



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

Natália Zardo

**SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS COMO FASE EXTRATORA
NA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE MEMBRANA MICROPOROSA DE FIBRA
OCA PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS EM AMOSTRAS DE CHÁ**

Florianópolis

2024

Natália Zardo

**SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS COMO FASE EXTRATORA
NA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE MEMBRANA MICROPOROSA DE FIBRA
OCA PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS EM AMOSTRAS DE CHÁ**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek
Coorientadora: Msc. Amanda Vitória Santos

Florianópolis

2024

Zardo, Natália

Solventes eutéticos profundos como fase extratora na extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de chá / Natália Zardo ; orientador, Eduardo Carasek, coorientadora, Amanda Vitória Santos, 2024.

64 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Graduação em Química - Bacharelado, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

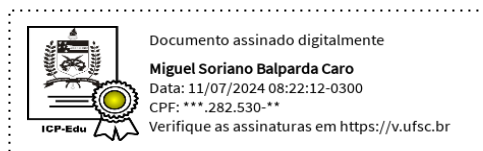
1. Química - Bacharelado. 2. HPAs. 3. DES. 4. Preparo de amostras. 5. Química Verde. I. Carasek, Eduardo. II. Santos, Amanda Vitória. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Química - Bacharelado. IV. Título.

Natália Zardo

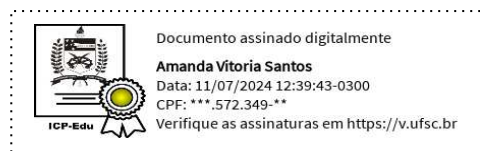
**SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS COMO FASE EXTRATORA
NA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE MEMBRANA MICROPOROSA DE FIBRA OCA
PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM
AMOSTRAS DE CHÁ**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de
Química Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso de Química.

Florianópolis, 27 de junho de 2024.

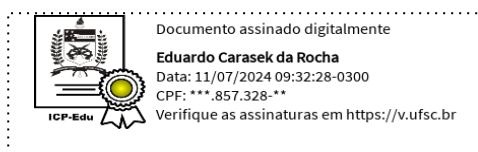


Coordenação do Curso

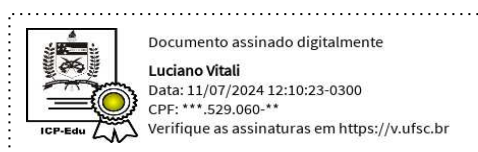


Msc. Amanda Vitória Santos
Coorientadora

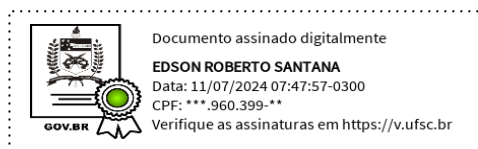
Banca examinadora



Prof. Dr. Eduardo Carasek
Orientador



Prof. Dr. Luciano Vitali
Universidade Federal de Santa Catarina

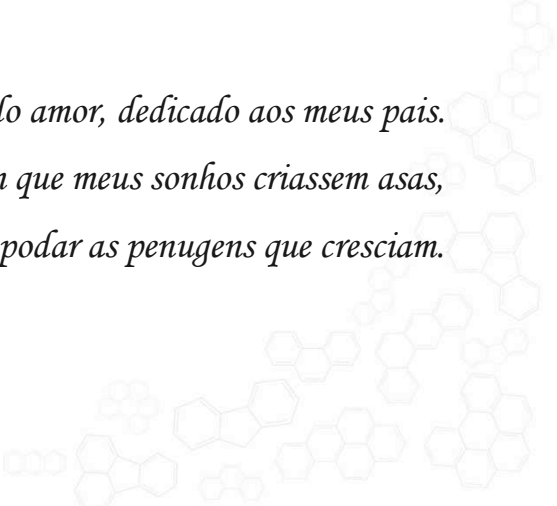


Prof. Dr. Edson Roberto Santana
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2024.



*Este trabalho é, com todo amor, dedicado aos meus pais.
Eternamente serei grata por permitirem que meus sonhos criassem asas,
ao invés de podar as penugens que cresciam.*



AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos àqueles que fizeram parte da minha jornada.

Em primeiro lugar aos meus pais, Ilene e Vilson. Testemunhar a determinação de vocês pela família, sempre provendo tudo e apoiando minhas escolhas, priorizando o que me faria feliz no futuro, me deu forças para acreditar em mim mesma e enfrentar cada obstáculo que encontrei pelo caminho. Vocês seguem sendo minha maior inspiração, e tudo que alcancei, e ainda alcançarei, é fruto do apoio incondicional que me forneceram. Espero poder encarar a vida com a mesma dedicação inabalável que vejo em vocês. Agradeço também por cuidarem da Mel, minha amada companheirinha dos últimos 17 anos. Aos meus melhores amigos nessa vida, minha eterna gratidão.

Ai miei nonne Maria e Olga, che sempre vegliano su di me, mantenendomi nelle loro preghiere; sappiate che voi siete sempre anche nelle mie preghiere. Al mio amato nonno Zardo, per avermi sempre fatto sentire il bambino più amato del mondo, rendendo la mia vita più leggera. Al mio nonno Antônio (*in memoriam*), so che, da un luogo migliore, continua a zelare su di noi. Vi amo tutti.

Ao Rômulo, Haroldo e a Karine, químicos incríveis que me presentaram com o propósito que persegui nos últimos anos. Rômulo, obrigado pela oportunidade de participar de um projeto tão motivador como o que trabalhamos, guardo com carinho as memórias dos seus ensinamentos e da sua perseverança. Haroldo, foi fácil ser inspirada por ti, já que sempre foi evidente o gosto que tens pelo que leciona, obrigada pelos ensinamentos. Karine, minha querida companheira de tantas xícaras de chá e café, dificilmente eu conseguiria, em palavras, descrever o apreço que tenho por ti e quanto aprendi contigo; graças a você busco encarar a vida com leveza, afinal, nada na vida deve ser temido apenas compreendido.

Agradeço também a Geisa, que me incentivou a acreditar na minha capacidade e apostar na UFSC. E aos demais professores, servidores e amigos do tempo de IFC, sem vocês a pessoa que sou hoje, e este trabalho, jamais existiriam. Sigo daqui, desejando a felicidade de cada um e sentindo saudades diariamente. Obrigada a todos por me fornecerem um norte a seguir.

Ao meu professor orientador Eduardo Carasek. Agradeço, não apenas a oportunidade de ser sua orientanda, mas também a leveza e liberdade que permitiste que eu tivesse para me desenvolver. Obrigada pelo incentivo constante, pela confiança, e pelos valiosos ensinamentos que compartilhaste. Ser sua aluna foi um privilégio imensurável.

As minhas queridas coorientadoras, Camila e Amanda. Não há palavras suficientes para expressar minha gratidão por vocês. Confiança foi algo que não me faltou, vocês permitiram que eu levasse meu tempo para processar, explorar e crescer com nossos trabalhos. Além de conhecimento acadêmico, vocês me presentearam com coisas inestimáveis, especialmente nos momentos difíceis em que eu mais precisei. Levarei sua amizade e lições com carinho pelo resto da vida.

A Francielle, que me ensina cada dia a ser mais firme nos meus propósitos; ao Ricardo, sempre disposto a melhorar o dia e nos inspirar a sermos tão corteses quanto ele; ao Morés, um sábio amigo que me inspira. E aos demais colegas do CroMaas: Gabrieli, Luísa, João, Elizandra, Luciane, Cristian e Augusto, por todo apoio e pelas conversas descontraídas do dia a dia.

A todos os professores que, mostrando amor pelo que fazem, me inspiraram durante a graduação. E pelo apoio dos amigos que estiveram presentes nesta jornada comigo: Amanda, Duane, Diogo, Helena, Vinicius, Thiem, Sthephany, Chantal, Guilherme e Brenda. Em especial à Cinthia e Kaliany, pessoas incríveis que merecem o melhor desse mundo. Estendo meus agradecimentos aos demais colegas de graduação, todos me ensinaram valiosas lições.

A Universidade Federal de Santa Catarina, pela estrutura e oportunidade de usufruir de um ensino gratuito e de qualidade.

Ao PIBIC/CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida para realização deste trabalho.

RESUMO

Este estudo relata o emprego de solventes eutéticos profundos (DES) como fase extratora na técnica de extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE), para a determinação simultânea de 13 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de chá, com posterior detecção e quantificação por HPLC-DAD. A presença destes compostos, provenientes em grande parte da combustão incompleta de matéria orgânica, em amostras alimentícias, é objeto de debate, pois representam um perigo potencial à saúde humana. Diante disso, seriam prudentes esforços a fim de monitorar e minimizar sua contribuição dietética. Devido a sua frequente ocorrência em nível traço, torna-se essencial uma etapa de preparo de amostras para pré-concentrar os analitos e reduzir a concentração de compostos interferentes presentes na matriz do chá. O preparo de amostras pela técnica HF-MMLLE foi associado a um sistema de 96 poços de amostragem, proporcionando a redução do tempo total de preparo para 0,88 minutos por amostra. Esta configuração de uma técnica de microextração, associada ao DES e ao sistema de 96 poços de amostragem, assegura que a metodologia proposta esteja em consonância com as principais diretrizes da Química Analítica Verde. As condições experimentais para o preparo das amostras foram otimizadas através de abordagens univariadas e multivariadas, sendo as condições ideais compostas por timol:cânfora (1:1) como fase extratora, com tempos de extração e dessorção de 45 e 30 minutos, respectivamente, utilizando MeOH como solvente de dessorção. Os parâmetros analíticos de mérito foram determinados com sucesso, com LOQs e LODs de 10 e 3,03 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para os 13 analitos, e coeficientes de determinação superiores a 0,9908. Além disso, os elevados valores de F, obtidos para as curvas de calibração dos analitos, corroboram com a significância da regressão, reforçando a adequação do modelo de regressão aos dados avaliados. A precisão intradia e interdia variou de 1,55 a 17,72% ($n = 3$) e 9,85 a 22,63% ($n = 9$), respectivamente, enquanto as recuperações relativas dos analitos variaram de 84,63 a 120,28%, com a maioria dos analitos dentro dos intervalos estabelecidos pelas diretrizes da AOAC. Em conclusão, a metodologia proposta mostrou-se adequada para a determinação simultânea dos 13 HPAs em amostras de chá.

Palavras-chave: HPAs; DES; preparo de amostras; química verde.

ABSTRACT

This study reports the use of deep eutectic solvents (DES) as the extractant phase in the hollow fiber microporous membrane liquid-liquid extraction technique (HF-MMLLE), for the simultaneous determination of 13 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tea samples, with subsequent detection and quantification by HPLC-DAD. The presence of these compounds, originating largely from the incomplete combustion of organic matter, in food samples is a subject of debate, as they represent a potential danger to human health. In light of this, efforts to monitor and minimize their dietary contribution would be prudent. Due to their frequent occurrence at trace levels, a sample preparation step becomes essential to pre-concentrate the analytes and reduce the concentration of interfering compounds present in the tea matrix. Sample preparation by the HF-MMLLE technique was associated with a 96-well sampling system, reducing the total preparation time to 0,88 minutes per sample. This configuration of a microextraction technique, associated with DES and the 96-well sampling system, ensures that the proposed methodology is in accordance with the main guidelines of Green Analytical Chemistry. The experimental conditions for sample preparation were optimized through univariate and multivariate approaches, with the ideal conditions composed of thymol:camphor (1:1) as the extractant phase, with extraction and desorption times of 45 and 30 minutes, respectively, using MeOH as the desorption solvent. The analytical parameters of merit were successfully determined, with LOQs and LODs of 10 and 3,03 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively, for the 13 analytes, and determination coefficients exceeding 0.9908. Furthermore, the high F values obtained for the analyte calibration curves corroborate the significance of the regression, and, together with the residuals, reinforce the adequacy of the regression model to the evaluated data. The intra-day and inter-day precision ranged from 1,55 to 17,72% ($n = 3$) and 9.85 to 22,63% ($n = 9$), respectively, while the relative recoveries of the analytes varied from 84,63 to 120,28%, with the majority of analytes within the ranges established by AOAC guidelines. In conclusion, the proposed methodology proved to be suitable for the simultaneous determination of the 13 PAHs in tea samples.

Keywords: PAHs; DES; sample preparation; green chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da ativação enzimática do BaP.	22
Figura 2. Média da concentração de 8 HPAs em amostras alimentícias.	24
Figura 3. Esquema dos modos de extração da HF-LPME.....	26
Figura 4. Etapas e otimizações do preparo de amostras pela técnica HF-MMLLE.	28
Figura 5. Membranas posicionadas no sistema de 96 poços de amostragem.	34
Figura 6. Eficiência de extração de HPAs em chá dos 4 DES pré-selecionados.	39
Figura 7. Estruturas do timol:cânfora, componentes dos demais DES e interações..	40
Figura 8. Superfície de resposta obtida na seleção do solvente de dessorção.....	41
Figura 9. Estruturas dos solventes de dessorção e interação do MeOH com o DES.	41
Figura 10. Otimização do tempo de dessorção.	42
Figura 11. Otimização do tempo de extração.....	44
Figura 12. Metodologia otimizada do preparo de amostras por HF-MMLLE/DES.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estruturas e propriedades físico-químicas a 25°C dos HPAs avaliados. ...	20
Tabela 2. Classificação de carcinogenicidade dos HPAs avaliados neste trabalho...	21
Tabela 3. Monitoramento dos analitos por HPLC-DAD.....	32
Tabela 4. Programa de eluição por gradiente para os HPAs avaliados.....	32
Tabela 5. Frações molares e aparência dos DES avaliados.	33
Tabela 6. Planejamento multivariado da otimização do solvente de dessorção.	36
Tabela 7. Dados obtidos para os parâmetros analíticos de mérito.....	45
Tabela 8. Dados obtidos para precisão e exatidão do método.....	46
Tabela 9. Efeito matriz nas amostras avaliadas.	47
Tabela 10. Concentração de HPAs em infusões de chás comerciais.....	48
Tabela 11. Comparativo da concentração de HPAs em chás de hortelã.....	48
Tabela 12. Comparação do método proposto com diferentes metodologias de determinação de HPAs em chás.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcEt	Acetato de Etila
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de Variância
ANT	Antraceno
ATSDR	Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (do inglês <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>)
BaA	Benzo(a)antraceno (do inglês <i>benzo(a)anthracene</i>)
BaP	Benzo(a)pireno (do inglês <i>benzo(a)pyrene</i>)
BbFA	Benzo(b)fluoranteno (do inglês <i>benzo(b)fluoranthene</i>)
BkFA	Benzo(k)fluoranteno (do inglês <i>benzo(k)fluoranthene</i>)
CHR	Criseno (do inglês <i>chrysene</i>)
CYP450	Sistema Enzimático do Citocromo P450 (do inglês <i>Cytochrome P-450 enzyme system</i>)
C4	Ácido butírico
C6	Ácido hexanóico
C8	Ácido octanóico
C10	Ácido decanóico
C12	Ácido dodecanóico
DBahA	Dibenzo(a,h)antraceno (do inglês <i>dibenzo(a,h)anthracene</i>)
DES	Solvente eutético profundo (do inglês <i>Deep Eutetic Solvent</i>)
DPR	Desvio padrão relativo
EPA	Agência de Proteção Ambiental (do inglês <i>Environmental Protection Agency</i>)

EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (do inglês <i>European Food Safety Authority</i>)
FA	Fluoranteno (do inglês <i>fluoranthene</i>)
FLD	Detector de fluorescência (do inglês <i>fluorescence detector</i>)
FLR	Fluoreno (do inglês <i>fluorene</i>)
HBA	Aceptor de ligação de hidrogênio (do inglês <i>hydrogen bond acceptor</i>)
HBD	Doador de ligação de hidrogênio (do inglês <i>hydrogen bond donor</i>)
HF – LPME	Microextração em fase líquida suportada com membrana oca (do inglês <i>hollow fiber liquid-phase microextraction</i>)
HF – MMLE	Extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca (do inglês <i>hollow fiber microporous membrane liquid-liquid extraction</i>)
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (do inglês <i>high performance liquid chromatography with diode array detection</i>)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês <i>liquid-liquid extraction</i>)
LOD	Limite de detecção (do inglês <i>limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>limit of quantification</i>)
LPME	Microextração em fase líquida (do inglês <i>liquid phase micro extraction</i>)
MeOH	Metanol
NPH	Naftaleno (do inglês <i>naphthalene</i>)
PAHs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (do inglês <i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i>)

PHE	Fenantreno (do inglês <i>phenanthrene</i>)
PY	Pireno (do inglês <i>pyrene</i>)
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>solid phase extraction</i>)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1.	HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	18
2.1.1.	Origem, Aplicações e Propriedades Físico-Químicas	18
2.1.2.	Aspectos Toxicológicos e Implicações na Saúde Humana	21
2.1.3.	Contaminação Alimentar e Regulamentações	23
2.2.	PREPARO DE AMOSTRAS	25
2.2.1.	Microextração em fase líquida suportada com membrana oca	26
2.2.2.	Extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca	27
2.2.3.	Solventes eutéticos profundos	28
3.	OBJETIVOS.....	30
3.1.	OBJETIVO GERAL	30
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4.	METODOLOGIA.....	31
4.1.	MATERIAIS E REAGENTES	31
4.2.	INSTRUMENTAÇÃO	31
4.3.	SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS	32
4.3.1.	Preparo dos Solventes Eutéticos Profundos	32
4.3.2.	Otimização do DES como Fase Extratora	33
4.3.3.	Preparo das Membranas Microporosas	34
4.4.	OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DA HF-MMLLE	34
4.4.1.	Otimizações da Etapa de Dessorção.....	35
4.4.2.	Otimização da Etapa de Extração.....	36

4.5.	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO	36
4.6.	AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ	37
4.7.	APLICAÇÃO DA METODOLOGIA	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1.	OTIMIZAÇÃO DO DES COMO FASE EXTRATORA	39
5.2.	OTIMIZAÇÕES DOS PARÂMETROS DA HF-MMLLE	40
5.2.1.	Otimização da Etapa de Dessorção	40
5.2.2.	Otimização da Etapa de Extração	43
5.3.	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO	45
5.4.	AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ	47
5.5.	APLICAÇÃO DA METODOLOGIA	48
5.6.	COMPARAÇÃO ENTRE METODOLOGIAS	49
6.	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS INDIVIDUAIS DOS 8 DES	59
	APÊNDICE B – DADOS DOS TESTES ESTATÍSTICOS UTILIZADOS PARA SELEÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR	61
	APÊNDICE C – DADOS DOS TESTES ESTATÍSTICOS UTILIZADOS PARA SELEÇÃO DO TEMPO DE DESSORÇÃO	62
	APÊNDICE D – DADOS DOS TESTES ESTATÍSTICOS UTILIZADOS PARA A SELEÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO	63
	APÊNDICE E – DADOS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ	64

1. INTRODUÇÃO

À medida que as atividades humanas se intensificam, cada vez mais poluentes são liberados no meio ambiente, dentre eles estão os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os HPAs são compostos amplamente relatados como potenciais agentes mutagênicos e carcinogênicos, além de serem classificados como poluentes orgânicos persistentes.

A ingestão de alimentos contaminados com HPAs, é uma das principais vias de exposição da população a estes contaminantes. A presença de HPAs em bebidas como chás tem sido amplamente relatada, com as potenciais fontes de contaminação sendo o cultivo das plantas em solos contaminados, o transporte inadequado e o processo de secagem das folhas de chá. Os HPAs estão presentes nessas amostras em baixas concentrações, contudo, devido ao seu risco à saúde, há um crescente interesse em seu monitoramento.

Em geral, matrizes complexas como a do chá são incompatíveis com introdução direta nos instrumentos de análise, tornando indispensável uma etapa de preparo de amostras para pré-concentrar os analitos e reduzir os interferentes. A adoção de metodologias alinhadas as diretrizes da Química Analítica Verde tem se destacado, fomentando o emprego de técnicas de microextração, frente a técnicas clássicas que, apesar de consolidadas, apresentam desvantagens quanto a geração de resíduos e frequência analítica.

A extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE), é uma destas técnicas, que pode ser acoplada a um sistema de 96 poços de amostragem, possibilitando o aumento da frequência analítica. A principal vantagem associada a HF-MMLLE é sua alta eficiência de extração, mesmo em matrizes complexas, viabilizando a quantificação dos analitos em baixas concentrações. Uma estratégia a ser explorada nesta técnica é o uso de solventes eutéticos profundos (DES), cujas propriedades adaptáveis os tornam apropriados para extração de compostos como os HPAs.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo ampliar a aplicação da HF-MMLLE, em conjunto ao sistema de 96 poços de amostragem, empregando DES como fase extratora, para a determinação simultânea de 13 HPAs em amostras de chá, com detecção e quantificação por HPLC-DAD.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

2.1.1. Origem, Aplicações e Propriedades Físico-Químicas

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem uma classe de compostos ubíquos, formados por anéis aromáticos condensados, que são subdivididos em compostos de baixo peso molecular (até 3 anéis aromáticos), e alto peso molecular (4, ou mais, anéis aromáticos)^{1,2}. Estes compostos podem advir de fontes pirogênicas, petrogênicas e biológicas³, sendo que, sua origem ocorre principalmente pela combustão incompleta de matéria orgânica, em grande parte proveniente de atividades antropogênicas, mas também de processos naturais, como erupções vulcânicas¹.

Os HPAs podem ser encontrados em uma variedade de substâncias fósseis, incluindo petróleo bruto e carvão mineral, os chamados HPAs de origem petrogênica, que, conseqüentemente, também são encontrados em seus derivados⁴. Ademais, estes compostos também são sintetizados por certas plantas e bactérias, ou gerados durante processos específicos de degradação da matéria vegetal³.

Na formação dos HPAs, a temperatura é um importante fator incidente sobre a diversidade dos compostos formados, devido à dificuldade associada à geração de HPAs de alto peso molecular, atribuível a limitações cinéticas relacionadas a adição de sucessivos anéis aromáticos⁵. Convém salientar que, os HPAs também podem ser formados pela exposição de matéria orgânica a temperaturas não tão elevadas, em casos especiais como dos óleos brutos, que contêm HPAs formados ao longo de milhões de anos a temperaturas de aproximadamente 100 a 150°C³.

O peso molecular é determinante na pressão de vapor, afetando a dispersão ambiental destes compostos, no entanto, é a estrutura dos HPAs que confere a eles uma menor solubilidade em água^{1,6}. Em geral, os HPAs são mais hidrofóbicos à medida que o peso molecular aumenta, favorecendo sua adsorção sobre a matéria orgânica, seja ela particulada na atmosfera, no solo, ou em sedimentos presentes na água⁷. Por este motivo, quando formados, os HPAs de alto peso molecular têm maior tendência de se associar a partículas, apresentando uma toxicidade mais elevada em comparação aos de baixo peso molecular^{5,8}.

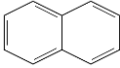
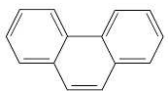
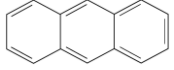
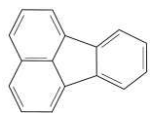
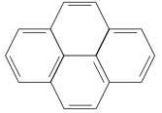
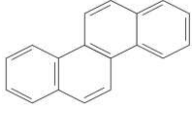
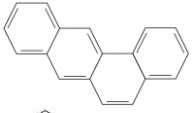
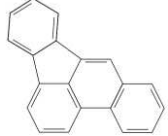
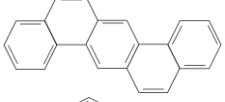
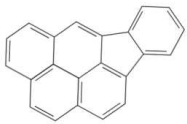
A estrutura planar dos anéis aromáticos condensados, com extensa deslocalização de elétrons π , e amplas conjugações, é responsável pelas propriedades de fluorescência dos HPAs⁹. Por conta dessa característica, o principal uso comercial de alguns HPAs, como fluoranteno e pireno, é na produção de pigmentos fluorescentes. Os HPAs também são utilizados como intermediários na fabricação de produtos farmacêuticos e agrícolas³.

A degradação ambiental dos HPAs pode variar de algumas horas até anos, conforme o HPA e o ambiente contaminado. De um modo geral, costumam ser estáveis com relação a hidrólise e outras vias de degradação mais convencionais, pela estabilidade de suas estruturas^{1,4,10}. O processo de degradação mais relevante dos HPAs, presentes no ar e na água, é a fotólise indireta sob a influência de radicais hidroxila, processo em que a interação da luz solar com outras substâncias presentes no ambiente resulta na formação de radicais altamente reativos, como os $\text{OH}\cdot$, agentes responsáveis pela degradação das moléculas dos HPAs¹¹. Em água pura, a degradação pode ocorrer em poucas horas, mas este intervalo aumenta drasticamente quando a partição sedimento/água é levada em conta. Além disso, os HPAs podem ser biotransformados por fungos e bactérias, mas a capacidade destes organismos de biodegradar HPAs diminui consideravelmente à medida que o peso molecular do HPA aumenta^{1,4}.

Dezesseis HPAs são considerados particularmente importantes no monitoramento de poluentes orgânicos persistentes, por representarem uma ameaça significativa à saúde humana e ao meio ambiente¹². Dentre eles estão os 13 HPAs abordados neste trabalho: naftaleno (NPH), fluoreno (FLR), fenantreno (PHE), antraceno (ANT), fluoranteno (FA), pireno (PY), criseno (CHR), benzo(a)antraceno (BaA), benzo(b)fluoranteno (BbFA), benzo(a)pireno (BaP), dibenzo(ah)antraceno (DBahA), benzo(ghi)perileno (BghiP) e indeno(1,2,3-cd)pireno (IP).

As estruturas químicas dos HPAs, e as propriedades físico-químicas responsáveis pelos efeitos associados a contaminação por estes compostos, são apresentadas na Tabela 1. Uma dessas propriedades é o coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$), que reflete uma tendência dos HPAs a respeito de possíveis processos cumulativos no meio ambiente, e em termos de bioacumulação. Quanto maior o valor do $\log K_{ow}$, maior a lipofilicidade do composto, tendo assim, uma maior capacidade de acumulação, e se tratando de organismos vivos, uma elevada toxicidade⁷.

Tabela 1. Estruturas e propriedades físico-químicas a 25°C dos HPAs avaliados.

Analito	Estrutura	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Pressão de vapor (Pa)	Solubilidade (mg L ⁻¹)	Log Kow
NPH		128,17	11,33	31,0	3,30
FLR		166,22	8,0.10 ⁻²	1,69	4,18
PHE		178,23	1,61.10 ⁻²	1,10	4,46
ANT		178,23	8,0.10 ⁻²	4,34.10 ⁻²	4,45
FA		202,25	1,23.10 ⁻³	0,20 – 0,26	5,16
PY		202,25	6,0.10 ⁻⁴	0,135	4,88
CHR		228,30	8,30.10 ⁻⁷	2,0.10 ⁻³	5,73
BaA		228,30	2,8.10 ⁻⁵	9,4.10 ⁻³	5,76
BbFA		252,30	6,67.10 ⁻⁵	1,5.10 ⁻³	5,78
BaP		252,30	7,32.10 ⁻⁷	1,62.10 ⁻³	6,13
DBahA		278,30	1,27.10 ⁻⁷	2,50.10 ⁻³	6,50
BghiP		276,30	1,33.10 ⁻⁸	2,60.10 ⁻⁴	6,63
IP		276,30	1,67.10 ⁻⁸	1,90.10 ⁻⁴	6,70

Fonte: Autoria própria (2024). Dados PubChem(2024).

Conforme o peso molecular dos HPAs aumenta, a pressão de vapor diminui, assim, os HPAs de baixo peso molecular estão mais dispersos na atmosfera, enquanto os de alto peso molecular tendem a se associar a partículas. Além disso, à medida que o peso molecular aumenta, a solubilidade em água diminui, corroborando com a análise do log Kow que indica que uma menor solubilidade em água favorece a acumulação dessas substâncias, por exemplo, em tecidos adiposos no organismo¹³.

2.1.2. Aspectos Toxicológicos e Implicações na Saúde Humana

Os HPAs têm sido amplamente investigados devido a evidências de sua ação carcinogênica e mutagênica, além de causarem efeitos adversos como problemas cardiovasculares, neurológicos, imunotóxicos, problemas sistêmicos como anemias, convulsões, dermatites, dentre outros. Além disso, alguns sintomas causados pela exposição a HPAs, como náuseas, taquicardia e tremores, podem ser facilmente confundidos com outras patologias^{7,14}.

Quanto a sua carcinogenicidade para seres humanos, estes compostos são classificados em cinco grupos¹⁵. A Tabela 2 apresenta a classificação referente aos 13 compostos avaliados neste trabalho. O grupo 1 diz respeito aos HPAs comprovadamente carcinogênicos. O grupo 2 é subdividido em 2A e 2B, sendo que os HPAs classificados como 2A possuem evidências limitadas de carcinogenicidade em humanos, mas evidências suficientes de carcinogenicidade em animais de laboratório; já os HPAs classificados como 2B, tem evidências limitadas de carcinogenicidade tanto em humanos, quanto em animais de laboratório. Os HPAs que não apresentam evidências suficientes para uma avaliação conclusiva em termos de carcinogenicidade pertencem ao grupo 3. Por fim, os HPAs com evidências suficientes de não carcinogenicidade em humanos e animais de laboratório compõem o grupo 4.

Tabela 2. Classificação de carcinogenicidade dos HPAs avaliados neste trabalho.

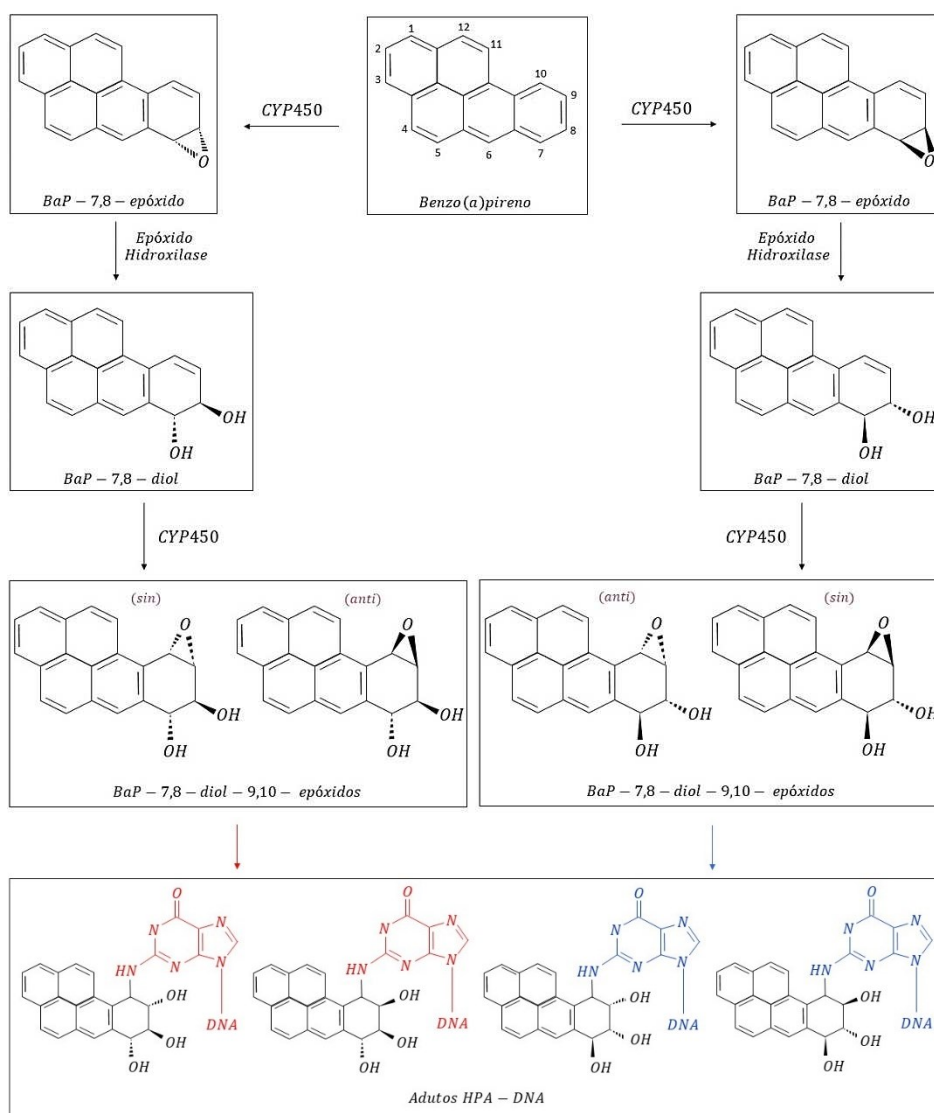
Classificação de carcinogenicidade	Analitos
Grupo 1	BaP
Grupo 2A	CHR, BbFA, DBahA e IP
Grupo 2B	FA
Grupo 3	NPH, FLR, PHE, ANT, PY, BaA e BghiP

Fonte: Autoria própria (2024). Dados IARC (2010)¹⁵.

Embora a maioria dos HPAs não sejam por si só carcinógenos, os produtos de sua metabolização apresentam uma maior solubilidade e demonstram serem mais tóxicos que as moléculas iniciais^{5,12,16}. Portanto, os HPAs também são descritos como co-carcinógenos, sendo capazes de interferir em processos biológicos que eliminam ou inativam estes contaminantes no organismo, e até mesmo promovendo a atividade de outros carcinógenos⁵.

Esse potencial co-carcinógeno dos HPAs está, portanto, intrinsicamente relacionado à sua ativação enzimática¹⁷. O mecanismo mais amplamente relatado envolve a oxidação dos anéis aromáticos mediada por enzimas da família CYP450^{3,12,17,18}. A Figura 1 ilustra o processo de bioativação do BaP, amplamente relatado pela literatura por ser comprovadamente carcinogênico¹⁵.

Figura 1. Esquema da ativação enzimática do BaP.



Fonte: Adaptado de Garcia¹⁷ e Höner¹⁸.

Os diol-epóxidos altamente reativos formados neste processo possuem alta afinidade para se ligarem ao grupo 2-amino da guanina do DNA. Isso ocorre devido à presença do grupo eletrofílico epóxido, e do grupo nucleófilo amino da guanina, que está localizado em um ponto específico da hélice do DNA, sendo particularmente acessível aos diol-epóxidos, resultando na formação de adutos HPA-DNA, fundamentais na carcinogênese^{3,12,17,18}.

2.1.3. Contaminação Alimentar e Regulamentações

A exposição humana a um único HPA é rara, uma vez que esses compostos estão presentes em misturas complexas. Apesar disso, estudos epidemiológicos que utilizam HPAs individuais como marcadores de exposição a misturas de HPAs, têm obtido êxito em associar a exposição aos compostos individuais com a ocorrência de câncer em humanos, principalmente no aparelho digestivo¹⁹. Entretanto, esta abordagem é limitada quanto a relacionar problemas de saúde resultantes da exposição crônica, ou aguda, a HPAs específicos, como danos a retina, ou catarata, associados a ingestão de NPH²⁰.

Essa exposição pode ocorrer por diferentes vias, principalmente pela ingestão de alimentos contaminados, inalação e contato dérmico³. Uma exposição considerável via inalação pode ocorrer em centros urbanos altamente poluídos, mas especialmente em indivíduos praticantes do tabagismo, ou devido à inalação passiva da fumaça de cigarro. O contato dérmico geralmente tem relação com exposições ocupacionais, como de trabalhadores em pavimentações que envolvam piche de carvão^{1,8}.

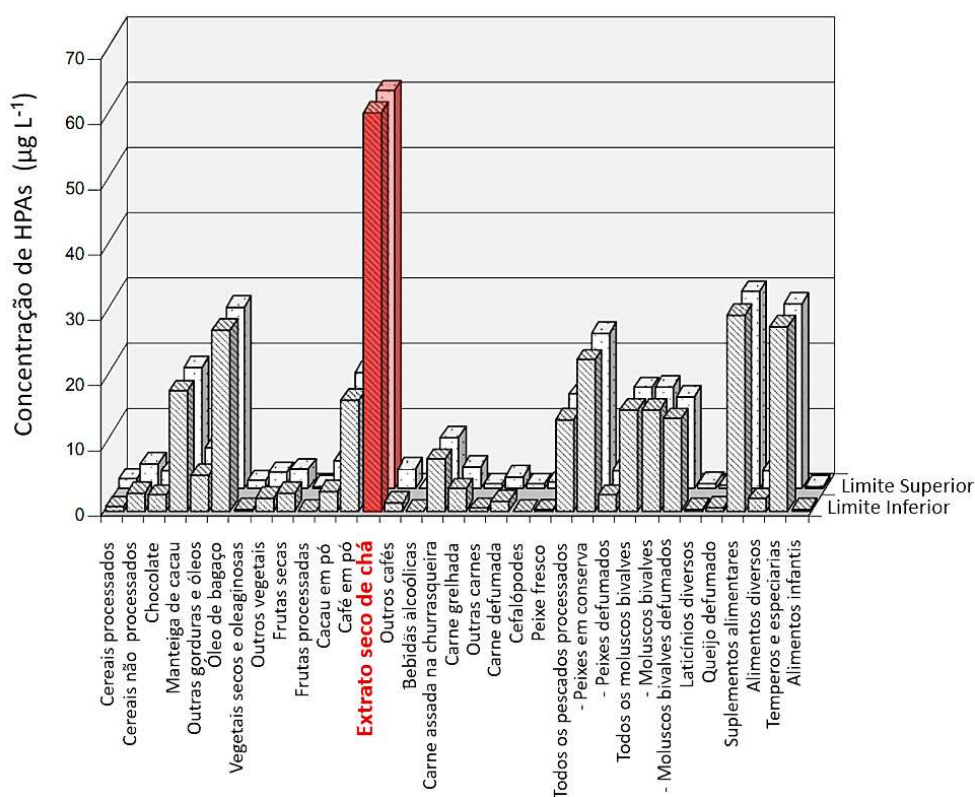
Já a ingestão de alimentos contaminados, caracteriza a principal rota de exposição humana aos HPAs^{5,14}. Essa contaminação pode ocorrer pelo cultivo em solo ou uso de água contaminados. Além disso, alimentos submetidos a processos térmicos, como os grelhados, defumados ou fritos, representam uma fonte significativa de contaminação devido ao papel da temperatura na formação dos HPAs^{14,21}.

A presença de níveis elevados de HPAs em alimentos consumidos com regularidade, como é o caso do chá, a segunda bebida não alcoólica mais consumida do mundo²², com destaque para as variedades de chá verde e chá preto, representa uma fonte relevante de exposição aos HPAs, pela elevada contaminação que costuma apresentar^{5,23}. A contaminação em chás por HPAs, provenientes de resíduos da queima de combustíveis fósseis já foi relatada²⁴, reforçando a hipótese de que o

transporte inadequado da matéria vegetal dos chás tenha relação com a contaminação, assim como os processos térmicos utilizados no preparo dessas bebidas. Neste contexto, diversos estudos^{23,25–27} tem explorado a presença de HPAs em amostras alimentares, tais como chás, por diferentes técnicas de preparo de amostras e sistemas instrumentais.

Dados da EFSA²⁸ para a concentração média de oito HPAs (BaP, CHR, BaA, BbFA, BkFA, BghiP, DBahA e IP), avaliados em 4.065 produtos alimentícios, são representados pela Figura 2, onde observa-se em destaque o extrato de chá seco. Concernente à essa categoria de extrato de chá seco, 20% das 30 amostras ultrapassaram a concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Contudo, vale ressaltar que o preparo do chá pode reduzir o nível de HPAs antes do consumo, devido a diluição⁵. Pesquisas recentes seguem demonstrando a presença de HPAs em diferentes tipos de chás, destacando que a concentração de cada HPA varia significativamente conforme o tipo de chá analisado^{29,30}.

Figura 2. Média da concentração de 8 HPAs em amostras alimentícias.



Fonte: EFSA²⁸.

As regulamentações acerca da presença dos HPAs variam entre os países. Alguns possuem regulamentações específicas para HPAs em água potável, enquanto

outros tratam de sua presença em alimentos. Além disso, muitas vezes o BaP é utilizado como marcador para a ocorrência de HPAs, tanto em água quanto em alimentos, como é o caso do Comitê Europeu Científico de Alimentos (SCF), que definiu o BaP como marcador de HPAs em alimentos¹⁹. A Comissão Europeia (EC) determina que o valor máximo tolerável de ingestão para HPAs, de modo geral, é de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ³¹. A Agência de Proteção Ambiental (EPA-EUA) estabelece que o nível máximo de BaP em água potável seja de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$; sugerindo ainda que a ingestão de 0,3 mg de ANT, 0,04 mg de FLR e PHE e 0,03 mg de PY por quilograma de massa corpórea, não cause efeitos significativos à saúde¹². Já a portaria GM/MS nº 888/2021 do Ministério da Saúde do Brasil, estabelece um valor máximo de $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ para BaP em água potável³⁴.

A variedade de abordagens concernentes a determinação e periculosidade de HPAs, evidenciam a complexidade no estabelecimento de limites de exposição^{19,33,35}. À medida que a regulamentação desses compostos recebe maior atenção, torna-se crucial estabelecer metodologias que não apenas determinem com precisão os HPAs, mas também sejam acessíveis e aplicáveis a todas as partes interessadas.

2.2. PREPARO DE AMOSTRAS

Uma análise direta, sem necessidade de um preparo de amostras, seria ideal. No entanto, em amostras como chá, o preparo é uma etapa crucial para ampliar a seletividade e sensibilidade do método, devido a incompatibilidade da matriz com a maioria dos sistemas instrumentais, e a elevada presença de interferentes^{5,36}.

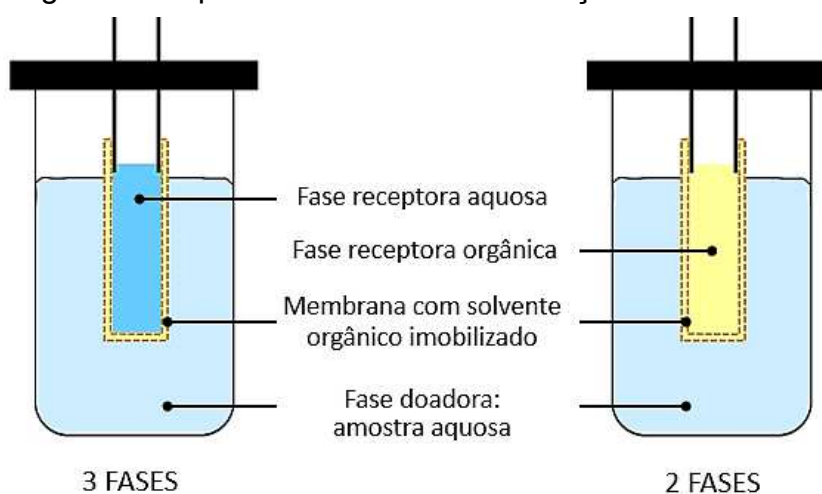
Técnicas tradicionais, como a extração em fase sólida (SPE) e extração líquido-líquido (LLE), são frequentemente descritas como metodologias oficiais de preparo de amostras. Contudo, apresentam limitações devido ao grande volume de solventes utilizados, consequentemente de resíduos, além de se tratar de técnicas laboriosas e mais propensas a erros. A miniaturização destas técnicas, surge como uma alternativa que visa simplificar os procedimentos, reduzindo tempo de análise, aumentando a frequência analítica, além de tornar as análises mais verdes através da redução do volume de solventes, de amostra e do emprego de materiais alternativos^{36,37}.

2.2.1. Microextração em fase líquida suportada com membrana oca

O advento da microextração em fase sólida, desenvolvida por Pawliszyn em 1990, marcou o início de uma nova era de técnicas miniaturizadas. A partir desse ponto, foi possível explorar outras abordagens, incluindo a adaptação do conceito de microextração para sistemas líquidos. Dentre as diferentes configurações da microextração em fase líquida (LPME), podemos destacar a microextração em fase líquida suportada com membrana oca (HF-LPME), introduzida em 1999^{38,39}.

Esta técnica é altamente eficiente na pré-concentração de analitos, se destacando por sua versatilidade. A HF-LPME utiliza fibras ocas microporosas para promover a transferência seletiva de analitos entre fases líquidas. Os modos de extração desta técnica, apresentados na Figura 3, envolvem o uso de uma fase aquosa denominada de doadora (amostra) e uma receptora (podendo ser orgânica ou aquosa), sendo que a seleção da fase receptora depende, em grande parte, da solubilidade dos analitos. A fase receptora está localizada no interior da membrana oca, denominada de lúmen. Entre as fases doadora e receptora, existe um solvente imobilizado nos poros da membrana hidrofóbica, que atua como mediador na migração dos analitos presentes na amostra para a fase receptora. Contudo, se adotou como convenção, que a denominação de fase receptora compreenda tanto o solvente nos poros da membrana, como a fase no lúmen da fibra³⁸.

Figura 3. Esquema dos modos de extração da HF-LPME.



Fonte: Adaptado de Merib e Carasek³⁸.

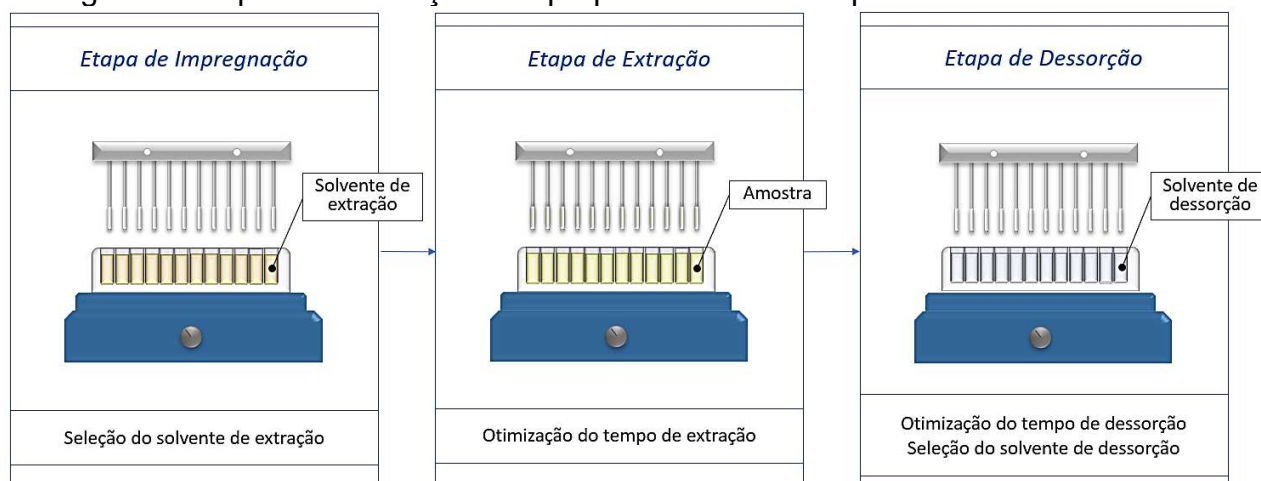
A imobilização da fase extratora possibilitada pelo uso de membranas, facilitou o processo de extração, levando ao surgimento de técnicas derivadas da HF-LPME. Nesse âmbito, a partir da HF-LPME, surgiu a proposta de utilizar apenas o solvente imobilizado nos poros da membrana hidrofóbica, formando um filme extrator, com o lúmen não preenchido dando origem a técnica de extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca^{39,40}.

2.2.2. Extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca

A técnica de extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE) é uma técnica de extração precisa, com baixo consumo de solvente orgânico, baixo custo, fácil manipulação e eliminação do efeito de memória, uma vez que as membranas não são reutilizadas^{40,41}. Sua principal vantagem sobre a HF-LPME é sua simplicidade operacional; na HF-LPME é necessário utilizar uma seringa para retirar a fase receptora do interior da membrana, enquanto na HF-MMLLE, a amostra é preparada fora da membrana, o que facilita a operação. Além disso, inicialmente essa técnica era realizada com o êmbolo de uma seringa posicionado no lúmen da membrana⁴¹, mas a fim de semi-automatizar o procedimento, as membranas podem ser posicionadas nos pinos de um sistema de 96 poços de amostragem, o que eleva a frequência analítica, uma vez que até 96 amostras podem ser processadas simultaneamente, minimizando custos e economizando tempo, além de garantir uma agitação uniforme durante o procedimento^{40,42}.

Analitos como os HPAs, devido a propriedades físico-químicas responsáveis por características em comum tanto com a membrana, quanto com o solvente extrator, podem ser extraídos pela técnica HF-MMLLE, a caracterizando como uma opção atrativa para pré-concentração destes analitos. O procedimento da HF-MMLLE compreende 3 etapas (Figura 4), sendo elas o preparo da membrana, a etapa de extração e a etapa de dessorção. Primeiramente ocorre a impregnação da membrana com o solvente extrator, seguido pela extração dos analitos da amostra e, por fim, a dessorção para remoção dos analitos da membrana, juntamente com o solvente extrator. Os parâmetros de cada etapa devem ser otimizados para melhorar a eficácia da técnica, o que compreende a seleção do solvente extrator, o tempo de extração, e o tempo e solvente de dessorção^{42,43}.

Figura 4. Etapas e otimizações do preparo de amostras pela técnica HF-MMLLE.



Fonte: Autoria própria (2024).

Nesta técnica, as propriedades da membrana microporosa, aliadas a um filme extrator de solvente, são responsáveis pela extração seletiva de compostos alvo, mesmo em matrizes complexas. A incorporação de solventes alternativos, como os solventes eutéticos profundos (DES), melhora a sustentabilidade do processo e contribui significativamente para o aumento da eficiência de extração.

2.2.3. Solventes eutéticos profundos

A seleção do solvente de extração a ser impregnado nos poros das membranas é um parâmetro crucial na HF-MMLLE, pois a interação entre o solvente e os analitos é essencial para uma maior taxa de extração. A investigação de fases extratoras alternativas no preparo de amostras, varia de acordo com a técnica de extração e o analito em questão.

Os solventes eutéticos profundos (DES) são considerados uma classe emergente de solventes verdes, que receberam maior atenção nas últimas duas décadas após um estudo de Abbott⁴⁴, que observou uma diminuição anormal do ponto de fusão da mistura na composição eutética de certos doadores de ligações de hidrogênio (HBD) e receptores de ligação de hidrogênio (HBA). Este comportamento foi observado pela primeira vez na combinação da fração molar 1:2 de cloreto de colina em pó (ponto de fusão $\approx 302\text{ }^{\circ}\text{C}$) com ureia cristalina (ponto de fusão $\approx 133\text{ }^{\circ}\text{C}$), mistura esta que resultou em um líquido à temperatura ambiente (ponto de fusão da mistura na composição eutética $\approx 12\text{ }^{\circ}\text{C}$)^{45,46}.

Os DES são muitas vezes relatados como uma classe de líquidos iônicos, pois compartilham de muitas das características, incluindo alta estabilidade térmica, baixa volatilidade, baixas pressões de vapor e polaridade ajustável. No entanto, enquanto os líquidos iônicos frequentemente apresentam um custo elevado, também costumam ser não biodegradáveis, podendo exibir elevados níveis de toxicidade; os DES, em maioria, são de menor custo, biodegradáveis, não tóxicos e de fácil preparação. Com relação a sua formação, até o momento, sabe-se que as estruturas são mantidas por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals^{45,47,48}.

Inicialmente, os DES formulados eram de natureza hidrofílica, mas a solubilidade em água limita sua aplicação para amostras aquosas, visto que estes DES se desintegram via dissolução⁴⁹. Contudo, dependendo da amostra e do meio, os DES hidrofílicos são uma alternativa promissora que seguem sendo aplicados com sucesso^{50–52}.

Os DES de natureza hidrofóbica foram relatados pela primeira vez por Osch e seus colaboradores⁵³, ao combinarem sais de amônio quaternário e ácido decanóico, formando uma mistura imiscível capaz de extrair, com alta eficiência, compostos orgânicos voláteis insolúveis em água. Devido a hidrofobicidade, estes DES mantêm sua integridade na presença de água. Esse fator, combinado com a flexibilidade em projetar e ajustar o comportamento físico-químico dos DES, devido a gama de combinações possíveis, que caracteriza uma das principais vantagens associada ao seu uso pois permite a criação de materiais com características únicas de interação e seletividade, tornam os DES hidrofóbicos ideais para emprego como fase extratora⁴⁵.

Nesse contexto, os DES têm sido objeto de estudos^{43,54–56} para a análise de compostos, e seu uso em técnicas de extração tem se mostrado promissor. A investigação de DES como fase extratora na HF-MMLLE, foi relatada por Morelli⁴³ na avaliação de contaminantes emergentes em água.

Diante disso, o presente estudo teve por finalidade ampliar a aplicação da técnica HF-MMLLE, acoplada a um sistema de 96 poços de amostragem, explorando o uso de DES como uma fase extratora alternativa, para determinação simultânea de 13 HPAs em amostras de matriz complexa, como de chá.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo visou ampliar o emprego da técnica de microextração HF-MMLLE, acoplada a um sistema de 96 poços de amostragem, a partir do uso de DES como fase extratora, para determinação de HPAs em amostras de chá por HPLC-DAD.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar a bibliografia referente aos compostos de interesse, a técnica de microextração selecionada, e a classe dos solventes de extração avaliados, para condução do estudo;
- Preparar e avaliar o desempenho de 8 DES, a fim de selecionar o mais adequado a técnica HF-MMLLE para extração de HPAs em amostras de chá;
- Realizar a otimização dos parâmetros da HF-MMLLE relacionados as etapas de extração e dessorção, o que inclui o tempo de extração, solvente de dessorção e tempo de dessorção;
- Determinar e avaliar os parâmetros analíticos de mérito, tais como limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), faixa linear de trabalho, coeficiente de determinação (R^2), assim como precisão e exatidão, avaliados por meio de análises intradia e interdia, e ensaios de recuperação relativa.
- Avaliar a significância da regressão para cada analito pelos valores de F;
- Avaliar a presença de efeito matriz;
- Aplicar a metodologia otimizada e validada em amostras de chá.

4. METODOLOGIA

4.1. MATERIAIS E REAGENTES

O padrão utilizado como solução estoque foi o mix CRM47930, que contém os 13 HPAs avaliados (NPH, FLR, PHE, ANT, FA, PY, CHR, BaA, BbFA, BaP, DBahA, BghiP e IP), em uma concentração de 20 mg L⁻¹, preparado em acetonitrila obtida da J.T. Baker (Center Valley, EUA). Foram utilizados os solventes metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e acetato de etila (AcEt), obtidos da Merck (Rio de Janeiro, BR), J.T. Baker (Center Valley, EUA) e Sigma Aldrich (St. Louis, EUA), respectivamente. A água ultrapura foi produzida, com resistividade de 18,3 MΩ cm, através de um sistema de purificação Mega Purity (Billerica, EUA).

Na produção dos DES, foram utilizados ácido dodecanóico, ácido butírico, ácido octanóico, timol, cânfora, ácido decanóico, ácido hexanóico, ácido levulínico da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A membrana oca utilizada foi de polipropileno PP300/1200 Accurel®, com diâmetro interno, espessura e tamanho do poro de 1,2 mm, 300 µm e 0,2 µm, respectivamente, obtida da Membrane (Wuppertal, Alemanha). As amostras foram preparadas a partir da infusão de chá de camomila, chá de hortelã, chá preto, chá verde e chá mate comerciais, além de chá mate industrializado e chá de hortelã *in natura*.

4.2. INSTRUMENTAÇÃO

Para alguns DES foi necessário o uso de um banho ultrassônico Modelo ALK0347101 da Dentsply Neytech (Yucaipa, EUA). Para realizar as otimizações da técnica HF-MMLLE, foi utilizado um sistema semiautomático de 96 poços de amostragem, obtido da Brüder Mannesmann Werkzeuge (Remscheid, Alemanha). Já para quantificação dos compostos de interesse, foi empregado um cromatógrafo líquido LC 20AT da Shimadzu (Kyoto, Japão), com detector de arranjo de diodos SPD-M20A, e injetor manual Rheodyne 7725i (Rohnert Park, EUA) com um loop de injeção de 20 µL. Os analitos foram monitorados em seis comprimentos de onda, sendo eles: 210, 215, 230, 254, 265 e 290 nm, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Monitoramento dos analitos por HPLC-DAD.

Analito	Comprimento de onda (nm)	Tempo de retenção (min)
NPH	215	8,90
FLR	254	11,20
PHE	254	11,80
ANT	230	12,30
FA	210	13,10
PY	230	13,80
CHR e BaA	254	14,80
BbFA	254	16,30
DBahA	265	17,30
BaP	290	17,60
BghiP	254	18,50
IP	210	19,20

Fonte: Autoria própria (2024).

A separação cromatográfica foi realizada em fase reversa e utilizou-se uma coluna ZORBAX Agilent-C18 (5,0 μm x 250 mm x 4,6 mm). Na fase móvel, foi utilizado o modo gradiente, com uma vazão de 1,0 mL min⁻¹, com os solventes ACN:H₂O ultrapura, e eluição conforme Tabela 4.

Tabela 4. Programa de eluição por gradiente para os HPAs avaliados.

Tempo (min)	% H ₂ O	% ACN
0,01	40	60
3,00	25	75
10,0	0	100
15,5	0	100
15,6	40	60
21,0	40	60

Fonte: Autoria própria (2024).

4.3. SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS

4.3.1. Preparo dos Solventes Eutéticos Profundos

Dos DES avaliados neste estudo, C12:C4, C12:C6, C12:C10, C10:Timol e Timol:Cânfora, foram preparados com base na literatura⁴³; os demais DES foram

preparados com base em estudos conduzidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa e nos reagentes disponíveis. As frações molares utilizadas no preparo dos DES estão detalhadas na Tabela 5. As massas e volumes dos reagentes foram aferidos e, em seguida, as misturas foram deixadas sob repouso por aproximadamente 2 horas, não sendo expostos a nenhum aquecimento. Alguns, a temperatura ambiente, formam uma mistura sólida homogênea, estes foram agitados em banho ultrassônico por alguns minutos antes de serem utilizados.

Tabela 5. Frações molares e aparência dos DES avaliados.

DES	HBA	HBD	Fração molar	Aspecto visual (298 K)
1		Timol	1:1	Líquido amarelo
2	C10	Cânfora	1:1	Líquido translúcido
3		C12	1:1	Sólido branco
4	Ácido Levulínico	Timol	1:1	Líquido amarelo
5	Cânfora	Timol	1:1	Líquido amarelo
6	C8	C12	1:1	Sólido branco
7	C6	C12	3:1	Líquido translúcido
8	C4	C12	3:1	Líquido translúcido

Fonte: Autoria própria (2024)

4.3.2. Otimização do DES como Fase Extratora

Para seleção do solvente extrator, em um primeiro momento foi realizado uma avaliação qualitativa individual dos DES. Para isso, amostras de 10 μL de cada DES foram diluídas em 1,0 mL de ACN, para se investigar bandas de cada solvente extrator avaliado, coincidentes com os tempos de retenção dos analitos.

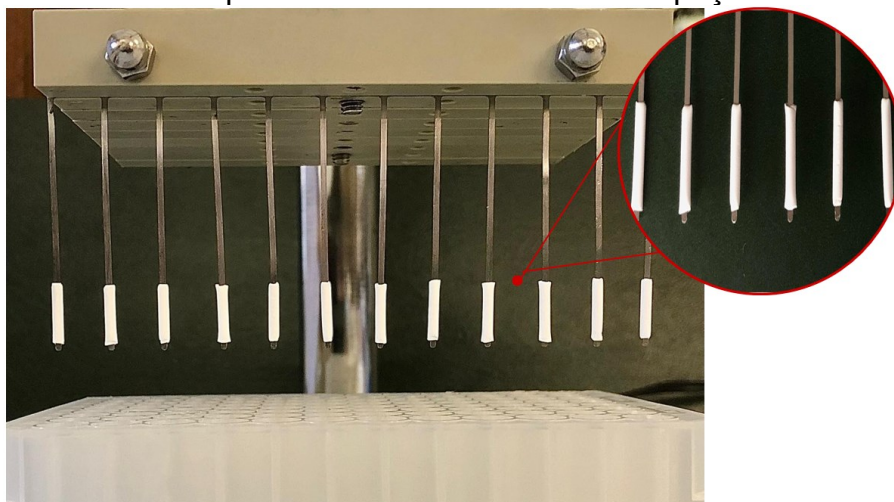
Após a identificação dos DES que apresentaram interferência, para garantir a integridade metodológica, os que demonstraram os melhores resultados na análise individual foram submetidos a uma avaliação quanto à sua eficiência na extração dos analitos em uma amostra real. Este processo foi realizado em triplicata, em uma amostra de chá de camomila fortificada em 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, utilizando 45 minutos de extração e 30 minutos de dessorção em ACN:MeOH (1:1). Além da seleção do DES, um estudo comparativo também foi empregado, nas mesmas

condições experimentais, utilizando a membrana sozinha sem solvente extrator. A seleção do DES como solvente extrator dos 13 analitos foi atestada por meio da análise de variância (ANOVA) de dois fatores com medidas repetidas, seguida pela comparação pareada realizada pelo teste de Tukey.

4.3.3. Preparo das Membranas Microporosas

O preparo das membranas utilizadas no sistema de 96 poços de amostragem seguiu um protocolo documentado na literatura⁴³. Inicialmente, as membranas foram cortadas em segmentos de 1,0 cm, limpas em ACN:MeOH (1:1) e secas à temperatura ambiente. Posteriormente, foram encaixadas no sistema de 96 poços de amostragem, de modo que todo interior da membrana esteja preenchido pelos pinos do sistema (Figura 5), para que o DES seja impregnado apenas nos poros da membrana. Por fim, as membranas são submersas e mantidas sob agitação por 10 minutos em 300 μ L de DES, colocados em cada poço de uma placa amostral de 96 poços.

Figura 5. Membranas posicionadas no sistema de 96 poços de amostragem.



Fonte: Autoria própria (2024).

4.4. OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DA HF-MMLLE

A avaliação dos parâmetros que influenciam as etapas da HF-MMLLE, foi realizada por abordagens univariadas e multivariadas, após a seleção do solvente extrator, as otimizações se iniciaram pela etapa de dessorção, para garantir a maior

recuperação possível dos analitos extraídos. Em seguida, os parâmetros de extração foram otimizados, para garantir a máxima eficiência da etapa de extração. No caso dos planejamentos multivariados, as respostas foram avaliadas pelo software Statsoft Statistica® (Hamburgo, Alemanha). Ademais, OriginPro® (Northampton, EUA) e Microsoft Excel® (Redmond, EUA) também foram utilizados.

Em virtude da estrutura química, log Kow e ausência de pKa dos HPAs, não foram avaliados parâmetros como pH e sal da amostra. O efeito salting-out, que pode ser significativo para compostos iônicos ou com grupos carregados, não é um fator relevante para HPAs, por se tratar de compostos apolares. Assim como, a ausência de hidrogênios ionizáveis nos HPAs elimina a necessidade de uma avaliação de pH.

4.4.1. Otimizações da Etapa de Dessorção

O primeiro parâmetro de dessorção otimizado foi a resposta à utilização de diferentes solventes de dessorção, sendo eles MeOH, ACN e AcEt. A seleção desses solventes foi baseada na literatura⁴³. Para tal, foi empregada a ferramenta quimiométrica simplex-centróide, um planejamento multivariado que visa avaliar a eficácia dos solventes na dessorção em sua forma pura e em misturas, com triplicata do ponto central, totalizando nove experimentos (Tabela 6).

Os experimentos foram conduzidos utilizando o solvente extrator otimizado, 1,50 mL de amostra de chá de camomila enriquecida com 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, mantida sob agitação nos poços do sistema de 96 poços de amostragem por 45 minutos, em seguida submetida a 30 minutos de dessorção. A média geométrica^a da área cromatográfica dos analitos de cada experimento foi utilizada para obter a superfície de resposta, pela qual foi selecionado o solvente de dessorção.

Um planejamento univariado, realizado em triplicata, foi implementado para otimização do tempo de dessorção. Para isso, foram utilizados o solvente extrator e de dessorção otimizados anteriormente, amostra de 1,50 mL de chá de camomila fortificada com 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, submetida a tempos de dessorção de 20, 30, 40 e 50 minutos. As respostas foram avaliadas pelo teste ANOVA de dois fatores para medidas repetidas, seguido do teste pareado de Tukey.

^a Optou-se pelo uso da média geométrica, em detrimento da média aritmética, a fim de se evitar uma eventual compensação inadequada das respostas menores.

Tabela 6. Planejamento multivariado da otimização do solvente de dessorção.

Experimento	ACN (μL)	MeOH (μL)	AcEt (μL)
1	300	0	0
2	0	300	0
3	0	0	300
4	150	150	0
5	150	0	150
6	0	150	150
7, 8 e 9	100	100	100

Fonte: Autoria própria (2024).

4.4.2. Otimização da Etapa de Extração

Procedeu-se à avaliação do tempo de extração de forma univariada, realizado em triplicata. A membrana, previamente impregnada com o solvente de extração otimizado, foi submersa em 1,50 mL de amostra de chá de camomila, fortificada em $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, por 45, 60, 75 e 90 minutos de extração. Para dessorção foram utilizados o solvente e o tempo de dessorção otimizados. As respostas foram avaliadas pelo teste ANOVA de dois fatores para medidas repetidas, seguido do teste pareado de Tukey.

4.5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

Após as otimizações da HF-MMLLE, a avaliação dos parâmetros analíticos de mérito são fundamentais para averiguar a confiabilidade do método. Para tal, foram construídas curvas de calibração, com no mínimo 5 níveis de concentração, em triplicatas, utilizando a amostra de chá de camomila fortificada com o mix de HPAs.

A partir dessas curvas, foram determinados os parâmetros analíticos de mérito, sendo eles: limite de quantificação (LOQ), definido como o primeiro ponto da curva de cada analito em se obteve uma resposta com precisão adequada ($\leq 20\%$)⁵⁷, limite de detecção (LOD), definido como LOQ dividido por 3,3⁵⁸. Também a faixa linear de trabalho, o coeficiente de determinação (R^2), bem como precisão e exatidão do método. Os valores de F obtidos para a curva de calibração de cada analito, foram calculados a partir do método dos mínimos quadrados.

A precisão do método foi demonstrada pela dispersão dos resultados, conforme diretrizes nacionais e internacionais^{57,59}, sendo avaliada sob abordagens intradia e interdia. Na precisão intradia, avaliada em triplicatas no mesmo dia (n=3), foram obtidos os desvios padrões relativos (DPR) das análises em amostra de chá de camomila fortificada com 50, 100 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito. Já para precisão interdia, o mesmo método é aplicado em triplicata, em três dias consecutivos (n=9), nas mesmas concentrações de 50, 100 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito.

A exatidão do método foi verificada conforme diretrizes^{57,59}, por meio de ensaios de recuperação, definidos como um percentual da razão entre o resultado médio de recuperação dos analitos e o valor real da concentração dos analitos adicionados a amostra. Para esta avaliação, foram utilizadas amostras de infusão de chá de hortelã e chá mate comerciais, fortificadas em três níveis de concentração, presentes na faixa linear de trabalho, sendo estes: 50, 100 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ

A avaliação do efeito matriz foi conduzida para confirmar a adequação do método de calibração utilizado, uma vez que a presença desse efeito inviabilizaria o emprego de uma estratégia de calibração externa, pois os constituintes da matriz devem ser considerados na validação do método. Com esse propósito, foram construídas curvas de calibração para cada analito em água ultrapura^b, em uma faixa de concentração de 10 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, seguindo a mesma metodologia otimizada empregada nas amostras de chá.

Os coeficientes angulares destas curvas foram comparados aos coeficientes das curvas de calibração de cada analito obtidas na avaliação dos parâmetros de mérito (chá de camomila), e das recuperações em chá mate e chá de hortelã comercial, por meio do teste t de Student e p-valor. Se confirmada uma diferença significativa entre os coeficientes angulares das curvas, comprova-se o efeito matriz.

^b Apesar dos analitos serem pouco hidrofílicos, é possível extraí-los eficientemente, da mesma forma como é realizado com as amostras aquosas de chá, devido à eficaz interação dos HPAs com a fase extratora.

4.7. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA

A metodologia otimizada foi empregada no preparo de amostras de chá mate industrializado, infusões de chá preto, chá verde, chá mate, chá de camomila e chá de hortelã, avaliadas em quadruplicatas. Com fins comparativos, também foram preparadas amostras por infusão de folhas de hortelã de procedência domiciliar. Os chás comerciais foram preparados através da infusão em 250 mL de água potável fervente, por aproximadamente três minutos. Todas as infusões de chás comerciais mencionadas referem-se à infusão de matéria vegetal seca, comercializada em porções para preparo individual.

No caso do chá de hortelã *in natura*, a amostra foi preparada pela imersão de 15 g de folhas frescas de hortelã em 250 mL de água potável fervente, por aproximadamente três minutos. Essa massa de folhas de hortelã representa uma proporção aproximada do material vegetal utilizado para obtenção de cerca de 3,0 g de hortelã seco, normalmente o conteúdo presente em uma porção individual de chá comercial para infusão.

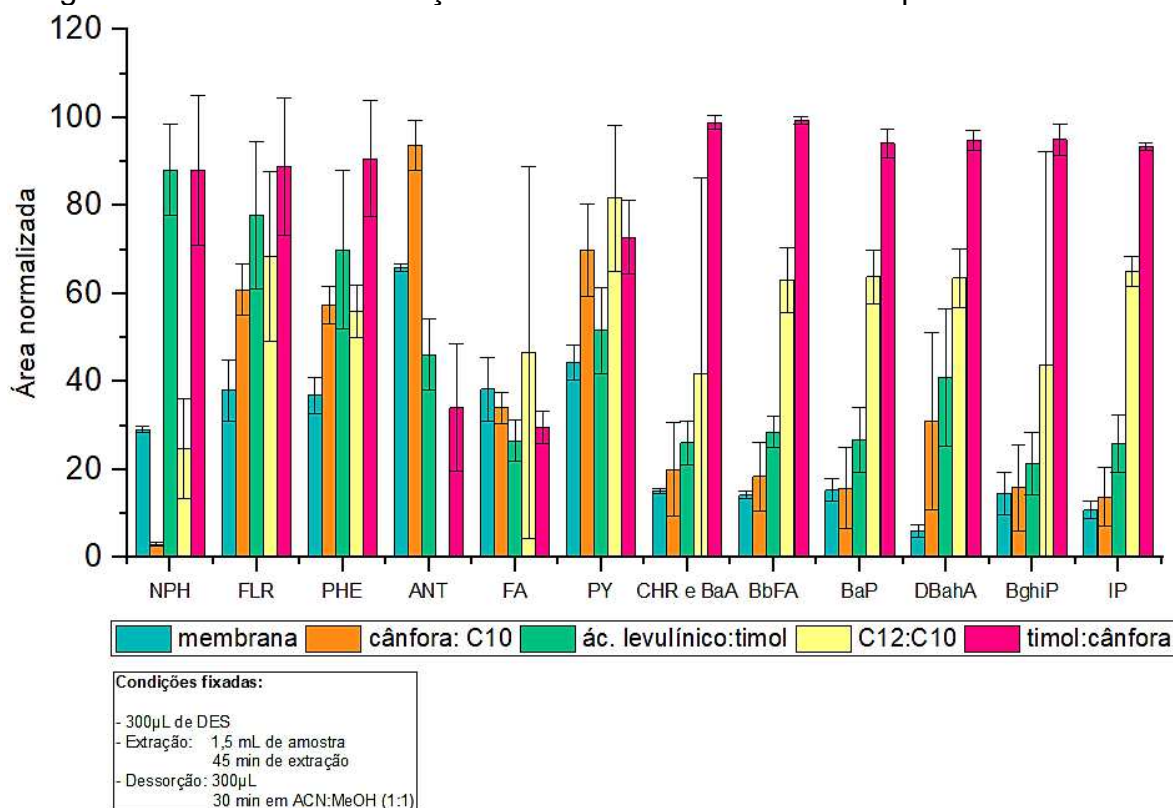
Vale ressaltar que, devido a viscosidade dos DES, estes podem ficar retidos nas colunas ou canais dos equipamentos, causando aumento de pressão e presença de contaminação nas quantificações de outras amostras. Assim, em todas as etapas deste estudo, das otimizações à aplicação em amostras, a pressão do equipamento foi monitorada e, quando necessário, um protocolo de limpeza foi realizado. Para limpeza foi utilizado a própria eluição por gradiente utilizada na determinação dos HPAs ([Tabela 4](#)).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OTIMIZAÇÃO DO DES COMO FASE EXTRATORA

Pela avaliação do sinal individual dos oito DES preparados ([Figura A-1](#)), observou-se que ácido levulínico:timol, timol:cânfora, cânfora:C10 e C12:C10 apresentaram apenas alguns ruídos e poucos sinais quantificáveis nos tempos de retenção dos analitos. Em seguida, os quatro DES que demonstraram melhores resultados na análise individual, foram avaliados quanto a sua eficiência de extração dos analitos em amostra fortificada de chá de camomila. A Figura 6 apresenta uma comparação visual do desempenho de cada DES, e a eficiência de extração da membrana sem o DES. Devido as características hidrofóbicas da membrana, ela é capaz de extrair os analitos da amostra mesmo sem um solvente extrator. No entanto, é possível observar uma melhora na resposta quando o DES é utilizado, que supera o emprego da membrana sozinha.

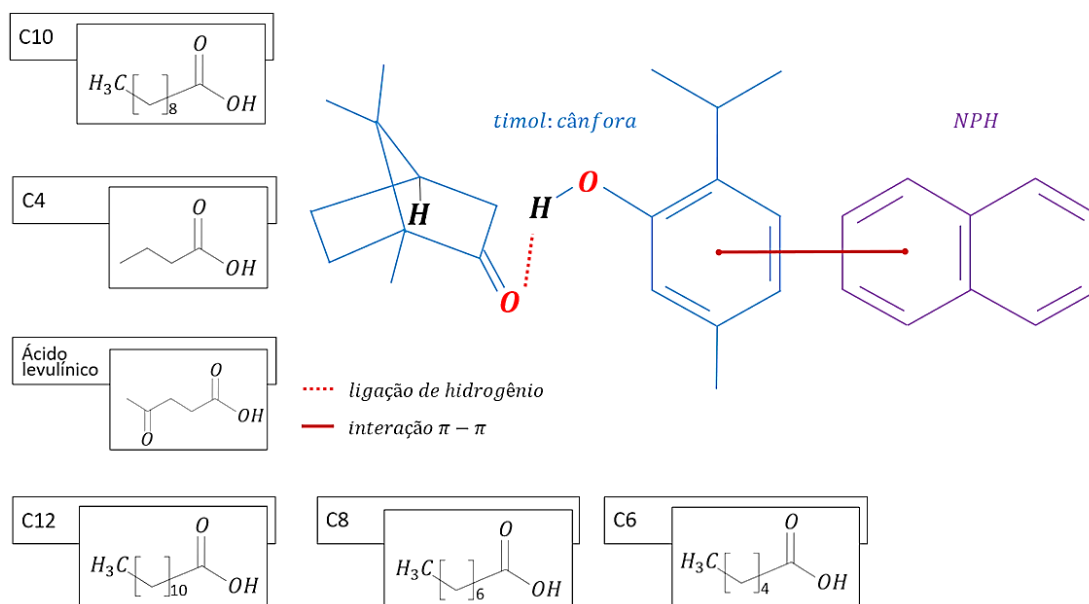
Figura 6. Eficiência de extração de HPAs em chá dos 4 DES pré-selecionados.



Fonte: Autoria própria (2024).

A seleção do solvente extrator foi realizada mediante testes estatísticos (Tabela B-1). Timol:cânfora apresentou a melhor taxa de extração, além de ser significativamente diferente dos demais DES avaliados, sendo selecionado como solvente extrator otimizado. A eficiência de extração apresentada por timol:cânfora, pode ser atribuída principalmente por interações π - π do anel aromático do timol com as estruturas dos analitos, ou dos elétrons π da carbonila da cânfora com os analitos. Além disso, a estrutura deste DES (Figura 7), mantida principalmente por ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e forças de dispersão⁴³, difere dos demais DES que possuem cadeias carbônicas abertas e extensas em pelo menos um constituinte. A presença destas cadeias carbônicas pode dificultar a interação dos analitos com o DES; enquanto timol:cânfora possui uma estrutura que, deste ponto de vista, facilita as interações entre fase extratora e analito.

Figura 7. Estruturas do timol:cânfora, componentes dos demais DES e interações.



Fonte: Autoria própria (2024).

5.2. OTIMIZAÇÕES DOS PARÂMETROS DA HF-MMLLE

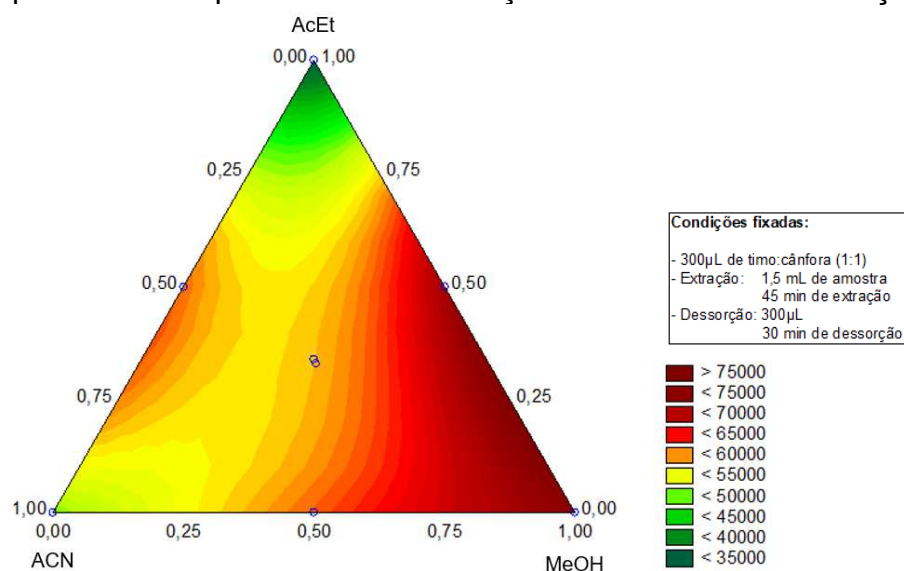
5.2.1. Otimização da Etapa de Dessorção

Com base nos experimentos conduzidos através do planejamento simplex-centróide, foi gerada a superfície de resposta apresentada na Figura 8. A partir dela,

MeOH foi selecionado como solvente de dessorção otimizado para o preparo das amostras de chá.

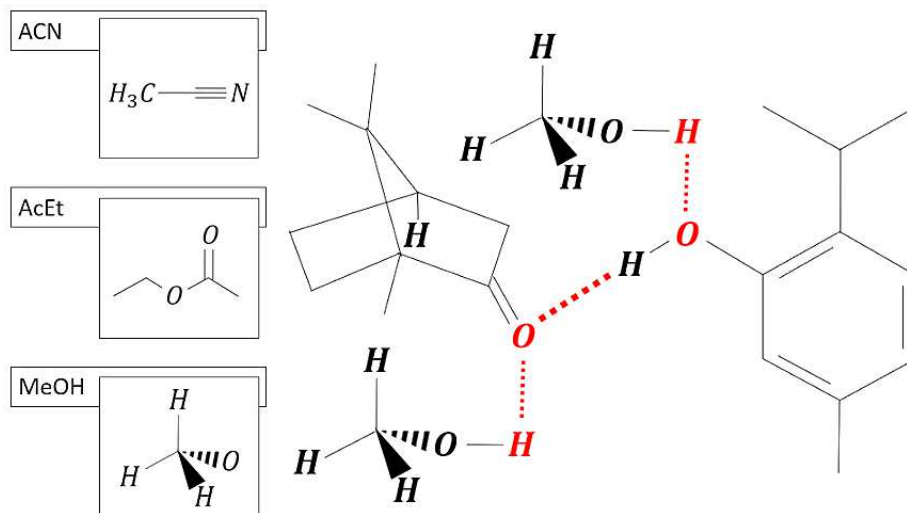
Considerando a semelhança de solubilidade da cânfora e do timol, bem como as dimensões das estruturas dos solventes avaliados (Figura 9), podemos concluir que, conforme relatado na literatura⁴³ e assim como na seleção do DES, a estrutura com menores impedimentos estéricos, que facilita a interação do solvente de dessorção com os constituintes do DES, ou seja, o MeOH, apresentou o melhor desempenho na etapa de dessorção.

Figura 8. Superfície de resposta obtida na seleção do solvente de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2024).

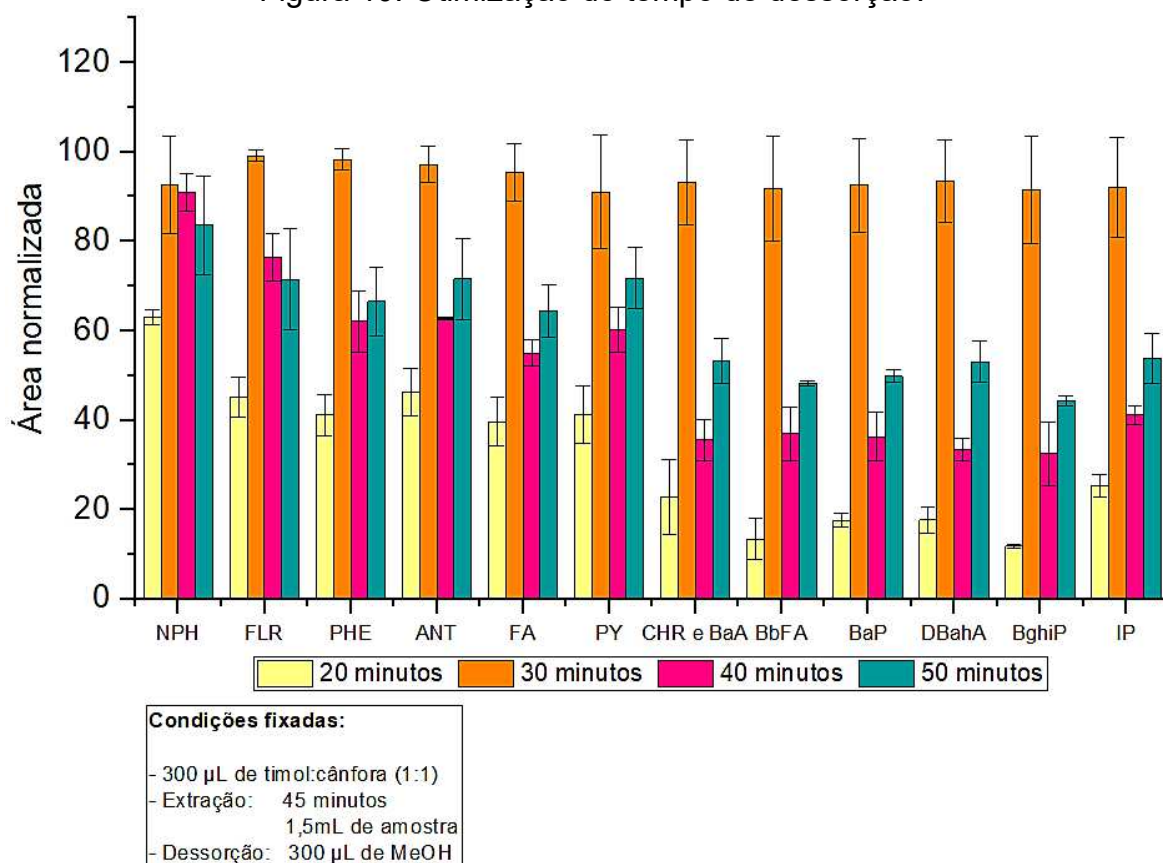
Figura 9. Estruturas dos solventes de dessorção e interação do MeOH com o DES.



Fonte: Autoria própria (2024).

Os resultados da otimização do tempo de dessorção ([Tabela C-1](#)), demonstram que todos os tempos avaliados diferem entre si. O tempo de 30 minutos de dessorção gerou a maior resposta, sendo selecionado como condição otimizada. A Figura 10 apresenta uma comparação visual dos tempos de dessorção avaliados.

Figura 10. Otimização do tempo de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2024).

O tempo de 20 minutos apresentou a menor resposta, sendo insuficiente para a dessorção dos analitos. Também se observa que, após o tempo otimizado, houve um declínio do sinal, essa diminuição da concentração dos analitos no solvente de dessorção pode ser justificada por uma retroextração dos analitos pela membrana microporosa.

Portanto, um tempo de dessorção muito curto pode resultar na dessorção incompleta dos analitos, do mesmo modo que um tempo de dessorção muito prolongado, pode propiciar uma retroextração dos analitos para a membrana⁴³. Isto

ocorre devido à sua natureza hidrofóbica, a membrana é capaz de reter compostos orgânicos, como os HPAs, mesmo sem o DES impregnado.

5.2.2. Otimização da Etapa de Extração

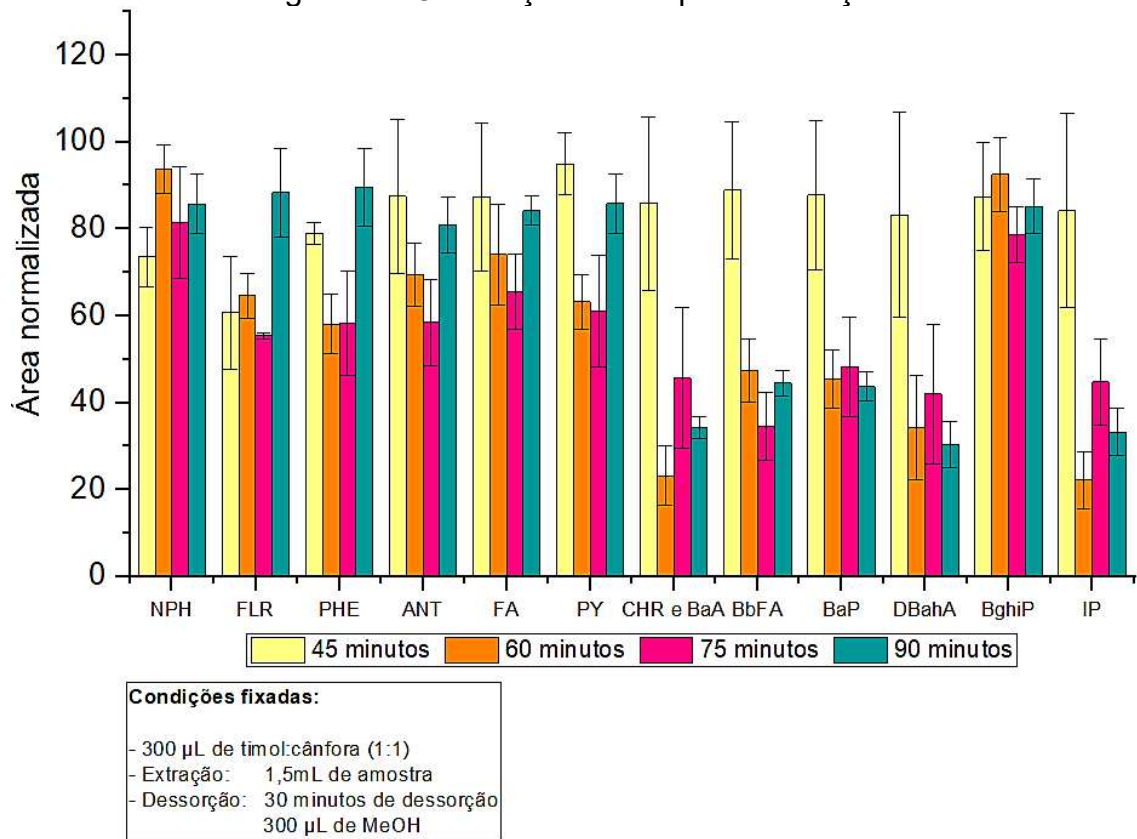
A otimização final envolveu a avaliação dos tempos de extração de 45, 60, 75 e 90 minutos. Com base nos resultados obtidos ([Tabela D-1](#)), o tempo de extração de 45 minutos, além de apresentar a maior resposta, difere significativamente dos demais tempos avaliados, sendo selecionado como condição otimizada.

Durante esta otimização, também foi observado o fenômeno de retroextração, uma vez que, após o tempo otimizado, o sinal sofre um decréscimo. Isso demonstra que para tempos de extração superiores a 45 minutos, os analitos podem retornar para a amostra. Somado a isso, pode ainda ocorrer uma perda do DES, com o solvente extrator também migrando para a amostra. Ou seja, um tempo de extração muito curto pode resultar na extração incompleta dos analitos presentes na amostra, enquanto um tempo de extração muito prolongado pode propiciar uma retroextração dos analitos para a amostra⁴³.

Os tempos de 60 e 75 minutos, onde ocorre a diminuição de sinal, apresentaram uma resposta estatisticamente equivalente. A partir dos 90 minutos de extração, o sinal volta a crescer, no entanto, o tempo de 90 minutos difere significativamente de 45 minutos de extração. A extração é governada por um equilíbrio químico entre os analitos presentes na fase extratora e na amostra, portanto, embora o sistema retorne a uma condição de equilíbrio que favoreça a extração dos analitos pela membrana, essa resposta ainda será inferior à de 45 minutos devido à possível perda do solvente extrator. Portanto, seja em termos de frequência analítica ou devido às perdas de analito e fase extratora, a etapa de extração desta metodologia deve ser realizada em, no máximo, 45 minutos.

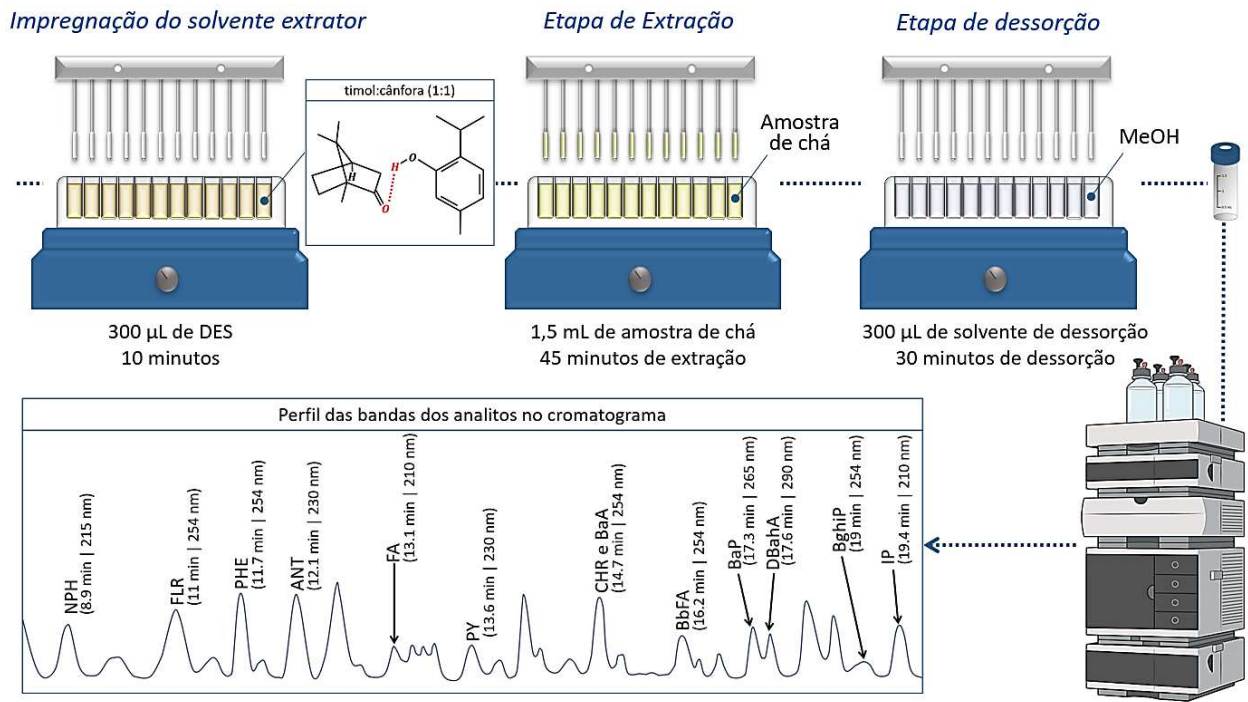
A Figura 11 apresenta uma comparação visual dos tempos de extração avaliados. Em seguida, a Figura 12 ilustra a metodologia otimizada do preparo de amostras de chá para determinação de HPAs.

Figura 11. Otimização do tempo de extração.



Fonte: Autoria própria (2024).

Figura 12. Metodologia otimizada do preparo de amostras por HF-MMLLE/DES.



Fonte: Autoria própria (2024).

5.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

Utilizando a metodologia otimizada em amostras de chá de camomila fortificadas por adição de padrão, foram obtidas curvas de calibração para cada analito. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Dados obtidos para os parâmetros analíticos de mérito.

Analitos	Parâmetros				
	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²	F
NPH	10	3,03	10 – 500	0,9908	752
FLR	10	3,03	10 – 500	0,9917	713
PHE	10	3,03	10 – 500	0,9983	4142
ANT	10	3,03	10 – 500	0,9994	14401
FA	10	3,03	10 – 500	0,9962	2122
PY	10	3,03	10 – 500	0,9924	788
CHR e BaA	10	3,03	10 – 500	0,9989	4382
BbFA	10	3,03	10 – 500	0,9956	1366
BaP	10	3,03	10 – 500	0,9969	2230
DBahA	10	3,03	10 – 500	0,9955	1543
BghiP	10	3,03	10 – 500	0,9957	1154
IP	10	3,03	10 – 500	0,9961	1537

Fonte: Autoria própria (2024).

As faixas lineares de trabalho variam de 10 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, com R² superior a 0,9908, e os valores de LOQ e LOD foram 10 e 3,03 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para todos os analitos. Os elevados valores de F obtidos corroboram com a obtenção de uma excelente relação linear nas curvas.

A Tabela 8 exhibe os resultados da avaliação da precisão e exatidão do método proposto^c. A precisão intradia variou de 1,55 a 17,72%, enquanto a interdia variou de 9,85 a 22,63%. A exatidão do método, avaliada pela porcentagem de recuperação relativa (%RR), apresentou valores que variaram de 84,78 a 117,50% para a amostra de chá mate, e 84,63 a 120,28% para a amostra e chá de hortelã. Os valores obtidos tanto para precisão, quanto para exatidão, são considerados satisfatórios, uma vez que estão de acordo com as diretrizes da AOAC⁵⁹ que determina que o DPR na precisão deve ser menor que 20%, e a %RR encontre-se entre 80 e 120% para as concentrações avaliadas.

^c Para garantir que os níveis pré-existentes de HPAs nas amostras de chá não afetassem os dados da validação, a concentração de 0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (branco do chá) foi incluída nas análises.

Tabela 8. Dados obtidos para precisão e exatidão do método.

Analitos	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão expressa pelo DPR		Exatidão expressa pela %RR	
		Intradia (%) (n = 3)	Interdia (%) (n = 9)	Chá mate	Chá de hortelã
NPH	50	8,54	12,38	92,61 ($\pm 1,2$)	92,87 ($\pm 3,9$)
	100	6,99	12,03	100,06 ($\pm 7,6$)	113,46 ($\pm 9,7$)
	300	2,40	9,85	100,43 ($\pm 2,7$)	98,96 ($\pm 1,7$)
FLR	50	3,60	12,12	92,15 ($\pm 8,2$)	90,31 ($\pm 7,6$)
	100	4,72	14,47	94,67 ($\pm 10,2$)	102,61 ($\pm 8,3$)
	300	3,76	10,98	106,48 ($\pm 7,1$)	94,43 ($\pm 9,9$)
PHE	50	1,55	13,35	85,52 ($\pm 10,0$)	89,46 ($\pm 14,4$)
	100	3,20	13,80	89,31 ($\pm 11,8$)	96,56 ($\pm 12,0$)
	300	8,07	13,30	106,23 ($\pm 6,1$)	96,30 ($\pm 12,7$)
ANT	50	13,56	14,13	108,24 ($\pm 7,2$)	84,63 ($\pm 6,3$)
	100	4,14	15,99	116,73 ($\pm 3,1$)	91,24 ($\pm 11,8$)
	300	12,52	15,80	105,46 ($\pm 12,8$)	94,07 ($\pm 16,9$)
FA	50	10,99	15,38	105,77 ($\pm 1,3$)	99,32 ($\pm 12,6$)
	100	11,64	13,79	90,88 ($\pm 9,3$)	109,71 ($\pm 3,7$)
	300	11,30	11,53	106,09 ($\pm 7,2$)	94,12 ($\pm 22,0$)
PY	50	13,87	14,42	111,33 ($\pm 10,7$)	108,22 ($\pm 20,2$)
	100	4,12	11,79	90,72 ($\pm 9,1$)	97,06 ($\pm 13,0$)
	300	13,29	12,96	104,16 ($\pm 20,6$)	92,91 ($\pm 15,7$)
CHR e BaA	50	10,58	16,73	84,78 ($\pm 5,2$)	91,08 ($\pm 15,9$)
	100	8,53	20,74	101,05 ($\pm 21,0$)	116,31 ($\pm 0,1$)
	300	14,74	19,10	95,60 ($\pm 12,6$)	103,44 ($\pm 17,1$)
BbFA	50	6,97	17,52	87,80 ($\pm 19,8$)	90,27 ($\pm 1,0$)
	100	14,49	20,55	116,69 ($\pm 19,9$)	111,85 ($\pm 17,1$)
	300	16,07	21,75	95,06 ($\pm 15,0$)	104,10 ($\pm 20,7$)
BaP	50	13,45	22,63	110,21 ($\pm 8,4$)	117,63 ($\pm 0,1$)
	100	12,86	19,49	117,50 ($\pm 7,6$)	120,28 ($\pm 0,2$)
	300	4,03	18,79	92,73 ($\pm 13,2$)	102,41 ($\pm 12,3$)
DBahA	50	12,56	19,42	108,45 ($\pm 8,9$)	112,55 ($\pm 9,9$)
	100	17,05	18,19	110,57 ($\pm 15,8$)	114,69 ($\pm 17,0$)
	300	6,73	21,36	95,94 ($\pm 15,5$)	100,67 ($\pm 18,8$)
BghiP	50	17,72	16,43	115,12 ($\pm 11,0$)	106,42 ($\pm 11,7$)
	100	3,90	17,02	112,33 ($\pm 5,3$)	107,97 ($\pm 5,5$)
	300	9,29	21,72	99,70 ($\pm 5,3$)	97,45 ($\pm 3,9$)
IP	50	8,09	20,90	116,16 ($\pm 6,9$)	105,28 ($\pm 6,9$)
	100	8,30	16,69	107,90 ($\pm 16,3$)	111,84 ($\pm 12,2$)
	300	6,41	19,58	94,80 ($\pm 1,8$)	102,41 ($\pm 18,5$)

Fonte: Autoria própria (2024).

5.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ

O efeito matriz não é propriamente um parâmetro analítico de mérito, mas é uma importante característica a ser considerada na avaliação de um método analítico, pois refere-se à influência que a matriz da amostra pode exercer sobre a exatidão e precisão das análises. Este efeito, regularmente presente em análises de matrizes complexas como as alimentícias, é consequência da natureza química da matriz e dos compostos de interesse, podendo acarretar a supressão ou amplificação do sinal analítico⁶⁰. No caso do chá, a composição das amostras inclui uma variedade de compostos orgânicos, principalmente polifenóis como flavonóides e catequinas⁶¹, que podem interferir na análise dos HPAs.

Após comparar os coeficientes angulares ([Tabelas E-1 e E-2](#)) das curvas de amostras de chá de camomila, chá mate e chá de hortelã, obtidas na precisão intradia e nas recuperações, com os coeficientes obtidos nas curvas em água ultrapura, verificou-se a ocorrência de efeito matriz. Esse resultado confirma que a calibração por adição de padrão é mais adequada do que a calibração externa na avaliação de HPAs em matrizes complexas, como de chás, devido aos interferentes da matriz que podem persistir mesmo após o preparo das amostras. Embora esteja presente, o efeito matriz não invalida a metodologia proposta, já que os parâmetros validação analítica confirmaram a confiabilidade do método.

Tabela 9. Efeito matriz nas amostras avaliadas.

Analito	Chá de camomila (infusão)	Chá mate (infusão)	Chá de hortelã (infusão)
NPH	✓	✓	✗
FLR	✓	✓	✓
PHE	✓	✓	✓
ANT	✓	✓	✓
FA	✓	✓	✓
PY	✓	✓	✓
CHR e BaA	✓	✓	✓
BbFA	✓	✓	✓
BaP	✓	✓	✓
DBahA	✓	✓	✓

Legenda: ✓ - há efeito matriz; ✗ – não há efeito matriz.

Fonte: Autoria própria (2024).

5.5. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA

A presença dos HPAs em infusões de chá de camomila, chá mate, chá verde, chá preto e chá de hortelã, além de chá mate pronto industrializado e chá de hortelã de origem domiciliar, foram avaliadas através da metodologia proposta e validada. As concentrações dos HPAs nas amostras são apresentadas nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Concentração de HPAs em infusões de chás comerciais.

Analitos	Concentração dos analitos nas amostras avaliadas ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
	Chá mate pronto (industrializado)	Chá mate (infusão)	Chá preto (infusão)	Chá verde (infusão)	Chá de camomila (infusão)
NPH	*	51,33 ($\pm 3,24$)	*	*	12,46 ($\pm 2,58$)
PHE	*	*	*	*	10,70 ($\pm 0,50$)
ANT	12,13 ($\pm 5,38$)	*	12,92 ($\pm 5,99$)	16,74 ($\pm 2,35$)	*
CHR e BaA	32,54 ($\pm 1,19$)	*	*	29,69 ($\pm 0,86$)	*
BaP	*	*	53,99 ($\pm 14,08$)	*	*
DBahA	*	*	39,39 ($\pm 12,04$)	*	*
BghiP	116,37 ($\pm 12,04$)	*	171,58 ($\pm 6,07$)	124,79 ($\pm 2,75$)	*

Legenda: *não detectado.

Fonte: Autoria própria (2024).

Tabela 11. Comparativo da concentração de HPAs em chás de hortelã.

Analitos	Concentração dos analitos nas amostras avaliadas ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Infusão de chá de hortelã domiciliar	Infusão de chá de hortelã comercial
NPH	*	54,98 ($\pm 7,41$)
PHE	*	10,39 ($\pm 1,28$)
ANT	15,52 ($\pm 9,51$)	*
CHR e BaA	*	26,24 ($\pm 3,27$)

Legenda: *não detectado.

Fonte: Autoria própria (2024).

O chá de hortelã domiciliar apresentou a menor concentração de HPAs, uma vez que esta matéria vegetal não foi submetida ao processo de secagem, ou transporte para comércio. Contaminações no ambiente domiciliar, bem como a infusão em água quente, podem ser os contribuintes responsáveis pela presença, mesmo que

baixa, do ANT. Em comparação, a infusão de chá de hortelã comercial apresentou cerca de 6 vezes a concentração de HPA do chá domiciliar.

Ao comparar o chá mate pronto industrializado com a infusão de chá mate comercial, observou-se que o primeiro apresenta uma concentração de cerca de 3,14 vezes maior de HPAs que a infusão de chá comercial. O chá de camomila apresentou a segunda menor contaminação entre as amostras avaliadas. Por outro lado, tanto o chá verde quanto o chá preto possuem uma presença pronunciada de HPAs, sendo este um resultado consistente com relatos da literatura^{24,26,62}, que indicam uma predominância de níveis elevados de HPAs nestes chás.

5.6. COMPARAÇÃO ENTRE METODOLOGIAS

A Tabela 12 apresenta estudos que investigaram HPAs em amostras de chá por diferentes técnicas de preparo de amostras e sistemas instrumentais. A literatura relacionada a determinação destes compostos em bebidas como o chá, ainda predominantemente apresenta técnicas clássicas de preparo de amostras. Contudo, o emprego de técnicas de microextração, inclusive associadas aos DES, já demonstram o potencial desse solvente alternativo na extração de HPAs.

Em comparação com os demais, o método desenvolvido neste estudo apresenta diversas vantagens. Está entre as metodologias com o maior número de analitos quantificados simultaneamente. Em termos de frequência analítica, alcança um tempo de preparo de 0,88 minutos por amostra^d. Além de ser de fácil manipulação, reduz a exposição a solventes tóxicos e faz uso de uma instrumentação relativamente simples, o HPLC-DAD. O valor de LOD obtido é superior aos relatos na literatura, mas foi alcançado utilizando menores volumes de solvente e, conseqüentemente, gerando menores volumes de resíduos.

^d Considerando o tempo de impregnação da membrana, extração dos analitos e dessorção, por 96 amostras simultâneas.

Tabela 12. Comparação do método proposto com diferentes metodologias de determinação de HPAs em chás.

Técnica de preparo de amostras	Fase Extratora	Analitos	Instrumentação	LOD	Tempo de preparo (min/amostra)	Referência
HF-MMLLE	DES (timol:cânfora)	NPH, FLR, PHE, ANT, FA, PY, CHR, BbFA, BaA, BaP, DBahA, BghiP, IP	HPLC-DAD	3,03 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,88	Este trabalho
Extração em fase sólida magnética (MSPE)	Líquido iônico	PHE, BaA, CHR, BbFA, DBahA, BaP e BkFA	HPLC-FLD	$1,0 \cdot 10^{-4} - 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$	12	27
Microextração líquido-líquido dispersiva à base de líquidos iônicos (IL-DLMME)	Líquido iônico:ACN	BaA, CHR, BbFA, BkFA, BaP e DBahA	HPLC-FLD	$2,0 \cdot 10^{-3} - 0,31 \mu\text{g L}^{-1}$	20	63
Microextração baseada em membrana de seringa (SMME)	UiO-66 (Zr)-MMMs	FA, ANT, PY, BbFA e BaP	HPLC-DAD	$0,02 - 0,08 \mu\text{g L}^{-1}$	*15	65
Procedimento semelhante ao QuEChERS + SPE e limpeza em MIPs	AcEt	BaA, BaP, BbFA, BkFA, BghiP, DBahA, CHR, IP, BcFLR, CPP, MCH, BjFA, DBaIP, DBaeP, DBaiP, DBahPY	GC-GC/TOFMS	$0,16 - 0,67 \mu\text{g kg}^{-1}$	<6	26
Microextração líquido-líquido assistida por ar baseada na solidificação de DES (AA-LLME-SFDES)	DES (mentol:C12)	NPH, FLR, PHE e ANT	HPLC-UV	$0,16 - 0,75 \mu\text{g L}^{-1}$	*11	66
Extração líquido-líquido com ultrassom	Hexano	ACN, ACY, ANT, BaA, BaP, BbFA, BghiP, BkFA, DBahA, FA, FLR, IP, NHP, PHE e PY	GC-FID	$0,30 - 0,90 \mu\text{g kg}^{-1}$	>30	67
Microextração líquido-líquido dispersiva (DLMME)	DES:ACN (timol:lidocaína)	BaA, CHR, BbFA, BkFA, BaP e DBahA	UHPLC-FLD	$6,0 \cdot 10^{-3} - 0,04 \mu\text{g L}^{-1}$	11	56

Legenda: **sem informação; *tempo aproximado

Fonte: Autoria própria (2024).

6. CONCLUSÃO

Identificar fontes relevantes de contribuição dietética na contaminação por HPAs auxilia no monitoramento da qualidade e segurança dos produtos alimentícios. Neste contexto, a metodologia proposta para a determinação de NPH, FLR, PHE, ANT, FA, PY, CHR, BaA, BbFA, BaP, DBahA, BghiP e IP, que consiste na utilização de DES como fase extratora na técnica HF-MMLLE, com quantificação por HPLC-DAD, demonstrou resultados satisfatórios. A integração da HF-MMLLE com o sistema de 96 poços de amostragem, permitiu ganho significativo em termos de frequência analítica; além disso, a abordagem apresenta vantagens do ponto de vista ambiental, alinhando-se aos princípios da Química Analítica Verde. A metodologia foi otimizada e validada com êxito, destacando o potencial dos DES como substitutos eficazes dos solventes orgânicos tradicionalmente empregados. Os parâmetros analíticos de mérito foram avaliados de forma satisfatória, evidenciando a confiabilidade do método proposto, com LOQ e LOD de 10 e 3,03 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, além de coeficientes de determinação e valores de F satisfatórios para todos os analitos. A avaliação da precisão intradia e interdia, assim como a exatidão avaliada por meio de ensaios de recuperação relativa, apresentaram resultados dentro das faixas estabelecidas pelas diretrizes da AOAC. E por fim, a aplicação da metodologia em sete amostras foi realizada com êxito, alcançando concentrações condizentes com as já relatadas na literatura.

REFERÊNCIAS

- ¹ INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Ambiente, Trabalho e Câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios. 2021.
- ² VIJAYANAND, M. *et al.* Polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in the water environment: A review on toxicity, microbial biodegradation, systematic biological advancements, and environmental fate. *Environmental Research*. 2023;227. doi:10.1016/j.envres.2023.115716.
- ³ ABDEL-SHAIFY, H.; MANSOUR, M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*. 2016;25. doi:10.1016/j.ejpe.2015.03.011.
- ⁴ WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Drinking-Water: Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. 2003.
- ⁵ PENG, P.; LIM, L. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Sample Preparation and Analysis in Beverages: A Review. *Food Anal Methods*. 2022;15(4). doi:10.1007/s12161-021-02178-y.
- ⁶ WANG, J. *et al.* Advances of the functionalized covalent organic frameworks for sample preparation in food field. *Food Chemistry*. 2023;405. doi:10.1016/j.foodchem.2022.134818.
- ⁷ DE SOUZA, P. *et al.* Bioaccumulation of PAHs in marine bivalves of the Santos Estuary (Brazil) associated with the evaluation of human consumption. *Marine Pollution Bulletin*. 2024;199. doi:10.1016/j.marpolbul.2023.115900.
- ⁸ COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). Ficha de Informação Toxicológica: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. 2022.
- ⁹ GOYAL, H.; GUPTA, R. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-based Soft Materials: Applications in Fluorescent Detection, Gelation, AIEE and Mechanochromism. *Chemistry – An Asian Journal*. 2023;18(14). doi:https://doi.org/10.1002/asia.202300355.
- ¹⁰ ROSLUND, M. *et al.* Half-lives of PAHs and temporal microbiota changes in commonly used urban landscaping materials. *PeerJ*. 2018;6. doi:10.7717/peerj.4508.

- ¹¹ RENE, P.; SCHWARZENBACH, P.; DIETER, M. Imboden. *Environmental Organic Chemistry*. 2002.
- ¹² AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Case Studies in Environmental Medicine: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). 2023. Disponível em: <[Polycyclic Aromatic Hydrocarbons \(PAHs\): What are the Standards and Regulations for PAHs Exposure? | Environmental Medicine | ATSDR \(cdc.gov\)](#)>.
- ¹³ PATEL, A. *et al.* Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11. doi:10.3389/fmicb.2020.562813.
- ¹⁴ INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Drinking Coffee, Mate, and Very Hot Beverages. In: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 2018.
- ¹⁵ INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. 2010;92.
- ¹⁶ HUSSAR, E. *et al.* Human Health Risk Assessment of 16 Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils of Chattanooga, Tennessee, USA. *Water, Air & Soil Pollution*. 2012;223. doi:10.1007/s11270-012-1265-7.
- ¹⁷ GARCIA, L. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em alimentos: uma revisão. *PUBVET*. 2014;8(268).
- ¹⁸ HÖNER, A. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Metabolites. In: *Handbook of Analytical Separations*. 2001;3.
- ¹⁹ HUANG, M.; PENNING, T. Processing Contaminants: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). In: *Encyclopedia of Food Safety*. Academic Press. 2014:416-423. doi:10.1016/B978-0-12-378612-8.00212-2.
- ²⁰ UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Health Effects Notebook for Hazardous Air Pollutants: Naphthalene. 2023. Disponível em: <[Health Effects Notebook for Hazardous Air Pollutants | US EPA](#)>.
- ²¹ KOSZUCKA, A.; NOWAK, A. Thermal processing food-related toxicants: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019;59(22).
- ²² FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *Markets and Trade: Tea*. FAO. 2024. Disponível em: <[Tea | FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations](#)>.

- ²³ GAO, G. *et al.* Residue pattern of polycyclic aromatic hydrocarbons during green tea manufacturing and their transfer rates during tea brewing. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2017;34(6):990-999. doi:10.1080/19440049.2017.1316873.
- ²⁴ GUO, X.; CHENN, F.; ZHANG, W. Pollution, source and risk assessment of PAHs in Chinese tea. *LWT*. 2022;167:113851. doi:10.1016/j.lwt.2022.113851.
- ²⁵ ARESTA, A.; ZAMBONIN, C. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Coffee Samples by DI-SPME-GC/MS. *Food Anal Methods*. 2023;16(6). doi:10.1007/s12161-023-02463-y.
- ²⁶ DRABOVA, L. *et al.* Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tea using two-dimensional gas chromatography coupled with time of flight mass spectrometry. *Talanta*. 2012;100:207-216. doi:10.1016/j.talanta.2012.07.081.
- ²⁷ SHI, Y. *et al.* Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee and tea samples by magnetic solid-phase extraction coupled with HPLC–FLD. *Food Chemistry*. 2016;199:75-80. doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.137.
- ²⁸ EUROPEAN FOOD STANDARD AGENCY (EFSA). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food - Scientific Opinion of the panel on contaminants in the food Chain. *EFSA Journal*. 2008.
- ²⁹ HARRISON, D.; CHANG, W.; LIN, H. Dietary Exposure and Health Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Black Tea Consumed in Taiwan. *Toxics*. 2024;12(2). doi:10.3390/toxics12020134.
- ³⁰ AHMADI, S. *et al.* Evaluation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in various teas: A meta-analysis study, systematic review, and health risk assessment. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2024;133. doi:10.1016/j.jfca.2024.106402.
- ³¹ EUROPEAN UNION. *Commission Implementing Decision (EU) 2024/367*. 2024. http://data.europa.eu/eli/dec_impl/2024/367/oj/eng.
- ³² EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission Regulations N° 208/2005. Published online 2005.
- ³³ AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. 1995.
- ³⁴ MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Portaria GM/MS N° 888, de 04 de Maio 2021. 2011.

- ³⁵ BULDER, A. *et al.* Initial Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Feed Materials. Institute of Food Safety, 2006.
- ³⁶ CARASEK, E.; MORÉS, L.; HUELSMANN, R. Disposable pipette extraction: A critical review of concepts, applications, and directions. *Analytica Chimica Acta*. 2022;1192. doi:10.1016/j.aca.2021.339383.
- ³⁷ CARASEK, E.; MORÉS, L.; MERIB, J. Basic principles, recent trends and future directions of microextraction techniques for the analysis of aqueous environmental samples. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 2018;19. doi:10.1016/j.teac.2018.e00060.
- ³⁸ MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. *Scientia Chromatographica*. 2013;5. doi:10.4322/sc.2014.008.
- ³⁹ PIERRI, M. *et al.* Multiclass determination of endocrine disruptors in urine by hollow fiber microporous membrane and liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 2022;652:114725. doi:10.1016/j.ab.2022.114725.
- ⁴⁰ CARASEK, E.; SCUR, R.; BERNARDI, G. High-throughput analytical methods employing microextraction techniques: Towards fast analyses lasting a few seconds. *Advances in Sample Preparation*. 2023;8:100095. doi:10.1016/j.sampre.2023.100095.
- ⁴¹ ZORITA, S.; BARRI, T.; MATHIASSEN, L. A novel hollow-fibre microporous membrane liquid–liquid extraction for determination of free 4-isobutylacetophenone concentration at ultra trace level in environmental aqueous samples. *Journal of Chromatography A*. 2007;1157(1):30-37. doi:10.1016/j.chroma.2007.05.039.
- ⁴² LOPES, D. *et al.* Determination of hormones in urine by hollow fiber microporous membrane liquid–liquid extraction associated with 96-well plate system and HPLC-FLD detection. *Journal of Chromatography B*. 2022;1207:123406. doi:10.1016/j.jchromb.2022.123406.
- ⁴³ MORELLI, D. *et al.* A green - high throughput –extraction method based on hydrophobic natural deep eutectic solvent for the determination of emerging contaminants in water by high performance liquid chromatography – diode array detection. *Journal of Chromatography A*. 2020;1626. doi:10.1016/j.chroma.2020.461377.
- ⁴⁴ ABBOTT, A. *et al.* Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*. 2003;(1):70-71. doi:10.1039/B210714G.

- ⁴⁵ HANSEN, B. *et al.* Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical Reviews*. 2021;121(3):1232-1285. doi:10.1021/acs.chemrev.0c00385.
- ⁴⁶ SPITTLE, S. *et al.* Evolution of microscopic heterogeneity and dynamics in choline chloride-based deep eutectic solvents. *Nature Communications*. 2022;13(1):1081. doi:10.1038/s41467-022-28671-4.
- ⁴⁷ ESPINO, M. *et al.* Natural designer solvents for greening analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*. 2016;76:126-136. doi:10.1016/j.trac.2015.11.006.
- ⁴⁸ BINTANEL-CENIS, J. *et al.* Critical overview on the use of hydrophobic (deep) eutectic solvents for the extraction of organic pollutants in complex matrices. *Talanta*. 2024;270:125599. doi:10.1016/j.talanta.2023.125599.
- ⁴⁹ DEVI, M. *et al.* Hydrophobic Deep Eutectic Solvents as Greener Substitutes for Conventional Extraction Media: Examples and Techniques. *ACS Omega*. 2023;8(11):9702-9728. doi:10.1021/acsomega.2c07684.
- ⁵⁰ HONG, S.; KAMARUDDIN, A.; NADZIR, M. Sustainable ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Cinnamomum cassia* bark using hydrophilic natural deep eutectic solvents. *Process Biochemistry*. 2023;132:323-336. doi:10.1016/j.procbio.2023.07.026.
- ⁵¹ ZHAO, L. *et al.* Hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvent-based extraction to determine parathion in cereals by digital image colorimetry integrated with smartphones. *Talanta*. 2023;265:124831. doi:10.1016/j.talanta.2023.124831.
- ⁵² GONZALEZ-DIAZ, A.; GARCÍA-NUÑEZ, J. Hydrophilic deep eutectic solvents: A new generation of green and safe extraction systems for bioactive compounds obtaining from natural oil & fats – A review. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2023;36:101278. doi:10.1016/j.scp.2023.101278.
- ⁵³ OSCH, D. *et al.* Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. *Green Chemistry*. 2015;17:4518-4521. doi:10.1039/C5GC01451D.
- ⁵⁴ MEHRAVAR, A. *et al.* Deep eutectic solvent-based headspace single-drop microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*. 2020;1632:461618. doi:10.1016/j.chroma.2020.461618.
- ⁵⁵ LI, Z. *et al.* Deep eutectic solvents with low viscosity for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by dispersive liquid–liquid microextraction. *Microchemical Journal*. 2024;198:110086. doi:10.1016/j.microc.2024.110086.

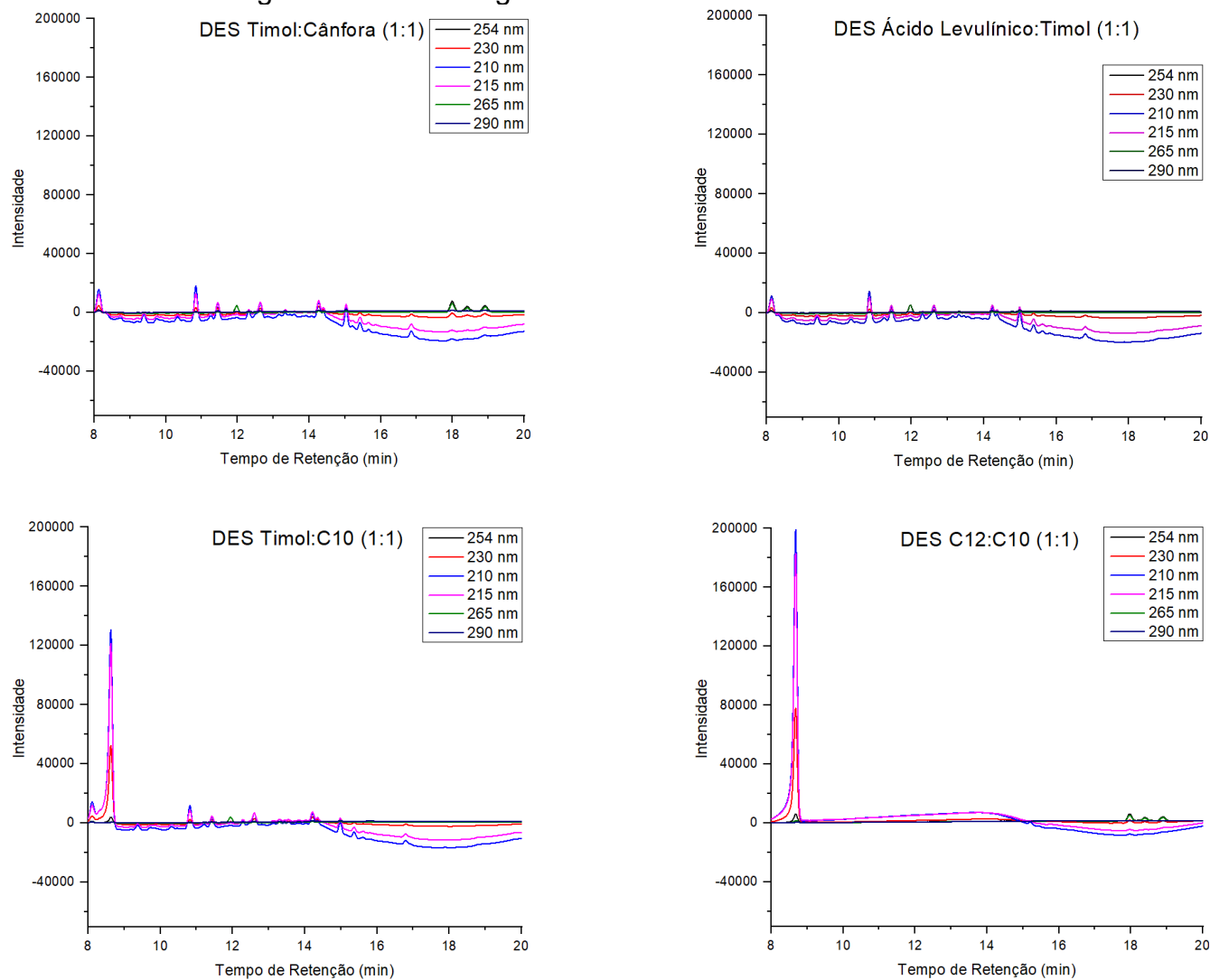
- ⁵⁶ MESÍAS-SALAZAR, A. *et al.* Hydrophobic deep eutectic solvent as extractant phase for determining six carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in tea and coffee infusion samples. *Microchemical Journal*. 2023;193:109022. doi:10.1016/j.microc.2023.109022.
- ⁵⁷ AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC N°166, de 24 de Julho de 2017.
- ⁵⁸ WILL, C. *et al.* High-throughput approach for the in situ generation of magnetic ionic liquids in parallel-dispersive droplet extraction of organic micropollutants in aqueous environmental samples. *Talanta*. 2021;223. doi:10.1016/j.talanta.2020.121759.
- ⁵⁹ ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Guidelines for Standard Method Performance Requirements. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 2016;2.
- ⁶⁰ STEINER, D. *et al.* Evaluation of Matrix Effects and Extraction Efficiencies of LC–MS/MS Methods as the Essential Part for Proper Validation of Multiclass Contaminants in Complex Feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020;68(12):3868–3880. doi:10.1021/acs.jafc.9b07706.
- ⁶¹ ZHAO, C. *et al.* Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of 30 Tea Infusions from Green, Black, Oolong, White, Yellow and Dark Teas. *Antioxidants*. 2019;8(7):215. doi:10.3390/antiox8070215.
- ⁶² CELIK-SAGLAM, I.; BALCIK, C.; CETIN, B. Concentrations, sources, and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in black, green and fruit flavored tea in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2022;109. doi:10.1016/j.jfca.2022.104504.
- ⁶³ RIVERA-VERA, C. *et al.* Ionic liquids-based dispersive liquid-liquid microextraction for determination of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in tea beverages: Evaluation of infusion preparation on pollutants release. *Food Control*. 2019;106:106685. doi:10.1016/j.foodcont.2019.06.011.
- ⁶⁴ LIN, D.; ZHU, L.; LUO, L. Factors Affecting Transfer of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Made Tea to Tea Infusion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2006;54(12):4350–4354. doi:10.1021/jf060189j.
- ⁶⁵ ZHOU, P.; ZHANG, W.; WANG, X. Development of a syringe membrane-based microextraction method based on metal–organic framework mixed-matrix membranes for preconcentration/extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea infusion. *Food Chemistry*. 2021;361:130105. doi:10.1016/j.foodchem.2021.130105.

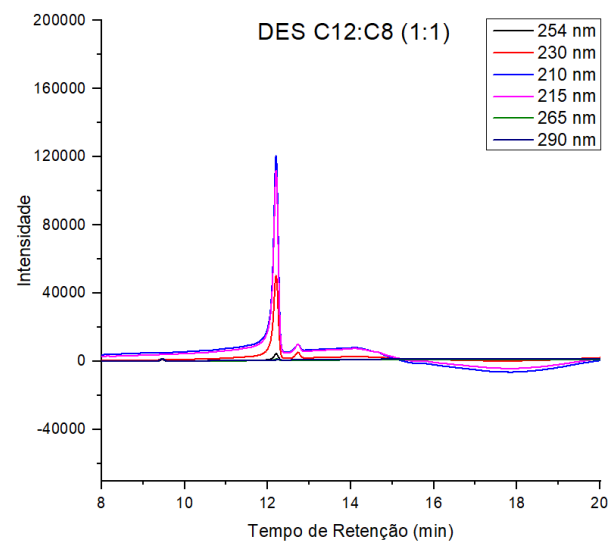
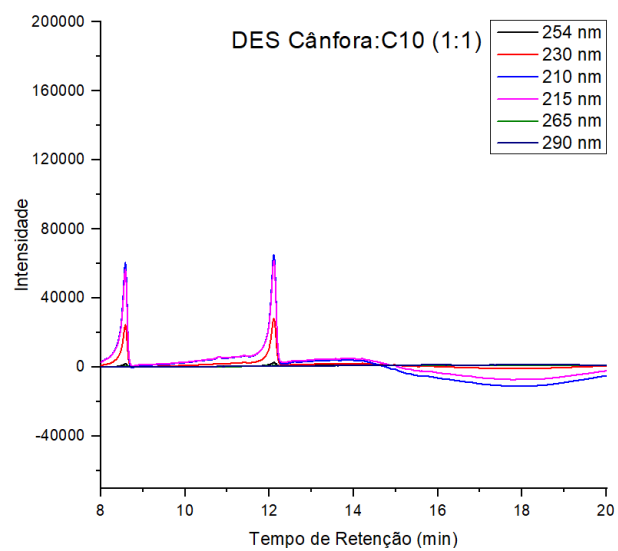
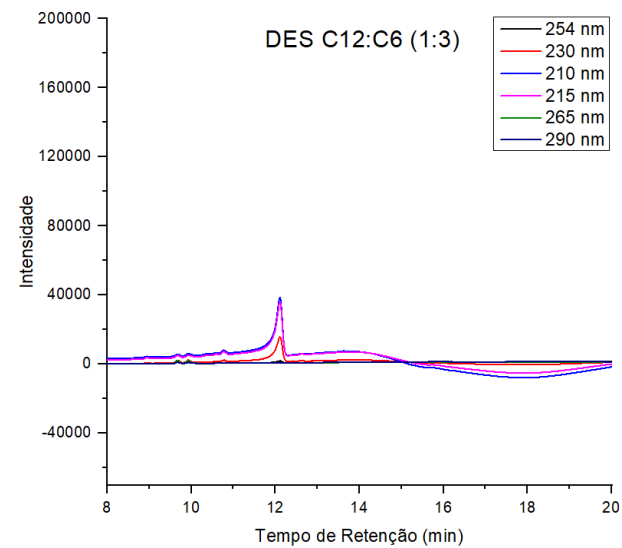
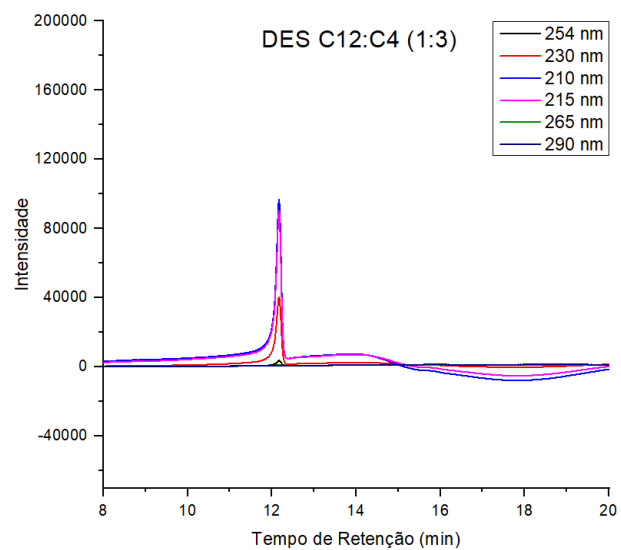
⁶⁶ ZHANG, K. *et al.* Air-assisted liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating deep eutectic solvents for the simultaneous determination of bisphenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in tea infusions via HPLC. *Food Chemistry*. 2021;348:129106. doi:10.1016/j.foodchem.2021.129106.

⁶⁷ BENSON, N. *et al.* Concentrations, sources and risk characterisation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in green, herbal and black tea products in Nigeria. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018;66:13-22. doi:10.1016/j.jfca.2017.11.003.

APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS INDIVIDUAIS DOS 8 DES

Figura A-1. Cromatogramas individuais dos DES avaliados





APÊNDICE B – DADOS DOS TESTES ESTATÍSTICOS UTILIZADOS PARA SELEÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR

Tabela B-1. Estatística da seleção do solvente extrator

ANOVA de dois fatores para medidas repetidas					
Fonte da variação	SS	df	MS	F	F crítico
Entre grupos	85954,33	44	1953,51	18,52	1,48
Dentro dos grupos	12660,26	120	105,50		
Total	98614,59	164			

Comparação pareada usando teste de Tukey		
Solvente extrator	Solvente extrator	p-valor
Membrana	Cânfora:C10	0,499
	Ácido levulínico:timol	0,071
	C12:C10	0,011
	Timol:cânfora	<0,0001
Cânfora:C10	Ácido levulínico:timol	0,572
	C12:C10	0,100
	Timol:cânfora	1,65.10 ⁻⁴
Ácido levulínico:timol	C12:C10	0,635
	Timol:cânfora	6,50.10 ⁻⁴
C12:C10	Timol:cânfora	0,003

APÊNDICE C – DADOS DOS TESTES ESTATÍSTICOS UTILIZADOS PARA SELEÇÃO DO TEMPO DE DESSORÇÃO

Tabela C-1. Estatística da seleção do tempo de deessorção

ANOVA de dois fatores para medidas repetidas					
Fonte da variação	SS	df	MS	F	F crítico
Entre grupos	6520,97	33	197,60	6,52	1,56
Dentro dos grupos	2907,86	96	30,29		
Total	9428,83	129			

Comparação pareada usando teste de Tukey		
Tempo de deessorção	Tempo de deessorção	p-valor
20 minutos	30 minutos	< 0,0001
	40 minutos	< 0,0001
	50 minutos	< 0,0001
30 minutos	40 minutos	< 0,0001
	50 minutos	< 0,0001
40 minutos	50 minutos	0,00182

APÊNDICE D – DADOS DOS TESTES ESTATÍSTICOS UTILIZADOS PARA A SELEÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO

Tabela D-1. Estatística da seleção do tempo de extração

ANOVA de dois fatores para medidas repetidas					
Fonte da variação	SS	df	MS	F	F crítico
Entre grupos	57945,74	33	19315,25	3,98	1,56
Dentro dos grupos	55161,28	96	394,01		
Total	113107,02				

Comparação pareada usando teste de Tukey		
Tempo de extração	Tempo de extração	p-valor
45 minutos	60 minutos	< 0,0001
	75 minutos	< 0,0001
	90 minutos	6,9.10 ⁻⁴
60 minutos	75 minutos	0,9851
	90 minutos	0,0273
75 minutos	90 minutos	0,0189

APÊNDICE E – DADOS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ

Tabela E-1. Coeficientes angulares avaliados na determinação do efeito matriz

Analito	Coeficiente angular A	Coeficiente angular B	Coeficiente angular C	Coeficiente angular D
NPH	3053,686	1967,838	3254,742	3131,719
FLR	249,972	296,830	535,897	1080,233
PHE	413,912	623,029	1239,809	456,297
ANT	188,281	361,230	621,823	575,959
FA	283,651	361,665	727,449	612,246
PY	314,401	368,748	873,718	749,571
CHR e BaA	632,754	398,580	1101,172	1181,115
BbFA	274,883	97,798	438,840	495,296
BaP	275,272	120,779	432,028	486,786
DBahA	469,031	129,536	705,787	743,496
BghiP	260,971	870,620	936,210	926,204
IP	407,870	123,338	124,299	139,198

Legenda: A – Curva em água ultrapura; B – Curva de calibração em chá de camomila (precisão intradia); C – Recuperação em chá mate; D – Recuperação em chá de hortelã (comercial).
Fonte: Autoria própria (2024).

Tabela E-2. Dados das estatísticas utilizados na avaliação do efeito matriz

Analitos	chá de camomila			chá mate			chá de hortelã		
	t_{tabelado}	$t_{\text{calculado}}$	p-valor	t_{tabelado}	$t_{\text{calculado}}$	p-valor	t_{tabelado}	$t_{\text{calculado}}$	p-valor
NPH	2,13	11,56	$7,18 \cdot 10^{-9}$	2,26	2,84	$1,93 \cdot 10^{-2}$	2,31	0,88	$4,02 \cdot 10^{-1}$
FLR	2,20	2,72	0,020	2,45	15,97	$3,83 \cdot 10^{-6}$	2,45	8,71	$1,26 \cdot 10^{-4}$
PHE	2,16	11,44	$3,71 \cdot 10^{-8}$	2,36	19,43	$2,38 \cdot 10^{-7}$	2,36	32,16	$7,28 \cdot 10^{-9}$
ANT	2,16	17,17	$2,58 \cdot 10^{-10}$	2,45	16,08	$3,68 \cdot 10^{-6}$	2,45	39,18	$1,85 \cdot 10^{-8}$
FA	2,14	5,99	$3,31 \cdot 10^{-5}$	2,36	10,31	$1,75 \cdot 10^{-5}$	2,36	8,46	$6,37 \cdot 10^{-5}$
PY	2,18	3,75	$2,76 \cdot 10^{-3}$	2,36	9,94	$2,22 \cdot 10^{-5}$	2,36	47,8	$4,59 \cdot 10^{-10}$
CHR e BaA	2,20	18,88	$9,93 \cdot 10^{-10}$	2,36	9,90	$2,28 \cdot 10^{-5}$	2,36	6,48	$3,40 \cdot 10^{-4}$
BbFA	2,20	16,09	$5,44 \cdot 10^{-9}$	2,45	3,35	$1,54 \cdot 10^{-2}$	2,45	7,88	$2,21 \cdot 10^{-4}$
BaP	2,18	13,73	$1,06 \cdot 10^{-8}$	2,45	4,11	$6,29 \cdot 10^{-3}$	2,45	7,96	$2,09 \cdot 10^{-4}$
DBahA	2,16	18,45	$1,05 \cdot 10^{-10}$	2,36	6,68	$2,81 \cdot 10^{-4}$	2,36	7,97	$9,31 \cdot 10^{-5}$
BghiP	2,26	22,98	$2,66 \cdot 10^{-9}$	2,57	25,04	$1,90 \cdot 10^{-6}$	2,57	23,12	$2,82 \cdot 10^{-6}$
IP	2,16	21,34	$1,67 \cdot 10^{-11}$	2,31	21,46	$2,34 \cdot 10^{-8}$	2,31	19,48	$5,00 \cdot 10^{-8}$

Fonte: Autoria própria (2024)