

Universidade Brasil – Campus Itaquera  
Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

***Avaliação dos níveis de cortisol em saliva artificial por  
espectrometria de massas***

**ANA ROSA ESCÓRCIO DIAS**

Orientador: Prof. Dr. Thiago de Oliveira Mendes

São Paulo, SP  
2020

***Evaluation of cortisol levels in artificial saliva by mass spectrometry***

**ANA ROSA ESCÓRCIO DIAS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.**

Área de Concentração: Engenharia Biomédica  
Orientador: Prof. Dr. Thiago de Oliveira Mendes

São Paulo, SP  
2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

D53a DIAS, Ana Rosa Escórcio  
Avaliação dos níveis de cortisol em saliva artificial por espectrometria de massas / Ana Rosa Escórcio Dias-- São Paulo, 2020.  
50 f.: il. color.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.  
Orientação: Prof. Dr. Thiago de Oliveira Mendes.

1. Diagnóstico. 2. Biofluidos. 3. Método rápido. I. Mendes, Thiago de Oliveira. II. Título.

CDD 620.82



## TERMO DE APROVAÇÃO

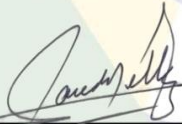
**ANA ROSA ESCÓRCIO DIAS**

**“AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CORTISOL EM SALIVA ARTIFICIAL POR  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS”**

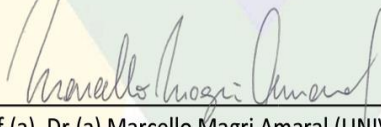
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:



Prof.(a). Dr.(a) Thiago de Oliveira Mendes (presidente-orientador)



Prof.(a). Dr.(a) Claudio Alberto Téllez Soto (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof.(a). Dr.(a) Marcello Magri Amaral (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof(a). Dr(a) Luis Felipe das Chagas e Silva de Carvalho (UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ)

São Paulo, 11 de junho de 2020

**Presidente da Banca Prof(a). Dr(a) Thiago de Oliveira Mendes**

Houve alteração do Título: sim ( ) não ( X ):

---

---

FOLHA DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DO TEXTO NA PÁGINA  
UNIVERSIDADE BRASIL E BANCO DE TESES DA CAPES E REPRODUÇÃO DO  
TRABALHO



**Termo de Autorização**

**Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES**

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **“AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CORTISOL EM SALIVA ARTIFICIAL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS”**

Houve alteração do Título: sim ( ) não ( X )

\_\_\_\_\_

Autor(es):

Discente: **Ana Rosa Escórcio Dias**

Assinatura: Ana Rosa Escórcio Dias

Orientador(a): **Prof. Dr. Thiago de Oliveira Mendes**

Assinatura: Thiago de Oliveira Mendes

Coorientador(a): -----

Assinatura: -----

Data: 11/06/2020

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus netos, em especial a Maria Augusta (acadêmica de Medicina) e ao Wellington Neto (Graduado em Direito), para que essa conquista sirva de exemplo e incentivo para que a busca do conhecimento esteja sempre presente nas suas vidas e para que estimule em suas trajetórias profissionais.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me protege, guiando meus passos e minhas escolhas, sempre me mostrando os melhores caminhos a seguir.

A Nossa Senhora, que passa na frente e ilumina meus caminhos.

Aos meus pais, Arnaldo e Eugênia (*in memoria*), pelo exemplo de luta e dedicação.

Ao meu marido, José Welington, pelo companheirismo ao longo desses anos e amor.

Aos meus filhos, Álvaro, Rossana, Welington Jr e Carlos Eugênio; minhas noras, Elaine, Lilian e Ana Karine; meu genro Ricardo, pelo carinho e força.

Aos meus amados netos, Maria Augusta, Wellington Neto, Maria Eduarda, João Victor, Maria Carolina, Maria Ady, Ricardo Jr, Maria Alice e Maria Rosa a quem dedico toda essa luta como exemplo de perseverança e Fé.

Ao meu orientador, Thiago de Oliveira Mendes, pelo compromisso em incansável em construir a tese, pela colaborações em todo seu seguimento, por ser um mestre perfeccionista e criteriosa, que sempre me desafiou a melhorar cada vez mais.

A Universidade Brasil, pela os ensinamentos repassados, ao enriquecimento curricular, a oportunidade do título de mestrado.

Aos mestres, pela colaboração a essa conquista, pelo repasse do seu saber e aos esforço em seu deslocamento para ministrar aulas presenciais.

Ao CNPq (Edital Universal CNPq 437516/2018-0) pela compra do padrão analítico de cortisol e reagentes.

A colaboração com a Dra. Brenda Porta e todo o suporte fornecido para o desenvolvimento da seção experimental realizada nas instalações do departamento de química da UFMG.

## RESUMO

A medição do nível de cortisol em fluidos biológicos é usada em alguns diagnósticos. Atualmente uma das mais utilizadas técnicas analíticas para mensurar os seus níveis é a espectrometria de massas (MS), com grande aplicação nas mais variadas áreas da ciência. Objetivou-se com este estudo propor um método de análise rápida, sem preparo de amostra, para avaliar o nível de cortisol em uma amostra de saliva pela técnica espectrometria de massa por *paper spray ionization* e análise multivariada. Sendo assim, Espectros de massas na região de 100-800 m/z foram adquiridos com um equipamento modelo LCQ FLEET da *Thermo Fisher Scientific* equipado com um analisador de massas do tipo Ion Trap de baixa resolução. A presença do cortisol em meio a uma amostra de saliva artificial foi determinada pela presença dos íons 363 m/z, 385 m/z, 725 m/z e 747 m/z característicos da molécula de cortisol. A comparação dos perfis espectrais da saliva e da saliva com cortisol mostrou a existência de faixas espectrais presentes no espectro do cortisol que não se sobrepõe aos espectros de saliva, sugerindo o monitoramento dessas regiões para determinação da concentração de cortisol em amostras de saliva. A análise de componentes principais (PCA) evidenciou a formação de grupos de amostras, diferenciando-os em relação aos níveis de concentração de cortisol, propondo a metodologia como análise qualitativa dos níveis de cortisol salivar. Finalmente, a análise do gráfico de loadings da PCA juntamente com a atribuição das razões massa carga sugerem os íons 363 m/z, 385 m/z e 747 m/z como marcadores para serem utilizados num ajuste linear múltiplo com o objetivo de quantificar a concentração de cortisol em amostras de saliva. A técnica PS-MS mostrou-se eficiente e promissora para a determinação em tempo real dos níveis de cortisol salivar sem a utilização de qualquer etapa de preparo de amostras. Partindo de um volume de apenas 5,0 µL de amostra, colocado diretamente sobre o amostrador do equipamento, foi possível obter a identificação pela análise do espectro de massas num tempo de aproximadamente 45 segundos.

**Palavras-chave:** Diagnóstico; Biofluidos; Método rápido; Cortisol.

## ABSTRACT

Measurement of the level of cortisol in biological fluids is used in some diagnoses. Currently, one of the most used analytical techniques to measure its levels is mass spectrometry (MS), with wide application in the most varied areas of science. The objective of this study was to propose a method of rapid analysis, without sample preparation, to assess the level of cortisol in a saliva sample using the mass spectrometry technique by paper spray ionization and multivariate analysis. Thus, mass spectra in the region of 100-800  $m/z$  were acquired with a Thermo Fisher Scientific LCQ FLEET model equipped with a low-resolution Ion Trap mass analyzer. The presence of cortisol in an artificial saliva sample was determined by the presence of 363  $m/z$ , 385  $m/z$ , 725  $m/z$  and 747  $m/z$  ions characteristic of the cortisol molecule. The comparison of the spectral profiles of saliva and saliva with cortisol showed the existence of spectral bands present in the cortisol spectrum that do not overlap with the saliva spectra, suggesting the monitoring of these regions to determine the concentration of cortisol in saliva samples. The principal component analysis (PCA) showed the formation of groups of samples, differentiating them in relation to the levels of cortisol concentration, proposing the methodology as a qualitative analysis of salivary cortisol levels. Finally, the analysis of the PCA loadings graph together with the attribution of the mass load ratios suggest the ions 363  $m/z$ , 385  $m/z$  and 747  $m/z$  as markers to be used in a multiple linear adjustment in order to quantify the concentration of cortisol in saliva samples. The PS-MS technique proved to be efficient and promising for the real-time determination of salivary cortisol levels without using any sample preparation step. Starting from a volume of only 5.0  $\mu\text{L}$  of sample, placed directly on the equipment's sampler, it was possible to obtain the identification by analyzing the mass spectrum in a time of approximately 45 seconds.

**Keywords:** Diagnosis; Rapid method; Biofluids; Cortisol.

## **DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO**

O presente trabalho teve o objetivo propor um método de análise rápida, sem preparo de amostra, para avaliar o nível de cortisol em uma amostra de saliva pela técnica espectrometria de massa por *paper spray ionization* e análise multivariada. Sendo assim, Espectros de massas na região de 100-800 m/z foram adquiridos com um equipamento modelo LCQ FLEET da *Thermo Fisher Scientific* equipado com um analisador de massas do tipo Ion Trap de baixa resolução. A técnica PS-MS mostrou-se eficiente e promissora para a determinação em tempo real dos níveis de cortisol salivar sem a utilização de qualquer etapa de preparo de amostras. Partindo de um volume de apenas 5,0  $\mu\text{L}$  de amostra, colocado diretamente sobre o amostrador do equipamento, foi possível obter a identificação pela análise do espectro de massas num tempo de aproximadamente 45 segundos.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Estrutura química da molécula do Cortisol. ....	20
Figura 2 - Diagrama do eixo HPA, descrevendo a regulação do cortisol. ....	21
Figura 3 - Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas. ....	25
Figura 4 - Ilustração do processo de Ionização por Electrospray. ....	27
Figura 5 - Esquema geral de um sistema de <i>paper spray</i> ....	30
Figura 6 - Esquema do preparo da amostra de cortisol. ....	32
Figura 7 - Esquema do preparo da saliva artificial. ....	33
Figura 8 - Esquema do preparo da amostra de saliva com adição de cortisol. ....	34
Figura 9 - Espectrômetro de massas. ....	35
Figura 10 - Espectro de massas do Cortisol. ....	36
Figura 11 - Espectro de massas da saliva artificial. ....	37
Figura 12 - Espectro de massas da saliva artificial com adição de cortisol. ....	38
Figura 13 - Análise de Componentes Principais. ....	40
Figura 14 - Determinação da concentração de cortisol salivar. ....	41

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Dissociação dos sais presentes na saliva artificial.....	37
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CBG	Globulina de Ligação ao Cortisol, do inglês <i>Cortisol-Binding Globulin</i>
CI	Ionização Química, do inglês <i>Chemical Ionization</i>
CMC	Carboximetilcelulose
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina, do inglês <i>corticotropin-releasing</i>
CRM	Modelo de resíduo cobrado, do inglês <i>Charged Residue Model</i>
DART	Análise Direta em Tempo Real, do inglês <i>Direct Analysis in Real Time</i>
DESI	Ionização por electropulverização por dessorção, do inglês <i>Desorption Electrospray Ionizati</i>
DI	Ionização por dessorção, do inglês <i>Desorption Ionization</i>
EASI	Ionização por spray sonoro ambiente fácil, do inglês <i>Easy Ambient Sonic Spray Ionization</i>
ELDI	Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Eletropulverização, do inglês <i>Electrospray Assisted Laser Desorption Ionization</i>
EI	Ionização de elétrons, do inglês <i>Electron Ionization</i>
ESI	Electropulverização, do inglês <i>Electrospray</i>
FAB	Bombardeio Atom Rápido, do inglês <i>Fast Atom Bombardment</i>
FT-ICR	Ressonância Ciclotrônica de Íons de Transformada de Fourier
GLC	Globulina de Ligação ao Corticosteroide, do inglês <i>Corticosteroid Binding Globulin</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alto rendimento, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IEM	Mecanismo de Evaporação de Íons, do inglês <i>Ion Evaporation Mechanism</i>
IMRT	Radioterapia de Intensidade Modulada, do inglês <i>Intensity Modulated Radiotherapy</i>
MALDI	Dessorção/ionização a laser assistida por matriz, do inglês <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MLR	regressão linear múltipla
PCA	análise de componentes principais
MS	Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
PSI	Ionização por spray de papel, do inglês <i>Paper Spray Ionization</i>
RIE	Radioimunoensaio

RGs	Receptores de Glicocorticoides
SIMS	Espectrometria de Massa de Íons Secundários, do inglês <i>Secondary Ion Mass Spectrometry</i>
SM	Síndrome Metabólica
TOF	Tempo de Vôo, do inglês <i>time-of-flight</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2.1 Objetivo Geral .....	19
2.2 Objetivos Específicos .....	19
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	20
3.1 Cortisol .....	20
3.2 Espectrometria de Massas .....	24
3.2.1 Espectrometria de Massas por <i>Paper Spray</i> .....	29
4.1 Preparo de Amostras .....	32
4.1.1 Materiais e reagentes .....	32
4.1.2 Análise do cortisol .....	32
4.1.3 Preparo e análise da saliva artificial .....	33
4.1.4 Preparo das amostras de saliva com adição de cortisol .....	33
4.2 Espectrometria de Massas .....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
6 CONCLUSÕES .....	43
REFERÊNCIAS .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

O cortisol é um hormônio esteroide que desempenha um papel importante na regulação de uma ampla gama de processos fisiológicos e patológicos que envolvem resposta imune, equilíbrio eletrolítico, pressão arterial e metabolismo, entre outros (SYED; HAMMAMI, 2019). O cortisol circula principalmente ligado à globulina de ligação ao corticosteroide (GLC), uma proteína endógena com alta afinidade e especificidade.

O cortisol que não está ligado à essa globulina está fracamente ligado a albumina ou livre e, conseqüentemente, os níveis de cortisol total no soro ou no plasma são fortemente dependentes dos níveis de GLC (VIEIRA *et al.*, 2014). Várias circunstâncias interferem nos níveis e na afinidade do cortisol, alguns mais raros como no caso de doenças imunossupressoras, fatores genéticos, fatores ligados a deficiências, gestação e ainda, uso de contraceptivos hormonais esteroides (MILLER *et al.*, 2013).

A medição do nível de cortisol em fluidos sanguíneo, geralmente plasma, é usada no diagnóstico de doenças relacionadas à função adrenal, hipofisária e hipotalâmica, incluindo a síndrome de *Cushing* e à doença de *Addison* (SYED; HAMMAMI, 2019). Outra possibilidade é a medição do cortisol na saliva ou no líquido parotídeo, já que a fração livre é o componente principal, e sua determinação nesta forma mostrou alta correlação com análises de plasma (VIEIRA *et al.*, 2014). Desta maneira, a necessidade de métodos para a avaliação de fração livre de cortisol, excluindo a interferência de níveis de GLC, foram descritos com ensaios baseados principalmente em radioimunoensaio (RIEs) (VIEIRA *et al.*, 2014).

Um dos motivos que contribui na avaliação do cortisol pela saliva está relacionado com a facilidade em coletar a amostra, uma vez que o paciente pode coletar em casa e pode ser repetido em intervalos curtos (RAFF, 2013).

Pesquisas mostram que a dosagem de cortisol salivar é uma metodologia que vem tendo crescente aceitação no estudo da função adrenocortical. Sua alta correlação com a fração livre sérica e presença limitada de interferentes têm originado múltiplas publicações, em especial no *screening* de pacientes suspeitos de hiperfunção (VIEIRA *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2014).

O intervalo de aplicação clínica para quantificação do cortisol (2 a 25  $\mu\text{g}/\text{dL}^{-1}$ ) é rotineiramente determinado por técnicas de imunoensaio, técnica que apresenta

problemas devido à semelhança estrutural entre os hormônios esteroides e à dificuldade de obtenção de anticorpos específicos, associados à ampla faixa de concentração em que estes podem ser encontrados (TURPEINEN and HÄMÄLÄINEN, 2013).

Outros métodos utilizados para quantificar pode ser feita por meio dos complexos organometálicos que são detectados por eletroquímica ou espectroscopia de infravermelho, métodos cromatográficos e ensaios competitivos como RIE, o qual possui alta sensibilidade e imunoensaios (VIEIRA et al., 2014).

Os imunoensaios não isotópicos costumam apresentar maior especificidade e maior sensibilidade quando comparados com ensaios colorimétricos (GATTI et al., 2009) A utilização de imunoensaios na determinação do cortisol urinário livre vem sendo substituída pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), visando, principalmente o diagnóstico da síndrome de *Cushing* (TURPEINEN; HÄMÄLÄINEN, 2013; SUGAWARA et al., 2008).

Atualmente a espectrometria de massas (MS) se apresenta como uma técnica analítica empregada em diversas aplicações, como análise de alimentos, pesticidas, biofluidos e fármacos. Com a introdução de novas fontes de ionização a MS vem experimentando um extraordinário desenvolvimento nos últimos anos. Desta maneira, com métodos de ionização diretos e rápidos e espectrômetros de massas portáteis, a MS pôde atuar em praticamente todos os campos, do interior de um poço de petróleo ao espaço sideral (GUO et al., 2018).

A MS fornece informações sobre a composição elementar de amostras; as estruturas de moléculas inorgânicas, orgânicas e biológicas; a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas; a estrutura e a composição de superfícies sólidas; e as razões isotópicas de átomos nas amostras (LIU et al., 2010).

O PS foi projetado para análises de misturas complexas. Isso porque o substrato usado, o papel, contém em sua composição, majoritariamente, celulose, uma substância com grande número de hidroxilas em sua estrutura química. Essas hidroxilas, tem grande importância, pois elas interagem com as macromoléculas das misturas complexas (por exemplo as proteínas e hemoglobina do sangue) e as retém, não permitindo que estas são encaminhadas ao espectrômetro de massas (GUO et al., 2018).

É importante mencionar que são insipientes os relatos na literatura do uso da espectrometria para determinar os níveis de cortisol salivar, assim como em outras

matrizes de biofluidos. Justificando com isso o interesse em desenvolver uma pesquisa nesse seguimento, possibilitando a implantação de novas metodologias de diagnóstico para o cortisol.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Propor um método de análise rápida, sem preparo de amostra, para avaliar o nível de cortisol em uma amostra de saliva pela técnica espectrometria de massa por *paper spray ionization* e calibração multivariada.

### 2.2 Objetivos Específicos

Obter o perfil de fragmentação, identificando fragmentações e formação de adutos, da molécula de cortisol através da técnica espectrometria de massa por *paper spray ionization*.

Identificar relações  $m/z$  característicos como biomarcadores da presença de cortisol em meio a uma amostra de saliva artificial.

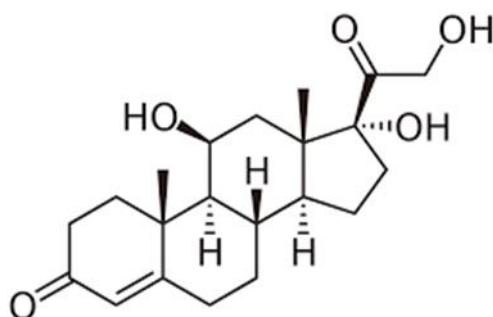
Analisar, pela técnica espectrometria de massa por *paper spray ionization*, um conjunto de amostras de saliva artificial e propor um modelo qualitativo que discrimine amostras de saliva baseado na concentração de cortisol destas amostras.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Cortisol

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é o principal efetador da resposta ao estresse e é crucial para a manutenção da homeostase basal relacionada ao mesmo (ALMEIDA *et al.*, 2014). O cortisol, composto de massa molar de 362,46 u.m.a, representado na Figura 1, é um dos principais hormônios glicocorticóides circulante e sua liberação pela glândula adrenal é estimulada pela hipófise através do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A produção do ACTH é modulada pelo hipotálamo, por meio da secreção por parte deste hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (REIGOTA, 2016).

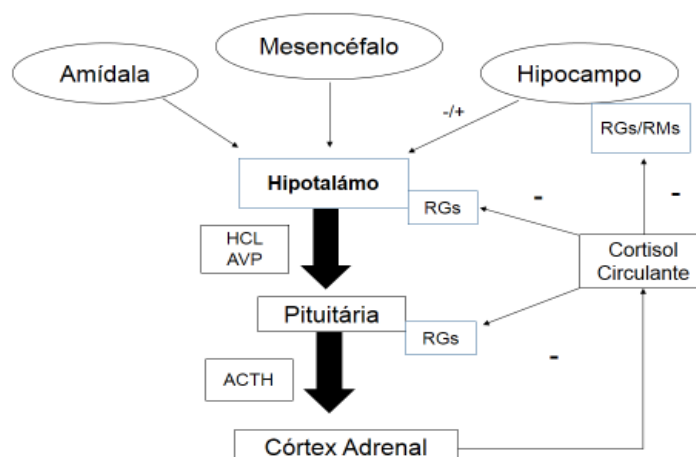
Figura 1. Estrutura química da molécula do Cortisol.



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Cortisol>

O cortisol atua como resposta negativa sobre o hipotálamo e a pituitária para manter equilíbrio sobre a secreção. Porém, estudos demonstram que os estímulos estressantes podem se impor sobre o inibitório direto do cortisol, provocando aumento na secreção do cortisol, conforme mostra a Figura 2 (ROCHA *et al.*, 2018).

Figura 2. Diagrama esquemático do eixo HPA, descrevendo a regulação do cortisol.



Fonte: JURUENA, M. F.; CLEARE, A. J.; PARIANTE, C. M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. **Rev. Bras. Psiquiatr.** São Paulo, v. 26, n. 3, p. 23-30, set. 2004.

Em indivíduos adultos e saudáveis, os níveis matinais de cortisol salivar ficam acima de  $12 \text{ nmol.L}^{-1}$  ( $4,35 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), enquanto as concentrações noturnas variam entre  $1,0$  a  $8,3 \text{ nmol.L}^{-1}$  ( $0,36$  e  $3,01 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) (VOGESER; AUERNHAMMER, 2006).

O cortisol é um dos hormônios mais abundantes no corpo e seus níveis aumentam na presença de estresse físico e/ou psicológico. Um nível elevado de cortisol pode ser um gatilho para reações psicofisiológicas que resultam na hiperfunção do sistema nervoso simpático e do sistema endócrino, especificamente das glândulas adrenais (LUZ NETO et al., 2019).

O cortisol pode desempenhar um papel importante no comportamento alimentar, além de estar associado ao aumento da absorção de energia em indivíduos saudáveis. A produção de cortisol tem um ritmo circadiano que depende do estímulo do hormônio ACTH. Seu nível é alto próximo ao início das atividades diárias, reduz-se ao longo das 24 h (LUZ NETO et al., 2019).

O cortisol é lipofílico e requer um transportador de proteínas para o transporte ao redor do corpo. Aproximadamente 80 % é ligado à globulina de ligação ao cortisol (CBG), 10 % é ligado à albumina e 10 % é livre (não ligado) e biologicamente ativo. O cortisol está envolvido no metabolismo energético através de efeitos diretos na síntese e degradação de carboidratos, proteínas e lipídios. Aumenta a glicogênese, ativando enzimas-chave, por exemplo, fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glicose-6-fosfatase, aumentando a degradação muscular e inibindo a captação de aminoácidos e a síntese de proteínas para fornecer substrato adicional (HARRIS; CHARLES, 2015).

O cortisol reduz a captação periférica de glicose nas células, ativa a glicogênio sintase e inibe a fosforilase do glicogênio, levando ao aumento das reservas de glicogênio. O resultado líquido é o aumento das concentrações de glicose no sangue, mediadas pela degradação de proteínas e lipídios; e o cortisol, juntamente com glucagon, adrenalina e hormônio do crescimento, é liberado em resposta à hipoglicemia (HARRIS; CHARLES, 2015).

Desta forma, o efeito metabólico mais conhecido do cortisol é a sua capacidade de estimular a glicogênese, ou seja, formação de carboidratos a partir de aminoácidos, lactato e glicerol pelo fígado. O cortisol estimula a síntese de enzimas importantes para a conversão de aminoácidos em glicose pelas células hepáticas. Quando se trata de um aumento a curto prazo nos níveis de cortisol e glicose, o corpo já está adaptado. Porém a longo prazo pode gerar problemas (MACEDO *et al.*, 2019).

Se submetidos a condições de estresse crônico, os níveis de glicose permanecem altos e não há solução para o estressor. Uma vez liberado, o cortisol potencializa a quantidade de glicose disponível. O estímulo a longo prazo do cortisol elevará os níveis de glicose e, em seguida, de insulina. Esse aumento da insulina desempenha um papel fundamental no ganho de peso resultante (MACEDO *et al.*, 2019).

Há forte evidência na literatura sobre a hipótese de que os glicocorticóides liberados em resposta ao estresse crônico induzem acúmulo de gordura visceral que, quando presentes em algumas condições, como excesso de ingestão energética, baixa atividade física e má qualidade da alimentação, será disparado o mecanismo de desenvolvimento da síndrome metabólica (SM) (PAREDES; RIBEIRO, 2014).

Uma revisão da literatura recente realizada por Abrahan *et al.* (2013) avaliou seis estudos que correlacionaram o cortisol matinal com a glicose; destes, três demonstraram associação positiva, ou seja, houve correlação entre cortisol e glicose. Níveis significativamente mais elevados de cortisol salivar às 10h e cortisol estimulado pela dexametasona foram encontrados em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 quando comparado aos indivíduos normoglicêmicos. Cortisol salivar às 10h correlacionou-se significativamente com glicemia de jejum e hemoglobina glicada. Este estudo ainda demonstrou que os indivíduos diabéticos apresentavam nível de estresse e resposta ao estresse, mais elevado que os não diabéticos, medido por questionários-padrão.

O cortisol está envolvido no equilíbrio de água e eletrólitos e no controle da pressão arterial. Aumenta a síntese de angiotensinogênio, aumenta os efeitos vasopressores das catecolaminas e da angiotensina II e reduz a dilatação endotelial mediada por óxido nítrico. Nos rins, aumenta a taxa de filtração glomerular e atua no túbulo renal distal para aumentar a retenção de sódio e a perda de potássio; também aumenta o transporte de sódio e a perda de água livre através do antagonismo da AVP (MELMED et al., 2011).

Seus efeitos renais são mediados pelo receptor mineralocorticoide ao qual se liga com igual afinidade à aldosterona. A magnitude da ligação do cortisol ao receptor é reduzida pela ação da 11 $\beta$ -hidroxisteróide desidrogenase tipo 2 (11 $\beta$ -HSD2) que oxida o cortisol em cortisona, que possui uma afinidade muito mais fraca pelo receptor (MELMED et al., 2011).

O cortisol também está envolvido na manutenção de uma gravidez saudável e no início do nascimento, embora seu papel exato ainda não esteja claro. Estudos adicionais estão sendo impedidos por diferenças entre modelos humanos e animais (HOHWU et al., 2015). Foi notada uma produção aumentada de CRH na placenta antes do trabalho de parto, resultando no aumento da produção fetal de cortisol. Foi demonstrado que o aumento do cortisol sérico e da CRH placentária, ambas manifestações do estresse materno, aumenta o risco de obesidade e diabetes mais tarde na vida (ENTRINGER, 2013; HOHWU et al., 2015).

A produção exacerbada de cortisol está relacionada a alterações imunológicas (ROCHA et al., 2018). Diminui a proliferação de linfócitos, interfere na comunicação entre eles e inibi a produção de anticorpos. Essa proliferação aumenta a sensibilidade do indivíduo a adquirir ou agravar doenças alérgicas. Um exemplo, dessas alterações imunológicas é a psoríase, considerada uma resposta imunopatológica, ou seja, acontece respostas ao estresse contra o próprio organismo. Onde há um aumento de mediadores inflamatórios locais ou sistêmicos que contribuem para o mecanismo desta afecção (REIGOTA, 2016).

Analisando a relação do cortisol salivar com a obesidade, um estudo com 82 indivíduos demonstrou que não houve diferença no nível de cortisol salivar matinal entre indivíduos não obesos, obesos e indivíduos que perderam peso (CHAMPANERI et al., 2013).

No entanto, homens que perderam peso têm nível menor que os não obesos; esta relação nas mulheres não foi observada. A observação que a perda de gordura

visceral pode reduzir a atividade do eixo hipotálamo hipófise-adrenal contrasta com os achados demonstrados que a perda de peso associada à restrição da ingestão calórica aumenta a atividade do eixo hipotálamo-hipofisário (GARBELLOTTO *et al.*, 2018). A partir disso pode-se inferir que jejum e perda de peso podem aumentar os níveis circulantes de cortisol, possivelmente para aumentar o apetite na tentativa de “defender-se” da perda de massa corporal (THERRIEN *et al.*, 2010).

### 3.2 Espectrometria de Massas

Thomson em 1890 iniciou os primeiros estudos a respeito da espectrometria de massas, determinando a razão massa/carga do elétron. Apesar desta descoberta, apenas em 1940 ocorreu sua primeira aplicação em análises, quando a técnica começou a ser adotada pela indústria petrolífera para análise quantitativa de misturas constituídas por até nove hidrocarbonetos (GUO *et al.*, 2017).

Anteriormente, para analisar essas misturas, utilizava-se destilação fracionada seguida por medidas de fração dos componentes separados, o que consumia, em média, 200 horas de trabalho do analista. O tempo gasto para avaliar essas misturas foi um dos principais motivos da utilização da MS, pois essas mesmas informações poderiam ser obtidas em poucas horas ou menos (TEODORO *et al.*, 2017).

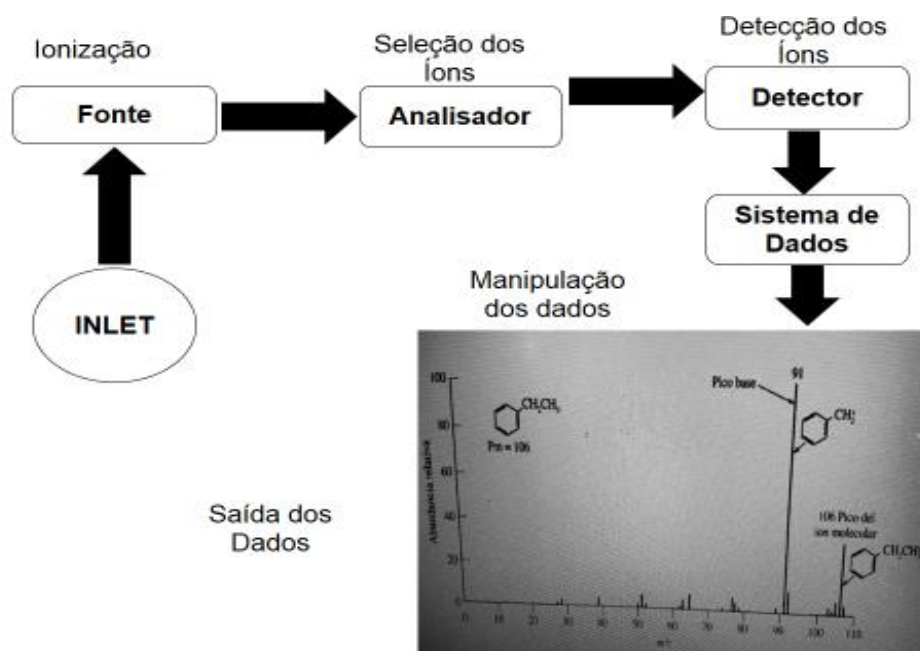
A partir de 1950, os espectrômetros de massas comerciais foram aperfeiçoados e adaptados para a identificação e elucidação estrutural de diversos compostos orgânicos (PAIVA *et al.*, 2010). Com o passar dos anos, em especial nas décadas de 80 e 90, as aplicações da espectrometria de massas tiveram mudanças significativas. O desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica permitiu que moléculas não-voláteis, com alto peso molecular ou termicamente instáveis como, por exemplo, a maioria das moléculas presentes nos alimentos ou amostras biológicas, fossem ionizadas e analisadas por MS (PAIVA *et al.*, 2010).

Essas técnicas conseguem analisar moléculas de grande diversidade de tamanhos e polaridades: desde átomos e pequenas moléculas como benzeno e drogas farmacêuticas como ácido acetilsalicílico e sais como líquidos iônicos até grandes (bio)moléculas, bem como tecidos, proteínas, embriões, vírus e bactérias intactas (MACIEL *et al.*, 2019).

De forma ilustrativa a figura 3 é a representação esquemática dos componentes de um espectrômetro de massas. Em geral, a análise de um composto

por MS compreende as seguintes etapas: (1) a introdução da amostra, (2) a ionização das moléculas, (3) a passagem por um analisador de massas, responsável por separar os íons formados de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ), (4) sistema de detecção onde os íons são contados e o sinal é transformado em corrente elétrica e, por fim, (5) o processador converte a magnitude do sinal elétrico em função da razão  $m/z$  em dados, resultando no espectro de massas correspondente (HARRIS; CHARLES, 2015).

Figura 3. Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas.



Fonte: HARRIS, D. C; CHARLES, A. R. *Análise Química Quantitativa*. Editora LTC, 12ª Edição, São Paulo, 2015.

É importante mencionar que o analisador de massas e o detector são sempre mantidos sob alto vácuo, enquanto a fonte, em diversas técnicas de ionização, opera à pressão atmosférica. O tipo da fonte de ionização e do analisador de massas é o que determina a aplicabilidade da MS. Inúmeros métodos de ionização e diversos detectores de massas, aplicáveis praticamente a todo o tipo de analito, foram desenvolvidos ao longo da história da MS (HOFFMAN; STROOBANT, 2014).

A Ionização por Impacto de Elétrons (EI - *Electron Ionization*) é o método mais simples e comum de converter a amostra em íons. Na EI, um feixe de elétrons de alta energia é emitido a partir de um filamento aquecido e colide com as moléculas. Na colisão um ou mais elétrons são retirados das moléculas e cátions são formados. A energia transmitida à amostra durante o processo é alta e pode levar a uma grande quantidade de fragmentações do íon molecular. Uma desvantagem da EI é que a

amostra deve ser relativamente volátil, o que impede a análise de compostos de alta massa molecular (PAIVA *et al.*, 2010).

Na Ionização Química (CI - *Chemical Ionization*), as moléculas da amostra colidem com as moléculas de um de gás reagente (ex.: H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>OH) pré-ionizado. Com a colisão, algumas moléculas da amostra são ionizadas por vários mecanismos, como transferência de íons H<sup>+</sup>, transferência de elétrons e formação de adutos. Assim como a EI, a Ionização Química exige que a amostra seja volátil (baixa massa molecular) (PAIVA *et al.*, 2010).

Existem também as chamadas técnicas de dessorção (DI - *Desorption Ionization*), como a Espectrometria de Massas de Íon Secundário (SIMS - *Secondary Ion Mass Spectrometry*), o Bombardeamento de Átomos Rápidos (FAB - *Fast Atom Bombardment*) e a Ionização por Dessorção a Laser Assistido por Matriz (MALDI - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) (HARRIS; CHARLES, 2015).

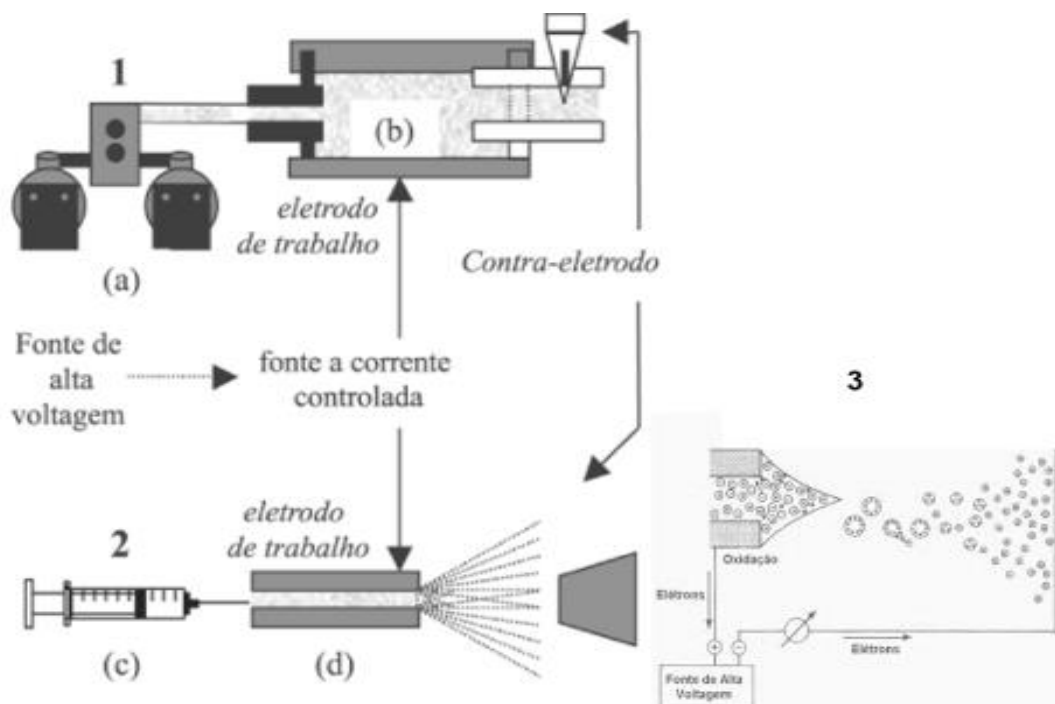
Na ionização por dessorção, a amostra a ser analisada é dissolvida ou dispersa em uma matriz. Em seguida, é emitido sobre a mistura (amostra + matriz) um feixe de íons de alta energia no caso da SIMS, um feixe de átomos neutros no FAB ou de fótons de alta intensidade no caso do MALDI. Na colisão com esses íons/átomos/fótons, algumas moléculas da amostra são ionizadas, expelidas da superfície e aceleradas na direção do analisador. Os métodos SIMS e FAB são capazes de analisar compostos com massa molecular de até 20.000 Da, como polipeptídios e oligonucleotídeos. Já a MALDI pode ser aplicada na análise de compostos com massas moleculares próximos de 300.000 Da (SHI *et al.*, 2015).

Desta maneira, até a década de 80, as fontes de ionização operavam somente sob alto vácuo. As fontes EI e CI eram, até então, os métodos de ionização mais utilizados e os que apresentavam melhor desempenho, uma vez que a quantidade de íons e solventes que adentram o equipamento não são capazes de comprometer o vácuo. No entanto, o emprego dessas técnicas se limitava à análise de substâncias de baixa massa molecular e termicamente estáveis (HOFFMAN; STROOBANT, 2014).

Para aperfeiçoar as técnicas já existentes, em 1989, o trabalho publicado por John Fenn *et al.* revolucionou o campo de estudo da espectrometria de massas ao divulgar uma nova técnica de ionização, menos “agressiva” e que opera à pressão atmosférica: a Fonte de Ionização por *Electrospray* (ESI - *Electrospray Ionization*) (HOFFMAN; STROOBANT, 2014).

Na ESI, os íons são formados fora do espectrômetro de massas. A amostra é diluída em um solvente volátil, em meio ácido ou básico, e as moléculas do analito são protonadas (modo positivo) ou desprotonadas (modo negativo). Os íons também podem ser observados na forma de adutos, coordenados com cátions ou ânions. O processo de ionização por *Electrospray*, Figura 4, ocorre basicamente em três etapas: (1) a nebulização da solução contendo a amostra em gotículas carregadas produzidas diretamente pela aplicação de tensão (2-5 kV), (2) a liberação de íons a partir das gotículas e (3) o transporte dos íons da região de pressão atmosférica da fonte de ionização para a região de alto vácuo do analisador (SHI *et al.*, 2015).

Figura 4. Ilustração do processo de Ionização por Electrospray.



Fonte: CROTTI, ANT. E. M.; VESSECCHELL, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Quím. Nova*. São Paulo, v. 29, n. 2, p., mar-abr. 2006.

A transferência dos íons presentes em solução para a fase gasosa se dá do seguinte modo: o tubo capilar expulsa pequenas gotículas carregadas (spray) para dentro da câmara de ionização. As gotículas carregadas enfrentam um contrafluxo de um gás de secagem (em geral, nitrogênio) que evapora as moléculas de solvente. Assim, a densidade de carga de cada gotícula aumenta até que as forças repulsivas excedam a sua tensão superficial (limite de Rayleigh), a gotícula então se divide em tamanhos menores (explosão coulômbica). O processo se repete até que os íons da amostra, livres de solvente, se encontrem em fase gasosa (DENG; YANG, 2013)

Com o surgimento da ESI, análises de moléculas não voláteis e de grande massa molecular, como as macromoléculas biológicas, se tornaram possíveis. Como a amostra a ser analisada deve ser introduzida em solução, é possível o acoplamento da ESI-MS com técnicas de separação, como a cromatografia líquida (LC-ESI-MS). Outra peculiaridade da Ionização por Electrospray está no fato de ser uma técnica de ionização branda, o que permite a análise da molécula intacta (sem ou com pouca fragmentação), mantendo inclusive as interações não covalentes (HARRIS; CHARLES, 2015).

Os analisadores de massas se diferenciam pelo seu modo de trabalho, pela sua exatidão e pela resolução. A exatidão é medida pelo erro calculado (em ppm) do desvio da medida experimental em relação ao valor de massa teórico. A alta exatidão de massas oscila entre valores de 0,1 a 50 ppm de erro. A resolução pode ser definida como a capacidade de o analisador medir a razão  $m/z$  com a menor diferença possível da razão  $m/z$  teórica. Os analisadores de massas comerciais possuem resolução que vai de 1.000  $m/z$  (resolução unitária), até 100.000  $m/z$  (alta resolução) e de 100.000  $m/z$  até 1.000.000  $m/z$  (altíssima resolução) (HOFFMAN; STROOBANT, 2014).

Outra característica excepcional da ESI é que ela forma íons com energias internas muito baixas, portanto, fragmentações na fonte são geralmente suprimidas. Essa suavidade resulta numa relação direta 1:1 molécula-íon; conseqüentemente, todos os componentes polares de misturas químicas podem ser acessados adequadamente, e ser instantaneamente separados pela seletividade da MS. Nota-se que a separação MS é rápida e eficiente, já que se baseia não no tempo de retenção, tal como cromatografia, mas em diferenças de  $m/z$  dos íons (HOFFMAN; STROOBANT, 2014).

Uma segunda revolução na MS, a MS ambiente, foi um grande progresso em direção à simplicidade (SCHWAB *et al.*, 2013). Na MS ambiente, procedimentos livres de preparação de amostras foram desenvolvidos via dessorção e ionização de analitos diretamente a partir de suas matrizes naturais, ou seja, diretamente das suas superfícies, em condições ambiente. Essas técnicas de MS ambiente, baseadas na ESI e em uma variedade de outras estratégias de ionização, fizeram da MS, como nunca antes, uma técnica ideal e cada vez mais utilizada em investigações de química forense (LIU *et al.*, 2010).

Por fim, existem um conjunto de cinco técnicas de MS ambiente: ionização com dessorção por eletrospray (DESI, do inglês *desorption electrospray ionization*),

ionização por nebulização sobre papel (PSI, do inglês *paper spray ionization*, análise direta em tempo real (DART, do inglês *direct analysis in real time*), ionização ambiente por spray sônico (EASI, do inglês *easy ambient sonic spray ionization*) e dessorção/ionização a laser assistida por electrospray (ELDI, do inglês *electrospray-assisted laser desorption ionization*) (HOFFMAN; JACKSEN, 2015; LIU *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2013). Neste trabalho foi utilizada a técnica de PSI, portanto, esta técnica de ionização será discutida em mais detalhes a seguir. Após a inserção e ionização da amostra no analisador de massas, diversas são as possibilidades de analisadores que podem ser utilizados.

O analisador deve permitir a passagem de um número de íons suficiente para fornecer uma corrente de íons facilmente mensurável, tais como: tempo-de-vôo; quadrupolo; Ressonância Ciclotrônica de Íons de Transformada de Fourier (FT - ICR) (TANG *et al.*, 2006).

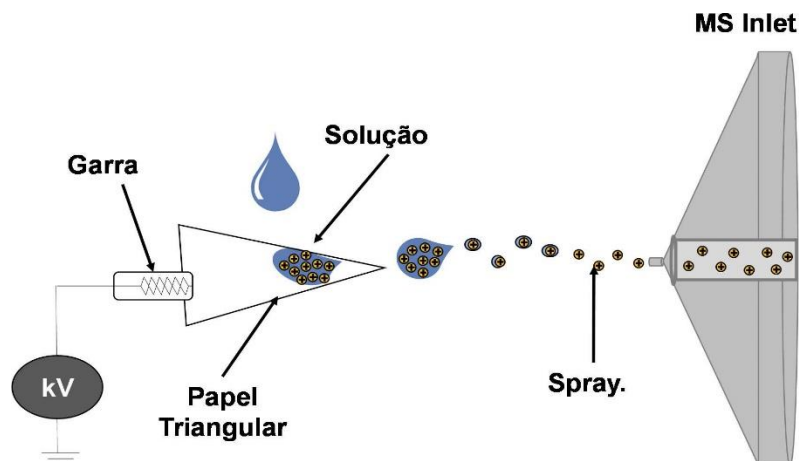
A espectrometria por Tempo de Vôo (TOF-MS) foram descritos por Wiley e McLaren em 1955. Eles conseguiram reunir os requisitos de focalização espacial e de energia dos íons, tornando viável o primeiro instrumento comercial TOF-MS. O princípio de operação do TOF-MS envolve a medida do tempo que um íon leva para viajar da fonte de íons até o detector (SING *et al.*, 2015).

Já os instrumentos de quadrupolo utilizam potenciais de corrente contínua e radiofrequência para separar diretamente os íons de acordo com a sua relação  $m/z$ . Recentemente, o espectrômetro de FT - ICR tornou-se uma técnica de espectrometria de massa poderosa baseada no confinamento de íons (SILVA *et al.*, 2012).

### 3.2.1 Espectrometria de Massas por *Paper Spray*

Em 2009 foi criada a fonte de ionização por spray de papel, do inglês *Paper Spray Ionization* (PSI), por Cooks *et al.* (2011), a técnica é composta por um fio soldado a uma garra tipo jacaré fixada a um suporte. Consiste na aplicação de alta tensão em um papel de formato triangular umedecido com uma solução contendo o analito, que por capilaridade espalha-se pelo papel alcançando as extremidades. A formação de um *spray* na forma de cone de Taylor é induzido pelo campo elétrico, oriundo da diferença da alta voltagem (3-5 kV) aplicada no papel e a tensão do capilar do espectrômetro de massas Yang *et al.* (2012), a figura 5 mostra esse processo.

Figura 5. Esquema geral de um sistema de *paper spray ionization*



Fonte: Adaptado de Cooks et al. (2011).

A formação de íons pelo PSI segue os mesmos princípios que o ESI. Basicamente, ocorre a remoção (ou captura) de elétrons, formação de adutos e protonação/ desprotonação da molécula neutra em fase gasosa. A escolha adequada da fonte depende de propriedades físico-químicas da(s) molécula(s)-alvo (como volatilidade e presença de sítios ácidos ou básicos) bem como do processo de transferência de energia interna para a formação de íons (YANG *et al.*, 2012).

Os íons são gerados em solução, pH ácido ou básico. Com a aplicação desses íons ocorre a formação de um fino spray em formato de cone de Taylor, os quais são produzidos pela transferência da solução do papel e subsequente aplicação de uma diferença de potencial. Dessa forma, o contra-íon é oxidado ou reduzido e formam-se gotas com excesso de carga positiva ou negativa. Por conseguinte, o solvente evapora reduzindo o volume das gotas até que elas se dividam. Após um tempo, devido a repulsão entre íons de mesma carga, ou formam-se gotas contendo apenas um íon (*charged residue model- CRM*) ou os íons evaporam das gotas para a fase gasosa (*ion evaporation mechanism- IEM*) (EVARD *et al.*, 2015).

O PSI foi projetada para análises de misturas complexas. Isso porque o substrato usado, o papel, contém em sua composição, majoritariamente, celulose, uma substância com grande número de hidroxilas em sua estrutura química. Essas hidroxilas, tem grande importância, pois elas interagem com as macromoléculas das misturas complexas (por exemplo as proteínas e hemoglobina do sangue) e as retém, não permitindo que estas sejam encaminhadas ao espectrômetro de massas (TAVERNA *et al.*, 2016).

O PSI tem possibilitado a análise de amostras sem o pré-tratamento prévio ou

com mínimo preparo. Inúmeros trabalhos têm demonstrado aplicabilidade do PSI, principalmente em aplicações clínicas, incluindo a triagem neonatal, monitoramento de drogas terapêuticas, medicina personalizada e a análise de fluidos biológicos, como sangue, urina e saliva (COOKS *et al.*, 2011; ESPY *et al.*, 2012; MANICKE *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2015).

Ressalta-se que o elemento primordial para a realização de análises por PSI é o papel, considerado comum e de custo financeiro baixo. Sendo assim, como existe a disponibilidade de uma variedade de tipos de papeis, tem-se um grande potencial para o desenvolvimento de diversos métodos de diagnóstico. Estas características tornam o PSI muito atrativo e com grandes potencialidades em aplicações analíticas e bioanalíticas (SNEHA; DULAY; ZARE, 2017).

Como exemplo da praticidade da técnica de PSI, foi demonstrado em um estudo que em 45 segundos pode-se ter um monitoramento de fármacos diretamente do sangue, sem nenhum preparo de amostra. Esse tempo, sobretudo quando comparado às demais técnicas de análises, se torna praticamente insignificante (WANG *et al.*, 2010).

O PSI também pode ser usado em laboratório de perícia, sendo considerado vantajoso por ser um método rápido para *screening* de drogas ilícitas, tanto diretamente quanto em biofluido esta é uma grande vantagem frente a elevada frequência analítica existente nesses laboratórios. É usado apenas um método de análise com alta eficiência e baixo custo. E ainda tem a vantagem de ser eficaz no descobrimento de novas drogas produzidas no mundo (TEODORO *et al.*, 2017).

Como limitação dessa técnica está a supressão iônica que acarreta uma sensibilidade baixa ao nível de traços e faixa dinâmica estreita. Estas limitações tem sido a força motriz para o desenvolvimento de novas abordagens que integrem de forma eficiente etapas de *clean up*, extração/enriquecimento do analito e melhorias na ionização (MACIEL *et al.*, 2019).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Preparo de Amostras

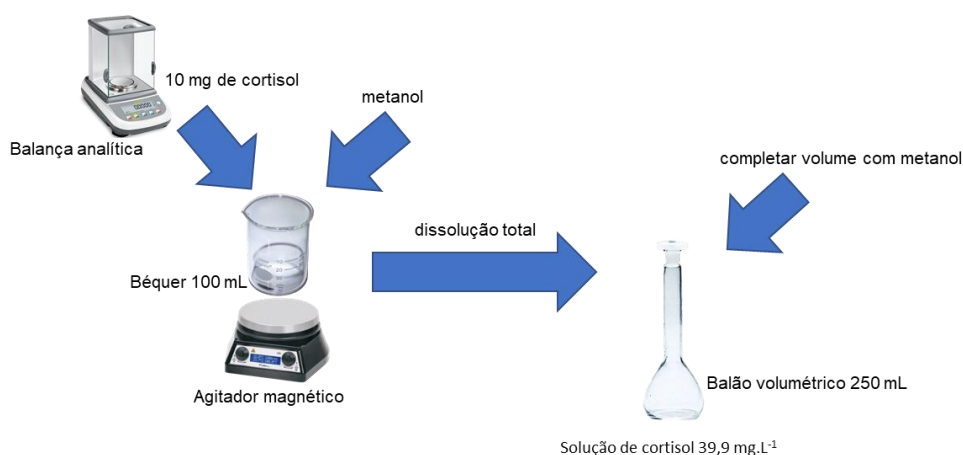
#### 4.1.1 Materiais e reagentes

Padrão analítico de cortisol foi adquirido na Sigma-Aldrich. Alfa-amilase, cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de magnésio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), metilparabeno ( $\text{CH}_3(\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{COO})$ ), fosfato dipotássico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e carboximetilcelulose de sódio foram adquiridos na Vetec. Água deionizada utilizada no preparo de amostras foi obtida com um sistema Milli-Q de purificação.

#### 4.1.2 Análise do cortisol

Para a obtenção do espectro de massas do padrão de cortisol, foi preparada uma solução de cortisol em metanol na concentração de  $39,9 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  da seguinte maneira: pesou-se  $10,0 \text{ mg}$  do padrão analítico de cortisol em um béquer de  $100 \text{ mL}$  e transferindo-se analiticamente para um balão volumétrico de  $250 \text{ mL}$ . A concentração obtida foi de  $39,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . A figura 6 mostra o esquema de preparo desta solução de cortisol.

Figura 6. Esquema do preparo da amostra de cortisol



Fonte: Autoria própria

Uma alíquota  $5,0 \text{ uL}$  desta solução foi aplicado sobre o papel. Após isso foi adicionado, como solução eluente,  $15,0 \text{ uL}$  de metanol sobre o papel.

#### 4.1.3 Preparo e análise da saliva artificial

O preparo da saliva sintética (ou artificial) foi realizado de acordo com metodologia descrita por Arain e colaboradores (2014). Inicialmente foram colocados 500 mL de água deionizada em um béquer de 1 L. Em seguida, sob agitação com uma barra magnética, foram adicionados 2500 unidades de alfa-amilase, 0,625 g de KCl, 0,166 g de cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 0,059 g de cloreto de magnésio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 2,0 g de metilparabeno ( $\text{CH}_3(\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{COO})$ ), 0,804 g de fosfato dipotássico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 0,326 g fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 10,0 g de carboximetilcelulose de sódio. Após a dissolução total dos reagentes a solução foi transferida analiticamente para um balão volumétrico de 1,00 L. O volume foi completado com água deionizada. A figura 7 mostra o esquema de preparo da solução de saliva artificial.

Figura 7. Esquema do preparo da saliva artificial



Fonte: Autoria própria

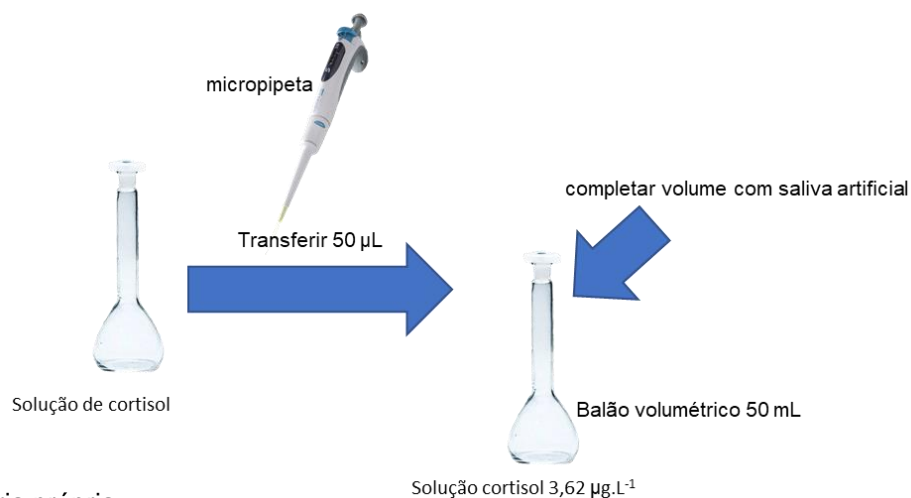
Para a obtenção do espectro de massas da amostra de saliva artificial foi colocado 5,0  $\mu\text{L}$  de saliva artificial diretamente sobre o papel e adicionado, 15,0  $\mu\text{L}$  de metanol sobre o papel, com função de solução eluente.

#### 4.1.4 Preparo das amostras de saliva com adição de cortisol

A partir da solução de cortisol, descrita na seção 4.1.2, foram pipetados 50  $\mu\text{L}$  desta solução e transferida para um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com a solução de saliva artificial. A concentração final obtida foi de 3,62

$\mu\text{g.L}^{-1}$ , selecionada a partir dos níveis de cortisol salivar reportados na literatura (VOGESER; AUERNHAMMER, 2006). O esquema de preparo da solução de saliva com adição de cortisol é mostrado na figura a seguir.

Figura 8. Esquema do preparo da amostra de saliva com adição de cortisol



Fonte: Autoria própria

Para a análise da amostra de saliva artificial com adição de cortisol foi retirado uma alíquota de  $5,0 \mu\text{L}$  da solução de saliva com adição de cortisol e colocado diretamente sobre o papel, após isso, foi adicionado  $15,0 \mu\text{L}$  de metanol como solução eluente.

## 4.2 Espectrometria de Massas

Com um equipamento de espectro de massas modelo LCQ FLEET da *Thermo Fisher Scientific* equipado com um analisador de massas do tipo Ion Trap de baixa resolução. AS condições experimentais do analisador foram: temperatura do tubo capilar de  $275 \text{ }^\circ\text{C}$ , tensão de  $50 \text{ V}$  no capilar e de  $100 \text{ V}$  no tube lens. A faixa de massas analisadas foi de  $100\text{-}800 \text{ m/z}$ .

A fonte de ionização *paper spray* consiste em um conector do tipo jacaré ligado a uma fonte de  $+5,0 \text{ kV}$  (detecção no modo positivo). Um pedaço de papel cromatográfico, de formato triangular e com  $1,0 \text{ cm}$  de lado, cortado manualmente, foi preso pelo conector jacaré, sendo este utilizado como amostrador. A extremidade do papel foi posicionada a  $0,5 \text{ cm}$  da entrada do espectrômetro de massas. A figura abaixo mostra o equipamento utilizado para as análises espectroscópicas.

Figura 9. Espectrômetro de massas

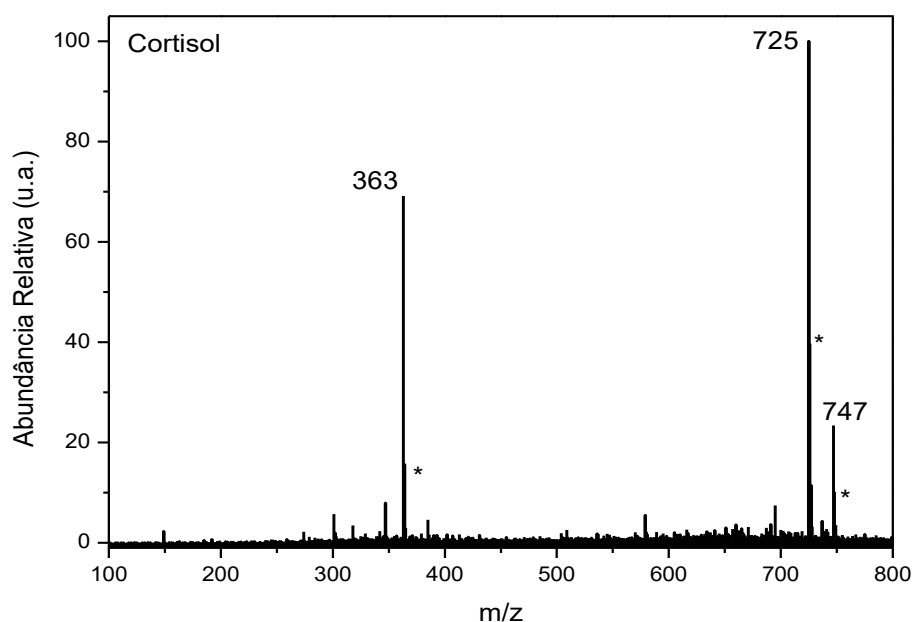


Fonte: Autoria própria

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O espectro de massas PS(+) para a amostra de cortisol é apresentado na figura 10. Nesta figura o sinal em 363 m/z representa a molécula de cortisol, massa molecular igual a  $M = 362$  u.m.a., após interação com um átomo de hidrogênio (massa molecular  $H = 1$  u.m.a.). Assim denota-se, para este pico,  $[M + H]^+ = 363$  m/z. O pico mais abundante é devido a interação de duas moléculas de cortisol com um hidrogênio,  $[2M + H]^+ = 725$  m/z, e o terceiro pico representa um aduto de sódio com duas moléculas de cortisol  $[2M + Na]^+ = 747$  m/z, uma vez que a massa molecular no  $Na = 23$  u.m.a.

Figura 10. Espectro de massas do Cortisol.



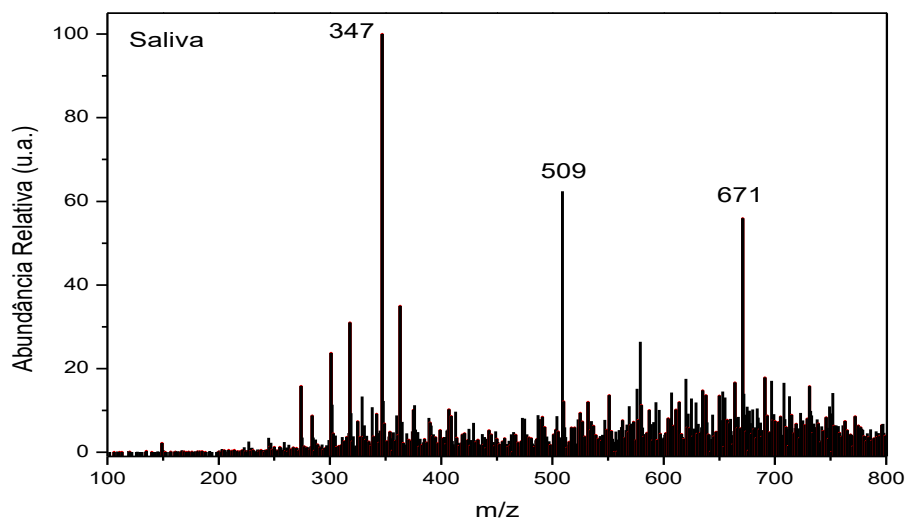
Fonte: Autoria própria

Na figura 10 também é possível verificar a presença dos picos referentes aos isótopos dos íons mais abundantes, destacados por asterisco (\*), na faixa de massas analisada. Deste modo, pode-se concluir que o preparo de amostras em conjunto com as condições experimentais propostas neste trabalho, permitiram observar com precisão fragmentos inequívocos da molécula de cortisol. Culminando numa metodologia eficiente para determinar a presença deste analito em amostras diversas.

O espectro de massas PS(+) para a amostra de saliva artificial é mostrado na figura a seguir. Nesta figura, são destacados os três íons mais abundantes, 347, 509 e 671 m/z. Devido a maior complexidade da composição da amostra de saliva artificial, não será realizada uma atribuição dos mesmos, uma vez que nosso propósito é

conhecer o perfil de massas da saliva e, poder identificar a presença da molécula de cortisol entre o conjunto de fragmentações detectáveis.

Figura 11. Espectro de massas da saliva artificial.



Fonte: Autoria própria

Os sais  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MgCl}_2$  que fazem parte da composição da saliva artificial apresentam moléculas de água em sua rede cristalina. Quando estes sais são colocados em solução a rede cristalina se dissolve e tais moléculas de água deixam de fazer parte da constituição dos respectivos sais. Desta forma, a massa detectada para estes compostos seria a massa dos íons individuais, a saber:  $\text{Ca}^{2+}$  (MM = 40 u.m.a.),  $\text{Cl}^-$  (MM = 35,5 u.m.a) e  $\text{Mg}^{2+}$  (MM = 24 u.m.a.), estando todas elas abaixo do ponto de corte de 100 m/z realizado nas análises deste estudo. Discussão semelhante pode ser realizada para os sais  $\text{KCl}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , cujas massas dos íons individuais também são menores que 100 m/z. A tabela 1 resume a dissociação dos sais que constituem a saliva artificial e suas respectivas massas detectáveis.

Tabela 1. Dissociação dos sais presentes na saliva artificial.

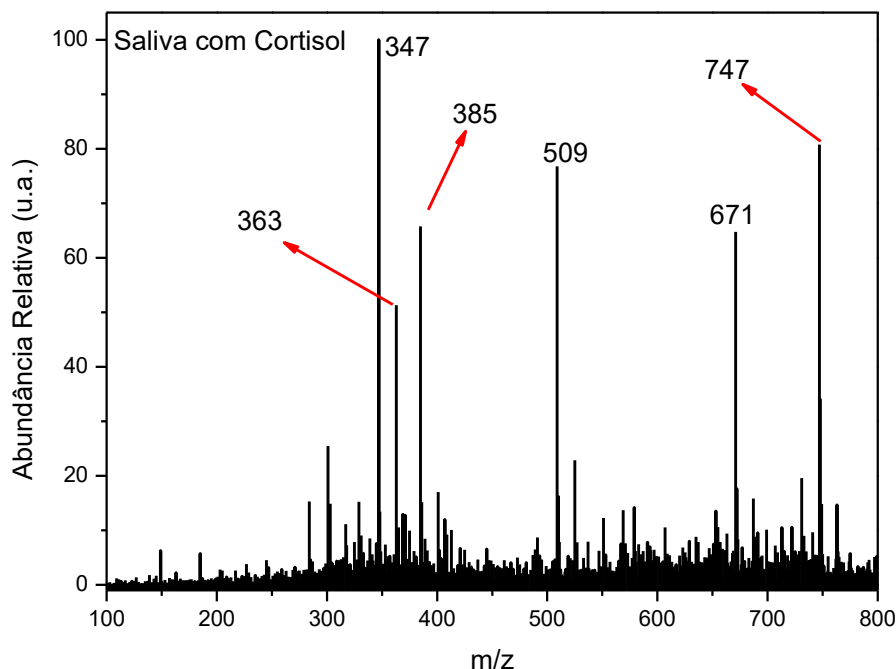
Composto	Íon	MM (u.m.a)	m/z
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{Ca}^{2+}$	40	20
	2 $\text{Cl}^-$	35,5	35,5
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{Mg}^{2+}$	24	12
	2 $\text{Cl}^-$	35,5	35,5
$\text{KCl}$	$\text{K}^+$	39	39
	$\text{Cl}^-$	35,5	35,5
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2 $\text{K}^+$	39	39
	$\text{HPO}_4^{2-}$	96	48
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$\text{K}^+$	39	39
	$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	97	97

Fonte: Autoria própria.

O composto metilparabeno ( $C_8H_8O_3 = 152$  u.m.a.) apresenta massa dentro da faixa analisada, todavia é pouco ionizável, sendo de difícil detecção. A enzima alfa-amilase tem peso molecular da ordem de dezenas de kDa e a carboximetilcelulose de sódio é um polímero de massa molar variável, ambos podendo ser fragmentados e detectáveis na faixa de massas analisada, todavia, tais fragmentações são de complexa interpretação sendo necessária uma análise de massas de cada composto individualmente. Nosso propósito é distinguir o espectro de massas de uma amostra de saliva artificial sem cortisol de uma com adição de cortisol. Isso será realizado por comparação dos dois espectros.

A seguir, na figura 12, é mostrado o espectro de massas para a amostra de saliva artificial com adição de cortisol. Nesta figura, pode-se ver os íons pertencentes a matriz de saliva artificial, pela presença dos fragmentos de 347, 509 e 671 m/z e dos fragmentos característicos da molécula de cortisol, de 363, 385 e 747 m/z, destacados pelas setas em vermelho, com atribuição do aduto de sódio  $[M + Na]^+ = 385$  m/z, além dos outros supracitados na análise da figura 10.

Figura 12. Espectro de massas da saliva artificial com adição de cortisol.



Legenda: Concentração utilizada de Cortisol em saliva artificial: 3.62  $\mu$ g.L-1.

Fonte: Autoria própria

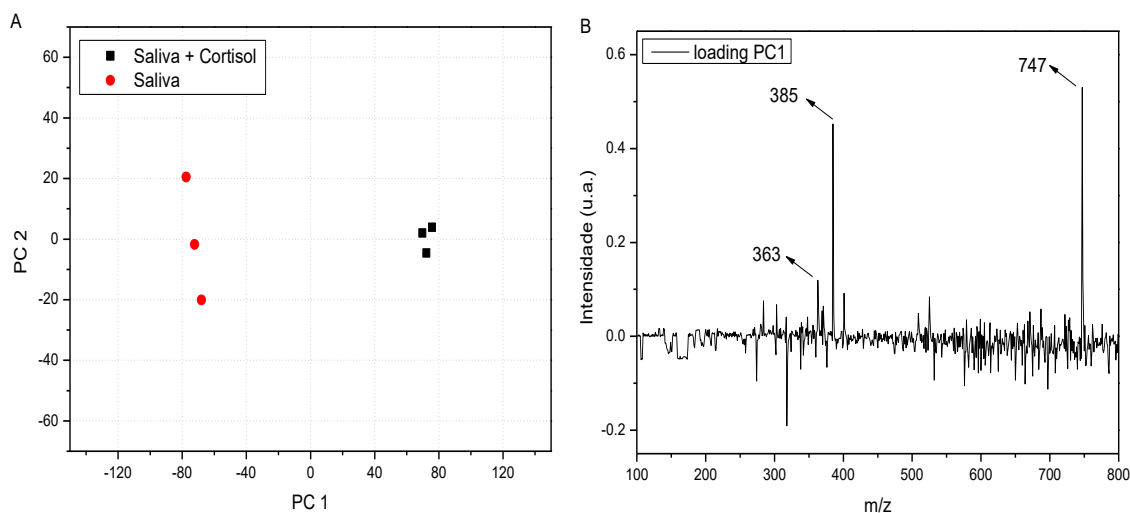
Em uma análise pela técnica de espectrometria de massas não ocorre, como numa análise cromatográfica, a coeluição de compostos, nem mesmo a sobreposição de bandas, como numa análise espectroscópica. A espectrometria de massas é a

técnica de análises de maior seletividade entre todas as técnicas analíticas. Tal característica a promove como análise inequívoca. A maior ou menor seletividade entre os diferentes analisadores de massas depende da resolução do analisador, podendo ser de baixa resolução, como o utilizado neste trabalho, apresentando precisão da ordem da unidade de Daltons, até um analisador de alta precisão, como nas configurações quadrupolo acoplado a tempo de voo, chegando a milésimos de uma unidade de Daltons.

A sensibilidade dependerá da concentração do composto e de sua capacidade de ionização e de fragmentação. Concentrações típicas de análise são da ordem de ppm ou ppb, podendo variar muito dependendo do composto alvo e da matriz no qual se encontra. Neste estudo não foi explorado um experimento objetivando determinar o limite de detecção e quantificação do cortisol salivar por OS-MS. O que demonstrou-se aqui é que a molécula de cortisol apresentou-se como um composto com grande potencial para ser monitorado pela técnica de PS-MS e que, além disso, sua detecção pode ser realizada em meio a matriz composta pelos constituintes presentes na saliva artificial, que simulam uma análise de cortisol salivar em uma amostra real, podendo assim ser aplicado a estudos de diferentes fins e sem preparo de amostra.

A seguir, figura 13, é mostrado o resultado de uma Análise de Componentes Principais (PCA). O objetivo desta análise é verificar se métodos não-supervisionados de análise multivariada são capazes de identificar, e agrupar, amostras de saliva em função da concentração de cortisol presente nas amostras. Para isso uma matriz de dados contendo espectros de massas de amostras de saliva artificial com e sem adição de cortisol foi utilizada. Os espectros foram obtidos a partir de três análises de amostras de saliva artificial sem adição de cortisol e três análises de amostras de saliva com cortisol na concentração de 3,62  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Após a obtenção dos espectros a análise PCA seguiu com a matriz de dados centrada na média.

Figura 13. Análise de componentes principais



Fonte: Autoria própria

A figura 13A mostra o gráfico de scores de PCA com variância explicada  $R^2$  igual a 95,3 (PC1) e 2,6 (PC2). Nesta figura estão destacados os dois agrupamentos formados, separados ao longo da primeira componente principal (PC1). A esquerda estão localizadas as amostras de saliva sem adição de cortisol e a direita as amostras de saliva com adição de cortisol. A dispersão ao longo da segunda componente principal (PC2) juntamente com o percentual de variância explicada, sugere uma pequena perturbação dos dados devido a variações da técnica experimental utilizada. Ou seja, pode-se observar a formação de dois grupos de amostras, separados ao longo da primeira componente principal da análise de componentes principais.

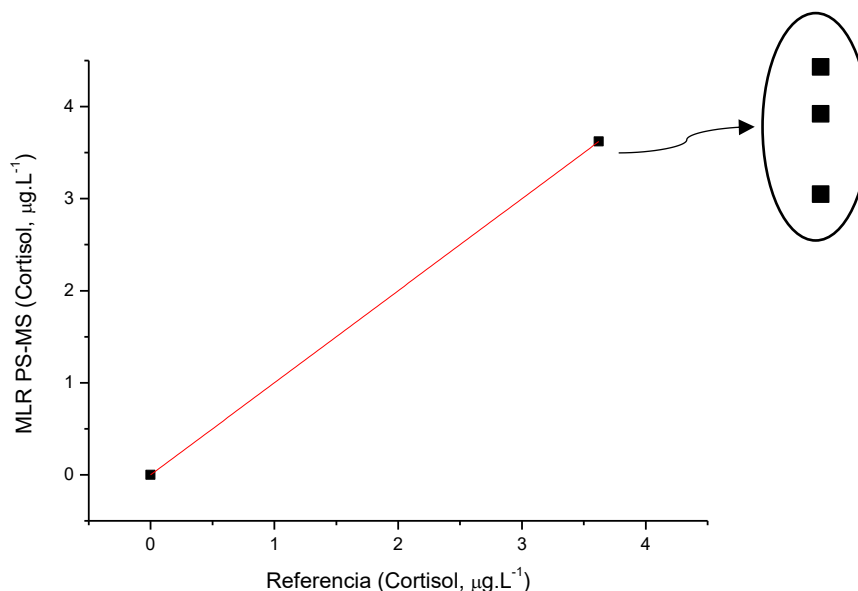
Os grupos de amostras com e sem cortisol separados ao longo da horizontal são explicados com a análise do gráfico de loadings da primeira componente principal, mostrado na figura 13B. A análise do gráfico de loadings destaca duas as razões massa carga de 363, 385 e 747 m/z como picos mais significativas para explicar a separação dos grupos evidenciado na PCA. Esses compostos correspondem a um hidrogênio com uma molécula de cortisol (363 m/z), um aduto de sódio com cortisol (385 m/z) e um aduto de sódio com duas moléculas de cortisol (747 m/z), ou seja, razões massa carga características da molécula de cortisol.

Além disso, como os loadings destacados são positivos, pode-se dizer também que as amostras de saliva localizadas a direita, no gráfico de scores, possuem valores de abundância mais elevados nesses picos. Tal análise corrobora com a utilização da PCA para uma análise qualitativa dos níveis de cortisol em amostras de saliva pois valores elevados de abundância, para os picos

correspondentes a molécula de cortisol, correspondem a uma maior concentração de cortisol nas amostras. Logo, podemos inferir que amostras mais à direita no gráfico de scores possuem concentrações mais elevadas de cortisol assim como amostras localizadas a esquerda possuem menores concentrações de cortisol.

Uma vez que a PCA mostra evidências que o monitoramento de espectros massas pela técnica *paper spray* podem ser utilizados para análises qualitativas dos níveis de cortisol salivar, foi avaliado a resposta da linearidade de valores de abundância destes três picos supracitados característicos da molécula de cortisol. Para isso, foi ajustada uma regressão linear múltipla (MLR) com as abundancias em 363, 385 e 747 m/z para as mesmas amostras utilizadas na análise de componentes principais. A figura 14 mostra o gráfico de correlação para os valores de concentração obtidos pela regressão múltipla comparados com os valores de concentração preparados em laboratório.

Figura 14. Determinação da concentração de cortisol salivar por regressão múltipla



Fonte: Autoria própria

Devido a não possibilidade de realizar um conjunto representativo de amostras, contemplando uma ampla faixa de concentrações de cortisol em amostras de saliva artificial, o ajuste mostrado na figura 14 ( $R^2 = 0,99$ ) obtido a partir da análise de seis amostras divididas em dois níveis de concentração é apresentado apenas como evidência que os valores de abundância obtidos por PS-MS estão correlacionados com a concentração de cortisol presente na amostra.

Ou seja, maiores abundâncias relativas de íons associados a molécula de cortisol efetivamente podem ser interpretadas como uma maior concentração de cortisol na amostra analisada. Na fig. 14 é mostrado em destaque uma aplicação do gráfico, mostrando que a dispersão dos pontos é mínima, uma vez que estes quase se sobrepõem. O ajuste acima foi obtido com seis pontos, três no nível zero, sem adição de cortisol, e três na concentração de  $3,62 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Evidentemente um modelo de calibração deve ser preparado em mais níveis de diluições, todavia, por hora, os resultados aqui apresentados sugerem que a técnica de espectrometria de massas com ionização por *paper spray* apresenta potencial quantitativo para determinar a concentração de cortisol salivar.

## 6 CONCLUSÕES

O perfil de fragmentação da molécula de cortisol foi obtido pela técnica de espectrometria de massas com ionização por *paper spray*. Os íons 363, 385, 725 e 747 m/z foram identificados e atribuídos, permitindo o reconhecimento da presença do cortisol em meio a uma amostra de saliva artificial.

A técnica PS-MS mostrou-se eficiente e promissora para a determinação de cortisol salivar sem a utilização de qualquer etapa de preparo de amostras. Partindo de um volume de apenas 5,0 µL de amostra, colocado diretamente sobre o amostrador do equipamento, foi possível obter a identificação pela análise do espectro de massas num tempo de aproximadamente 45 segundos.

A análise de componentes principais evidenciou que a espectrometria de massas com ionização por *paper spray* pode ser utilizada para avaliação qualitativa dos níveis de cortisol salivar. A análise dos loadings sugeriram três razões massa carga como candidatos a marcadores para quantificação da concentração de cortisol em amostras de saliva.

Finalmente, o conjunto de explicações e observações apresentadas nesta dissertação podem ser utilizados para elaboração de métodos de análise em biofluidos com um mínimo, ou nenhum, preparo de amostras. Ressaltando a característica de análise inequívoca, distinta da seletividade da espectrometria de massas, além disso podendo ser utilizada concomitantemente com métodos de análise multivariada que permitem aferir qualitativamente e quantitativamente a respeito da concentração de analitos de interesse presentes nas amostras analisadas.

## REFERÊNCIAS

- B.; WANG, H.; HUANG, G.; OUYANG, Z. **Faraday Discuss.** Analysis of caffeine and other components in energy drinks using paper-spray mass spectrometry v. 149, n. 23, p. 247-55, mai. 2011.
- CROTTI, ANT. E. M.; VESSECCHILL, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Quím. Nova.** São Paulo, v. 29, n. 2, p., mar-abr. 2006.
- DENG, J.; YANG, Y. Chemical fingerprint analysis for quality assessment and control of Bansha herbal tea using paper spray mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta.** v. 785, n. 12, p. 82-90. 2013.
- DIAZ-ARNOLD, A, MAREK, C.; VESSECCHILL, R.; LOPES, J. L. The impact of saliva on patient care: A literature review; **The Journal of Prosthetic Dentistry.** v. 337, n. 12, p. 21-9, set. 2012.
- ENTRINGER, S. Impact of stress and stress physiology during pregnancy on child metabolic function and obesity risk. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 16, p.320-327, 2013.
- ESPY, R. D.; MANICKE, N. E.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. **Analyst.** v. 137, n. 12, p. 2344-350, set. 2012.
- EVARD, H.; KRUIVE, A.; LOHMUS, R.; LEITO, I. Paper spray ionization mass spectrometry – Study of a method for fast-screening analysis of pesticides in fruits and vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis.** v. 41, n. 2, p. 221-25. Mai. 2015.
- HARRIS, D. C; CHARLES, A. R. **Análise Química Quantitativa.** Editora LTC, 12<sup>a</sup> Edição, São Paulo, 2015.
- HOHWU, L.; HENRIKSEN, T. B; GRØNBORG, T. K. Maternal salivary cortisol levels during pregnancy are positively associated with overweight children. **Psychoneuroendocrinology.** v. 13, n. 52, p. 143-52, mai. 2015.
- ENTRINGER, S. Impact of stress and stress physiology during pregnancy on child metabolic function and obesity risk. 16: 320–327. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 2013.
- EVARD, H.; KRUIVE, A.; LOHMUS, R.; LEITO, I. Paper spray ionization mass spectrometry - Study of a method for fast-screening analysis of pesticides in fruits and vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis.** v. 41, n. 2, p. 221-25. mai. 2015.
- FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE C. M.; Mass Spectrom. **Rev.** v. 9, n. 2, p. 30-7, set. 1990.
- GARBELLOTO, G. I.; REIS, F. J.; FEOLI, A. M<sup>a</sup>. P.; PIOVESAN, C. H.; GUSTAVO, A. S.; OLIVEIRA, M. S.; MACAGNAN, F. E.; FERREIRA, C. A. S.; BAUER, M. E.; WIETZYCOSKI, C. R. Associação do cortisol salivar com os componentes da síndrome metabólica. **ABCD, arq. bras. cir. dig.** São Paulo, v. 31, n. 1, p., jun. 2018

- GATTI, R.; ANTONELLE, G. PREARO, P.; SPINELLA, P. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. **Clin Biochem.** v. 42, p. 1205-217, 2009.
- GUO, Q.; GAO, L.; ZHAI, Y.; XU, W. Recent developments of miniature ion trap mass spectrometers. **Chinese Chemical Letters.** v. 12, n. 12, p. 1.170-81, mai. 2017, 2018.
- GUO, T.; ZHANG, Z.; YANNELL, K. E.; DONG, Y.; COOKS, G. R. Paper spray ionization mass spectrometry for rapid quantification of illegal dyes in beverages. **Analytical Methods.** 9. 6273-6279. 2017.
- HARRIS, D. C.; CHARLES, A. L. **Análise Química Quantitativa.** Editora LTC, 12<sup>a</sup> Edição, São Paulo, 2015.
- HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications,** 7<sup>a</sup> Edição, England, 2014.
- HOFFMANN, W. D.; JACKSON, G.P., Forensic Mass Spectrometry. **Annu. Rev. Anal. Chem.** v. 12, n. 21, p. 31-45, set. 2015.
- HOHWU, L.; HENRIKSEN, T. B; GRONBORG, T. K. Maternal salivary cortisol levels during pregnancy are positively associated with overweight children. **Psychoneuroendocrinology.** v. 13, n. 52, p. 143-52, mai. 2015.
- JURUENA, M. F.; CLEARE, A. J.; PARIANTE, C. M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. **Rev. Bras. Psiquiatr.** São Paulo, v. 26, n. 3, p. 23-30, set. 2004.
- LIU, J.; WANG, H.; MANICKE, N. E.; LIN, J. M.; COOKS, R. G.; OUYANG Z. Development , Characterization , and Application of Paper Spray Ionization. **Anal. Chem.** v. 82, n. 6, p. 2463–471, 2010.
- LUZ NETO, L. M.; VASCONCELOS, F. M<sup>a</sup>. N.; SILVA, J. E.; PINTO, T. C. C.; SOUGEA, E. B. Diferenças nas concentrações de cortisol em adolescentes com transtornos alimentares: uma análise sistemática.
- MACEDO, W. L. R; BANERJEE, R.; MACHADO, A. K. S.; OLIVEIRA, L. D. Influência hormonal do excesso de carboidratos refinados e do meio ambiente no avanço da obesidade. **Revista Brasileira Interdisciplinar de Saúde.** Brasília, v. 1, n. 1, p.19-25, set. 2019.
- MACIELA, L. I. L.; CARVALHO, T, C.; PEREIRA, I.; VAZ, B. G. Determinação de designer drugs em saliva por Paper Spray Mass Spectrometry. **Quim. Nova.** São Paulo, v. 42, n. 6, p. 676-82, mai. 2019.
- MANICKE, N. E.; NEIL, P. A. R.; OUYANG, S. Z.; COOKS, R. G.; **J. Am. Soc. Mass Spectrom.** v. 22, n. 12, p. 1501-520, mai. 2011.
- MELMED, S.; POLONSKY, K. S.; LARSEN, P. R. Williams textbook of endocrinology. **Saunders:** Elsevier Inc. v. 12, n. 2, p. 479-544, set. 2011.
- MILLER, R.; PLESSOW, F.; RAUH, M.; GRÖSCHL, M.; KIRSCHBAUM, C. Comparison of salivary cortisol as measured by different immunoassays and tandem mass spectrometry. **Psiconeuroendocrinology.** v. 21, n. 2, p. 50-7, mai. 2013.
- PAREDES, S.; RIBEIRO, L. Cortisol: the villain in metabolic syndrome? **Rev Assoc**

**Med Bras.** v. 60, n. 1, p. 80-92, set. 2014.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia.** Cengage Learning. São Paulo. 2010.

RAFF, H. Update on late-night salivary cortisol for the diagnosis of Cushing's syndrome: methodological considerations. **Endocrine.** v. 44, n. 12, p. 346-51, set. 2013.

REIGOTA, C. P. **Stress e doença alérgica:** Artigo de revisão. 2016. 51 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Área Científica de Imunologia Clínica, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.

ROCHA, T. P.; SILVA, C. S.; MATOS, M. S.; CORREA, F. B.; BURLA, R. S. Anatomofisiologia do estresse e o processo de adoecimento. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos.** Campos dos Goytacazes (RJ), v. 13, n. 2, p.31-37, 21 dez. 2018.

SCHWAB, M. N.; EBERLIN, M. N.; NIKITA, S. A.; ASTRI, T. O. Mass spectrometry made easy: The quest for simplicity, **Drug Test. Anal.** v. 5, n. 12, p. 137-44, set. 2013.

SILVA, M. P.; CHIBEBE JUNIOR, J.; JORJÃO, A. L.; MACHADO, A. K. S.; OLIVEIRA, L. D.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, ANT. O. Influence of artificial saliva in biofilm formation of *Candida Albicans* in vitro. **Braz Oral Res**, v. 26, n. 1, p. 24-8, mai. 2012.

SINGH, O.; MITTAL, N.; NIKITA, S. A.; ASTRI, T. O. How to manage xerostomia in prosthodontics???. **Dental Journal of Advance Studies.** p. 144-151, mai. 2013.

SHI, R.Z.; EL GIERARI, M.; MANICKE, N. E.; FAIX, J. D. Rapid measurement of tacrolimus in whole blood by paper spray-tandem. **Clinica Chimica Acta.** v. 441, n. 21, p. 99–104. 2015.

SNEHA, M.; DULAY, M. T.; ZARE, R. Z. Introducing mass spectrometry to first-year undergraduates Analysis of caffeine and other components in energy drinks using paper- spray mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry.** v. 418, n. 54, p.156-161, set. 2017.

SYED, S. N.; HAMMAMI, MM. A Simple Ultrapformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Measurement of Cortisol Level in Human Saliva Syed. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 1-8, mai. 2019.

SUGAWARA, E. K. Emprego da cromatografia líquida de alta eficiência na determinação de cortisol sérico em substituição à técnica de radioimunoensaio. **Jornal Bras. Patol. Med. Lab.** Rio de Janeiro, v. 44, n. 5, p. 337-42, mai. 2008.

YANG, Q; WANG, H; MAAS, J D; CHAPPELL, W J; MANICKE, N E; COOKS, R G; OUYANG, Z. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry.** v. 312, p. 201–07, 2012.

TAVERNA, D.; DI DONNA, L.; BARTELLA, L.; NAPOLI, A.; SINDONA, G.; MAZOTTI, F. Fast analysis of caffeine in beverages and drugs by paper spray tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 408. 3783-3787.

2016.

TEODORO, J. A. R.; PEREIRA, H. V.; SENA, M. M.; PICCIN, E.; ZACCA, J. J.; AUGUSTI, R. Paper spray mass spectrometry and chemometric tools for a fast and reliable identification of counterfeit blended Scottish whiskies. **Food Chemistry**. v. 237, n. 21, p. 1058-064, ago. 2017.

THERRIEN, F.; DRAPEAU, V.; LALONDE, J.; LUPIEN, S.; BEAULIEU, S.; DORÉ, J. Cortisol response to the Trier Social Stress Test in obese and reduced obese individuals. **Biol Psychol**. v. 84, n. 12, p. 325-29, set. 2010.

TURPEINEN, U.; HÄMÄLÄINEN, E. Determination of cortisol in serum, saliva and urine. **Best Prac Res Clin Endocrinol Metab**. v. 27, p. 795-801, mai. 2013.

VIEIRA, G. H.; NAKAMURA, O. H.; CARVALHO, V. M. Determination of cortisol and cortisone in human saliva by a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. **Arq Bras Endocrinol Metab**. Rio de Janeiro, v. 58, n. 8, p. 842-48, set. 2014.

VOGESER, M.; AUERNHAMMER, C. Measurement of late-night salivary cortisol with an automated immunoassay system. v. 44, n. 12, p. 1441–1445, 2006.

WANG, H.; LIU, J.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry. **Angewandte Chemie**. v. 122, n. 5, p. 889–92, 2010.

WILEY, W. C.; MCLAREN, I. H. Interpretation of Mass Spectra. **Rev. Sci. Instrum**. v. 26, n. 12, p. 1150-171, set. 1955.

WU, A. L.; DILL, L. S.; EBERLIN, R. G. COOKS, D. R. Ifa, Mass spectrometry imaging under ambient conditions. **Mass Spectrom Rev**. v. 32, n. 3, p. 218-43, mai. 2013.

ZHANG, G.; UEERHEIDE, B. M.; WALDEMARSON, S.; MYUNG, S.; MOLLOY, K.; ERIKSSON, J.; CHAIT, B. T.; NEUBERT, T. A.; FENYÖ, D. Protein Quantitation Using Mass Spectrometry. **Methods Mol Biol**. v. 673, n. 12, p. 211-22, set. 2010.