapura. Passou-se a amostra pela coluna em fluxo lento (aprox. 0,5 mL/min.), com o auxílio de uma bomba peristáltica, para reter os HPAs no polímero. Após, lavou-se a coluna com 3 mL de água ultrapura e os analitos foram eluídos com 5 mL de acetona. Filtrou-se o eluato em filtro para seringa (PTFE 0,20 µm e armazenou-se o líquido em frasco de vidro âmbar, sob refrigeração (2-6°C) para análise posterior. Das amostras injetou-se 20 µL no cromatógrafo.

#### 4.5.1.3.2 Quantificação das amostras de nutrições parenterais e formulações parenterais comerciais

A quantificação dos HPAs encontrados nas amostras foi realizada utilizando a equação da reta ( $y = ax + b$ ) obtida através da curva analítica externa, onde substituindo o y pelo valor da área obtida no cromatograma e obtém-se o valor de x, que corresponde à concentração do analito.

#### *4.5.1.4 Teste de adsorção dos HPAs nas paredes das bolsas de Etil Vinil Acetato (EVA) utilizadas para envase das nutrições parenterais*

Com base nas formulações das nutrições analisadas neste trabalho, preparou-se uma formulação de nutrição parenteral em nosso laboratório. Utilizou-se as amostras comerciais de solução de aminoácidos e suspensão de lipídeos adquiridas na farmácia hospitalar do HUSM e demais componentes, perfazendo um volume total de 36,75 mL. Transferiu-se esta preparação para uma bolsa de EVA e adicionou-se 13,25 mL de um mix de HPAs com concentrações entre o 3º e 5º ponto da curva analítica (previamente preparado). Na segunda bolsa de EVA adicionou-se 36,75 mL de água ultrapura e 13,25 mL do mesmo mix de HPAs. O volume total de ambas as bolsas foi de 50 mL. As bolsas foram mantidas sob refrigeração por 24 h. Após este tempo, foram transferidas para uma estufa a 25°C e mantidas assim por 24 h. Passado este tempo, retirou-se as bolsas da estufa e, para a bolsa de nutrição parenteral, procedeu-se às análises conforme item 4.5.1.3.

Da bolsa que continha água e HPAs retirou-se o seu conteúdo e o transferimos para frasco de vidro âmbar e mantivemos sob refrigeração para posterior análise. Nesta mesma bolsa, adicionou-se 50 mL de acetona e deixou-se em contato com a bolsa, com agitação, por 24 h. Após este tempo, da água retirada da bolsa e da acetona adicionada na bolsa, procedeu-se às análises conforme item 4.5.1.3.

A composição da bolsa de nutrição parenteral preparada em nosso laboratório e a concentração do mix dos HPAs encontram-se no apêndice C e D, respectivamente.

#### **4.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por fluorescência para determinação do metabólito 1-hidróxipireno na urina**

Utilizou-se a CLAE em fase reversa, adaptada conforme condições descritas na tabela 9, com base na literatura (JONGENELEN; ANZION; HENDERSEN, 1987; ANGERER; SCHALLER, 1991; SAKIARA et al., 2010), utilizando detecção por fluorescência.

Tabela 9 – Condições cromatográficas para determinação do 1-hidróxipireno

Coluna cromatográfica	Coluna C18 Luna Phenomenex , 25 cm de comprimento, d.i. de 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 $\mu$ m
Fase móvel	Acetonitrila (70%):Água ultrapura (30%)
Fluxo	0,8 mL/min
Temperatura	Ambiente (21°C $\pm$ 2°C)
Volume de injeção	100 $\mu$ L
$\lambda$ de excitação	242 nm
$\lambda$ de emissão	388 nm

#### 4.5.2.1 Preparo das soluções analíticas

A solução analítica do 1-hidróxipireno foi preparada como segue: pesou-se, exatamente, cerca de 0,0010g do padrão analítico, transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com metanol, obtendo-se a concentração de 20 mg/L. Esta solução foi denominada solução estoque 1. Da solução estoque 1, transferiu-se 100  $\mu$ L para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com metanol, obtendo-se a concentração de 200  $\mu$ g/L. Esta solução foi denominada solução estoque 2. As soluções foram armazenadas em frasco âmbar e sob temperatura de -30°C. A partir da solução estoque 2 foram preparadas as soluções de trabalho.

#### 4.5.2.2 Otimização do método cromatográfico

O método de determinação do 1-hidróxipireno foi otimizado segundo os seguintes parâmetros: linearidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação.



#### 4.5.2.2.1 Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da construção de curvas analíticas. As curvas analíticas do composto estudado foram obtidas preparando-se misturas das soluções analíticas do 1-hidróxipireno em metanol. As concentrações do analito variaram de 0,5 a 10 µg/L. Injetou-se três vezes (n=3), 100 µL das soluções, em ordem crescente de concentração. As áreas obtidas foram inseridas em uma planilha do Excel e aplicou-se ANOVA para verificação do desvio de linearidade.

#### 4.5.2.2.2 Repetitividade

A repetitividade também é conhecida como precisão intracorrída ou intraensaio e foi realizada segundo a ICH (2005) e a ANVISA (2003) através de nove determinações utilizando o primeiro, terceiro e quinto pontos da curva analítica (três níveis e três repetições de cada nível), no mesmo dia e foi expressa através do desvio padrão relativo (fórmula 1).

#### 4.5.2.2.3 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi realizada segundo a ICH (2005) e a ANVISA (2003) através de nove determinações utilizando o primeiro, terceiro e quinto pontos da curva analítica (três níveis e três repetições de cada nível), em diferentes dias e foi expressa através do desvio padrão relativo (fórmula 1).

#### 4.5.2.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados com base na relação sinal : ruído, segundo INMETRO (2010). Para o cálculo foram utilizadas as fórmulas 2 e 3 para os limites de detecção e quantificação, respectivamente. Realizou-se um número de sete replicatas do branco da amostra, conforme recomendado pelo INMETRO (2010).

#### 4.5.2.3. Preparo das amostras de urina para determinação do 1-hidróxipireno

As amostras de urina utilizadas para este método foram coletadas de recém-nascidos do Hospital Universitário de Santa Maria, na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal, que estavam sob regime de nutrição parenteral, e na maternidade do mesmo hospital, por profissionais da enfermagem. Destas amostras de urina, coletadas rotineiramente, uma parte foi separada e destinada para avaliação da presença do 1-hidroxipireno (1-OHP). As amostras foram armazenadas em frascos de polipropileno transparente a - 30°C.

##### 4.5.2.3.1 Extração do 1-hidróxipireno da urina

A quantificação do 1-OHP na urina foi feita após uma hidrólise enzimática e clean-up da amostra, adaptada do método desenvolvido por JONGENELEN et al. (1985; 1987), conforme segue: em um frasco de vidro âmbar pipetou-se, com auxílio de uma micropipeta, 2,5 mL de urina, adicionou-se 10 mL de tampão acetato pH 5,0, 10 µL de enzima  $\beta$ -glucuronidase/arilsulfatase e incubou-se a 37°C por duas horas.

Para o clean-up da amostra utilizou-se um cartucho C18 fase reversa (500 mg) para extrair o metabólito. Após ativação do cartucho com 2 mL de metanol, seguido de 5 mL de água ultrapura, passou-se a amostra hidrolisada pelo cartucho a uma vazão de, aproximadamente, 10 mL/min com o auxílio de leve vácuo. O cartucho foi, então, lavado com 6 mL de metanol 60% (em água ultrapura). O soluto residual foi eluído com 2 mL de álcool isopropílico. O solvente foi evaporado em capela, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O resíduo foi redissolvido com 2,5 mL de metanol, filtrado em filtro PTFE 0,20 µm e acondicionado em frasco de vidro âmbar para posterior determinação do metabólito por HPLC com detecção por fluorescência. Um branco da amostra foi ensaiado juntamente com a amostra de urina. O branco da amostra consistiu de 10 mL de água ultrapura processada da mesma maneira que a amostra de urina.

#### 4.5.2.3.2 Quantificação do 1-hidroxipireno em amostras de urina

A quantificação do analito nas amostras de urina foi realizada utilizando a equação da reta ( $y = ax + b$ ) obtida através da curva analítica externa, onde substitui-se o  $y$  pelo valor da área obtida no cromatograma e obtém-se o valor de  $x$ , que corresponde à concentração do analito.

### 4.6 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Para a avaliação da presença de HPAs na urina e a sua relação com a NP, dois grupos de RN foram estabelecidos: o grupo estudo e o grupo controle. Para o grupo estudo ficou determinado dez recém-nascidos, obtidos por amostragem de conveniência, independente de sexo, internados na UTI neonatal do Hospital Universitário de Santa Maria e que estavam sob regime de nutrição parenteral. Os recém-nascidos portadores de síndromes genéticas e malformações maiores foram excluídos, bem como aqueles que apresentaram valor de creatinina superior a 1,2 mg/dL que define alguma malformação no aparelho urinário e insuficiência renal. O tempo estabelecido para a realização deste estudo foi o período em que os recém-nascidos receberam nutrição parenteral durante a internação dos mesmos na UTI neonatal, sendo que o primeiro dia da administração da nutrição parenteral passou a contar como o primeiro dia da pesquisa e o último dia da administração da nutrição parenteral como o último dia de estudo.

Já para o grupo controle foram obtidos recém-nascidos, também por amostragem de conveniência, que estavam na maternidade do mesmo hospital e que não estavam sob regime de nutrição parenteral, independente de sexo.

Para a coleta dos dados de identificação e dados das amostras (medicação diária, volume urinário, creatinina, bolsa de nutrição parenteral) foi realizada pesquisa diária no prontuário dos pacientes, através de um protocolo como mostrado no Apêndice E.

Através da pesquisa no prontuário dos pacientes foi possível determinar se as mães seriam ou não fumantes. Esta informação é importante, pois a fumaça do cigarro é uma mistura de numerosos compostos, incluindo HPAs (SIWINSKA, 1999).

Segundo Sasco e Vainio (1999) os compostos presentes na fumaça do cigarro podem atravessar a barreira placentária e dessa forma mascarar os resultados encontrados, neste estudo, para o metabólito 1-hidroxi-pireno, pois este é usado como biomarcador para avaliar a exposição à fumaça de cigarro e poluição do ar (LLOP et al, 2008).

As principais características dos recém-nascidos selecionados para este trabalho, tanto para o grupo estudo quanto para o grupo controle, encontram-se na tabela 10.

Tabela 10 – Características dos recém-nascidos selecionados para este trabalho

Grupo Estudo	Peso ao nascer (g)	Sexo	Mãe Fumante	Creatinina (mg/dL)	Tempo sob regime de NP (dias)
01	4200	M	Não	0,55	12
02	2340	M	Não	0,87	10
03	1225	F	Não	0,25	07
04	970	F	Não	0,84	14
05	800	M	n/c	0,26	13
06	1730	M	Não	084	01
07	3160	F	n/c	1,16	11
08	1335	M	Não	n/c	04
09	1420	M	Não	0,74	11
10	1695	M	Não	0,39	09
<b>Grupo controle</b>					
01	2900	M	Não	n/c	-
02	2830	F	Não	n/c	-
03	3875	M	Não	n/c	-
04	2875	M	Sim	n/c	-
05	1495	F	Não	n/c	-
06	2160	M	Sim	n/c	-
07	2080	M	Não	n/c	-
08	2095	M	Não	n/c	-

n/c – não constava no prontuário médico; (-) sem nutrição parenteral.

Este trabalho foi aprovado sob seus aspectos éticos e metodológicos pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria tendo como CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) o número 33027414.2.0000.5346.

Entre os documentos que fizeram parte deste estudo encontra-se, no Apêndice F, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), que é o termo que relata os benefícios e riscos a que são submetidos os pacientes, sendo que os mesmos tem o livre arbítrio de participar ou não do estudo.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DOS HPAS EM NUTRIÇÕES PARENTERAIS E FORMULAÇÕES PARENTERAIS COMERCIAIS

#### 5.1.1 Otimização do sistema cromatográfico

A otimização consistiu em adaptar o método descrito na literatura (US EPA, 1984; 1986; 1990), sob os seguintes parâmetros: tamanho da coluna e diâmetro da partícula, gradiente de fase móvel e de fluxo e modo de detecção dos analitos. Os parâmetros dos métodos encontrados na literatura encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 – Parâmetros cromatográficos dos métodos encontrados na literatura para determinação dos HPAs

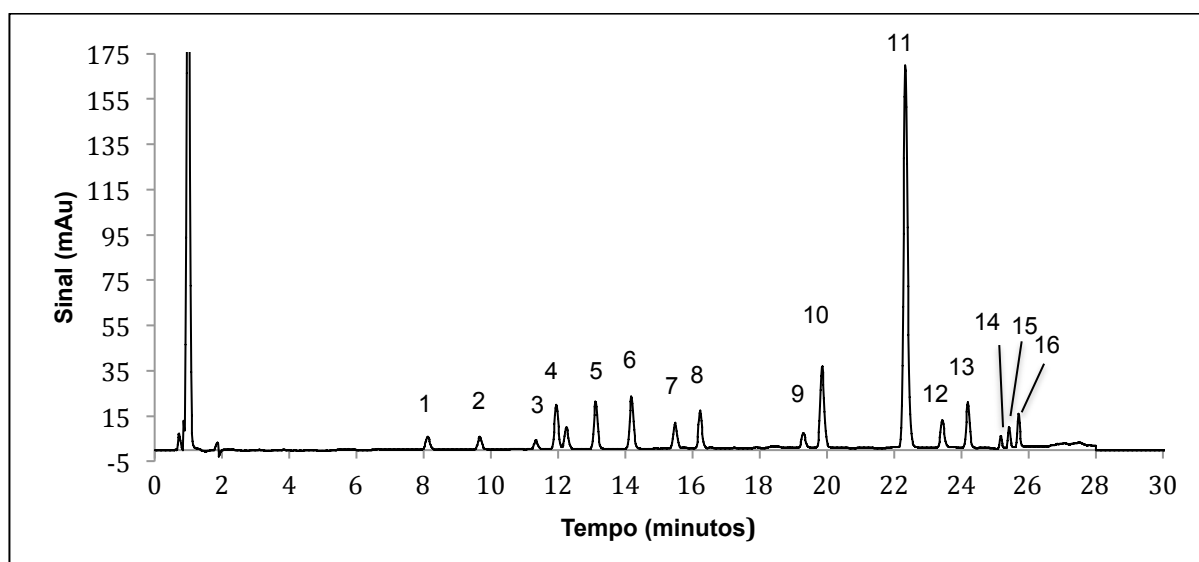
Método	EPA 610	EPA 8310	EPA 5501
Coluna	HC-ODS Sil-X 25 cm; 2,6 mm (d.i.)	HC-ODS Sil-X 25 cm; 2,6 mm (d.i.)	LC-PAH 25 cm; 4,6 mm (d.i.)
Partícula	5 µm	5 µm	5 µm
Fase móvel/ gradiente	ACN:Água (40:60) por 5 minutos, a 100% de ACN em 25 minutos	ACN:Água (40:60) por 5 minutos, a 100% de ACN em 25 minutos	ACN:Água(35:65) por 2 minutos, a 100% de ACN em 22 minutos
Fluxo	0,5 mL/minuto	0,5 mL/minuto	2,0 mL/minuto
Detecção	UV/Fluorescência	UV/Fluorescência	UV/Fluorescência

Com base nos métodos encontrados na literatura, um novo perfil de gradiente de fase móvel e de fluxo foi testado. Este novo perfil encontra-se descrito na tabela 12. O cromatograma obtido utilizando o gradiente de fase móvel e de fluxo descrito na tabela 12 está representado na figura 4.

Tabela 12 – Perfil do gradiente de fase móvel e de fluxo testado na otimização do método para determinação dos HPAs por CLAE usando fase reversa

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)	Fluxo (mL/min)
0	60	40	1,8
4	60	40	1,8
23	10	90	1,8
23,5	10	90	2,0
24	5	95	2,0
24,5	0	100	3,0
25	0	100	3,5
29	0	100	3,5
29,5	60	40	1,8
30	60	40	1,8

Figura 4 – Cromatograma da separação dos HPAs estudados utilizando o perfil de gradiente de fase móvel e de fluxo descritos tabela 12



Coluna Pursuit 3 PAH; gradiente da fase móvel acetonitrila-água (40:60) a 100% de acetonitrila em 29 min.; gradiente de fluxo: 1,8 a 3,5 mL/min.; volume injetado: 20  $\mu$ l; detecção arranjo de fotodiodos (DAD) – 254 nm (canal 1); 1-naftaleno; 2-acenaftileno; 3-acenafteno; 4-fluoreno; 5-fenantreno; 6-antraceno; 7-fluoranteno; 8-pireno; 9-benzo(a)antraceno; 10-criseno; 11-benzo(b)fluoranteno; 12-benzo(k)fluoranteno; 13- benzo(a)pireno; 14-dibenzo(a,h)antraceno; 15-benzo(g,h,i)perileno; 16-indeno(1,2,3-cd)pireno.

Utilizando o método descrito na tabela 12 foi possível separar os HPAS escolhidos para este trabalho, mas os últimos três encontravam-se muito próximos e acabariam coeluyendo caso a concentração fosse aumentada. Passou-se então a trabalhar nas tentativas de melhorar a separação cromatográfica destes três últimos analitos.

A primeira tentativa consistiu em modificar o fluxo de 3,5 mL/min para 2,0 mL/min a partir dos 25 minutos até os 29 minutos de corrida cromatográfica. O restante permaneceu o mesmo. Esta tentativa não apresentou resultados satisfatórios e uma nova tentativa foi necessária. Desta vez modificou-se a concentração da fase móvel. De zero a 25 minutos permaneceu o mesmo gradiente e a partir dos 25 minutos até 29 minutos a fase móvel passou de 0% água:100% acetonitrila para 30% água:70% acetonitrila. Esta tentativa também não deu bons resultados. Uma terceira tentativa foi realizada alterando a concentração e o fluxo da fase móvel. Aos 25 minutos a concentração da fase móvel passou de 0% água:100% acetonitrila para 30% água:70% acetonitrila e o fluxo de 3,5 mL/min para 1,8 mL/min até os 29 minutos de corrida. O restante permaneceu o mesmo. Também não houve sucesso. Resolvemos alterar o fluxo e o gradiente a partir dos 23 minutos de corrida cromatográfica, ficando da seguinte maneira: dos 23 minutos até 29 minutos o fluxo foi de 1,8 mL/min para 3,5 mL/min e o gradiente passou de 10% de água e 90% de acetonitrila para zero % de água e 100% de acetonitrila. Dessa forma, a separação cromatográfica melhorou. Mas o gradiente de fluxo era bastante agressivo e causava uma elevação na pressão da coluna que chegava próximo aos 360 bar, o que deveria ser evitado, para preservar a vida útil da coluna e também do equipamento (que suporta uma pressão máxima de 400 bar). Então, uma última alteração no método foi avaliada. O gradiente da fase móvel foi alterado a partir dos 24,5 minutos de 10% de água e 90% de acetonitrila para 7% de água e 93% de acetonitrila chegando aos 29 minutos com zero% de água e 100% de acetonitrila e retornando a 60% de água e 40% de acetonitrila aos 30 minutos. O fluxo da fase móvel também foi alterado. Passou de 1,8 mL/min aos 23 minutos para 2,2 mL/min até 29 minutos e voltando a 1,8 mL/min aos 30 minutos. Dessa forma, a pressão exercida sobre a coluna durante a corrida cromatográfica, que iniciava em aproximadamente 234 bar não se elevou, e sim reduziu, pois a quantidade de



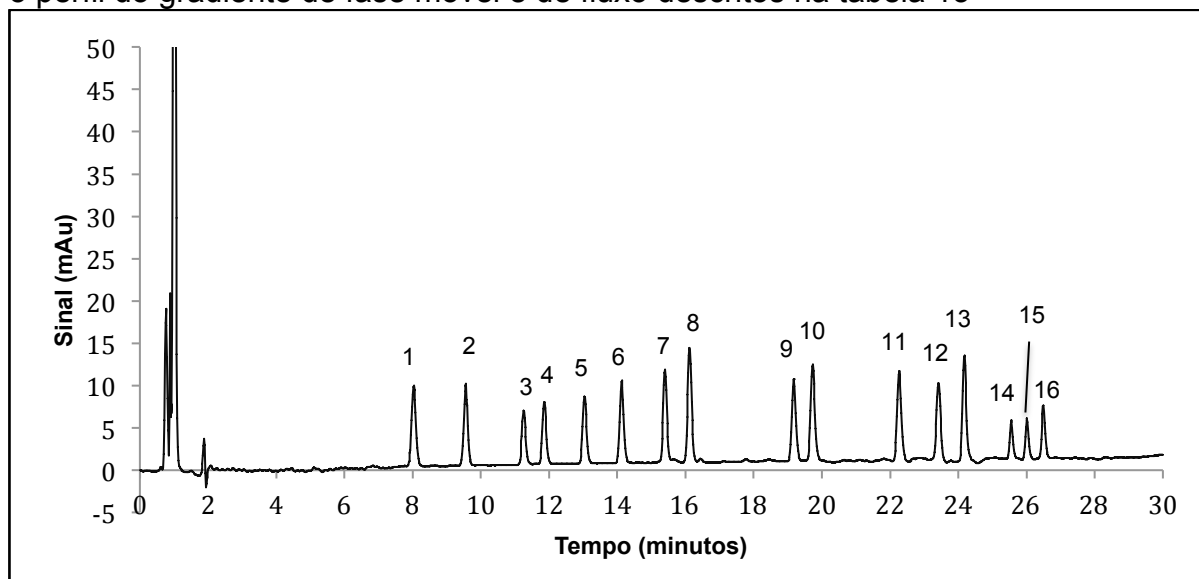
acetonitrila foi aumentando gradativamente o que causou uma redução na pressão, mesmo com o aumento do fluxo.

O perfil do gradiente de fase móvel e de fluxo do método usado para realizar as análises encontra-se na tabela 13. O cromatograma obtido com os dados da tabela 13 está representado na figura 5.

Tabela 13 – Perfil do gradiente de fase móvel e de fluxo do método utilizado para realizar as análises

Tempo (minutos)	Água (%)	Acetonitrila (%)	Fluxo (mL/min)
0	60	40	1,8
4	60	40	1,8
23	10	90	1,8
24,5	7	93	2,2
29	0	100	2,2
30	60	40	1,8

Figura 5 – Cromatograma de separação dos HPAs pelo método adaptado utilizando o perfil do gradiente de fase móvel e de fluxo descritos na tabela 13

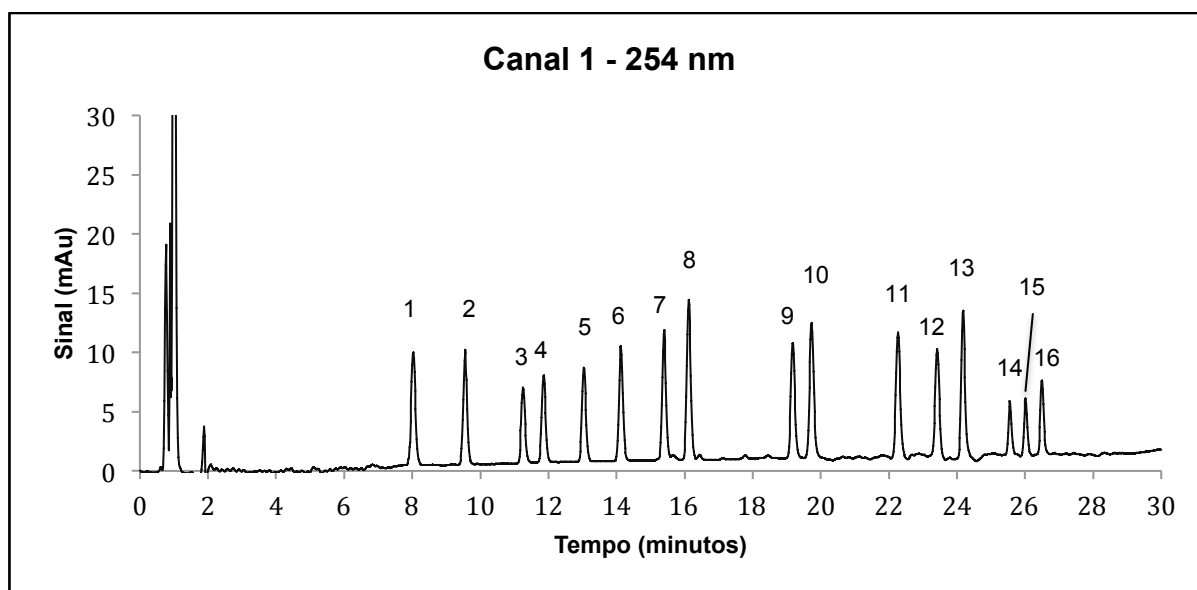


Coluna Pursuit 3 PAH; gradiente da fase móvel acetonitrila-água (40:60) a 100% de acetonitrila em 29 min.; gradiente de fluxo: 1,8 a 2,2 mL/min.; volume injetado: 20 µl; detecção por arranjo de fotodiodos (DAD) – 254 nm (canal 1); 1-naftaleno; 2-acenaftileno; 3-acenafteno; 4-fluoreno; 5-fenantreno; 6-antraceno; 7-fluoranteno; 8-pireno; 9-benzo(a)antraceno; 10-criseno; 11-benzo(b)fluoranteno; 12-benzo(k)fluoranteno; 13-benzo(a)pireno; 14-dibenzo(a,h)antraceno; 15-benzo(g,h,i)perileno; 16-indeno(1,2,3-cd)pireno.

### 5.1.2 Seletividade

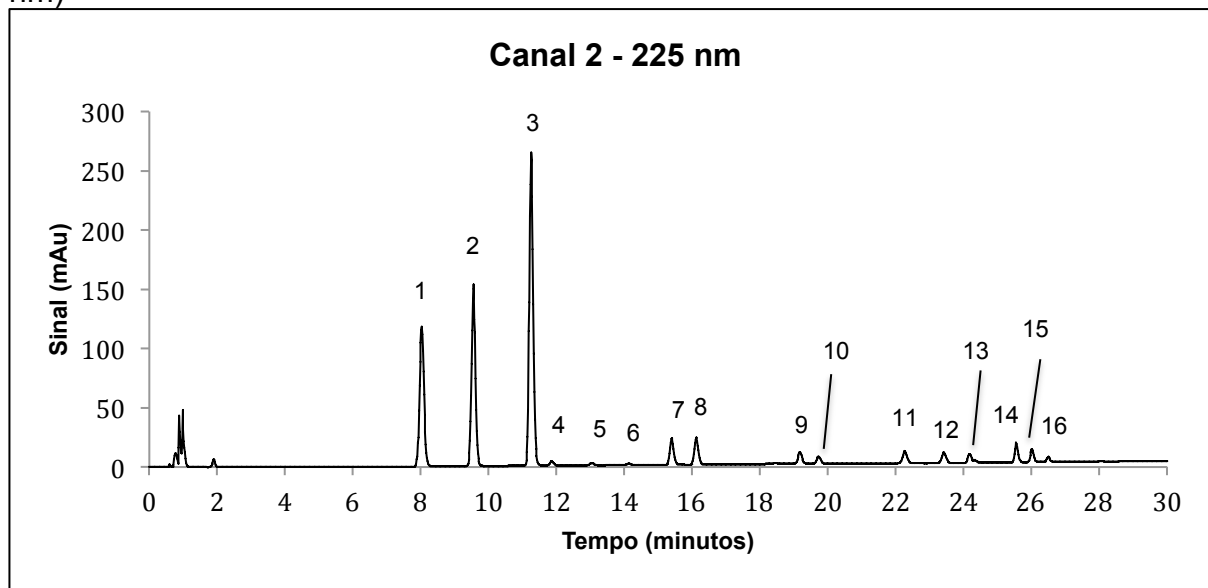
A mudança do modo de detecção para arranjo de fotodiodos (DAD) permitiu determinar o melhor comprimento de onda para cada analito, pois este tipo de detecção nos fornece o espectro da substância analisada. Desta maneira foi possível determinar os comprimentos de ondas onde os analitos melhor respondiam, mas como o aparelho propiciava leitura de somente quatro comprimentos de onda (separados em canais) simultaneamente, foi necessário escolher os que englobassem todos os HPAs estudados. Ficou, então, determinado que apenas os canais 1 (254 nm) e 2 (225 nm) seriam utilizados para a determinação dos compostos, pois foi verificado que não havia diferença relevante entre os demais canais. A tabela 5 mostra a divisão dos HPAs em seus respectivos canais. Os cromatogramas correspondentes aos canais selecionados encontram-se nas figuras 6 e 7.

Figura 6 –Cromatograma da separação dos compostos obtido pelo canal 1 (254 nm)



Coluna Pursuit 3 PAH; gradiente da fase móvel acetonitrila-água (40:60) a 100% de acetonitrila em 29 min.; gradiente de fluxo: 1,8 a 2,2 mL/min.; volume injetado: 20 µl; detecção por arranjo de fotodiodos (DAD); 1-naftaleno; 2-acenaftileno; 3-acenafteno; 4-fluoreno; 5-fenantreno; 6-antraceno; 7-fluoranteno; 8-pireno; 9-benzo(a)antraceno; 10-criseno; 11-benzo(b)fluoranteno; 12-benzo(k)fluoranteno; 13- benzo(a)pireno; 14-dibenzo(a,h)antraceno; 15-benzo(g,h,i)perileno; 16-indeno(1,2,3-cd)pireno.

Figura 7 – Cromatograma da separação dos compostos obtido pelo canal 2 (225 nm)



Coluna Pursuit 3 PAH; gradiente da fase móvel acetonitrila-água (40:60) a 100% de acetonitrila em 29 min.; gradiente de fluxo: 1,8 a 2,2 mL/min.; volume injetado: 20 µl; detecção por arranjo de fotodiodos (DAD); 1-naftaleno; 2-acenaftileno; 3-acenafteno; 4-fluoreno; 5-fenantreno; 6-antraceno; 7-fluoranteno; 8-pireno; 9-benzo(a)antraceno; 10-criseno; 11-benzo(b)fluoranteno; 12-benzo(k)fluoranteno; 13- benzo(a)pireno; 14-dibenzo(a,h)antraceno; 15-benzo(g,h,i)perileno; 16-indeno(1,2,3-cd)pireno.

Como podemos observar, os cromatogramas não estão na mesma escala, pois na figura 7 a escala está em 300 mAu, mostrando que o comprimento de onda de 225 nm é mais sensível para os compostos naftaleno, acenaftileno e acenafteno. Desta forma, esse foi o canal (comprimento de onda) escolhido para estes analitos, bem como para o fluoranteno, pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno. Para os demais analitos o canal 1 (254 nm) foi mais adequado.

### 5.1.3 Linearidade do método

A linearidade do método foi determinada através da construção de curvas analíticas. As concentrações dos pontos da curva analítica, para os 16 HPAs, encontram-se na tabela 8. Foram realizadas três injeções de cada ponto da curva e as áreas obtidas foram analisadas pela ANOVA que gerou equações da reta para cada composto. Faixa de trabalho, equações da reta e r encontram-se na tabela 14.

Tabela 14 – Faixa de trabalho, equação da reta e valores de r para os HPAs estudados.

HPAs	Faixa de trabalho (mg/L)	Equação da reta	r
Naftaleno	0,125 – 2,000	$y = 200583x + 2493,7$	0,9983
Acenaftileno	0,125 – 2,000	$y = 158485x + 1557,7$	0,9984
Acenafteno	0,125 – 2,000	$y = 251586x + 10332$	0,9993
Fluoreno	0,250 – 4,000	$y = 58888x + 3961,4$	0,9997
Fenantreno	0,125 – 2,000	$y = 151658x + 3675,9$	0,9999
Antraceno	0,050 – 0,800	$y = 340361x + 2505,3$	0,9998
Fluoranteno	0,500 – 8,000	$y = 32680x + 2976,1$	0,9995
Pireno	0,250 – 4,000	$y = 62938x + 3235,8$	0,9994
Benzo(a)antraceno	0,180 – 2,880	$y = 109258x + 3018,1$	0,9999
Criseno	0,150 – 2,400	$y = 67644x + 1383,9$	0,9999
Benzo(b)fluoranteno	0,180 – 2,880	$y = 105887x + 4712,7$	0,9998
Benzo(k)fluoranteno	0,250 – 4,000	$y = 79337x + 3826,4$	0,9980
Benzo(a)pireno	0,300 – 4,800	$y = 71378x + 3893,8$	0,9983
Dibenzo(a,h)antraceno	0,500 – 8,000	$y = 48296x - 2552,8$	0,9981
Benzo(g,h,i)perileno	0,360 – 5,670	$y = 60214x + 719,1$	0,9984
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,200 – 3,200	$y = 84641x + 3805,7$	0,9990

Observou-se que o intervalo de trabalho escolhido guarda excelente relação linear com o sinal analítico, denotado pelos valores do coeficiente de correlação próximos de 1. Do mesmo modo, o método apresentou grande sensibilidade, pois os coeficientes angulares das retas (representado pelo termo “a” da equação da reta) apresentaram valores elevados. Isso significa que com pequenas variações na concentração obtêm-se grandes variações no sinal analítico, garantindo diferenciação entre duas concentrações bastante próximas.

## 5.1.4 Precisão

### 5.1.4.1 Repetitividade

Os resultados da repetitividade, determinada em três níveis de concentração, encontram-se na tabela 15 e foram expressos através do desvio padrão relativo, também conhecido como coeficiente de variação (C.V.).

Tabela 15 – Precisão intradia do método para determinação dos HPAs estudados utilizando CLAE em fase reversa e detecção por DAD – resultados em C.V. (%) (n=9)

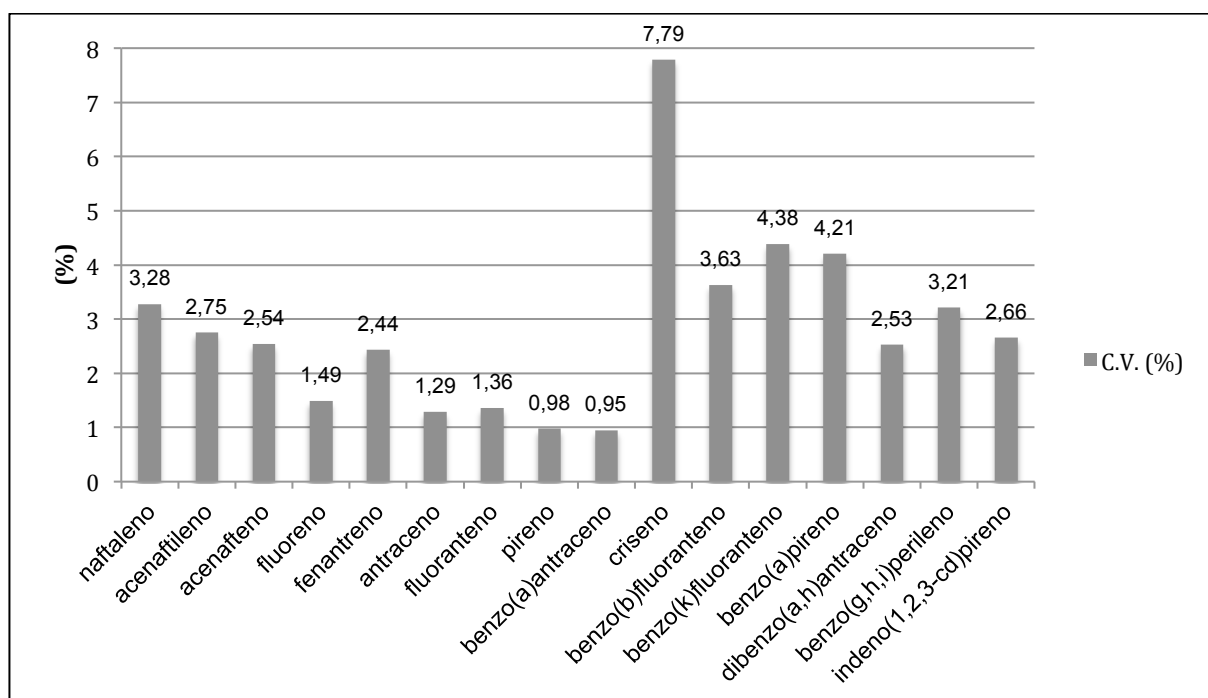
HPAs	1º ponto da curva	3º ponto da curva	5º ponto da curva
Naftaleno	2,35	2,43	3,80
Acenaftileno	8,08	1,58	6,31
Acenafteno	5,14	1,56	3,90
Fluoreno	4,10	7,57	9,32
Fenantreno	3,50	1,90	1,28
Antraceno	4,18	3,62	1,22
Fluoranteno	3,64	3,69	2,50
Pireno	3,81	2,47	1,37
Benzo(a)antraceno	6,61	7,51	4,03
Criseno	11,26	9,04	2,99
Benzo(b)fluoranteno	0,48	2,26	1,25
Benzo(k)fluoranteno	3,64	7,07	6,11
Benzo(a)pireno	2,53	6,46	7,16
Dibenzo(a,h)antraceno	1,42	2,76	1,63
Benzo(g,h,i)perileno	0,42	2,39	0,92
Indeno(1,2,3-cd)pireno	2,16	2,41	2,91

De acordo com a European Medicines Agency (EMA 2009) e ANVISA (2012), são aceites coeficientes de variação de até 15%. Dessa maneira, os resultados obtidos encontram-se dentro dos limites aceitáveis para precisão, uma vez que a variação ficou entre 0,42% e 11,26%.

#### 5.1.4.2 Precisão intermediária

A figura 8 mostra os resultados para a precisão intermediária, expressos através do coeficiente de variação (C.V.%). Pode-se verificar que nenhum dos resultados ultrapassou os limites citados pela literatura consultada, conforme EMA (2009) e ANVISA (2012), onde são aceites coeficientes de variação de até 15%, mostrando que estão em conformidade com o preconizado uma vez que a variação ficou entre 0,95% e 7,79%.

Figura 8 – Precisão intermediária do método para determinação dos HPAs estudados utilizando CLAE em fase reversa e detecção por DAD



### 5.1.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação, para os HPAs estudados, foram determinados com base na relação sinal:ruído, segundo INMETRO (2010), utilizando as fórmulas 2 e 3, respectivamente. Realizou-se um número de sete replicatas do branco do solvente, conforme recomendado pelo INMETRO (2010). Os resultados obtidos estão listados na tabela 16.

Tabela 16 – Limites de detecção e quantificação dos HPAs estudados

HPAs	L.D. (mg/L)	L.Q. (mg/L)
Naftaleno	0,001	0,003
Acenaftileno	0,002	0,006
Acenafteno	0,002	0,006
Fluoreno	0,005	0,011
Fenantreno	0,002	0,004
Antraceno	0,001	0,002
Fluoranteno	0,020	0,044
Pireno	0,014	0,037
Benzo(a)antraceno	0,004	0,012
Criseno	0,016	0,040
Benzo(b)fluoranteno	0,009	0,022
Benzo(k)fluoranteno	0,023	0,060
Benzo(a)pireno	0,060	0,167
Dibenzo(a,h)antraceno	0,031	0,063
Benzo(g,h,i)perileno	0,014	0,031
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,012	0,030

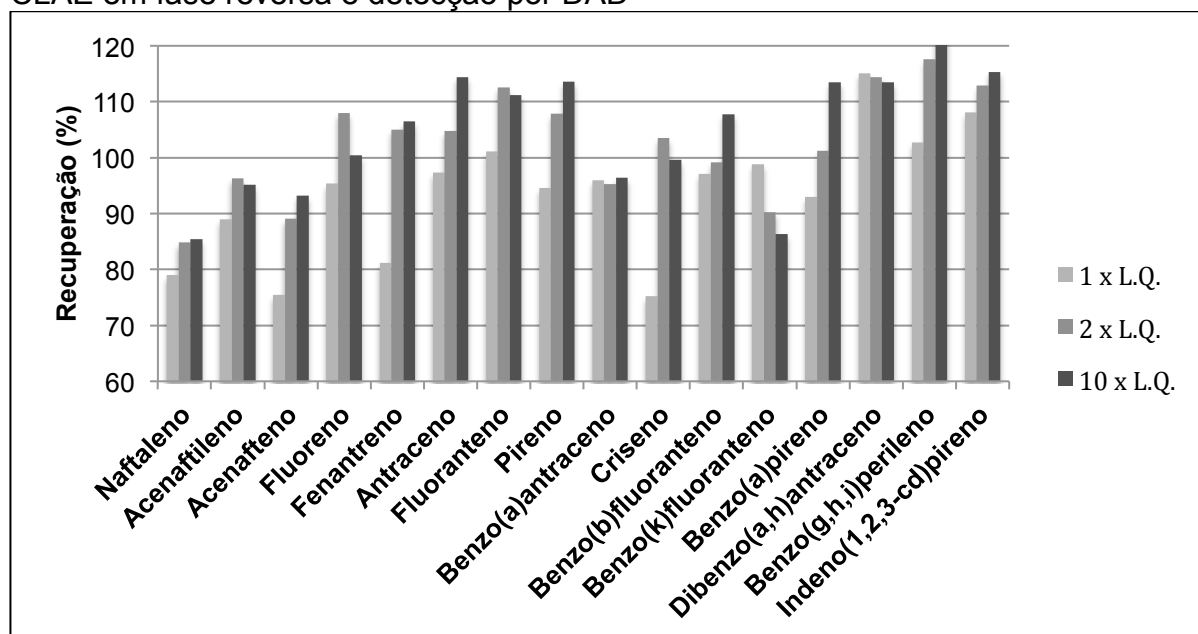
Ao comparar nossos resultados, para o limite de detecção, com os encontrados na literatura, podemos verificar que vão ao encontro do que foi observado por Oleszczuk e Baran (2004) que, usando CLAE com detecção UV, obtiveram valores de limite de detecção inferiores a 0,05 mg/L para os 16 HPAs considerados prioritários, enquanto que os nossos resultados revelaram ser inferiores a 0,06 mg/L para os mesmos analitos.

Não foi possível estabelecer uma comparação dos valores encontrados para o limite de detecção, para todos os HPAs envolvidos em nosso estudo, com os valores obtidos pelos métodos usados como base para o desenvolvimento do método CLAE-DAD utilizado para determinação dos HPAs em nosso trabalho (tabela 11). Os métodos, descritos na tabela 11, utilizaram duas formas de detecção dos analitos, que foram ultravioleta e fluorescência. Naftaleno, acenaftileno e acenafteno foram detectados por UV e os demais por fluorescência. Dessa forma, somente seria possível uma comparação dos valores para os três analitos anteriormente relatados, já que foram detectados da mesma forma que em nosso trabalho. Nos métodos anteriores (tabela 11) os valores encontrados tanto para naftaleno, acenaftileno e acenafteno foi em torno de 0,002 mg/L, o que também se repetiu em nossos resultados.

### 5.1.6 Exatidão

A exatidão foi determinada através da recuperação do analito na amostra nos níveis de 1, 2 e 10 vezes o limite de quantificação. Os resultados encontram-se na figura 9.

Figura 9 – Recuperação (%), na amostra, dos HPAs estudados (n=9) utilizando CLAE em fase reversa e detecção por DAD



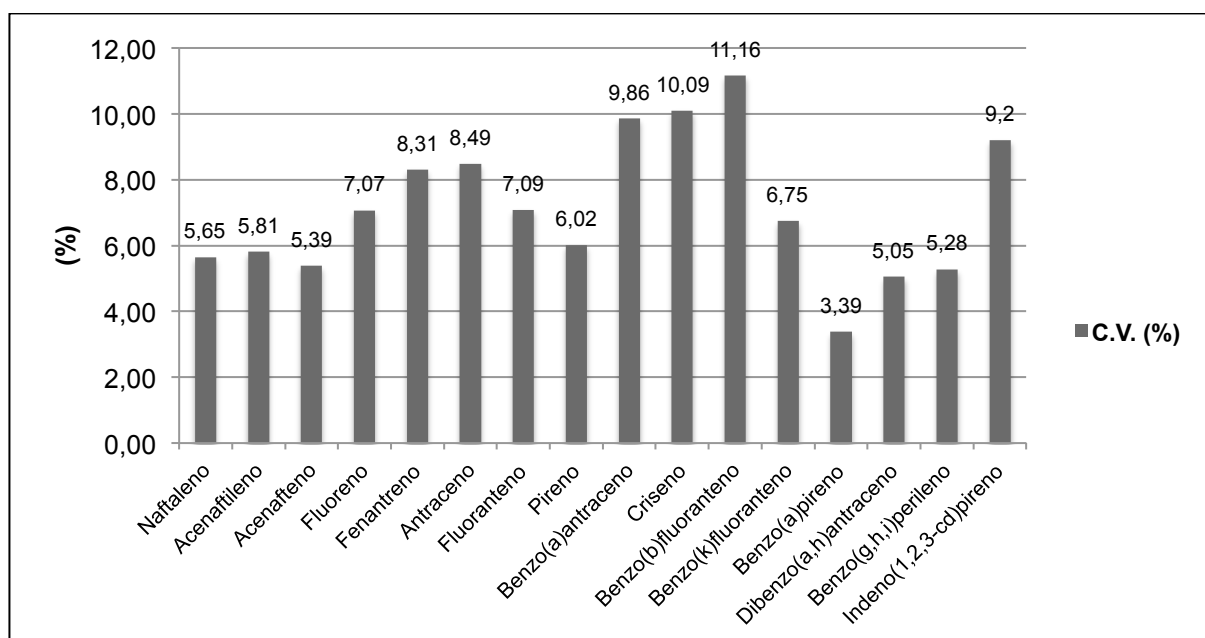


Podemos observar que os resultados obtidos estão dentro do esperado para este ensaio, pois ficaram na faixa de 75,19% e 117,63%. Segundo a EPA (1996) e a E.C. (2016) os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de traços geralmente estão entre 70 e 120%. Apenas o benzo(g,h,i)perileno apresentou, no ponto 10 x L.Q., valor acima do recomendado (121,54%).

### 5.1.7 Robustez

O teste de robustez para o método de determinação dos HPAs foi realizado usando a temperatura como parâmetro de variação. Os resultados encontram-se na figura 10. Os valores dos coeficientes de variação obtidos encontram-se dentro do permitido pela literatura, ou seja abaixo de 15%, segundo EMA (2009) e ANVISA (2012).

Figura 10 – Resultado do teste de robustez para o método de determinação dos HPAs por CLAE em fase reversa e detecção por DAD



### 5.1.8 Conformidade do sistema

Para a avaliar a conformidade do sistema, levamos em consideração o fator de retenção (k) e o número de pratos teóricos da coluna. Para o cálculo do número de pratos teóricos da coluna (fórmula 5) utilizamos a largura da base do terceiro pico do cromatograma (correspondente ao acenafteno) que mostrou um fator de retenção maior que cinco, pois segundo HARRIS (2012) quando determinamos a altura do prato de uma coluna, escolhemos um pico que apresente um fator de retenção maior que cinco. Dessa forma, o número de pratos teóricos resultou no valor de 6284. Segundo o FDA (2000) a recomendação para a conformidade do sistema em relação ao número de pratos teóricos é que a coluna possua mais que 2000. Assim, este parâmetro está em conformidade com os dados da literatura.

O fator de retenção (fórmula 6) foi determinado para cada analito e os resultados encontram-se na tabela 17.

Tabela 17 – Fator de retenção (k) para os HPAs estudados

HPAs	k	HPAs	k
Naftaleno	3,74	Benzo(a)antraceno	10,81
Acenaftileno	4,75	Criseno	11,13
Acenafteno	5,81	Benzo(b)fluoranteno	12,69
Fluoreno	6,19	Benzo(k)fluoranteno	13,31
Fenantreno	6,94	Benzo(a)pireno	13,75
Antraceno	7,63	Dibenzo(a,h)antraceno	14,81
Fluoranteno	8,38	Benzo(g,h,i)perileno	15,13
Pireno	8,81	Indeno(1,2,3-cd)pireno	15,50

Segundo o FDA (2000) o fator de retenção (k) deve ser superior a 2,0. Dessa forma, os resultados estão dentro do determinado pela literatura.

## 5.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS PARA NUTRIÇÕES PARENTERAIS

As amostras comerciais utilizadas na composição das nutrições parenterais foram preparadas conforme descrito no item 4.5.1.3.1 e analisadas pelo método cromatográfico otimizado anteriormente.

Foram analisadas as seguintes amostras: solução de aminoácidos Aminoven 10% Infant® (FreseniusKabi), emulsão lipídica Lipovenos®MCT 20% (FreseniusKabi), Água para injeção (FreseniusKabi), Glycophos® (glicerofosfato de sódio – fósforo orgânico - FreseniusKabi), Glicose 50% (Viaflex® - Baxter), Gluconato de cálcio 10% (FreseniusKabi), Cloreto de potássio 10% (Isofarma), Sulfato de magnésio 50% (Isofarma), Olig-Trat (Oligoelementos – Citopharma) e Frutovitam (vitaminas – Cristália).

Todas as amostras foram cedidas pela farmácia hospitalar do HUSM, pois eram as mesmas utilizadas no preparo das NP administradas aos bebês recém-nascidos selecionados para o estudo.

As amostras de solução de aminoácidos e emulsão lipídica tinham lotes variados, pois foram marcadas por dia de utilização e cada lote foi analisado separadamente. Já para o fósforo orgânico, água para injetáveis, glicose 50%, gluconato de cálcio, cloreto de potássio, sulfato de magnésio, Olig.-Trat e Frutovitam não houve mudança no lote destas substâncias durante o tempo da coleta das bolsas de nutrição parenteral.

As amostras de soluções de aminoácidos e emulsões lipídicas estavam armazenadas em recipientes de vidro e fechadas com tampa de borracha e lacre de alumínio. A água para injeção estava armazenada em bolsa de plástico rígido, já o fósforo orgânico, cloreto de potássio e sulfato de magnésio estavam armazenados em frasco-ampola de plástico. A solução de glicose 50% estava armazenada em bolsa flexível isenta de látex. O gluconato de cálcio, Olig-Trat e Frutovitam estavam armazenados em ampola de vidro.

Os lotes das amostras de soluções de aminoácidos e de emulsões lipídicas e a data em que foram utilizadas na preparação das NP encontram-se na tabela 18.

Tabela 18 – Denominação das amostras de soluções de aminoácidos e emulsões lipídicas utilizadas na preparação das nutrições parenterais

Amostra	Lote	Data de utilização	Denominação
Aminoven 10% Infant®	16GL0314	29.01.2015	A1
Aminoven 10% Infant®	16GL0314	30.01.2015	A2
Aminoven 10% Infant®	16GL0314	11.02.2015	A3
Aminoven 10% Infant®	16GK0029-067	12.02.2105	A4
Aminoven 10% Infant®	16GK0029-069	12.02.2105	A5
Aminoven 10% Infant®	16GK0029	20.02.2015	A6
Aminoven 10% Infant®	16GK0029-089	05.04.2015	A7
Lipovenos® MCT 20%	16HB0232	29.01.2015	L1
Lipovenos® MCT 20%	16HB0232	30.01.2015	L2
Lipovenos® MCT 20%	16HB0235	09.02.2015	L3
Lipovenos® MCT 20%	16HB0235	10.02.2015	L4
Lipovenos® MCT 20%	160055HB0232	25.02.2015	L5
Lipovenos® MCT 20%	16082HB0235	05.04.2015	L6

A concentração (em mg/L) de cada HPA encontrado nas amostras de soluções de aminoácidos e das emulsões lipídicas, que foram analisados por lotes e datas de utilização para preparação das nutrições parenterais, encontra-se na tabela 19 e 20, respectivamente.

Tabela 19 – Concentração (em mg/L) de HPA encontrado nas amostras de soluções de aminoácidos analisadas por lotes e datas de utilização na preparação das nutrições parenterais

HPAs	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
Naftaleno	-	<L.Q.	0,017	0,053	0,017	-	0,029
Acenaftileno	0,036	<L.Q.	<L.Q.	0,091	0,034	0,120	0,043
Acenafteno	0,032	-	-	0,096	0,013	0,052	0,028
Fluoreno	-	-	-	-	-	0,340	-
Fenantreno	0,031	0,021	0,112	-	-	0,024	-
Antraceno	-	-	-	-	-	<L.Q.	-
Fluoranteno	0,268	0,044	<L.Q.	-	-	0,732	-
Pireno	0,194	0,047	0,044	<L.Q.	-	0,292	-
Benzo(a)antraceno	-	-	-	-	-	-	-
Criseno	-	-	-	-	-	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	1,628	-	-	-	-	-
Benzo(k)fluoranteno	-	-	-	-	0,102	-	-
Benzo(a)pireno	-	-	-	-	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	-	-	-	0,153	0,090	0,078	0,072
Benzo(g,h,i)perileno	-	-	0,279	0,026	<L.Q.	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-	-	-	-	<L.Q.	-	-
Total	0,561	1,740	0,452	0,419	0,256	1,638	0,172

(-) = não detectado; <L.Q.= abaixo do limite de quantificação.

Tabela 20 - Concentração (em mg/L) de HPA encontrado nas amostras de emulsões lipídicas analisadas por lotes e datas de utilização na preparação das nutrições parenterais

HPAs	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Naftaleno	0,023	<L.Q.	-	0,100	-	0,005
Acenaftileno	0,077	-	0,077	0,096	-	0,032
Acenafteno	0,023	-	0,035	0,081	-	0,015
Fluoreno	0,200	0,092	0,179	-	-	-
Fenantreno	0,013	0,026	0,006	0,332	-	-
Antraceno	-	-	-	-	-	-
Fluoranteno	-	-	7,238	0,129	-	0,025
Pireno	0,187	3,908	0,208	0,093	-	-
Benzo(a)antraceno	-	-	-	-	-	-
Criseno	-	-	-	-	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	-	-	-	-	-
Benzo(k)fluoranteno	-	-	0,112	0,053	0,145	0,064
Benzo(a)pireno	-	-	-	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	3,219	-	-	2,754	-	-
Benzo(g,h,i)perileno	5,970	2,950	2,689	0,033	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-	-	0,018	-	-	-
Total	9,712	6,976	10,562	3,671	0,145	0,141

(-) = não detectado; (< L.D.) = abaixo do limite de quantificação.

Os resultados expostos nas tabelas 19 e 20 mostram que a concentração total de HPAs nas soluções de aminoácidos foi menor do que nas emulsões lipídicas. O valor médio nas soluções de aminoácidos foi de 0,748 mg/L enquanto que para as emulsões lipídicas foi de 5,201 mg/L.

A diferença encontrada entre estas formulações talvez possa ser explicada pela característica lipofílica que as emulsões lipídicas possuem e que poderia favorecer a extração (migração) dos analitos da tampa de borracha para a formulação (BALL et al., 2007; FDA, 2011).

As concentrações de HPAs encontradas na amostra de fósforo orgânico, água para injetáveis, glicose 50%, cloreto de potássio e Frutovitam (tabela 21)

também apresentaram o mesmo comportamento que as soluções de aminoácidos, mostrando valores menores que as emulsões lipídicas. Já o gluconato de cálcio, sulfato de magnésio e Olig-Trat não apresentaram HPAs.

Tabela 21 – Concentração (em mg/L) de HPAs encontrada nas amostras dos demais componentes utilizados nas preparações das nutrições parenterais

HPAs	Fósforo orgânico	Água para injetáveis	Glicose 50%	Fruto-vitam	Cloreto de potássio	Sulfato de magnésio	Olig-Trat	Gluconato de Cálcio
Naftaleno	0,045	0,078	0,038	-	-	-	-	-
Acenaftileno	0,129	0,224	0,090	-	-	-	-	-
Acenafteno	0,159	0,272	0,070	-	-	-	-	-
Fluoreno	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenantreno	-	0,020	-	-	-	-	-	-
Antraceno	-	0,003	-	-	-	-	-	-
Fluoranteno	0,063	0,170	0,022	-	-	-	-	-
Pireno	0,096	0,131	0,047	0,313	0,019	-	-	-
Benzo(a)antraceno	-	-	-	-	-	-	-	-
Criseno	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzo(k)fluoranteno	0,146	0,114	0,096	-	-	-	-	-
Benzo(a)pireno	-	-	-	-	-	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	-	0,182	0,098	-	-	-	-	-
Benzo(g,h,i)perileno	-	-	-	-	-	-	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	0,638	1,194	0,461	0,313	0,019	-	-	-

(-) = não detectado

A tabela 22 ilustra o efeito dos lipídeos na extração dos HPAs das bolsas de NP. A tabela mostra a concentração de HPAs em três bolsas de NP (apêndice B) administradas à três bebês selecionados para o estudo, em cuja composição não entrou lipídeos e uma bolsa que continha lipídeos. Pode-se observar que o total de HPAs, para as bolsas sem lipídeos é semelhante ao encontrado nas soluções comerciais de aminoácidos. Na bolsa com lipídeos, a concentração de HPAs é bem mais elevada.

Tabela 22 – Concentração de HPAs (mg/L) encontrados nas nutrições parenterais administradas aos recém-nascidos 01, 04 e 07 nos dias 31.01.2015, 15.02.2015 e 16.02.2015, respectivamente

HPAs	RN 01 NP 31.01.15	RN 04 NP 15.02.2015	RN 07 NP 16.02.2015
Naftaleno	-	0,013	0,007
Acenaftileno	0,114	<L.Q.	-
Acenafteno	0,051	-	-
Fluoreno	0,348	-	-
Fenantreno	0,030	-	-
Antraceno	-	-	-
Fluoranteno	-	-	-
Pireno	2,383	<L.Q.	0,037
Benzo(a)antraceno	-	-	-
Criseno	-	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	-	-
Benzo(k)fluoranteno	-	-	-
Benzo(a)pireno	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	0,839	-	0,074
Benzo(g,h,i)perileno	1,556	-	<L.Q.
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-	-	-
Total	5,321	0,013	0,118

(-) = não detectado; (<L.Q.) = abaixo do limite de quantificação.

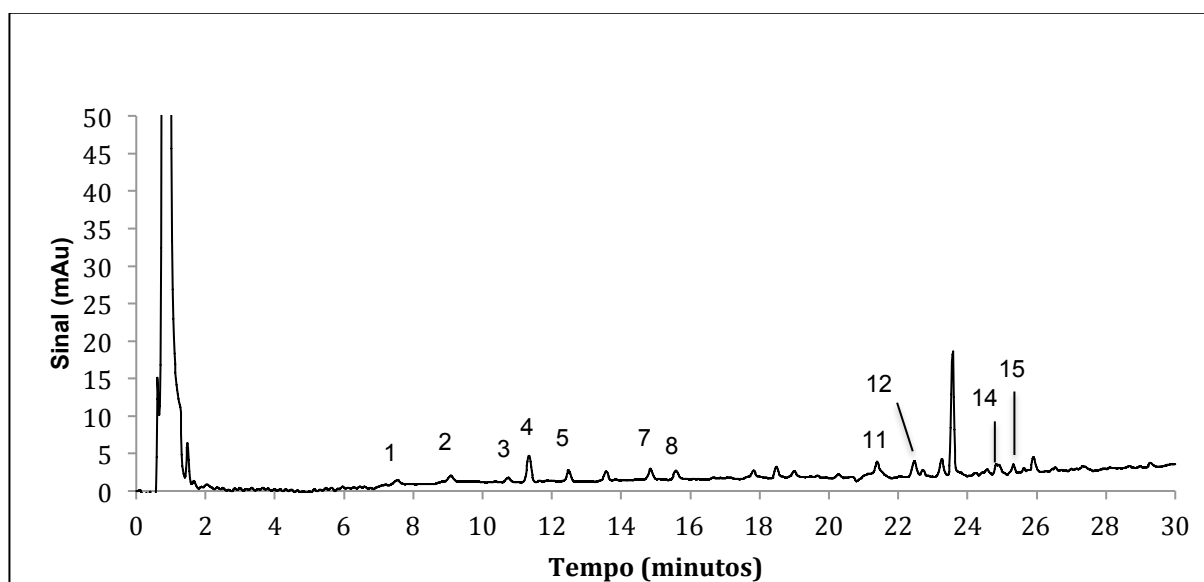


### 5.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE NUTRIÇÃO PARENTERAL PREPARADAS NA FARMÁCIA HOSPITALAR DO HUSM E QUE FORAM ADMINISTRADAS AOS RECÉM-NASCIDOS DA UTI NEONATAL

Para cada recém-nascido, durante o tempo que esteve sob regime de nutrição parenteral (tabela 10), foram coletadas amostras das bolsas de nutrição parenteral administradas. Como as bolsas de nutrição parenteral são trocadas a cada 24 h, o que restava na bolsa nos foi cedido para realizar as análises. Não foi possível obter amostras de todas as bolsas administradas durante todo o tempo em que os bebês estiveram sob regime de NP pois, algumas vezes, não houve sobra de volume suficiente para a análise.

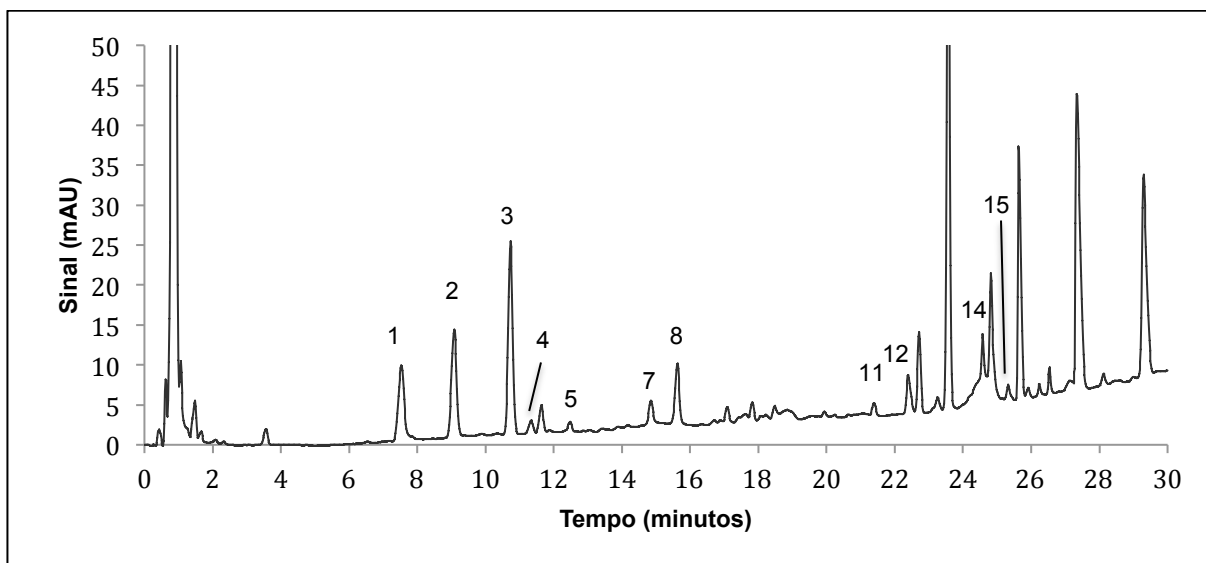
As figuras 11 e 12 mostram cromatogramas da nutrição parenteral administrada ao RN 05 no dia 18.02.2015, onde foram encontrados 11 dos 16 HPAs selecionados para este trabalho.

Figura 11 – Cromatograma de uma amostra real de nutrição parenteral analisada pelo canal 1 ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ )



1-naftaleno; 2-acenaftileno; 3-acenafteno; 4-fluoreno; 5-fenantreno; 7-fluoranteno; 8-pireno; 11-benzo(b)fluoranteno; 12-benzo(k)fluoranteno; 14-dibenzo(a,h)antraceno; 15-benzo(g,h,i)perileno. Coluna Pursuit 3 PAH; gradiente da fase móvel acetonitrila-água (40:60) a 100% de acetonitrila em 29 min.; gradiente de fluxo: 1,8 a 2,2 mL/min.; volume injetado: 20  $\mu\text{l}$ ; detecção por arranjo de fotodiodos (DAD).

Figura 12 – Cromatograma de uma amostra real de nutrição parenteral analisada pelo canal 2 ( $\lambda = 225$  nm)



1-naftaleno; 2-acenaftileno; 3-acenafteno; 4-fluoreno; 5-fenantreno; 7-fluoranteno; 8-pireno; 11-benzo(b)fluoranteno; 12-benzo(k)fluoranteno; 14-dibenzo(a,h)antraceno; 15-benzo(g,h,i)perileno. Coluna Pursuit 3 PAH; gradiente da fase móvel acetonitrila-água (40:60) a 100% de acetonitrila em 29 min.; gradiente de fluxo: 1,8 a 2,2 mL/min.; volume injetado: 20  $\mu$ l; detecção por arranjo de fotodiodos (DAD).

Os resultados da concentração de HPAs encontrados nas amostras de nutrição parenteral que foram administradas aos recém-nascidos selecionados para este estudo encontram-se nas tabelas que vão do número 23 ao 32.

Tabela 23 – Concentração dos HPAs (mg/L) encontrados nas bolsas de nutrição parenteral administradas ao recém-nascido 01

HPAs	29.01.15	30.01.15	31.01.15	07.02.15
Naftaleno	0,069	0,058	-	-
Acenaftileno	0,022	0,017	0,114	0,168
Acenafteno	-	-	0,051	0,075
Fluoreno	0,061	-	0,348	0,446
Fenantreno	0,003	-	0,030	0,046
Antraceno	-	-	-	-
Fluoranteno	-	-	-	-
Pireno	2,612	2,560	2,383	2,080
Benzo(a)antraceno	-	-	-	-
Criseno	-	-	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	-	-	-
Benzo(k)fluoranteno	-	-	-	-
Benzo(a)pireno	-	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	-	-	0,839	0,563
Benzo(g,h,i)perileno	0,226	2,245	1,556	1,119
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-	-	-	-
Total	2,993	4,880	5,321	4,497

(-) = não detectado

Tabela 24 – Quantidade de HPAs (mg/L) encontrados nas nutrições parenterais totais administradas ao recém-nascido 02

HPAs	30.01.15	31.01.15	04.02.15	05.02.15	07.02.15
Naftaleno	<L.Q.	0,009	-	-	-
Acenaftileno	0,030	0,044	-	-	-
Acenafteno	-	0,013	-	-	-
Fluoreno	0,045	0,231	-	<L.Q.	-
Fenantreno	<L.Q.	0,014	0,012	0,026	<L.Q.
Antraceno	-	-	<L.Q.	<L.Q.	-
Fluoranteno	0,170	0,450	-	-	-
Pireno	2,437	0,236	1,609	1,314	1,091
Benzo(a)antraceno	-	-	-	-	-
Criseno	-	-	-	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	-	-	-	-
Benzo(k)fluoranteno	-	-	-	0,213	-
Benzo(a)pireno	-	-	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	-	0,789	0,607	-	-
Benzo(g,h,i)perileno	0,035	-	-	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-	-	-	-	-
Total	2,717	1,789	2,228	1,553	1,091

(-) = não detectado; (<L.Q.) = abaixo do limite de quantificação.

Tabela 25 – Concentração de HPAs (mg/L) encontrados nas nutrições parenterais totais administradas ao recém-nascido 03

HPAs	31.01.15	02.02.15
Naftaleno	-	0,007
Acenaftileno	-	<L.Q.
Acenafteno	-	-
Fluoreno	-	-
Fenantreno	0,455	0,034
Antraceno	-	-
Fluoranteno	0,450	-
Pireno	1,274	0,972
Benzo(a)antraceno	-	-
Criseno	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	-
Benzo(k)fluoranteno	-	-
Benzo(a)pireno	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	-	1,177
Benzo(g,h,i)perileno	2,983	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-	-
Total	5,162	2,190

(-) = não detectado; (< L.Q.) = abaixo do limite de quantificação.

Tabela 26 – Concentração de HPAs (mg/L) encontrados nas nutrições parenterais totais administradas ao recém-nascido 04

HPAs	07.02.15	11.02.15	13.02.15	14.02.15	15.02.15	17.02.15
Naftaleno	0,010	0,013	0,010	0,082	0,013	0,005
Acenaftileno	0,007	-	-	0,041	<L.Q.	-
Acenafteno	-	-	-	0,043	-	-
Fluoreno	-	-	-	-	-	-
Fenantreno	-	0,038	0,312	0,075	-	-
Antraceno	-	-	-	-	-	-
Fluoranteno	<L.Q.	-	0,074	0,035	-	-
Pireno	1,061	0,911	1,219	1,297	<L.Q.	1,244
Benzo(a)antraceno	-	-	-	-	-	-
Criseno	-	-	-	-	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	-	-	-	-	-
Benzo(k)fluoranteno	0,121	-	-	-	-	-
Benzo(a)pireno	-	-	-	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	-	0,463	0,983	0,957	-	0,422
Benzo(g,h,i)perileno	-	-	-	-	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-	-	-	-	-	-
Total	1,199	1,425	2,598	2,530	0,013	1,671

(-) = não detectado; (<L.Q.) = abaixo do limite de quantificação.

Tabela 27 – Concentração de HPAs (mg/L) encontrados nas nutrições parenterais totais administradas ao recém-nascido 05

HPAs	13.02.15	14.02.15	17.02.15	18.02.15
Naftaleno	0,016	0,038	0,131	0,515
Acenaftileno	0,183	0,091	0,256	0,869
Acenafteno	0,088	0,040	0,223	0,839
Fluoreno	0,513	0,073	0,240	0,458
Fenantreno	0,037	-	0,014	0,061
Antraceno	-	-	-	-
Fluoranteno	0,737	<L.Q.	0,282	0,645
Pireno	2,289	1,560	1,325	0,968
Benzo(a)antraceno	-	-	-	-
Criseno	-	-	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	-	-	0,073
Benzo(k)fluoranteno	-	-	-	0,158
Benzo(a)pireno	-	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	0,556	0,582	0,181	0,624
Benzo(g,h,i)perileno	-	-	0,036	0,205
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-	-	-	-
Total	4,419	2,384	2,688	5,415

(-) = não detectado; (< L.Q.) =abaixo do limite de quantificação.

Tabela 28 – Concentração de HPAs (mg/L) encontrados nas nutrições parenterais totais administradas ao recém-nascido 06

HPAs	13.02.15
Naftaleno	0,017
Acenaftileno	0,015
Acenafteno	0,006
Fluoreno	-
Fenantreno	-
Antraceno	-
Fluoranteno	-
Pireno	1,902
Benzo(a)antraceno	-
Criseno	-
Benzo(b)fluoranteno	-
Benzo(k)fluoranteno	0,061
Benzo(a)pireno	-
Dibenzo(a,h)antraceno	0,090
Benzo(g,h,i)perileno	2,999
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-
Total	5,090

(-) = não detectado.



Tabela 29 – Concentração de HPAs (mg/L) encontrados nas nutrições parenterais totais administradas ao recém-nascido 07

HPAs	13.02	14.02	16.02	17.02	18.02	19.02	20.02
Naftaleno	0,016	0,016	0,007	0,013	0,025	-	0,014
Acenaftileno	0,029	0,011	-	0,011	0,062	0,017	0,012
Acenafteno	0,035	-	-	-	0,039	-	-
Fluoreno	-	-	-	-	-	-	-
Fenantreno	-	-	-	-	-	-	-
Antraceno	-	-	-	-	-	-	-
Fluoranteno	<L.Q.	-	-	-	-	-	-
Pireno	2,283	1,003	0,037	1,377	1,805	2,125	2,475
Benzo(a)antraceno	-	-	-	-	-	-	-
Criseno	-	-	-	-	-	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	-	-	0,041	0,123	0,112	0,063
Benzo(k)fluoranteno	-	-	-	-	-	-	0,062
Benzo(a)pireno	-	-	-	-	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	0,118	-	0,074	-	0,117	-	-
Benzo(g,h,i)perileno	3,816	2,327	<L.Q.	3,259	-	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-	-	-	-	-	-	-
Total	6,297	3,357	0,118	4,701	2,171	2,254	2,626

(-) = não detectado; (< L.D.) =abaixo do limite de quantificação.

Tabela 30 – Concentração de HPAs (mg/L) encontrados nas nutrições parenterais totais administradas ao recém-nascido 08

HPAs	18.02.15	19.02.15
Naftaleno	0,006	0,020
Acenaftileno	<L.Q.	0,010
Acenafteno	-	-
Fluoreno	-	-
Fenantreno	-	-
Antraceno	-	-
Fluoranteno	-	-
Pireno	1,705	1,174
Benzo(a)antraceno	-	-
Criseno	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	-
Benzo(k)fluoranteno	-	-
Benzo(a)pireno	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	-	0,076
Benzo(g,h,i)perileno	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-	-
Total	1,711	1,280

(-) = não detectado; (<L.Q.) = abaixo do limite de quantificação.

Tabela 31 – Concentração de HPAs (mg/L) encontrados nas nutrições parenterais totais administradas ao recém-nascido 09

HPAs	24.03.15	28.03.15	31.03.15	02.04.15
Naftaleno	0,010	0,009	0,024	0,014
Acenaftileno	<L.Q.	-	0,026	<L.Q.
Acenafteno	-	-	0,024	-
Fluoreno	-	-	-	-
Fenantreno	-	-	-	-
Antraceno	-	-	-	-
Fluoranteno	-	-	-	<L.Q.
Pireno	1,749	1,435	1,127	2,426
Benzo(a)antraceno	-	-	-	-
Criseno	-	-	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	-	-	-
Benzo(k)fluoranteno	-	-	-	-
Benzo(a)pireno	-	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	-	0,980	0,851	-
Benzo(g,h,i)perileno	-	-	0,034	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-	-	-	-
Total	1,759	2,424	2,086	2,440

(-) = não detectado; (<L.Q.) = abaixo do limite de quantificação.

Tabela 32 – Concentração de HPAs (mg/L) encontrados nas nutrições parenterais totais administradas ao recém-nascido 10

HPAs	24.03.15	28.03.15	31.03.15
Naftaleno	0,007	0,007	0,007
Acenaftileno	-	-	-
Acenafteno	-	-	-
Fluoreno	-	-	-
Fenantreno	-	-	-
Antraceno	-	-	-
Fluoranteno	-	-	-
Pireno	0,527	1,412	0,561
Benzo(a)antraceno	-	-	-
Criseno	-	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	-	-
Benzo(k)fluoranteno	-	<L.Q.	-
Benzo(a)pireno	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	-	-	-
Benzo(g,h,i)perileno	-	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-	-	-
Total	0,534	1,419	0,568

(-) = não detectado; (< L.Q.) =abaixo do limite de quantificação.

As bolsas de nutrição parenteral apresentaram concentrações totais de HPAs variando entre 0,013 mg/L e 6,297 mg/L.

O pireno esteve presente em 37 das 38 amostras analisadas e sua concentração variou de 0,037 mg/L a 2,612 mg/L, sendo o valor médio encontrado de 1,502 mg/L. Esse comportamento reflete o que diz a literatura, pois o pireno, um HPA não carcinogênico, está presente em praticamente todas as misturas de HPAs em concentrações relativamente altas e também como maior componente do conteúdo total dos HPAs encontrados no ambiente (IARC, 1983; JONGENELEN et al., 1985).

O dibenzo(a,h,)antraceno, um HPA provavelmente carcinogênico para humanos (IARC, 2015), apareceu em 20 das 38 amostras analisadas, com concentração média de 0,482 mg/L. HPAs possivelmente carcinogênicos para humanos como o naftaleno, benzo(b)fluoranteno e o benzo(k)fluoranteno (IARC, 2015), estavam presentes nas amostras de nutrição parenteral. Naftaleno foi encontrado em 30 das 38 amostras, benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno em 5 amostras e as concentrações médias foram de 0,040 mg/L, 0,082 mg/L e 0,123 mg/L, respectivamente.

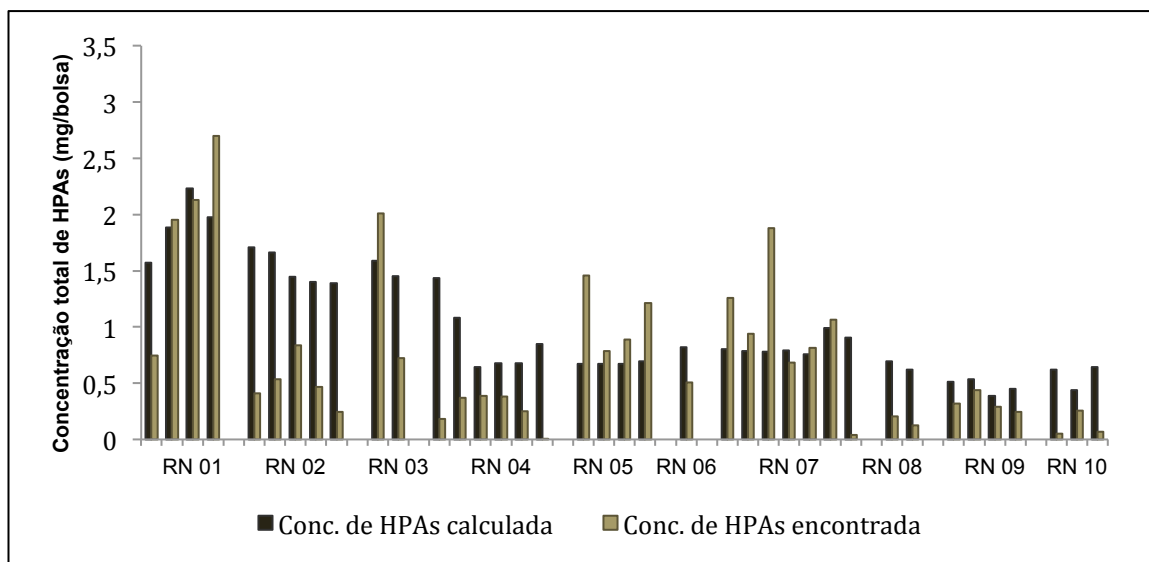
Como não existem, na literatura, dados sobre a presença de HPAs em NP administrada a recém-nascidos, há dificuldade em avaliar os níveis de contaminação encontrados. As pesquisas remetem a quantidade de HPAs em alimentos como cereais, carnes, leite, óleos e gorduras, peixes, ovos, legumes, frutas (DENNIS et al., 1983; DE VOS et al., 1990; CAMARGO; TOLEDO, 2003; FARHADIAN et al., 2011; DOST; ÍDELI, 2012; WU; YU, 2012), em margarina, creme vegetal, maionese (CAMARGO; TOLEDO, 2000), em chá mate, café e guaraná em pó (CAMARGO; TOLEDO, 2002; GARCÍA-FALCÓN et al., 2005; CAMARGO et al., 2006), em solos contaminados e esgotos (SONG et al., 2002; OLESZCZUK; BARAN, 2004; GONG et al., 2010), no ar atmosférico (CHOI et al., 2015), em água potável (EPA,1990), em ligante de asfalto (PINHEIRO et al., 2009).

Os componentes individuais que foram utilizados na preparação das NP administradas aos recém-nascidos, foram analisados e, dessa forma, foi possível determinar, baseando-se na composição original de cada bolsa e no seu volume, a contribuição de HPAs que cada um destes componentes da formulação forneceria para cada bolsa e assim comparou-se os resultados obtidos do cálculo com os resultados encontrados nas bolsas. Estes resultados estão representados na figura 13.

A comparação entre os resultados obtidos nos cálculos e os resultados encontrados nas bolsas revelou que houve uma diminuição na concentração de HPAs encontrados nas bolsas analisadas em relação aos resultados obtidos por cálculo na maioria dos casos. Teoricamente, esse não seria o resultado esperado. As bolsas deveriam apresentar uma concentração de HPAs semelhante ao somatório das concentrações encontradas nas soluções componentes da bolsa. Considerando que os HPAs podem estar presentes no ambiente, principalmente

adsorvidos em material particulado, considerou-se a hipótese de que eles poderiam estar adsorvidos nas paredes do polímero da bolsa de nutrição parenteral, como mostrado neste estudo. O caráter lipofílico dos HPAs e a natureza apolar do polímero favorecem essa adsorção, um fenômeno semelhante a um “salting out” que ocorre com espécies iônicas em soluções apolares (IARC, 1983; WILD; JONES, 1995; PEREIRA NETTO, 2000, LACHENMEIER; NERLICH; KUBALLA, 2006; ANTHEMIDIS; IOANNOU, 2009; VALENTE; GONÇALVES; RODRIGUES, 2013). O meio aquoso polar da solução, “encoraja” o HPA a procurar um “ambiente químico” mais semelhante à sua natureza, a superfície do polímero.

Figura 13 – Comparação entre a concentração calculada do total de HPAs e a concentração total determinada experimentalmente



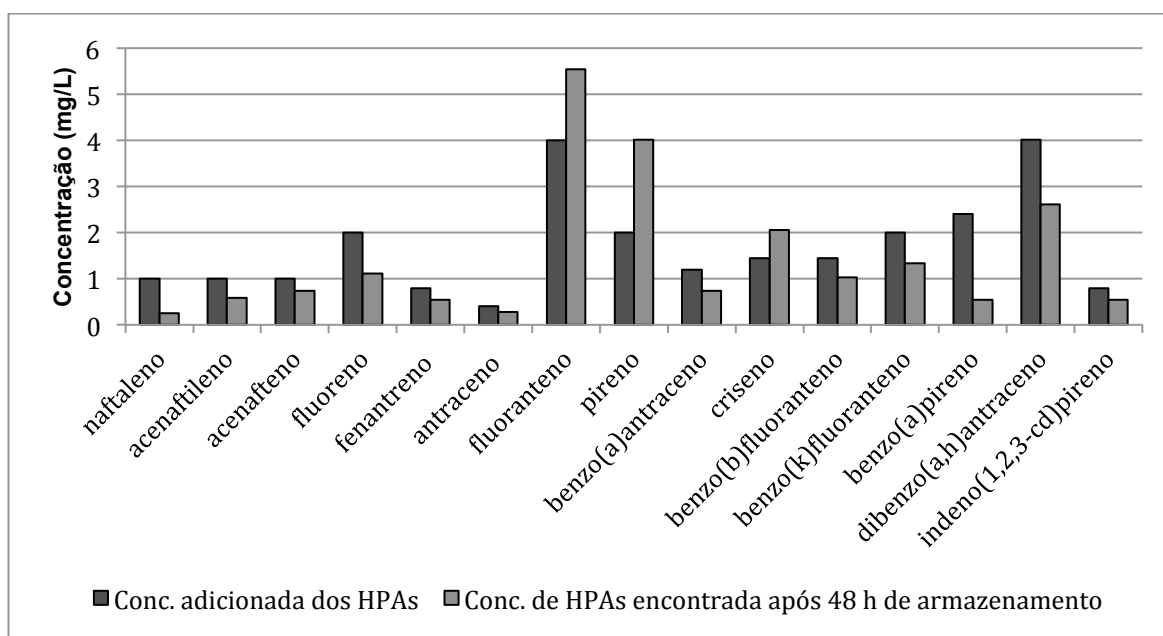
Dessa forma, um teste para verificar a possibilidade de adsorção dos HPAs nas paredes do polímero foi realizado.

#### 5.4 TESTE DE ADSORÇÃO DOS HPAs NAS PAREDES DAS BOLSAS DE EVA UTILIZADAS PARA ENVASE DAS NUTRIÇÕES PARENTERAIS

Conforme foi determinado, para o teste de adsorção, preparou-se duas bolsas de nutrição. A primeira continha uma formulação de nutrição parenteral preparada em nosso laboratório e a segunda apenas água ultrapura. Em ambas as bolsas foi acrescentado um mix de HPAs com concentração entre o 3º e 5º pontos da curva analítica .

A análise da bolsa de nutrição parenteral preparada em nosso laboratório adicionada do mix dos HPAs, após 48 horas de armazenamento, mostrou a presença de todos os HPAs que foram adicionados, como pode ser observado na figura 14. Como a maioria dos HPAs apresentou uma concentração inferior à adicionada, este resultado corrobora com a hipótese levantada.

Figura 14 – Concentração dos HPAs (mg/L) encontrados na bolsa de nutrição parenteral preparada, após 48 h de armazenamento

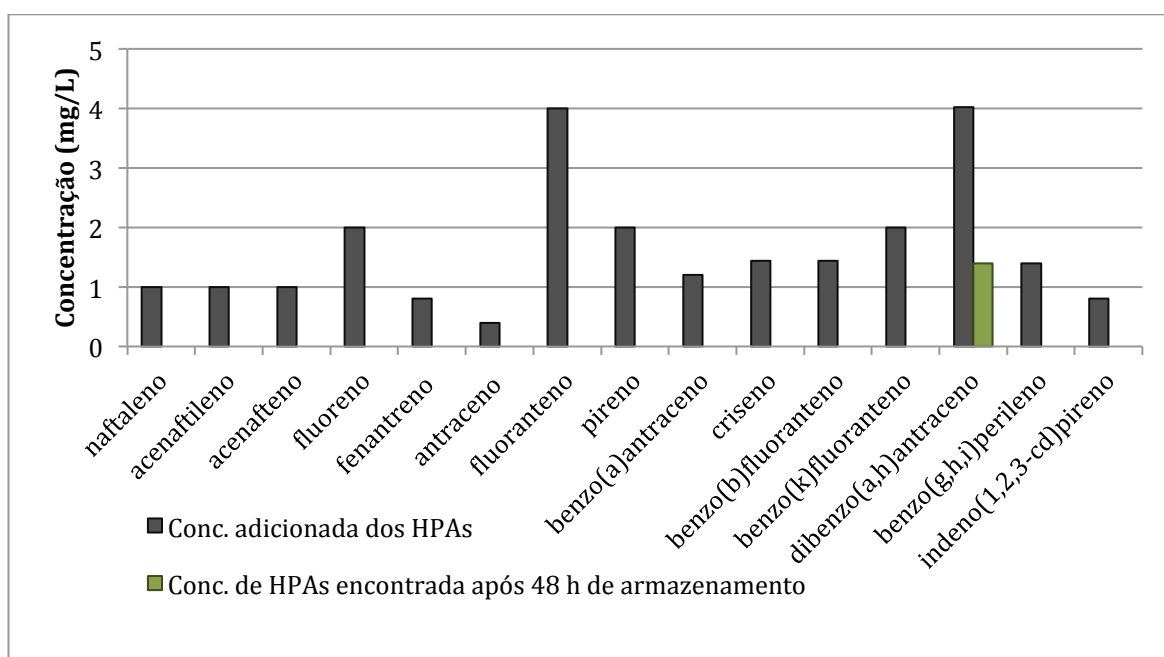


Quase todos os analitos apresentaram concentração menor do que a que foi adicionada. Exceções foram o fluoranteno e o pireno, cuja concentração foi superior

a adicionada. Este aumento na concentração pode estar relacionado com uma contribuição extra de HPAs proveniente das próprias soluções componentes da formulação (aminoácidos, lipídeos, fósforo, água para injetáveis, glicose 50%, cloreto de potássio e Frutovitam).

Entretanto, quando o teste foi realizado com água pura, a concentração dos HPAs na solução, com exceção do dibenzo(a,h)antraceno, ficou extremamente reduzida, conforme podemos observar na figura 15 que mostra os resultados obtidos na análise da bolsa contendo água ultrapura e o mix de HPAs, após 48 horas de armazenamento, em comparação com a concentração dos analitos que foi adicionada.

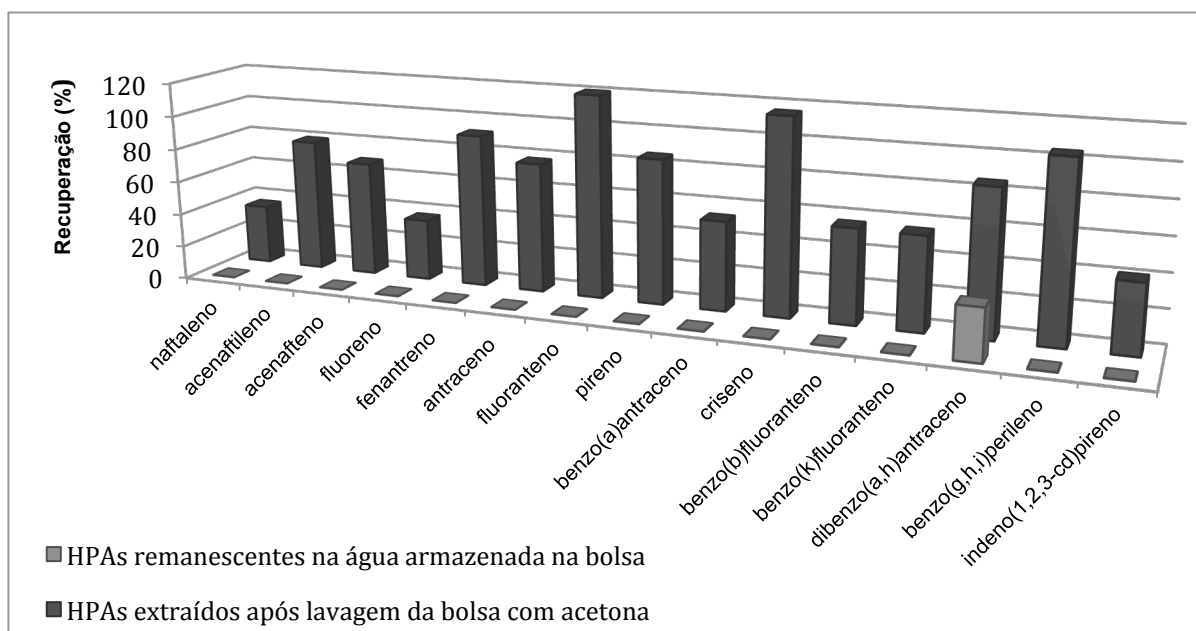
Figura 15 – Concentração (mg/L) dos HPAs encontrados na bolsa contendo água ultrapura após 48 h de armazenamento



Para avaliar se os HPAs estavam realmente adsorvidos na superfície da bolsa, retirou-se a água da bolsa e adicionou-se acetona para extrair os HPAs do polímero. Os resultados desta análise encontram-se na figura 16.



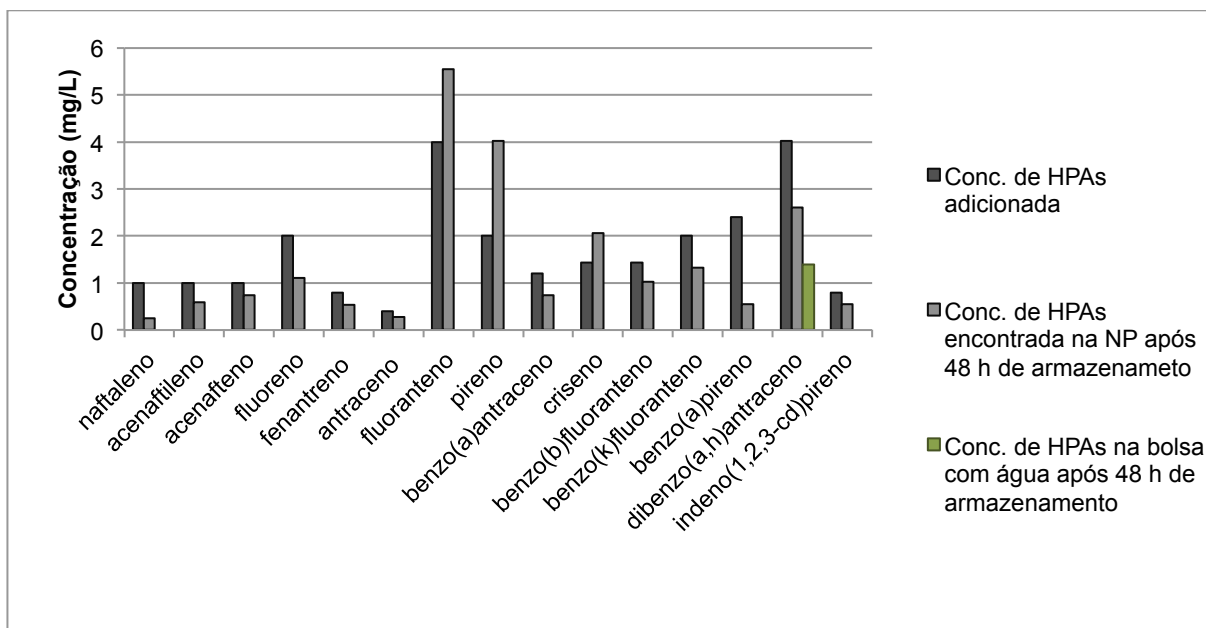
Figura 16 – Recuperação dos HPAs na bolsa com água ultrapura após 48 h de armazenamento e dos HPAs extraídos pela ação da acetona.



As concentrações dos HPAs na acetona, mostram que os analitos foram extraídos da parede do polímero pela ação da acetona o que comprova que os HPAs estavam adsorvidos no polímero.

Tendo como base os resultados obtidos para as duas bolsas utilizadas para o teste de adsorção dos HPAs nas paredes do polímero podemos concluir que, quando apenas água estava presente na bolsa, os HPAs se adsorveram nas paredes do polímero por apresentarem maior afinidade por este do que pela água. Na presença dos componentes da nutrição parenteral os HPAs se mantiveram em solução, apresentando apenas uma redução parcial da concentração. Esse resultado explica os baixos valores encontrados para a bolsa de nutrição parenteral cuja composição não continha lipídeos. A figura 17 mostra este resultado, apresentando uma comparação entre as bolsas utilizadas no teste de adsorção dos HPAs nas paredes do polímero e a concentração de padrão que foi adicionado.

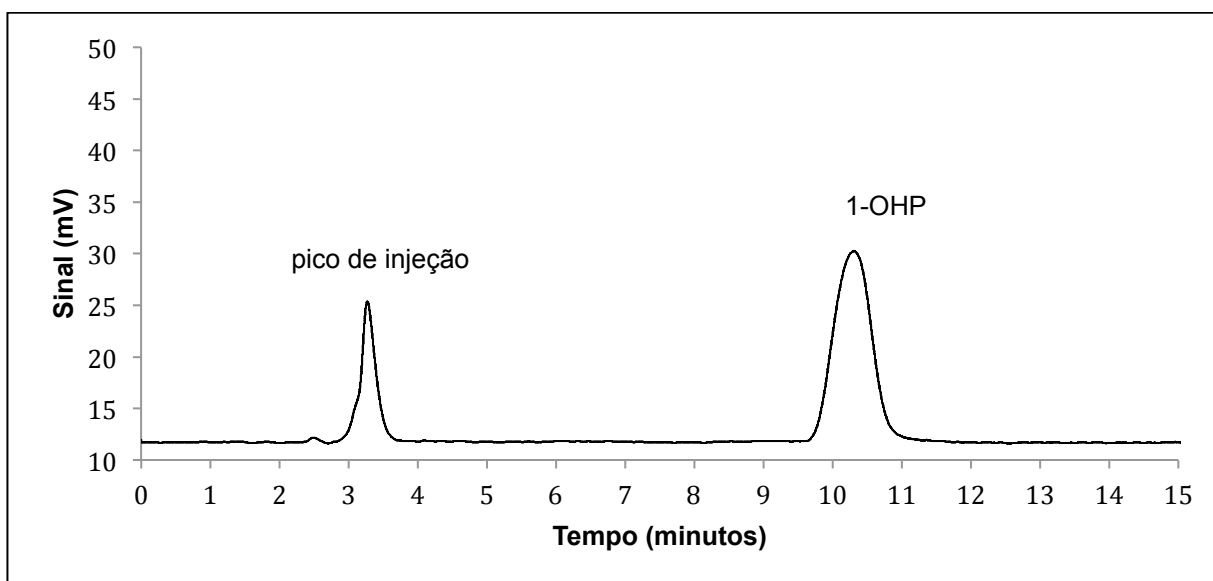
Figura 17 – Concentração dos HPAs na bolsa de NP e na bolsa com água após 48 h de armazenamento em comparação com a concentração de HPAs adicionada.



## 5.5 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO 1-HIDRÓXIPIRENO EM AMOSTRAS DE URINA

A otimização do sistema cromatográfico consistiu em adaptar o método desenvolvido por (JONGENELEN; ANZION; HENDERSON; 1987). A coluna utilizada nesse trabalho tem 25 cm e acetonitrila foi utilizada no lugar de metanol. O modo de eluição adotado foi isocrático. A figura 18 mostra o cromatograma obtido utilizando um padrão de 10 µg/L do 1-hidróxipireno com as condições mencionadas.

Figura 18 – Cromatograma do Padrão do 1-hidróxipireno (1-OHP), na concentração de 10 µg/L, utilizando CLAE em fase reversa e detecção por fluorescência



Coluna Luna C18 25cm, 4,6mm, 5µm (d.i.); fase móvel: acetonitrila (70%):água (30%); fluxo: 0,8 mL/min.; λ excitação: 242 nm, λ emissão: 388 nm

### 5.5.1 Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da construção de curvas analíticas. Os resultados encontram-se na tabela 33.

Tabela 33 – Faixa de trabalho, equação da reta e valor de r para o 1-hidróxipireno

Analito	Faixa de trabalho	Equação da reta	r
1-hidróxipireno	0,5µg/L - 10µg/L	$y = 1,0093x + 0,1114$	0,9995

Observou-se que o intervalo de trabalho escolhido guarda excelente relação linear com o sinal analítico, denotado pelo valor do coeficiente de correlação próximo de 1.

### 5.5.2 Repetitividade

A repetitividade foi determinada utilizando três níveis de concentração (alto, médio e baixo). Os resultados, expressos através do coeficiente de variação, encontram-se na tabela 34.

Tabela 34 – Precisão intradia do método para determinação do 1-hidróxipireno (n=9)

Concentração (µg/L)	Média das concentrações (µg/L)	C.V. (%)
1,0	0,98	1,79
4,0	4,01	0,88
10,0	10,11	3,61

### 5.5.3 Precisão intermediária

A precisão intermediária, cujos resultados foram expressos através do coeficiente de variação e encontram-se na tabela 35, foi realizada através da injeção, em triplicata, de três níveis de concentração.

Tabela 35 – Precisão intermediária do método para determinação do 1-hidróxipireno (n=9)

Concentração (µg/L)	Média das concentrações (µg/L)	C.V. (%)
1,0	1,05	13,34
4,0	4,30	0,46
10,0	10,79	2,52

Segundo a European Medicines Agency (EMA 2009) e ANVISA (2012), são aceitos valores de coeficiente de variação de até 15%, mostrando que os resultados encontrados e listados nas tabelas 34 e 35 estão de acordo com a literatura.

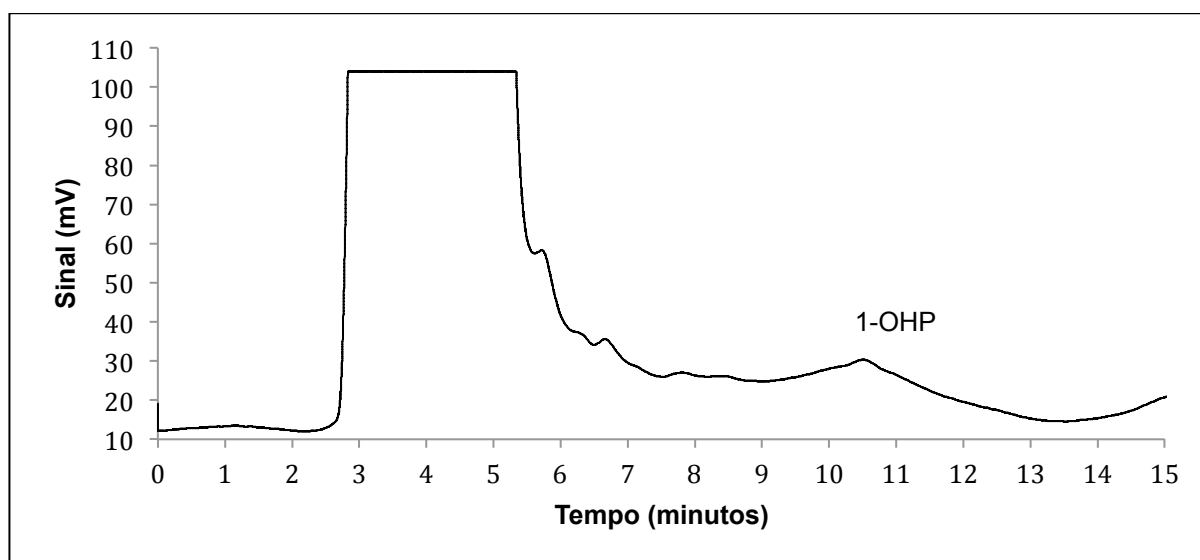
#### 5.5.4 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados com base na relação sinal:ruído, segundo INMETRO (2010), utilizando as fórmulas 1 e 2, respectivamente. Realizou-se um número de sete replicatas do branco da amostra, conforme recomendado pelo INMETRO (2010). Os resultados encontrados para os limites de detecção e de quantificação foram 0,029  $\mu\text{g/L}$  e 0,043  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente.

#### 5.5.5 Extração do 1-hidróxipireno das amostras de urina

A extração do metabólito 1-hidróxipireno das amostras de urina foi realizado conforme descrito anteriormente (item 4.5.2.3.1). O cromatograma obtido (figura 19) mostra uma resolução pouco satisfatória, com o sinal de injeção da amostra muito largo e próximo do pico do analito.

Figura 19 – Cromatograma de uma amostra de urina após extração segundo JONGENEELLEN (1987) utilizando CLAE em fase reversa e detecção por fluorescência

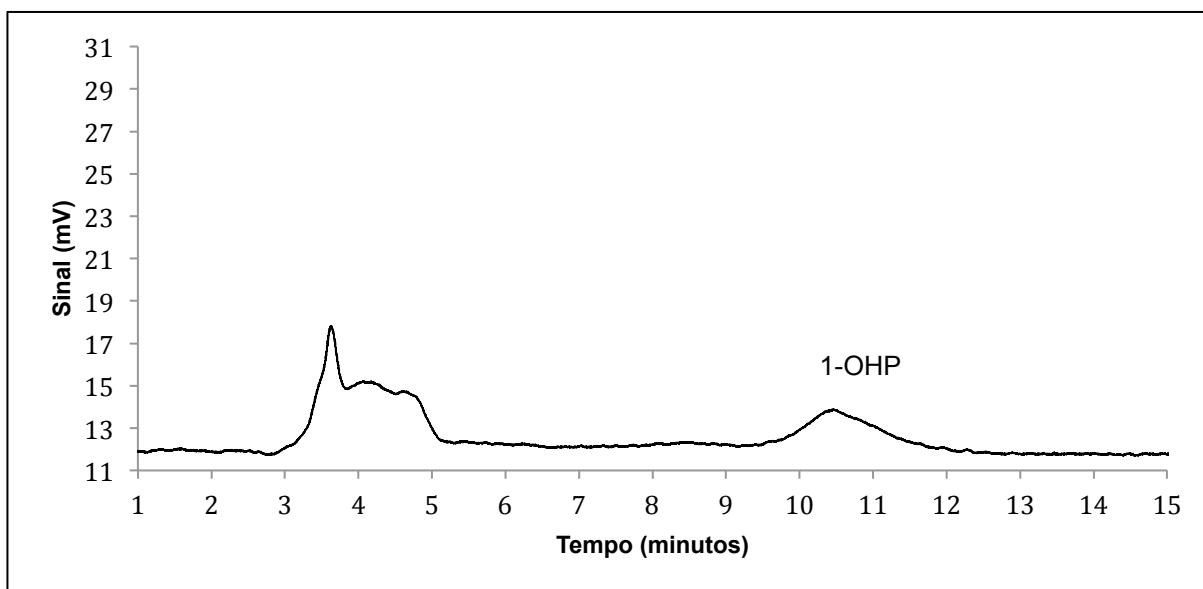


Coluna Luna C18 25cm, 4,6mm, 5 $\mu\text{m}$  (d.i.); fase móvel: acetonitrila (70%):água (30%); fluxo: 0,8 mL/min.;  $\lambda$  excitação: 242 nm,  $\lambda$  emissão: 388 nm

Desta forma, buscou-se uma extração mais efetiva, utilizando, na etapa de lavagem, metanol 60% e isopropanol como solvente de eluição, conforme o método

proposto por MARDER (2010). Com este procedimento, conseguiu-se uma melhor limpeza da amostra, como pode ser visualizado no cromatograma da figura 20.

Figura 20 – Cromatograma de uma amostra de urina após extração e clean-up segundo MARDER (2010) utilizando CLAE em fase reversa e detecção por fluorescência



Coluna Luna C18 25cm, 4,6mm, 5 $\mu$ m (d.i.); fase móvel: acetonitrila (70%):água (30%); fluxo: 0,8 mL/min.;  $\lambda$  excitação: 242 nm,  $\lambda$  emissão: 388 nm

Na figura 20 pode-se observar que a linha base retorna ao seu nível após a eluição dos interferentes (pico de injeção da amostra), não se sobrepondo ao tempo de retenção do analito, o que não acontecia com a limpeza da amostra feita anteriormente. Para verificar que se tratava apenas do pico do 1-OHP, pois o pico ficou alargado, aplicou-se escala logarítmica no cromatograma da figura 20, o que resultou em apenas um pico, mostrando apenas a presença do metabólito. Este cromatograma em escala logarítmica encontra-se no apêndice G.

### 5.5.6 Quantificação do 1-hidróxipireno nas amostras de urina

As amostras de urina foram coletadas de bebês que estavam internados na UTI neonatal do HUSM e estavam sob regime de nutrição parenteral (grupo estudo), e de recém-nascidos que estavam na maternidade do mesmo hospital e que não receberam nutrição parenteral (grupo controle). Cada bebê gerou uma ou mais de uma amostra de urina que foram armazenadas em frascos de polipropileno a -30°C

para posterior preparo e análise, pois as urinas podem ser estocadas até um ano sem perda do metabólito (ANGERER; SCHALLER, 1991).

Após a análise das amostras, utilizando cromatografia com detecção por fluorescência, determinou-se a concentração do 1-hidroxipireno na urina dos RN através da equação da reta analítica externa. A tabela 36 mostra os resultados da concentração do 1-OHP nas amostras de urinas dos recém-nascidos do grupo estudo. No grupo controle (recém-nascidos que não estavam sob regime de nutrição parenteral), o metabólito não foi detectado.

Tabela 36 – Concentrações do metabólito 1-hidroxipireno encontradas nas amostras de urina dos recém-nascidos selecionados para o estudo

Recém-nascidos	Nº da coleta	Concentração (µg/L)	Concentração (µmol/mol de creatinina)
01	01	0,066	0,049
	02	0,249	0,184
	03	< L.Q.	< L.Q.
	04	0,039	0,030
02	01	0,372	0,265
	02	< L.Q.	< L.Q.
	03	< L.Q.	< L.Q.
03	01	0,544	0,877
04	01	0,095	0,046
	02	< L.Q.	< L.Q.
	03	< L.Q.	< L.Q.
05	01	< L.Q.	< L.Q.
	02	0,523	0,817
06	01	< L.Q.	< L.Q.
07	01	0,065	0,023
	02	< L.Q.	< L.Q.
	03	< L.Q.	< L.Q.
	04	< L.Q.	< L.Q.
	05	< L.Q.	< L.Q.
08	01	< L.Q.	< L.Q.
09	01	0,208	0,114
10	01	0,061	0,063

(< L.Q.) = abaixo do limite de quantificação.

Analisando a tabela 36 pode-se observar que o metabólito 1-OHP foi quantificado na urina de 8 dos 10 bebês do grupo estudo, com valores entre 0,039 µg/L e 0,544 µg/L (0,030 e 0,877 µmol/mol de creatinina, respectivamente) e com valor médio de 0,222 µg/L (0,247 µmol/mol de creatinina).

De acordo com a literatura os níveis individuais de 1-OHP são influenciados por fatores como poluição regional, alimentação, fumo, etc. Dessa forma foram estabelecidos níveis basais para indivíduos não ocupacionalmente expostos e não fumantes de 0,03 µmol/mol de creatinina e para fumantes de 0,05 a 0,5 µmol/mol de creatinina (LLOP et al., 2008). Estudos de Siwinska et al. (1998 e 1999) com crianças entre 7 e 8 anos de idade, expostos aos HPAs (uso de fogões a carvão e fumaça do cigarro) mostraram concentrações de 1-OHP na urina com variação de 0,07 a 3,62 µmol/mol de creatinina (1998) e com média de 0,32 µmol/mol de creatinina (1999).

A *Human Biomonitoring Commission* determinou, como valor de referência, para o 1-hidroxipireno na urina, na população geral de não fumantes (3 a 69 anos), 0,3 µg/g de creatinina (0,155 µmol/mol de creatinina), baseada em dados da *German Environmental Survey* (1998) e em estudo piloto da *German Environmental Survey* em crianças entre 2001 e 2002 (WILHELM et al., 2008). Sakiara et al (2010) verificou aumento na excreção do 1-OHP na urina dos cortadores de cana de açúcar, no período da safra (variando de 0,026 a 2,3 µmol/mol de creatinina) comparado com o da entressafra (0,0023-0,38 µmol/mol de creatinina), pois no período da safra a cana é queimada gerando HPAs, o que ocasiona um aumento na exposição dos cortadores a estes contaminantes ambientais. Guo et al. (2010) encontrou valores de 1-OHP, na urina de adultos entre 30 e 51 anos em diferentes países da Ásia, variando entre 0,065 e 0,463 µg/L. Um estudo realizado com mulheres grávidas não fumantes e não ocupacionalmente expostas mostrou uma concentração média do metabólito de 0,43 µg/g de creatinina (POLANSKA et al., 2014). Jongeneelen (2014), baseado em 9 estudos com trabalhadores expostos a HPAs encontrou o valor de 1,0 µmol/mol de creatinina como sendo um valor limite para o não aparecimento de efeitos genotóxicos no organismo.

Um estudo realizado por Viau et al. (1995) com voluntários expostos ao pireno por via oral e dérmica (500 µg), mostrou que, em média, 3,7% da dose de pireno foi excretada como 1-OHP na urina, após 48 h da administração oral.

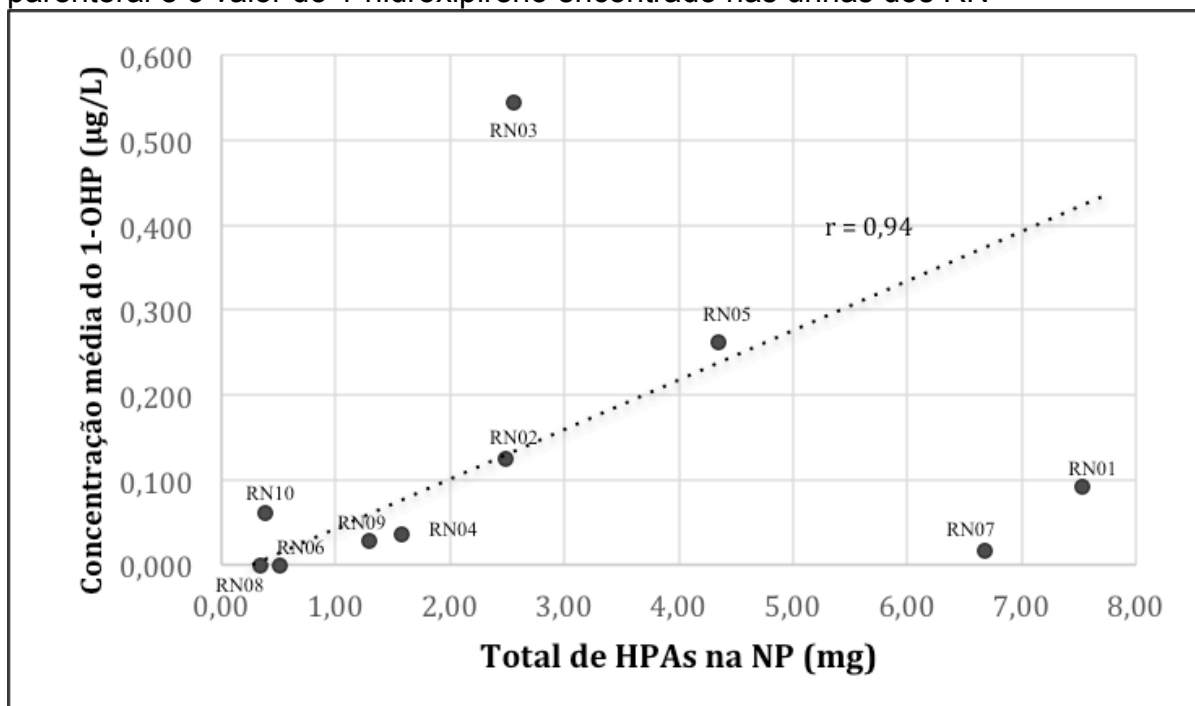


Bouchard e Viau (1998) em estudo realizado para avaliar a cinética da excreção do 1-OHP através da administração de pireno por via oral e intravenosa em ratos, observaram que existe uma relação linear entre dose e excreção do metabólito na urina e na bile tanto após administração oral quanto intravenosa, e que, em média 2,7% do pireno administrado por estas duas vias foi excretado como 1-OHP na urina após 24 h da administração. Esta relação linear também foi encontrada por Viau et al (1999) e que o 1-OHP representa uma pequena porção da excreção urinária total de pireno, mas que esta permanece constante ao longo do período de eliminação, justificando o uso deste metabólito como um bioindicador da exposição sistêmica aos HPAs.

Avaliando a literatura, pode-se evidenciar que existem vários trabalhos tanto avaliando a excreção do metabólito 1-OHP em animais e voluntários, como a presença deste na urina de crianças e adultos, expostos aos HPAs por meio da poluição ambiental, fumaça de cigarro, entre outros, mas não envolvendo recém-nascidos, nosso público alvo.

A impossibilidade de obter amostras de NP e urina durante todo o tempo da pesquisa, não permitiu a verificação de uma relação direta entre a exposição aos HPAs e a excreção do metabólito, ou seja, se um aumento na presença de HPAs na bolsa de NP proporcionaria um aumento na excreção urinária do 1-hidroxipireno. Porém, pode-se verificar que houve uma correlação significativa ( $r=0,94$ ) entre o total de HPAs encontrados nas bolsas de NP e o valor do 1-OHP encontrado na urina de 70% dos RN do grupo de estudo. Essa correlação pode ser observada na Figura 21, onde os pontos que não foram incluídos no cálculo da correlação (valores considerados “outliers” por estarem acima da média em, aproximadamente, 2 desvios padrões) também estão mostrados (RN 01, RN 03 e RN 07).

Figura 21 – Relação entre o total de HPAs (mg) encontrado nas bolsas de nutrição parenteral e o valor do 1-hidroxipireno encontrado nas urinas dos RN



Dada a coleta não completa das amostras, isto é, não analisou-se amostras de urina para todos os dias de internação na UTI, pode-se considerar essa correlação satisfatória e atribuir os “outliers” às variabilidade interindividual na excreção urinária do metabólito 1-OHP, como já exposto por SIWINSKA et al. (1998) e HANSEN et al. (2008).

Assim, ficou evidente que houve exposição aos HPAs pela avaliação da presença do metabólito 1-OHP na urina dos RN do grupo estudo, com média de 0,222 µg/L ou 0,247 µmol/mol de creatinina, que seria, aproximadamente 8 vezes maior que o valor considerado basal para indivíduos não expostos ocupacionalmente e não fumantes.

A exposição dos RN em nutrição parenteral aos HPAs é ainda comprovada pela comparação dos resultados do grupo controle, onde nenhum dos RN incluídos apresentou níveis mensuráveis de 1-OHP.

Como a principal diferença entre os dois grupos está na alimentação, a introdução dos HPAs através da nutrição parenteral é a responsável pela presença do metabólito na urina dos RN do grupo de estudo.

Uma observação paralela pode ser feita a partir dos resultados desse estudo em relação à exposição dos bebês aos HPAs devido às mães fumantes. No grupo estudo não havia mães fumantes, mas no grupo controle, dois RN eram filhos de mães fumantes, como está descrito na tabela 10. O resultado negativo para estes dois RN pode ser devido as mães não terem fumado após o ingresso do hospital. Mesmo que a mãe tenha fumado durante a gestação e o feto tenha sido exposto aos HPAs provenientes do fumo, pois podem atravessar a barreira placentária (MACHADO et al., 2014), o metabólito dificilmente seria encontrado na urina, uma vez que o 1-OHP possui uma meia vida bastante curta (18 h) e a coleta da urina dos RN não seria imediata, ou seja, ocorreria após 24 hs do parto.

A exposição ao fumo durante a gravidez tem sido, repetida e consistentemente, relacionada com numerosos riscos para o feto, incluindo baixo peso ao nascer, parto prematuro, aumento do risco de aborto espontâneo (GILBOA et al, 2005; MANNES et al., 2005; WIHELM; RITZ , 2005; RITZ et al., 2007) e aumento dos efeitos teratogênicos no desenvolvimento de vários órgãos (SHI; WEHBY; MURRAY, 2008). A exposição pré-natal aos HPAs pode aumentar o risco de câncer em humanos (BOCSKAY, 2005) e pode acarretar inúmeros problemas no desenvolvimento do bebê. Perera et al. (2009), realizando acompanhamento de um grupo de recém-nascidos desde o pré-natal até a idade de cinco anos, que foram expostos aos HPAs, detectou um decréscimo no desenvolvimento neurológico destas crianças.

Assim, avaliando os resultados e o que foi encontrado na literatura pode-se inferir que os RN foram expostos aos HPAs pela presença do metabólito 1-OHP na urina dos RN do grupo estudo, provenientes das bolsas de nutrição parenteral. O fumo, um fator que poderia ocasionar um resultado falso positivo de exposição através das mães fumantes foi descartado pelos resultados negativos encontrados no grupo controle.

## 6. CONCLUSÃO

A avaliação da contaminação de formulações parenterais comerciais usadas na preparação de bolsas de nutrição parenteral por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bem como das bolsas de NP administradas a recém-nascidos, foi realizada neste estudo.

Para tanto, um método para detecção de 16 HPAs utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos foi desenvolvido e validado. O método se mostrou sensível e linear para as amostras do estudo.

Foram encontrados HPAs em 18 das 21 amostras comerciais, sendo que 11 dos 16 HPAs nas soluções de aminoácidos e nas emulsões lipídicas e 9 nos demais componentes das nutrições parenterais (fósforo orgânico, água para injetáveis, glicose 50%, cloreto de potássio 10% e multivitaminas). O pireno foi detectado em amostras de aminoácidos, lipídeos e também no fósforo orgânico, água para injetáveis, glicose 50%, cloreto de potássio 10% e vitaminas, bem como o naftaleno e o benzo(k)fluoranteno, que são possíveis carcinogênicos para humanos. Já o dibenzo(a,h)antraceno, considerado provável carcinogênico para humanos, foi detectado em amostras de aminoácidos, lipídeos, água para injetáveis e glicose 50%. A concentração de HPAs foi maior nas emulsões lipídicas (0,141 – 10,562 mg/L) do que nas demais amostras (0,019 – 1,740 mg/L).

Os 11 HPAs também foram detectados nas bolsas de NP administradas aos RN. O pireno esteve presente em 37 das 38 amostras analisadas (0,037 – 2,612 mg/L), e o dibenzo(a,h,)antraceno em 20 das 38 amostras analisadas, com valor médio de 0,482 mg/L. Naftaleno foi encontrado em 30 das 38 amostras, benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno em 5 amostras concentrações médias de 0,040, 0,082 e 0,123 mg/L, respectivamente.

Um teste para verificar se ocorreria adsorção dos HPAs na bolsa de EVA foi realizado. Os resultados mostraram que os HPAs ficaram adsorvidos no polímero da bolsa quando esta continha um meio mais hidrofílico e o contrário ocorria quando a bolsa apresentava meio mais lipofílico. Evidenciou-se assim que os HPAs ficaram adsorvidos no polímero da bolsa de EVA por este apresentar um “ambiente químico” mais semelhante à sua natureza. Este efeito também foi verificado quando há ausência de lipídeos na composição da nutrição parenteral.

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência foi utilizada para determinar o metabólito 1-hidroxipireno na urina. O método mostrou-se suficientemente sensível para a análise das amostras do estudo.

O metabólito 1-OHP foi quantificado na urina de 8 dos 10 bebês do grupo estudo (0,039 – 0,544 µg/L), detectado em todas as urinas deste grupo e não foi detectado nas urinas do grupo controle.

Considerando os resultados encontrados nesse trabalho, é razoável supor que os RN do grupo estudo tenham sido expostos aos HPAs através da nutrição parenteral, pois entre os RN do grupo controle, nenhum apresentou níveis mensuráveis de 1-hidroxipireno na urina.

Considerando a toxicidade dos HPAs e a sua presença em formulações de administração parenteral e ainda o grande volume usualmente administrado na NP, seria muito importante que mais estudos fossem realizados e que limites para HPAs fossem estabelecidos. A presença de HPAs na NP administrada a recém-nascidos é ainda mais relevante, dado que são os mais vulneráveis a efeitos adversos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGERER, J.; MANNSCHRECK, C.; GÜNDEL, J. Biological monitoring and biochemical effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **International archives of occupational and environmental health**, v. 70, n. 6, p. 365-377, 1997.

ANGERER, J. SCHALLER, K. H. (Ed.) JONGENEELLEN, F. J.; ANZION, R. B. M. (Aut.) 1-Hydroxypyrene. **Analysis of hazardous substances in biological materials**, v. 3, p. 151-169, 1991.

ANTHEMIDIS, A.N.; IOANNOU, K-I. G. Recent developments in homogeneous and dispersive liquid-liquid extraction for inorganic elements determination. A review. **Talanta**. n. 80, p. 413-421, 2009.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução – RDC nº 274, de 22 de setembro de 2005.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução – RDC nº 27, de 17 de maio de 2012.

BAAN, R. et al. Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. **The lancet oncology**, v. 7, n. 4, p. 295-296, 2006.

BALL, D. et al. Development of safety qualification thresholds and their use in orally inhaled and nasal drug product evaluation. **Toxicological Sciences**, v. 97, n. 2, p. 226-236, 2007.

BOCSAY, K. A. et al. Chromosomal aberrations in cord blood are associated with prenatal exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v. 14, n. 2, p. 506-511, 2005.

BOHRER, D. **Sources of contamination in medicinal products and medical devices**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2013.

BOHRER, D. et al. Presence of polycyclic aromatic hydrocarbons in rubber packaging materials and in parenteral formulations stored in bottles with rubber stoppers. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, 2016. DOI: 10.1177/0148607116633801.

BOUCHARD, M.; VIAU, C. Urinary and biliary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene following intravenous and oral administration of pyrene in rats. **Toxicology**, n. 127, p.69-84, 1998.

BRASIL. Portaria nº 272/MS/SNVS de 8 de abril de 1998. Regulamento técnico para a terapia de nutrição parenteral. 1998.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira, vol 1. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília: ANVISA, 2010. 546p.

CAMARGO, M. C. R. et al. Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em guaraná em pó (*Paullinia cupana*). **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 26, n. 1, p. 230-4, 2006.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na dieta da população de Campinas. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 22, n. 1, p. 49-53, 2002.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. **Food Control**, v. 14, n. 1, p. 49-53, 2003.

CAMARGO, M. S. F. O.; TOLEDO, M. C. F. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em margarina, creme vegetal e maionese. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 20, n. 1, p. 51-55, 2000.

CAMPO, L. et al. Urinary profiles to assess polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in coke-oven workers. **Toxicology Letters**, v. 192, p. 72-78, 2010.

CHOI, H. et al. Estimation of chronic personal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons. **Science of the Total Environment**, p. 252-261, 2015.

COMUNIDADE EUROPÉIA. European Directive 2007/19/EC. Plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. **Official Journal**, v. 97, 2007.

EUROPEAN COMMISSION (E. C.). Guidance document and analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. **Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides**, 2016.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Guidelines for the Validation of Analytical Methods used in Residue Depletion Studies, 2009.

DE VOS, R. H. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984–1986). **Food and chemical toxicology**, v. 28, n. 4, p. 263-268, 1990.

DENNIS, M. J. et al. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets. **Food and chemical toxicology**, v. 21, n. 5, p. 569-574, 1983.

DOST, K.; IDELI, C. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and barbecued food by HPLC/UV–Vis detection. **Food chemistry**, v. 133, n. 1, p. 193-199, 2012.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants: method 610, 1984.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants: method 8310, 1986.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Residue chemistry test guidelines – residue analytical method 860.1340, 1996.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-solid Extraction and HPLC with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection: Test Method 550.1, 1990.

FARHADIAN, A. et al. Effects of meat preheating and wrapping on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled meat. **Food chemistry**, v. 124, n. 1, p. 141-146, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Current FDA perspective on leachable impurities in parenteral and ophthalmic drug products. 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for industry**. Analytical procedures and methods., 2000.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Code of Federal Regulations (CFR) 21- Sec. 178.3297. **Colorants for polymers**. 2006. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/xfrsearch.cfm?fr=178.3297>> Acessado em: 10 jul. 2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Code of Federal Regulations (CFR) 21- Sec. 177.2600. **Rubber articles intended for repeated use**. 2006. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/xfrsearch.cfm?fr=177.2600>> Acessado em: 10 jul. 2015.

GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em cachaça, rum, uísque e álcool combustível. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1447-1451, 2009.

GARCÍA-FALCÓN, M. S.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Minimal clean-up and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in instant coffee. **Food chemistry**, v. 90, n. 4, p. 643-647, 2005.

GIL, E. S. **Farmacotécnica compacta**. São Paulo: Pharmabooks, 2006. 100p.

GILBOA, S.M. et al. Relation between ambiente air quality and selected birth defects, seven country study, texas, 1997-2000. **American Journal of Epidemiology**. V. 162, n. 3, p. 238-252, 2005.

GONG, Z. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons removal from contaminated solis using fatty acid methyl esters. **Chemosphere**, v.79, p. 138-143, 2010.



GUIMARÃES, D. R. S. et al. Avaliação das prescrições de nutrição parenteral dos usuários de um hospital público de Fortaleza. **Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde**, v. 3, n. 2, p. 25-29, 2012.

GUO, Y. et al. Concentrations and profiles of urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites (OH-PAHs) in several Asian countries. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 6, p. 2932-2938, 2013.

HANSEN, A. M. et al. Urinary 1-hydroxypyrene (1-HP) in environmental and occupational studies – a review. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. v. 211, p. 471-503, 2008.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2012, 898p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO). Coordenação Geral. **Orientação sobre Validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008, revisão 3, 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Agents classified by the IARC monographs**, volumes 1–112, 2015.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans**. v.32, 1983.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans**. v.65, 1996.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures**. v. 92, 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE HARMONIZATION (ICH). Guideline Validation of analytical procedures: text and methodology. **Q2 (R1)**, v. 1, 2005.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). **Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons**. (Environmental Health Criteria 202), 1998.

JONGENEELLEN, F. J. et al. 1-Hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product. **International archives of occupational and environmental health**, v. 57, n. 1, p. 47-55, 1985.

JONGENEELLEN, F. J.; ANZION, R. B. M.; HENDERSON, P. Th. Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 413, p. 227-232, 1987.

JONGENEELLEN, F. A guidance value of 1-hydroxypyrene in urine in view of acceptable occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology Letters**, v. 231, p. 239-248, 2014.

JUNG, K. H. et al. Repeatedly high polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and cockroach sensitization among inner-city children. **Environmental research**, v. 140, p. 649-656, 2015.

LACHENMEIRER, D.W.; NERLICH, U.; KUBALLA, T. Automated determination of ethyl carbamate in stone-fruits spirits using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, n. 1108, p. 116-120, 2006.

LLOP, S. et al. Urinary 1-hydroxypyrene, air pollution exposure and associated life style factors in pregnant women. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 97-104, 2008.

LATIMER, J. S. et al. Sources of petroleum hydrocarbons in urban runoff. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 52, n. 1-2, p. 1-21, 1990.

LING, M.P. et al. Assessing the potential exposure risk and control for airborne titanium dioxide and carbon black nanoparticles in the workplace. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, n. 6, p. 877-889, 2011.

LOPES, W. A.; ANDRADE, J.B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 497-516, 1996.

MACHADO, J. B. et al. Cotinine and polycyclic aromatic hydrocarbons levels in the amniotic fluid and fetal cord at birth and in the urine from pregnant smokers. **Plos One**, v. 30, p. 1-12, 2014.

MANNES, T. et al. Impacto f ambiente air pollution on birth weight in Sydney, Australia. **Occup. Environ. Med.**, v. 62, p. 524-530, 2005.

MARCÉ, R. M.; BORRULL, F. Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. **Journal of chromatography A**, v. 885, n. 1, p. 273-290, 2000.

MARDER, L.S. et al. Validação de método para determinação de 1-hidróxipireno urinário. **XI Salão de Iniciação Científica**. PUCRS, 2010.

NEGHBAB, M.; MOHRAZ, M. H.; HASSANZADEH, J. Symptoms of respiratory disease and lung functional impairment associated with occupational inhalation exposure to carbon black dust. **Journal of occupational health**, n. 53, p. 432-438, 2011.

NIOSH – National Institute for Occupational Safety and Healthy. Polycyclic aromatic hydrocarbons by HPLC. In: Manual of analytical methods, 4. ed., Atlanta, GA. Method 5506, 1998.

OLESZCZUK, P.; BARAN, S. Application of solid-phase extraction to determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge extracts. **Journal of Hazardous Materials B**, v. 113, p. 237-245, 2004.

PEREIRA NETTO, A. D. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química nova**, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

PERERA, F. P. et al. Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and child IQ at age 5 years. **Pediatrics**, v. 124, n. 2, p. 195-202, 2009.

PINHEIRO, L. S. et al. Polycyclic hydrocarbons from asphalt binder : extraction and characterization. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n.2, p. 222-228, 2009.

POLANSKA, K. et al. The determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urine of non-smoking Polish pregnant women. **Science of the Total Environment**, v. 487, p. 102-109, 2014.

RATOLA, N. et al. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in pine needles by gas chromatography-mass spectrometry Comparison of diferente extraction and clean-up procedures. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, p.198-204, 2006.

REMYINGTON – **A ciência e a prática da Farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, 2210 p.

REVISTA PHARMACIA BRASILEIRA. Brasília: **Conselho Federal de Farmácia**, v. 72, jul/ago. 2009.

REY-SALGUEIRO, L. et al. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in infant foods. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 814-819, 2009.

RIBANI, M. et al. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RITZ, B. et al. Ambient air pollution and preterm birth in the environment and pregnancy outcomes study at the university of California, Los Angeles. **American Journal of Epidemiology**, v. 166, n.9, p. 1045-1052, 2007.

SASCO, A. J.; VAINIO. H. From in utero and childhood exposure to parenteral smoking to childhood cancer: a possible link and the need for action. **Human & Experimental Toxicology**, v.18, p. 192-201, 1999.

SAKAMOTO, L.M. et al. A importância do uso de filtros durante a infusão de nutrições parenterais adicionadas de emulsões lipídicas. **Medicina, Ribeirão Preto**, n. 32, p. 478-485, 1998.

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

SISINNO, C. L. S. et al. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n. 2, p. 671-676, 2003.

SIWINSKA, E. et al. Evaluation of intra – and – interindividual variation of urinary 1-hydroxypyrene, a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **The Science of the Total Environment**, n. 217, p. 175-183, 1998.

SIWINSKA, E. et al. The effect of coal stoves and environmental tobacco smoke on the level of urinary 1-hydroxypyrene. **Mutation Research**, n. 445, p. 147-153, 1999.

SHI, M.; WEHBY, G. L.; MURRAY, J. C. Review on genetic variants and maternal smoking in the etiology of oral clefts and other birth defects. **Birth Defects Research**, v. 84, p. 16-29, 2008.

STRICKLAND, P.; KANG, D. Urinary 1-hydroxypyrene and the other PAH metabolites as biomarkers of exposure to environmental PAH in air particulate matter. **Toxicology Letters**, n. 108, p. 191-199, 1999.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010. 912p.

SONG, Y. F. et al. Comparative study of extraction methods for the determination of PAHs from contaminated soils and sediments. **Chemosphere**, n. 48, p. 993-1001, 2002.

SUN, F.; LITTLEJOHN, D.; GIBSON, M.D. Ultrasonication extraction and solid phase extraction clean-up for determination of US EPA 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet absorption detection. **Analytica Chimica Acta**, n. 364, p. 1-11, 1998.

United States Pharmacopoeial USP 31. Rockville, MD. United States Pharmacopoeial Convention Inc. 2009.

VALENTE, I.M.; GONÇALVES, L.M.; RODRIGUES, J.A. Another glimpse over the salting-out assisted liquid-liquid extraction in acetonitrile/water mixtures. **Journal of Chromatography A**, n. 1308, p. 58-62, 2013.

VIAU, C. et al. Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in volunteers exposed to pyrene by the oral and dermal route. **The Science of the Total Environment**, n. 163, p. 179-186, 1995.

VIAU, C. et al. The toxicokinetics of pyrene and its metabolites in rats. **Toxicology Letters**, n. 108, p. 201-207, 1999.

VIAU, C. et al. Is 1-hydroxypyrene a reliable bioindicator of measured dietary polycyclic aromatic hydrocarbons under normal conditions? **Journal of Chromatography B**, n. 778, p. 165-177, 2002.

WELLMANN, J. et al. Cancer mortality in German carbon black workers 1976–98. **Occupational and environmental medicine**, v. 63, n. 8, p. 513-521, 2006.

WILD, S. R.; JONES, K. C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. **Environmental pollution**, v. 88, n. 1, p. 91-108, 1995.

WILHELM, M.; RITZ, B. Local variations in CO and particulate air pollution and adverse birth outcomes in Los Angeles County, California, USA. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 9, p. 1212-1221, 2005.

WILHELM, M. et al. New reference value and the background exposure for the PAH metabolites 1-hydroxypyrene and 1 - and 2-naphthol in urine of the general population in Germany: basis for validation of human biomonitoring data in environmental medicine. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, n. 211, p. 447-453, 2008.

WU, S.; YU, W. Liquid-liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in four different edible oils from China. **Food Chemistry**, n. 134, p. 597-601, 2012.

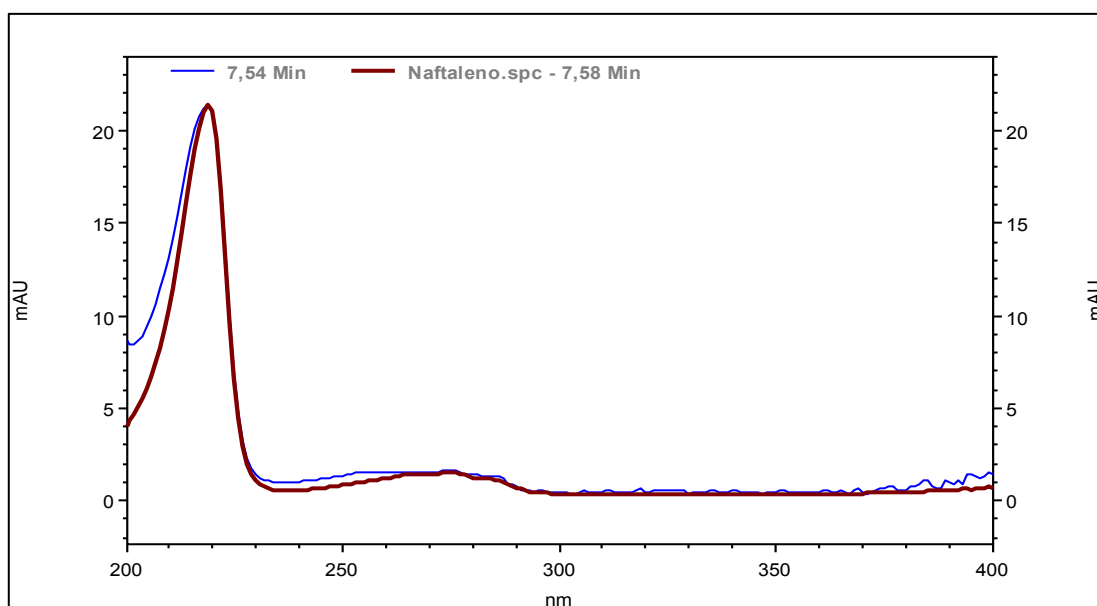
ZOCCOLILLO, L. et al. Routine determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in carbon black by chromatographic techniques. **Journal of Chromatography**, v. 288, p. 347-355, 1984.

## APÊNDICES

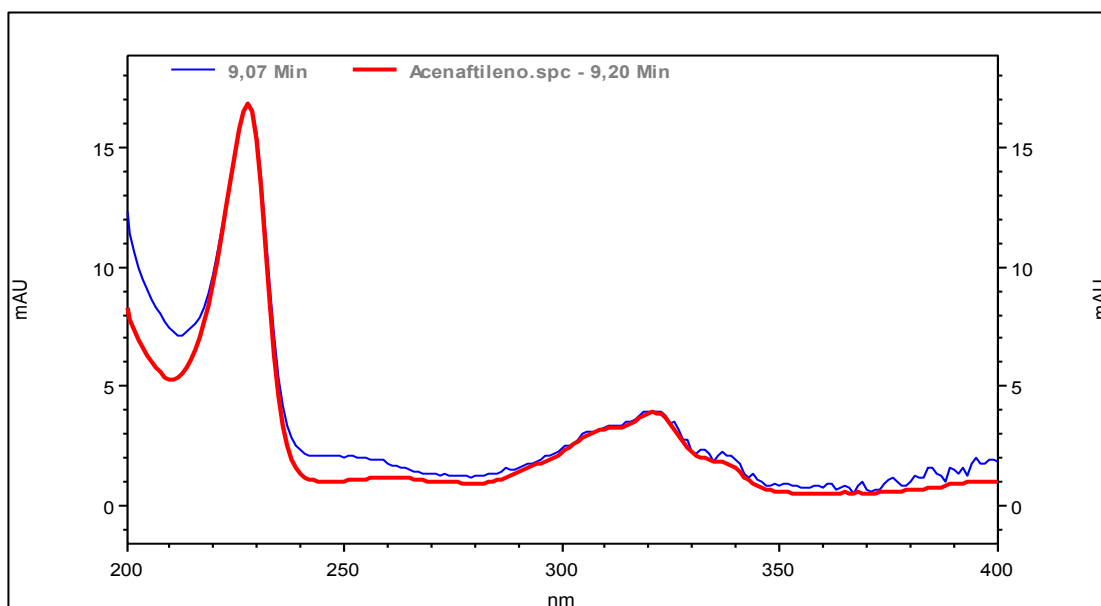
### APÊNDICE A – Exemplos de espectros obtidos no detector UV-DAD dos HPAs presentes nas amostras analisadas

Nutrição Parenteral RN 05 ADM 18.02.2015

Sobreposição do espectro do padrão de naflateno (vermelho) e amostra (azul)

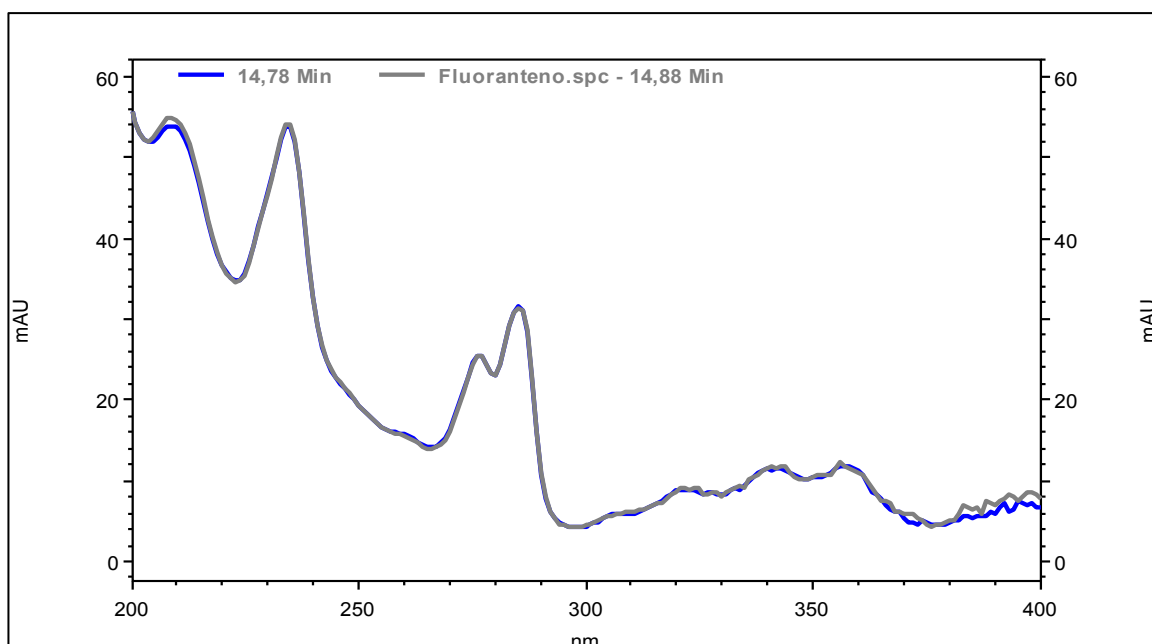


Sobreposição do espectro do padrão acenaftileno (vermelho) e amostra (azul)

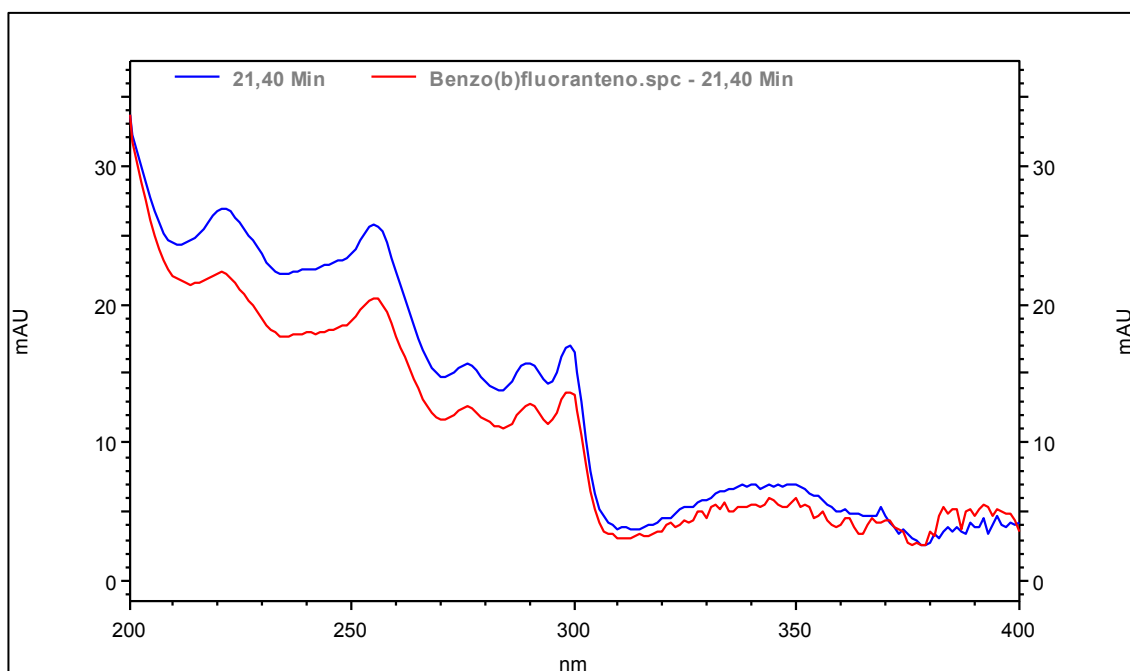


Lipovenos MCT 20% lote 16HB0235 09.02.2015

Sobreposição do espectro do padrão do fluoranteno (cinza) e amostra (azul)



Sobreposição do espectro do padrão do benzo(b)fluoranteno (vermelho) e amostra (azul)



**APÊNDICE B – Composição das bolsas de nutrição parenteral administradas aos recém-nascidos selecionados para o estudo**

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 302      Volume Total: 250 ml

Identificação.: **NPT RN01 ADM 29.01**

Composição:

Aa pediátrico 10% .....	100 ml
Água destilada .....	55 ml
Glicose 50% .....	60 ml
Fósforo orgânico .....	xxx
NaCl 20% .....	xxx
KCl 10% .....	xxx
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
Gluconato de Ca 10% .....	10 ml
Lipídeos 20% .....	25 ml
Oligoelementos Ped. ....	xxx
Vitaminas .....	xxx

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 345      Volume Total: 400 ml

Identificador: **NPT RN01 ADM 31.01**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	150 ml
Água destilada .....	47 ml
Glicose 50% .....	100 ml
Fósforo orgânico .....	5 ml
NaCl 20% .....	1,50 ml
Sulfato de Mg 50% .....	0,30 ml
KCl 10% .....	7,70 ml
Gluconato de Ca 10% .....	10 ml
Lipídeos 20% .....	75 ml
Oligoelementos Ped. ....	1 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 317      Volume Total: 400 ml

Identificação.: **NPT RN01 ADM 30.01**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	125 ml
Água destilada .....	120,60 ml
Glicose 50% .....	90 ml
Fósforo orgânico .....	xxx
NaCl 20% .....	4,40 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
KCl 10% .....	xxx
Gluconato de Ca 10% .....	10 ml
Lipídeos 20% .....	50 ml
Oligoelementos Ped. ....	xxx
Vitaminas .....	xxx

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 57      Volume Total: 600,60 ml

Identificador: **NPT RN 01 ADM 07.02**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	150 ml
Água destilada .....	223,40 ml
Glicose 50% .....	120 ml
Fósforo orgânico .....	2,50 ml
NaCl 20% .....	2,90 ml
Sulfato de Mg 50% .....	0,60 ml
KCl 10% .....	7,70 ml
Gluconato de Ca 10% .....	15 ml
Lipídeos 20% .....	75 ml
Oligoelementos Ped. ....	1 ml
Vitaminas .....	2,50 ml



Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 319      Volume Total: 150 ml

Identificador: **NPT RN02 ADM 30.01**

Composição:

Aa pediátrico 10% .....	30 ml
Água destilada .....	61,50 ml
Glicose 50% .....	30 ml
Fósforo orgânico .....	xxx
NaCl 20% .....	xxx
KCl 10% .....	xxx
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
Gluconato de Ca 10% .....	12 ml
Lipídeos 20% .....	16,50 ml
Oligoelementos Ped. ....	xxx
Vitaminas .....	xxx

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 21      Volume Total: 375 ml

Identificador: **NPT RN02 ADM 04.02**

Composição:

Aa pediátrico 10% .....	87 ml
Água destilada .....	150,40 ml
Glicose 50% .....	78 ml
Fósforo orgânico .....	2,40 ml
NaCl 20% .....	1,20 ml
Sulfato de Mg 50%.....	0,30 ml
KCl 10% .....	4,60 ml
Gluconato de Ca 10% .....	6 ml
Lipídeos 20% .....	42 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,60 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 349      Volume Total: 299,50 ml

Identificador: **NPT RN02 ADM 31.01**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	75 ml
Água destilada .....	110 ml
Glicose 50% .....	54 ml
Fósforo orgânico .....	1,50 ml
NaCl 20% .....	1,80 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
KCl 10% .....	4,60 ml
Gluconato de Ca 10% .....	12 ml
Lipídeos 20% .....	37,50 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,60 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 33      Volume Total: 300 ml

Identificador: **NPT RN 02 ADM 05.02**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	54 ml
Água destilada .....	131 ml
Glicose 50% . ....	66 ml
Fósforo orgânico .....	2,40 ml
NaCl 20% .....	1,20 ml
Sulfato de Mg 50% .....	0,20 ml
KCl 10% .....	4,60 ml
Gluconato de Ca 10% .....	6 ml
Lipídeos 20% .....	31,50 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,60 ml
Vitaminas .....	2,50 m

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 64      Volume Total: 225,10 ml

Identificador: **NPT RN02 ADM 07.02**

Composição:

Aa pediátrico 10% .....	51 ml
Água destilada .....	88,40 ml
Glicose 50% .....	48 ml
Fósforo orgânico .....	1,50 ml
NaCl 20% .....	0,90 ml
KCl 10% .....	2,30 ml
Sulfato de Mg 50% .....	0,20 ml
Gluconato de Ca 10% .....	4,20 ml
Lipídeos 20% .....	22,50 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,60 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 352      Volume Total: 330,70 ml

Identificador: **NPT RN03 ADM 31.01**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	75 ml
Água destilada .....	105 ml
Glicose 50% .....	90 ml
Fósforo orgânico .....	1,50 ml
NaCl 20% .....	1,80 ml
Sulfato de Mg 50% .....	0,20 ml
KCl 10% .....	4,60 ml
Gluconato de Ca 10% .....	9 ml
Lipídeos 20% .....	40,50 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,60 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Presc. nº 02      Volume Total: 389,50 ml

Identificador: **NPT RN03 ADM 02.02**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	90 ml
Água destilada .....	146,90 ml
Glicose 50% .....	90 ml
Fósforo orgânico .....	1,50 ml
NaCl 20% .....	1,80 ml
Sulfato de Mg 50% .....	0,60 ml
KCl 10% .....	4,60 ml
Gluconato de Ca 10% .....	6 ml
Lipídeos 20% .....	45 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,60 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 60      Volume Total: 150 ml

Identificador: **NPT RN 04 ADM 07.02**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	45 ml
Água destilada .....	43,40 ml
Glicose 50% .....	30 ml
Fósforo orgânico .....	0,80 ml
NaCl 20% .....	0,90 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
KCl 10% .....	2,30 ml
Gluconato de Ca 10% .....	6 ml
Lipídeos 20% .....	18,80 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,30 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 91      Volume Total: 260,10 ml

Identificador: **NPT RN04 ADM 11.02**

Composição:

Aa pediátrico 10% .....	70 ml
Água destilada .....	89,20 ml
Glicose 50% .....	56 ml
Fósforo orgânico .....	2 ml
NaCl 20% .....	0,60 ml
KCl 10% .....	3,10 ml
Sulfato de Mg 50% .....	0,30 ml
Gluconato de Ca 10% .....	6 ml
Lipídeos 20% .....	30 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,40 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 115      Volume Total: 150 ml

Identificador: **NPT RN04 ADM 14.02**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	45 ml
Água destilada .....	36,70 ml
Glicose 50% .....	36 ml
Fósforo orgânico .....	1,50 ml
NaCl 20% .....	0,40 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
KCl 10% .....	1,20 ml
Gluconato de Ca 10% .....	3,90 ml
Lipídeos 20% .....	22,50 ml
Oligoelementos Ped.....	0,30 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 114      Volume Total: 150 ml

Identificador: **NPT RN04 ADM 13.02**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	45 ml
Água destilada .....	36,70 ml
Glicose 50% .....	36 ml
Fósforo orgânico .....	1,50 ml
NaCl 20% .....	0,40 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
KCl 10% .....	1,20 ml
Gluconato de Ca 10% .....	3,90ml
Lipídeos 20% .....	22,50 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,30 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 116      Volume Total: 150 ml

Identificador: **NP RN 04 ADM 15.02**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	45 ml
Água destilada .....	62 ml
Glicose 50% .....	36 ml
Fósforo orgânico .....	1,50 ml
NaCl 20% .....	0,40 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
KCl 10% .....	1,20 ml
Gluconato de Ca 10% .....	3,90 ml
Lipídeos 20% .....	xxx
Oligoelementos Ped. ....	xxx
Vitaminas .....	xxx

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 148      Volume Total: 150 ml

Identificador: **NPT RN04 ADM 17.02**

Composição:

Aa pediátrico 10% .....	45 ml
Água destilada .....	36,70 ml
Glicose 50% .....	36 ml
Fósforo orgânico .....	1,50 ml
NaCl 20% .....	0,40 ml
KCl 10% .....	1,20 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
Gluconato de Ca 10% .....	3,9 ml
Lipídeos 20% .....	22,5 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,30 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 123      Volume Total: 330 ml

Identificador: **NPT RN05 ADM 13.02**

Composição:

Aa pediátrico 10% .....	105 ml
Água destilada .....	78,40 ml
Glicose 50% .....	78 ml
Fósforo orgânico .....	3 ml
NaCl 20% .....	0,90 ml
KCl 10% .....	4,60 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
Gluconato de Ca 10% .....	12 ml
Lipídeos 20% .....	45 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,60 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 124      Volume Total: 330 ml

Identificador: **NPT RN05 ADM 14.02**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	105 ml
Água destilada .....	78,40 ml
Glicose 50% .....	78 ml
Fósforo orgânico .....	3 ml
NaCl 20% .....	0,90 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
KCl 10% .....	4,60 ml
Gluconato de Ca 10% .....	12 ml
Lipídeos 20% .....	45 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,60 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 152      Volume Total: 330 ml

Identificador: **NPT RN05 ADM 17.02**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	105 ml
Água destilada .....	78,40 ml
Glicose 50% .....	78 ml
Fósforo orgânico .....	3 ml
NaCl 20% .....	0,90 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
KCl 10% .....	4,60 ml
Gluconato de Ca 10% .....	12 ml
Lipídeos 20% .....	45 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,60 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 169      Volume Total: 224,30 ml

Identificador: **NPT RN 05 ADM 18.02**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	60 ml
Água destilada .....	64,10 ml
Glicose 50% .....	54 ml
Fósforo orgânico .....	3 ml
NaCl 20% .....	xxx
Sulfato de Mg 50% .....	0,10 ml
KCl 10% .....	4,60 ml
Gluconato de Ca 10% .....	6 ml
Lipídeos 20% .....	30 ml
Oligoelementos Ped. ....	xxx
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 129      Volume Total: 200 ml

Identificador: **NPT RN07 ADM 13.02**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	40 ml
Água destilada .....	90 ml
Glicose 50% .....	40 ml
Fósforo orgânico .....	xxx
NaCl 20% .....	xxx
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
KCl 10% .....	xxx
Gluconato de Ca 10% .....	8 ml
Lipídeos 20% .....	22 ml
Oligoelementos Ped. ....	xxx
Vitaminas .....	xxx

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 132      Volume Total: 100 ml

Identificador: **NPT RN06 ADM 13.02**

Composição:

Aa pediátrico 10% .....	20 ml
Água destilada .....	45 ml
Glicose 50% .....	20 ml
Fósforo orgânico .....	xxx
NaCl 20% .....	xxx
KCl 10% .....	xxx
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
Gluconato de Ca 10% .....	4 ml
Lipídeos 20% .....	11 ml
Oligoelementos Ped. ....	xxx
Vitaminas .....	xxx

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 130      Volume Total: 280 ml

Identificador: **NPT RN07 ADM 14.02**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	72 ml
Água destilada .....	110,70 ml
Glicose 50% .....	56 ml
Fósforo orgânico .....	xxx
NaCl 20% .....	xxx
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
KCl 10% .....	xxx
Gluconato de Ca 10% .....	8 ml
Lipídeos 20% .....	30 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,80 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 131      Volume Total: 320 ml

Identificador: **NP RN 07 ADM 16.02**

## Composição:

Aa pediátrico 10%.....	80 ml
Água destilada .....	164,50 ml
Glicose 50% .....	64 ml
Fósforo orgânico .....	xxx
NaCl 20% .....	3,50 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
KCl 10% .....	xxxl
Gluconato de Ca 10% .....	8 ml
Lipídeos 20% .....	xxx
Oligoelementos Ped. ....	xxx
Vitaminas .....	xxx

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 166      Volume Total: 314,10 ml

Identificador: **NPT RN07 ADM 18.02**

## Composição:

Aa pediátrico 10%.....	67,50 ml
Água destilada .....	131,50 ml
Glicose 50% .....	63 ml
Fósforo orgânico .....	3,60 ml
NaCl 20% .....	0,50 ml
Sulfato de Mg 50% .....	0,20 ml
KCl 10% .....	5,20 ml
Gluconato de Ca 10% .....	6,30 ml
Lipídeos 20% .....	33,80 ml
Oligoelementos Ped. ....	xxx
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 156      Volume Total: 400 ml

Identificador: **NPT RN07 ADM 17.02**

## Composição:

Aa pediátrico 10% .....	100 ml
Água destilada .....	158,10 ml
Glicose 50% .....	80 ml
Fósforo orgânico .....	xxx
NaCl 20% .....	3,50 ml
KCl 10% .....	3,10 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
Gluconato de Ca 10% .....	8 ml
Lipídeos 20% .....	44 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,80 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 175      Volume Total: 360 ml

Identificador: **NPT RN07 ADM 19.02**

## Composição:

Aa pediátrico 10%.....	90 ml
Água destilada .....	132,80 ml
Glicose 50% .....	72 ml
Fósforo orgânico .....	3,60 ml
NaCl 20% .....	0,50 ml
Sulfato de Mg 50% .....	0,20 ml
KCl 10% .....	3,50 ml
Gluconato de Ca 10% .....	9 ml
Lipídeos 20% .....	45 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,90 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 180      Volume Total: 405,10 ml

Identificador: **NPT RN 07 ADM 20.02**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	90 ml
Água destilada .....	182,70 ml
Glicose 50% .....	63 ml
Fósforo orgânico .....	3,60 ml
NaCl 20% .....	1,90 ml
Sulfato de Mg 50% .....	0,50 ml
KCl 10% .....	6,90 ml
Gluconato de Ca 10% .....	8,10 ml
Lipídeos 20% .....	45 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,90 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 176      Volume Total: 100 ml

Identificador: **NPT RN08 ADM 19.02**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	20 ml
Água destilada .....	26,10 ml
Glicose 50% .....	32 ml
Fósforo orgânico .....	xxx
NaCl 20% .....	xxx
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
KCl 10% .....	xxx
Gluconato de Ca 10% .....	8 ml
Lipídeos 20% .....	11 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,40 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 168      Volume Total: 119,60 ml

Identificador: **NPT RN08 ADM 18.02**

Composição:

Aa pediátrico 10% .....	26 ml
Água destilada .....	38,90 ml
Glicose 50% .....	32 ml
Fósforo orgânico .....	xxx
NaCl 20% .....	xxx
KCl 10% .....	xxx
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
Gluconato de Ca 10% .....	7,20 ml
Lipídeos 20% .....	13 ml
Oligoelementos Ped. ....	xxx
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 119      Volume Total: 180 ml

Identificador: **NPT RN09 ADM 24.03**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	50 ml
Água destilada .....	51,80 ml
Glicose 50% .....	44 ml
Fósforo orgânico .....	xxx
NaCl 20% .....	1,80 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
KCl 10% .....	1,50 ml
Gluconato de Ca 10% .....	8 ml
Lipídeos 20% .....	20 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,40 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 148      Volume Total: 179,90 ml

Identificador: **NPT RN 09 ADM 28.03**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	50 ml
Água destilada.....	54,20 ml
Glicose 50% .....	40 ml
Fósforo orgânico .....	1,60 ml
NaCl 20% .....	0,20 ml
Sulfato de Mg 50% .....	0,10 ml
KCl 10% .....	1,50 ml
Gluconato de Ca 10% .....	4,40 ml
Lipídeos 20% .....	25 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,40 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 12      Volume Total: 100,10 ml

Identificador: **NPT RN09 ADM 02.04**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	30 ml
Água destilada .....	20 ml
Glicose 50% .....	28 ml
Fósforo orgânico .....	xxx
NaCl 20% .....	1,20 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
KCl 10% .....	0,80 ml
Gluconato de Ca 10% .....	2 ml
Lipídeos 20% .....	15 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,60 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 181      Volume Total: 139,80 ml

Identificador: **NPT RN09 ADM 31.03**

Composição:

Aa pediátrico 10% .....	50 ml
Água destilada .....	23,90 ml
Glicose 50% .....	36 ml
Fósforo orgânico .....	1 ml
NaCl 20% .....	0,60 ml
KCl 10% .....	1,50 ml
Sulfato de Mg 50% .....	0,10 ml
Gluconato de Ca 10% .....	4 ml
Lipídeos 20% .....	20 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,20 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 117      Volume Total: 100 ml

Identificador: **NPT RN10 ADM 24.03**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	20 ml
Água destilada .....	39 ml
Glicose 50% .....	20 ml
Fósforo orgânico .....	1 ml
NaCl 20% .....	0,60 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
KCl 10% .....	1,50 ml
Gluconato de Ca 10% .....	4 ml
Lipídeos 20% .....	11 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,40 ml
Vitaminas .....	2,50 ml



Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 142      Volume Total: 180,50 ml

Identificador: **NPT RN 10 ADM 28.03**

Composição:

Aa pediátrico 10%.....	60 ml
Água destilada .....	36,80 ml
Glicose 50% .....	44 ml
Fósforo orgânico .....	2 ml
NaCl 20% .....	0,60 ml
Sulfato de Magnésio 50% .....	xxx
KCl 10% .....	xxx
Gluconato de Ca 10% .....	4 ml
Lipídeos 20% .....	30 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,60 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

Bolsa de Nutrição Parenteral

Nº: 179      Volume Total: 125 ml

Identificador: **NPT RN10 ADM 31.03**

Composição:

Aa pediátrico 10% .....	25 ml
Água destilada .....	50,70 ml
Glicose 50% .....	25 ml
Fósforo orgânico .....	1,30 ml
NaCl 20% .....	0,70 ml
KCl 10% .....	1,90 ml
Sulfato de Mg 50% .....	xxx
Gluconato de Ca 10% .....	2,50 ml
Lipídeos 20% .....	15 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,40 ml
Vitaminas .....	2,50 ml

**APÊNDICE C - Composição da nutrição parenteral preparada em nosso laboratório e utilizada para o teste de adsorção dos HPAs**Bolsa de Nutrição Parenteral

Volume Total: 50 ml

## Composição:

Aa pediátrico 10% .....	10,80 ml
Água destilada .....	8,71 ml
Glicose 50% .....	8,64 ml
Fósforo orgânico .....	0,18 ml
NaCl 20% .....	0,18 ml
KCl 10% .....	0,54 ml
Sulfato de Mg 50% .....	0,18 ml
Gluconato de Ca 10% .....	1,44 ml
Lipídeos 20% .....	5,40 ml
Oligoelementos Ped. ....	0,07 ml
Vitaminas .....	0,61 ml

**APÊNDICE D – Concentração dos HPAs utilizados para preparar o mix do teste de adsorção**

HPAs	Concentração (mg/L)
Naftaleno	1,00
Acenaftileno	1,00
Acenafteno	1,00
Fluoreno	2,00
Fenantreno	0,80
Antraceno	0,40
Fluoranteno	4,00
Pireno	2,00
Benzo(a)antraceno	1,20
Criseno	1,44
Benzo(b)fluoranteno	1,44
Benzo(k)fluoranteno	2,00
Benzo(a)pireno	2,40
Dibenzo(a,h)antraceno	4,02
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,80

**APÊNDICE E – Protocolo para coleta de dados****UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
PROTOCOLO PARA COLETA DE DADOS  
PREMATUROS – UTI – NEONATAL****IDENTIFICAÇÃO:**

RN nº \_\_\_\_\_

Data Internação: \_\_\_\_\_

Idade Gestacional: \_\_\_\_\_ Peso ao nascer: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

1º dia da coleta – Data: \_\_\_\_\_

Determinação dos HPAs

Urina	Medicamentos	
	Tipo	Horário
	1)	
	2)	
	3)	

Urina/ 24h \_\_\_\_\_

Creatinina sérica \_\_\_\_\_

**APÊNDICE F - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (RES. MS no 196/96)**

**Título do estudo:** Avaliação do risco de contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em medicamentos armazenados em recipientes com partes de borracha

**Pesquisador(res) responsável(eis):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Bohrer do Nascimento

**Instituição/Departamento:** UFSM – Departamento de Química

**Telefone para contato:** (055) 3220-8870

**Local da coleta de dados:** HUSM – UTI – Neonatal

As informações contidas neste documento de consentimento livre e esclarecido serão fornecidas pela pesquisadora e responsável pelo projeto Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Denise Bohrer do Nascimento**, com o objetivo de esclarecer os pais ou responsáveis pelo recém-nascido, sobre o objetivo da pesquisa, os procedimentos que serão utilizados e seu propósito, os desconfortos e riscos esperados e os benefícios que podem ser obtidos com esse estudo.

O nome deste projeto é: “**Avaliação do risco de contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em medicamentos armazenados em recipientes com partes de borracha**” e com ele pretendemos verificar a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que possam estar presentes na urina dos bebês. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são substâncias químicas que podem estar presentes na borracha das tampas dos medicamentos injetáveis e também na borracha dos êmbolos das seringas plásticas.

Estas substâncias são consideradas contaminantes destes medicamentos, pois podem causar danos à saúde e podem ser encontrados na urina, uma vez que são eliminados dessa forma. Para a realização deste estudo será coletada uma pequena amostra de urina e dos remédios que os bebês tomam. Como há a coleta de urina para realização de exames de rotina no hospital, nesse momento será solicitado um pouquinho mais para este projeto. A urina é um produto eliminado pelo bebê de forma natural, sendo assim, a coleta de urina não causará nenhum risco ou dor ao bebê. Apenas será necessário colocar um saco plástico na região das fraldas e esperar que o bebê faça xixi espontaneamente. A colocação do saco é um procedimento simples e não causa dor ao bebê nem qualquer tipo de prejuízo para a sua saúde. Os senhores (pais ou responsáveis) e os participantes, não gastarão nada para participar do estudo, nem receberão dinheiro ou qualquer outro prêmio. Assim como asseguramos que seus nomes ou o do bebê (confidencialidade) não aparecerão em nenhum momento. Os senhores poderão pedir qualquer tipo de esclarecimento sobre a pesquisa e retirar o seu consentimento, caso assim desejarem sem qualquer tipo de penalização ou prejuízo para si ou ao cuidado do seu filho. Assim se o Sr.(a) aceitar a participação do seu filho(a) nesta pesquisa, por favor preencha os espaços abaixo:

Mediante estes esclarecimentos, eu \_\_\_\_\_  
portador da carteira de identidade número \_\_\_\_\_ autorizo a  
participação do meu filho/aceito participar \_\_\_\_\_ nessa pesquisa.

Santa Maria, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Coordenadora do projeto:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Bohrer do Nascimento

Endereço profissional:

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Campus Universitário – Centro de Ciências Naturais e Exatas

Prédio 15 – Laboratório Lachem

Fone/Fax: (055) 3220-8870

Comitê de Ética em Pesquisa

Avenida Roraima, 1000 – Prédio da Reitoria – Sala Comitê de Ética

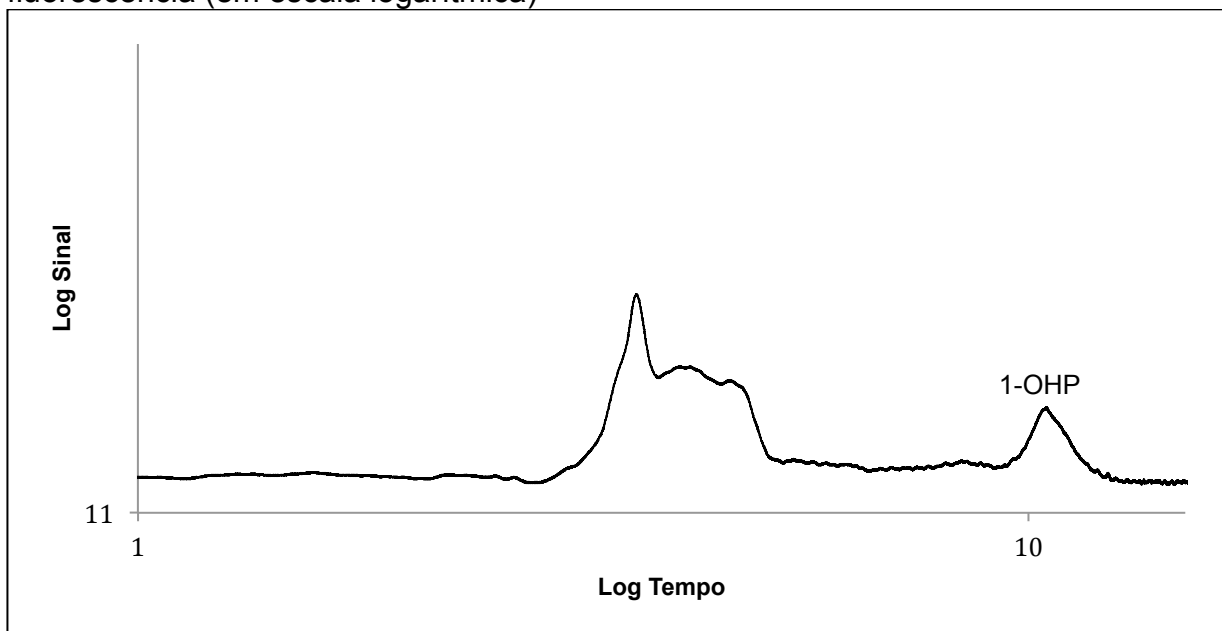
Cidade Universitária – Bairro Camobi CEP: 97105-900 Santa Maria – RS

Fone: (55) 3220-9362 Fax: (55) 3220-8009

Email: [cep.ufsm@gmail.com](mailto:cep.ufsm@gmail.com)

**APÊNDICE G – Cromatograma da figura 20 em escala logarítmica**

Figura 20 – Cromatograma de uma amostra de urina após extração e clean-up segundo MARDER (2010) utilizando CLAE em fase reversa e detecção por fluorescência (em escala logarítmica)



Coluna Luna C18 25cm, 4,6mm, 5 $\mu$ m (d.i.); fase móvel: acetonitrila (70%):água (30%); fluxo: 0,8 mL/min.;  $\lambda$  excitação: 242 nm,  $\lambda$  emissão: 388 nm