



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Natan da Cunha

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE ALTA FREQUÊNCIA
COMBINANDO POLÍMERO DE IMPRESSÃO MOLECULAR E MICROEXTRAÇÃO
EM FILME FINO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS EM AMOSTRAS
DE CERVEJA E IDENTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA**

Florianópolis

2026

Natan da Cunha

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE ALTA FREQUÊNCIA
COMBINANDO POLÍMERO DE IMPRESSÃO MOLECULAR E MICROEXTRAÇÃO
EM FILME FINO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS EM AMOSTRAS
DE CERVEJA E IDENTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Coorientador: Dr. Lucas Morés

Florianópolis

2026

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Cunha, Natan da

Desenvolvimento de metodologia de alta frequência combinando polímero de impressão molecular e microextração em filme fino para a quantificação de aflatoxinas em amostras de cerveja e identificação cromatográfica / Natan da Cunha ; orientador, Eduardo da Rocha Carasek, coorientador, Lucas Morés, 2026.

79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2026.

Inclui referências.

1. Química. 2. TF-SPME. 3. MIP. 4. Aflatoxinas. 5. Cerveja. I. Carasek, Eduardo da Rocha. II. Morés, Lucas. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Natan da Cunha

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE ALTA FREQUÊNCIA
COMBINANDO POLÍMERO DE IMPRESSÃO MOLECULAR E MICROEXTRAÇÃO
EM FILME FINO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS EM AMOSTRAS
DE CERVEJA E IDENTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado em 27 de fevereiro de 2026, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Dr^a. Camila Marchioni
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Habdias de Araujo Silva Neto
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.Dr. Alexandre Luis Parize
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Orientador(a)

Florianópolis, 2026.

Aos meus pais por ser minha base estruturante, ao meu irmão por ser exemplo, à minha noiva pelo amor e apoio incondicional, e principalmente, aos meus avós, raízes perenes do que sou.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar a minha mais sincera gratidão àqueles que tornaram um sonho possível.

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me permitido ter uma segunda chance de viver, sobrevivendo ao acidente de dezembro de 2022, superando as dificuldades da UTI de todo o tratamento e recuperação. Essa recuperação não seria possível sem o apoio e cuidados da minha família, agradeço imensamente aos meus pais, Mauro e Goreti, por terem acreditado em mim, lutado junto comigo em meio a dificuldade. Agradeço também à minha noiva, Larissa, que acreditou no impossível e esteve presente nos meus momentos mais difíceis. Ao meu irmão e minha cunhada, Lucas e Deborah, por terem sido apoio e inspiração. A minha avó Marli (*in memoriam*), que sempre acreditou, sempre amou e foi presente na minha vida, bem como, o meu avô José, o qual fez parte da minha criação e sempre me ensinou os valores de uma verdadeira vida boa, uma vida simples.

À professora Dra. Adriana, a qual foi um farol de exemplo e motivação para buscar um sonho – o qual, para mim, era distante de mais – mas que através do projeto de pesquisa, de um trabalho docente de natureza ímpar, tornou-se o estopim na minha busca por algo além, por um sonho.

À professora Dra. Agnes, a sua dedicação pelo curso de Licenciatura em Química, o seu conhecimento mais diverso da Química, foram sopros de vento que me permitiram alçar voo para buscar novos horizontes. A sua visão de mundo pelas lentes da Química, a qual discutíamos nas aulas do curso noturno, é sem dúvida algo pela qual a vida dedicada à Química vale a pena.

Ao meu orientador professor Dr. Eduardo Carasek, que acredito não saber, o quão importante foi em minha vida, ao me permitir fazer parte de um grupo de pesquisa excepcional, ser um incentivador e possibilitador das mais inacreditáveis oportunidades, as quais foram degraus em direção a uma evolução.

Ao Dr. Lucas Morés, meu coorientador, por toda a sabedoria, e incentivo em meio a tantas incertezas e dificuldades. Seus conselhos precisos e necessários fizeram parte da escalada na busca da excelência. Além disso, seu posicionamento bem definido e a sua coerência, tornaram possível alcançar o topo deste desafio. Não obstante, a partir do convívio com a sua pessoa, entendi que acreditar em um objetivo distante era apenas questão de perspectiva.

Ao professor Dr. Diego Galvan por ser um excelente professor e apoiador nas ideias, nos desafios, por incentivar sempre no sucesso do trabalho proposto, além de sempre se disponibilizar para tirar dúvidas e explicações sobre estatística.

Aos colegas e ex-colegas do CroMaas, Ricardo, Luciane, Fran, Natália, Luiza e Amanda, o convívio com vocês me moldou em ser uma melhor versão de mim. As memórias construídas no agora que serão lembradas no futuro, serão de certeza, certeza que o acaso – Deus – me levou exatamente para o local em que eu deveria estar, não com outros, mas com vocês, pessoas que exprimem no olhar uma leveza e uma verdadeira fonte de empatia, amizade, e sobretudo, carisma.

Ao Arthur, um excelente amigo, o qual dividimos o aluguel, com sua rotina dedicada a diversas atividades estruturantes na formação pessoal e na fé, foram exemplos na minha vida para alcançar uma versão verdadeira de mim.

Ao Cassio, um grande amigo, o qual em meio a dúvidas e incertezas de uma carreira no futuro, me inspirou de forma simples e direta, sem atalhos, mas com dedicação através do caminho das pedras para alcançar o que sou de verdade. Uma pessoa que diariamente foi exemplo de dedicação e excelência no que faz, com entusiasmo e carisma, faz parte de memórias importantes na construção da minha vida.

Ao professor Dr. Alexandre Parize, Dr. Rodrigo Saatkamp e ao POLIMAT de maneira geral, agradeço por toda a disponibilidade e apoio para a síntese e caracterização do MIP e do NIP, desde o início, acolheram, com muito entusiasmo, o desafio de fazer este trabalho acontecer.

À professora Tati e ao IFC-Brusque por ter cedido amostras de cerveja para o progresso do trabalho, além de todo o carisma e apoio.

À todos aqueles que de forma direta e indireta fizeram parte da minha trajetória com críticas e elogios, os quais foram combustível para todo o percurso, bem como, a UFSC e o PPGQ pela estrutura e qualidade ensino, Muito Obrigado!

“[...]Forget your lust for the rich man’s gold, all that you need is in your soul, and you can do this, if you try, all that i want for you, my son, is to be satisfied [...]”
(Simple Man, Lynyrd Skynyrd, 1973).

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica de alta frequência para a determinação simultânea das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em amostras de cerveja, empregando microextração em fase sólida em filme fino (TF-SPME) combinada ao uso de polímero molecularmente impresso (MIP) como fase extratora em sistema semi-automático de placa de 96 poços (96 *well plate*), com posterior determinação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FLD). A cerveja, por se tratar de uma matriz complexa e amplamente consumida, apresenta desafios analíticos significativos, especialmente no monitoramento de micotoxinas termorresistentes e altamente tóxicas, como as aflatoxinas. O MIP foi sintetizado por polimerização de precipitação utilizando um template dummy estruturalmente semelhante às aflatoxinas, visando maior seletividade, menor toxicidade e alinhamento aos princípios da Química Analítica Verde (GAC). A caracterização do MIP e do polímero não impresso (NIP) foi realizada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), análise termogravimétrica (TGA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), confirmando a formação do polímero, sua estabilidade térmica e sua morfologia microesférica. A metodologia de TF-SPME foi avaliada e otimizada por abordagens multivariadas e univariadas diretamente em amostras reais, sem a necessidade de derivatização dos analitos. As condições ótimas encontradas foram a partir do uso de fita adesiva dupla face de 2 cm com MIP, condicionamento da fase extratora em 20 min com ACN, com tempo de extração e dessorção em 50 e 20 min, respectivamente, com pH em 4,6, o solvente de dessorção sendo a ACN, sem a necessidade de diluir a amostra e realizar limpezas no material extrator após a dessorção. Os parâmetros analíticos foram determinados com limite de quantificação (LOQs) e limite de detecção (LODs) de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,30 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. O coeficiente de determinação (R^2), para os 4 analitos foi superior a 0,9811. A precisão foi avaliada no intradia (n=3) com RSD% $\leq 17,97$. A metodologia desenvolvida mostrou-se eficiente, seletiva e compatível com sistemas semiautomatizados, possibilitando alta frequência analítica e redução do consumo de solventes e resíduos, configurando-se como uma alternativa promissora para o monitoramento de aflatoxinas em cerveja.

Palavras-chave: TF-SPME; MIP; Aflatoxinas; Cerveja.

ABSTRACT

This study aimed to develop a high-throughput analytical methodology for the simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in beer samples, employing thin-film solid-phase microextraction (TF-SPME) combined with a molecularly imprinted polymer (MIP) as the extraction phase in a semi-automated 96-well plate system, followed by determination using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD). Beer, as a complex and widely consumed matrix, poses significant analytical challenges, particularly in the monitoring of thermoresistant and highly toxic mycotoxins such as aflatoxins. The MIP was synthesized by precipitation polymerization using a dummy template structurally similar to aflatoxins, aiming to achieve higher selectivity, lower toxicity, and compliance with the principles of Green Analytical Chemistry (GAC). Characterization of the MIP and the non-imprinted polymer (NIP) was performed by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), thermogravimetric analysis (TGA), and scanning electron microscopy (SEM), confirming polymer formation, thermal stability, and microspherical morphology. The TF-SPME methodology was evaluated and optimized using multivariate and univariate approaches directly in real samples, without the need for analyte derivatization. The optimal conditions were established using 2 cm double-sided adhesive tape coated with MIP, extraction phase conditioning for 20 min with acetonitrile, extraction and desorption times of 50 and 20 min, respectively, pH adjusted to 4.6, acetonitrile as the desorption solvent, without the need for sample dilution or post-desorption cleaning of the extraction material. The analytical parameters were determined with limits of quantification (LOQs) and limits of detection (LODs) of approximately $1 \mu\text{g L}^{-1}$ and $0.30 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The coefficient of determination (R^2) for the four analytes was higher than 0.9811. Precision was evaluated under intraday conditions ($n = 3$), with $\text{RSD}\% \leq 17.97$. The developed methodology proved to be efficient, selective, and compatible with semi-automated systems, enabling high analytical throughput and reduced solvent consumption and waste generation, thus representing a promising alternative for aflatoxin monitoring in beer.

Keywords: TF-SPME; MIP; Aflatoxins, Beer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Típico Processo Cervejeiro.	19
Figura 2 - Estrutura Molecular das AFs.	20
Figura 3 - Visão geral do impacto das aflatoxinas.	21
Figura 4 - Cromatograma das aflatoxinas.....	22
Figura 5 - Ilustração da SPME.....	27
Figura 6 - Modos de operação da TF-SPME.	31
Figura 7 - TF-SPME com 96 <i>well plate</i>	32
Figura 8 - Ilustração da síntese do MIP.	34
Figura 9 - Relação entre DMC e AFs.....	35
Figura 10 - Fabricação do Filme Fino.	41
Figura 11 – Resultado do FT-IR.	47
Figura 12 - Resultado TGA.	48
Figura 13 - Resultado MEV.....	49
Figura 14 - Gráfico de Efeito da Fita.....	50
Figura 15 - Comparação entre as fitas com material extrator.....	51
Figura 16 - Gráfico do Efeito do Condicionamento.	52
Figura 17 - Gráfico do Efeito de Diluição.	53
Figura 18 - Gráfico de Efeito de memória (<i>Carry Over</i>).	54
Figura 19 - Superfície de Resposta do Solvente de Dessorção.	55
Figura 20 - Perfil de Desejabilidade da Média Geométrica.....	56
Figura 21 - Tempo de Dessorção.	57
Figura 22 - <i>Doehlert</i> : Tempo de Extração e pH.	58
Figura 23 - Perfis de Desejabilidade entre os analitos.....	76
Figura 24 - Desejabilidade Global - Modelo Doehlert	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Experimentos do <i>Simplex-centróide</i>	44
Tabela 2 - Matriz <i>Doehlert</i>	45
Tabela 3 - Parâmetros Analíticos.....	59
Tabela 4 - Comparação com outros trabalhos.....	60
Tabela 5 - Resultado da ANOVA do condicionamento.	74
Tabela 6 - Resultado da ANOVA do efeito da diluição	74
Tabela 7 - Resultado da ANOVA do efeito de memória	74
Tabela 8 - Resultado da ANOVA no estudo do efeito da fita	75
Tabela 9 - Resultado da ANOVA para o modelo <i>simplex-centróide</i>	75
Tabela 10 - Resultado da ANOVA para o tempo de dessorção.....	76
Tabela 11 - Resultados da otimização de tempo de extração e pH pelo planejamento <i>Doehlert</i>	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AFs	Aflatoxinas B1,B2,G1 e G2
AIBN	2,2'-azobisisobutironitrila (do inglês, 2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais (do inglês, Association of Official Analytical Chemists)
CH ₃ COOH	Ácido Acético
DI	Imersão direta (do inglês, <i>Direct imersion</i>)
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês, <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>)
DMC	5,7-dimetóxicumarina
DoE	Planejamento de experimentos (do inglês, <i>Design of Experiments</i>)
DVB	Divinilbenzeno
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
GAC	Química Analítica Verde (do inglês, <i>Green Analytical Chemistry</i>)
GC	Cromatografia Gasosa (do inglês, <i>Gas chromatography</i>)
HF-LPME	Microextração em fase líquida em fibra oca (do inglês, <i>Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction</i>)
HPLC-FLD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection</i>)
HS	Espaço de cabeça (do inglês, <i>Headspace</i>)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (do inglês, <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
LLE	Extração Líquido-Líquido (do inglês, <i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LMTs	Limites Máximos Toleráveis
LOD	Limite de Detecção (do inglês, <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de Quantificação (do inglês, <i>Limit of Quantitation</i>)
LPME	Microextração em fase líquida (do inglês, <i>Liquid Phase Microextraction</i>)
MAA	Ácido Metacrílico
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

MIP	Polímero de Impressão Molecular (do inglês, <i>Molecularly Imprinted Polymer</i>)
NIP	Polímero Molecularmente Não-impresso (do inglês, <i>Non-imprinted Polymer</i>)
ODS	Objetivo de Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
R ²	Coeficiente de Determinação
SDME	Microextração em gota única (do inglês, <i>Single Drop Microextraction</i>)
SPE	Extração em Fase Sólida (do inglês, <i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração em Fase Sólida (do inglês, <i>Solid Phase Microextraction</i>)
TFA	Ácido Trifluoracético (do inglês, <i>Trifluoroacetic acid</i>)
TFAA	Anidrido Trifluoracético (do inglês, <i>Trifluoroacetic anhydride</i>)
TF-SPME	Microextração em Fase Sólida em Filme Fino (do inglês, <i>Thin-Film Solid Phase Microextraction</i>)
TGA	Análise Termogravimétrica (do inglês, <i>Thermogravimetric analyses</i>)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1.	CERVEJA	17
2.2.	AFLATOXINAS	19
2.3.	CONTAMINAÇÃO NA CERVEJA	23
2.4.	PREPARO DE AMOSTRA	25
2.5.	TÉCNICAS MINIATURIZADAS	26
2.5.1.	<i>MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)</i>	<i>27</i>
2.5.2.	<i>MICROEXTRAÇÃO EM FILME FINO</i>	<i>30</i>
2.5.3.	<i>POLÍMEROS BIOMIMÉTICOS.....</i>	<i>33</i>
2.6.	METODOLOGIA SUSTENTÁVEL	36
3.	OBJETIVOS.....	37
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4.	METODOLOGIA	38
4.1.	MATERIAIS E REAGENTES	38
4.2.	INSTRUMENTAÇÃO	38
4.3.	SÍNTESE DO MIP E DO NIP	39
4.4.	CARACTERIZAÇÃO MIP E NIP	39
4.5.	EXTRAÇÃO DO TEMPLATE.....	40
4.6.	AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO MIP	40
4.7.	FABRICAÇÃO DO FILME FINO	41
4.7.1.	<i>CONDICIONAMENTO DA FASE EXTRATORA</i>	<i>41</i>
4.7.2.	<i>EFEITO DO SUPORTE DA FITA ADESIVA</i>	<i>42</i>
4.7.3.	<i>DILUIÇÃO DA CERVEJA.....</i>	<i>42</i>
4.8.	OTIMIZAÇÕES	43
4.8.1.	<i>EFEITO DE LIMPEZA – CARRY OVER</i>	<i>43</i>
4.8.2.	<i>SOLVENTE DE DESSORÇÃO</i>	<i>43</i>

4.8.3.	OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE DESSORÇÃO	44
4.8.4.	OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO E pH	44
4.9.	PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1.	MIP e NIP	46
5.1.1.	CARACTERIZAÇÃO DO MIP e DO NIP	46
5.1.1.1.	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	46
5.1.1.2.	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	47
5.1.1.3.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	48
5.1.2.	AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO MIP	49
5.2	EFEITO DO SUPORTE DE FITA ADESIVA.....	50
5.3	CONDICIONAMENTO DA FASE EXTRATORA.....	51
5.4	EFEITO DA DILUIÇÃO DA AMOSTRA	52
5.5	EFEITO DE MEMÓRIA (CARRY OVER).....	53
5.6.	OTIMIZAÇÕES	54
5.6.1.	SOLVENTE DE DESSORÇÃO.....	54
5.6.2.	TEMPO DE DESSORÇÃO	56
5.6.3.	TEMPO DE EXTRAÇÃO E PH.....	57
5.7.	PARÂMETROS ANALÍTICOS	59
5.8.	COMPARAÇÃO DE RESULTADOS.....	60
6.	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXO 1 – ANOVA DO CONDICIONAMENTO DA FASE EXTRATORA.....	74
	ANEXO 2 – ANOVA DO EFEITO DA DILUIÇÃO DA AMOSTRA	74
	ANEXO 3 – ANOVA DO EFEITO DE MEMÓRIA	74
	ANEXO 4 – ANOVA DO EFEITO DA FITA	75
	ANEXO 5 – ANOVA E DESEJABILIDADE DO MODELO SIMPLEX CENTRÓIDE	75
	ANEXO 6 – ANOVA DO TEMPO DE DESSORÇÃO.....	76
	ANEXO 7 – ANOVA DO RESULTADO DO MODELO DOEHLERT	77

1. INTRODUÇÃO

A bebida fermentada foi uma ferramenta de suma importância na coerção social dos grupos tribais, utilizada para fins de trabalhos comunitários e inclusive agregação de valor de recompensas em sociedades ancestrais, como a do Antigo Egito. A cerveja tornou-se uma das bebidas fermentadas mais consumidas do mundo, com processos a base de cereais, água, leveduras e temperatura, além das diversas técnicas diferentes para a produção dos mais variados sabores. No entanto, diante do alto consumo do produto, há uma preocupação crescente quanto a qualidade deste, visto que o mesmo é passível de contaminação por aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, metabólitos secundários dos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*.

As aflatoxinas são compostos com polaridade intermediária ($\text{LogKow} \approx -0,27$ a $1,45$) levemente solúveis em água e completamente solúveis em compostos com polaridade moderada, como mentol, clorofórmio, acetonitrila, entre outros. Portanto, a sua solubilidade ocorre em compostos orgânicos presentes em alimentos resultando em contaminação, a qual é amplamente investigada.

Em 1960 na Inglaterra mais de cem mil perus foram mortos, a causa do problema foi a contaminação da ração dos animais por aflatoxinas, desta forma, diversos estudos foram realizados com as aflatoxinas, estas foram classificadas como B1, B2, G1, G2, M1 e M2, as mais encontradas em alimentos. Suas características lipofílicas e a resistência térmica permitem contaminar ao longo de toda a cadeia produtiva, e alcançar o consumidor. Além disso, observou-se a sua alta capacidade carcinogênica no fígado, relacionado à sua capacidade lipofílica, entre as quais a aflatoxina B1 é a que possui a maior capacidade, reconhecido pela Agência Internacional em Pesquisa em Câncer (IARC).

Portanto, agências governamentais, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estipularam limites máximos toleráveis (LMTs) destes compostos para monitoramento da qualidade do produto.

Consequentemente, o monitoramento dessas aflatoxinas é realizado através de metodologias analíticas, porém, produtos alimentícios, como a cerveja, representam um desafio analítico inerente a sua natureza complexa, repleta de compostos interferentes às técnicas analíticas. Novas metodologias analíticas

surtem a fim de superar os desafios analíticos presentes, bem como, para atualizar metodologias analíticas ultrapassadas.

O alicerce da metodologia analítica são as técnicas de preparo de amostra as quais visam alcançar métodos mais seletivos e sensíveis para identificação e determinação dos analitos, principalmente em pequenas concentrações, além de permitir que amostras incompatíveis com injeção direta nos instrumentos de separação e detecção, sejam passíveis de análise através do preparo de amostra.

As técnicas de preparo de amostras almejam não somente solucionar os desafios analíticos, buscam também atender aos princípios da Química Analítica Verde (GAC), principalmente as técnicas miniaturizadas, permitindo maiores eficiências de extração e segurança ao analista. As técnicas clássicas, entre elas a extração em fase sólida (SPE), foi precursora da técnica miniaturizada a microextração em fase sólida (SPME). Por sua vez, surge a partir da SPME a microextração em filme fino (TF-SPME) como uma adaptação que supera os limites da técnica original. Desta forma, as vantagens da TF-SPME como técnica recente é amplamente explorada para novas metodologias analíticas, podendo ser acoplada a sistemas automatizados, como a placa de 96 poços (96 *well plate*), os quais permitem a realização de operações simultâneas sem o contato do analista, reduzindo o erro do método e aprimorando a frequência analítica.

Na busca por atingir os princípios do GAC, a substituição de fases extratoras comerciais, as quais fazem parte das técnicas apresentadas, por materiais de fabricação própria que utilizem reagentes que reduzam impactos ao meio ambiente e ao analista são cruciais, entre eles, os polímeros molecularmente impressos, MIPs, são uma classe de compostos que substituem fases extratoras comerciais, pois, as suas características únicas de seletividade, baixo custo e estabilidade o tornam um material ideal para ser utilizado como fase extratora. Os MIPs são resultados de uma polimerização de um monômero funcional complexado com uma molécula *template* (molde), que após a polimerização, a molécula de *template* é extraída do complexo polimérico, resultando em espaços vazios, sítios ativos, exatamente iguais a estrutura da molécula extraída. Desta forma, os MIPs são polímeros que simulam a relação antígeno e anticorpo observado na natureza, na qual o sítio ativo do antígeno possui o complemento da estrutura do anticorpo, resultando em uma alta seletividade.

Além disto, a substituição dos reagentes para síntese dos MIPs por opções mais ambientalmente amigáveis é um esforço válido para uma síntese mais verde. Entre os reagentes, a substituição das moléculas de *template* é primordial, visto que, usualmente o *template* utilizado é o próprio analito, o qual, pode ser prejudicial ao meio ambiente ao analista e de alto custo (alta pureza do reagente). Nesse cenário, a utilização de *template dummy* (molde substituto) é empregado com uma molécula que possui estrutura molecular similar ao do analito, ou classe de analito, porém, com menor toxicidade, e mantendo a estabilidade necessária para a síntese.

Em relação a isto, este estudo investigou o uso de MIP como fase extratora na TF-SPME em um sistema semiautomático para determinação simultânea das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em amostras de cerveja, com determinação quantitativa realizada por meio de cromatográfica líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLD). Além de redução das interferências da matriz, o arranjo técnico é uma alternativa viável diante das vantagens como a eficiência de extração e pré-concentração da TF-SPME, alta seletividade fornecida pelo emprego do MIP e alta frequência analítica através do 96 *well plate*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CERVEJA

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo (174 bilhões de litros em 2021) (Statista, 2022). Sendo o Brasil um grande consumidor, ficando em 3º lugar no *ranking* de maior consumidor de cerveja do mundo em 2022, com cerca de 13.944.000 toneladas de cerveja consumida (World Population Review, 2026).

No Egito Antigo (3150 a.C a 30 a.C), a cerveja foi um meio de agregar valor para pagamentos e recompensas, evidenciando a sua importância para aquela sociedade e a relação com as desigualdades sociais (JOFFE, 1998). Além disto, no Oriente Médio rituais festivos envolvendo bebidas fermentadas foram instrumentos auxiliares na manutenção da coesão social e ideológica entre caçadores-coletores, evidências presentes no Göbekli Tepe, sudeste da Turquia, apontam para uma forte relação entre o uso de bebidas fermentadas como uma forma de reunir mão de obra,

garantir a cooperação e promover a coesão do mesmo grupo e entre grupos distintos relacionados em até 200 km de distância (HOCKINGS; DUNBAR, 2019; DIETRICH O, 2012; HAYDEN; CANUEL; SHANSE, 2012). Além disso, a relação da bebida fermentada como um instrumento de coesão social não é exclusiva do Oriente, nos Andes, a produção de *chicha*, bebida fermentada tradicionalmente produzida a partir do milho, definiu as relações sociais, estruturou o desencadeamento das atividades agrícolas e permitiu a legitimidade da formação da elite governante (BAUER, 1996; CUMMINS, 2002).

Distintamente de bebidas tradicionalmente fermentadas, como o saquê, o qual ocorre fermentação paralela, a produção de cerveja segue um processo diferente na qual sacarificação, e fermentação ocorrem sequencialmente (YU et al., 2025). Durante a produção da cerveja, enzimas do malte, cevada germinada, primeiro degradam o amido à açúcares redutores, seguido da fermentação por leveduras, a qual converte maltose e glicose em álcool e dióxido de carbono (KIM, 2020; PARK; KANG, 2020). Os ácidos orgânicos são produzidos por microrganismos, como as bactérias ácidos-lácticas, e componentes de sabor que conferem gosto e aroma à cerveja, além disso, as alfas e beta-amilases convertem a cevada em glicose na sacarificação, seguida da formação de álcool na fermentação pelas leveduras. (YU et al., 2025).

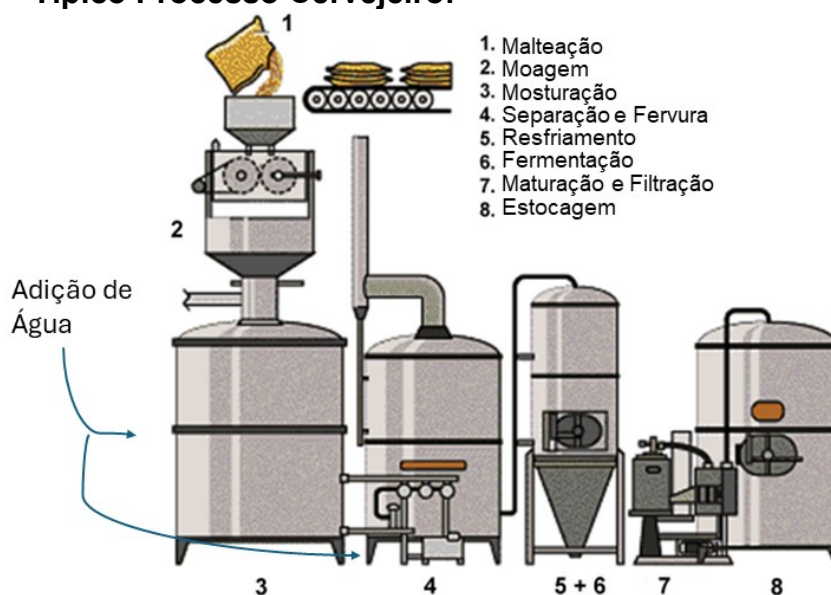
Evidentemente, a qualidade da cerveja depende do mosto, dos subprodutos, do tipo de levedura e das condições de fermentação (LEE, 2019). Desta forma, a influência de variados maltes e intensidade de torrefação, são alguns fatores que influenciam na presença de furanonas, piranona, maltol, pirazinas, fenólicos (2-metoxifenol e 4-metilfenol, por exemplo), ácidos fenólicos, flavonoides, melanoidinas, vitaminas B, minerais, polifenóis antioxidantes, fibra alimentar e componentes prébióticos (BAMFORTH, 2009; SOHRABVANDI; MOUSAVI; RAZAVI, 2010; NARDINI, 2020; SHOPSKA R.; DENKOVA-KOSTOVA; DZHIVODEROVA-ZARCHEVA, 2021; Reglitz et al., 2022; YU et al., 2025).

No Brasil a cerveja é definida segundo o Decreto nº 12.709/25 (BRASIL, 2026), como:

“Cerveja é a bebida resultante da fermentação alcoólica do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção, adicionada de lúpulo ou extrato de lúpulo.”

Sendo que a cevada maltada pode ser substituída por outros grãos (adjuntos cervejeiros), como trigo, sorgo, aveia, centeio, quinoa, amaranto, batata-doce, milho e arroz. (Cadenas et al., 2021; Bogdan; Kordialik-Bogacka, 2017). A Figura 1 apresenta uma ilustração relacionada a um típico processo cervejeiro.

Figura 1 - Típico Processo Cervejeiro.



Fonte: Adaptado de Ruiz-Medina; Córdoba, 2015.

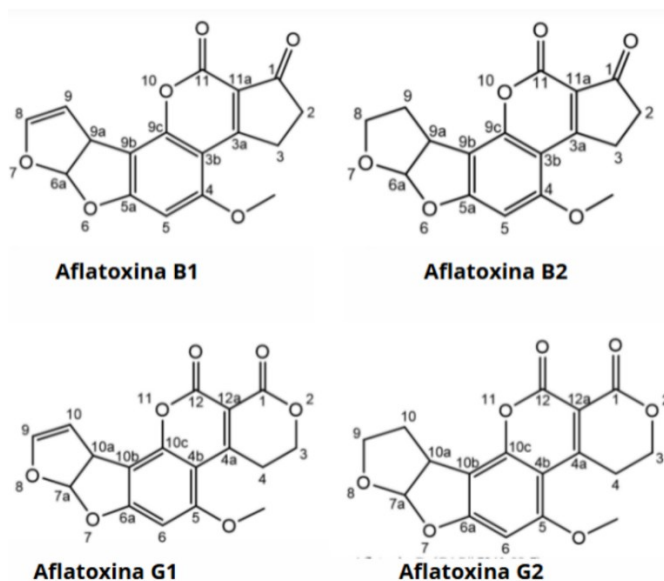
Diante disto, emerge uma preocupação crescente relacionada aos riscos de contaminação da bebida, entre os quais, a contaminação por fungos se destaca, contaminando os adjuntos cervejeiros (grãos cereais) no campo, até mesmo na estocagem, com toxinas que podem contaminar a cadeia produtiva inteira chegando até o consumidor final (Rocha et al., 2023). Entre estas toxinas, destaca-se as aflatoxinas secretadas pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, os quais crescem em ambientes úmidos e quentes, além de outros fatores que promovem o seu desenvolvimento, como o *stress* climático relacionado ao excesso de dióxido de carbono e agrotóxicos, os quais atuam como ameaças aos fungos que por sua vez, secretam as aflatoxinas como instrumento de defesa biológica (Sultana et al., 2024).

2.2. AFLATOXINAS

Na Inglaterra de 1960, inesperadamente ocorreu a morte de mais de 100.000 perus e algumas outras aves, a chamada “doença X dos perus” levou a

investigações, as quais constatarem a presença de aflatoxinas na ração das aves, e a partir disto, iniciou-se as pesquisas a fundo com essa classe de toxinas (Vijaya Kumar, 2018). As principais variantes encontradas das aflatoxinas são a B1, B2, G1, G2 e M1, uma variante hidroxilada da B1. Entretanto, com exceção da M1 que é presente, principalmente, no leite, as demais variantes são encontradas em grãos, com uma estrutura molecular muito similar entre si, apresentadas na Figura 2 (Zhang; Banerjee, 2020).

Figura 2 - Estrutura Molecular das AFs.

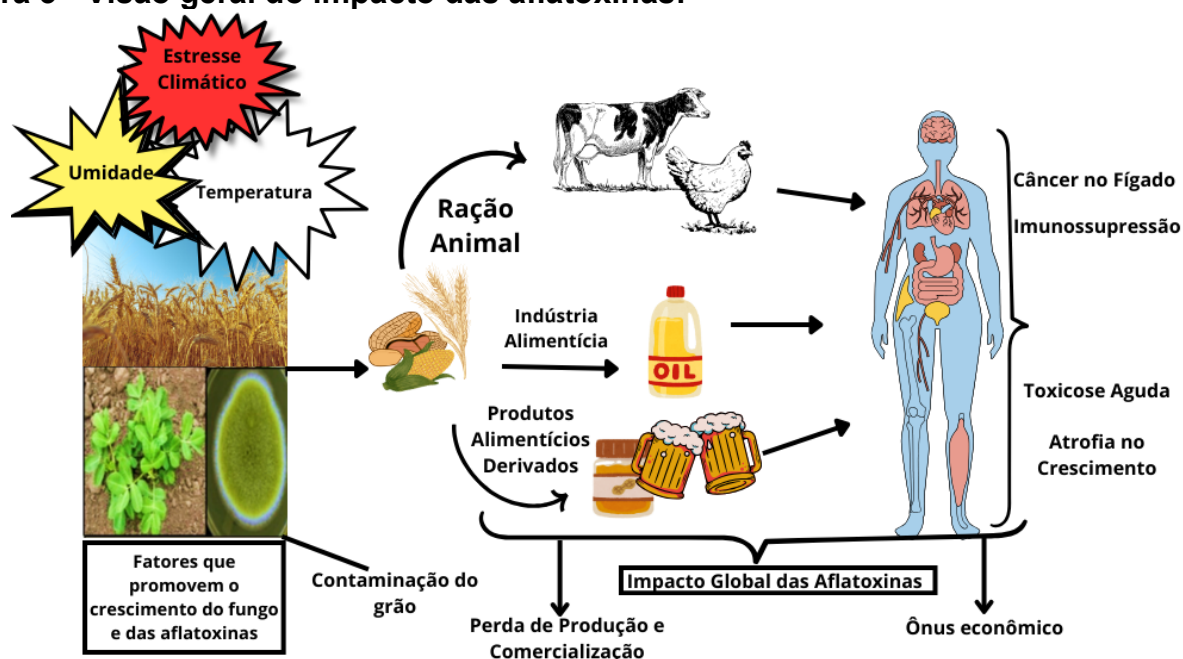


Fonte: Adaptado de Zhang, 2020.

Ao decorrer das pesquisas com as aflatoxinas foi documentado a sua toxicidade pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), e reconhece que as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 são carcinogênicas e hepatóxicas para os seres humanos, sendo elas classificadas como grupo B1 (carcinogênica para humanos). Dentre elas, a mais comum e a com maior potencial de carcinogenicidade é a B1. A sua capacidade tóxica está relacionada com a conversão das aflatoxinas para a forma reativa de 8,9 – epóxido, a qual é capaz de ligar-se ao DNA e as proteínas através das enzimas citocromo P450 nos hepatócitos. A concentração das aflatoxinas no fígado (tecido hepático) deve-se a característica lipofílica do órgão, desta forma, a corrente sanguínea deposita as aflatoxinas ingeridas neste órgão, desencadeando a aflatoxicose (Zhang; Banerjee, 2020; Vijaya Kumar, 2018).

A aflatoxicose atua de duas formas: aguda e crônica. A forma aguda está relacionada a um consumo elevado de aflatoxinas, o qual desencadeia de forma ágil os efeitos deletérios supracitados. Com o consumo de pequenas quantidades de aflatoxinas diariamente, estas se acumulam nos hepatócitos e desencadeiam as doenças de forma crônica (Sultana et al., 2024). Na Figura 3 é apresentando um panorama geral do impacto das aflatoxinas na sociedade.

Figura 3 - Visão geral do impacto das aflatoxinas.



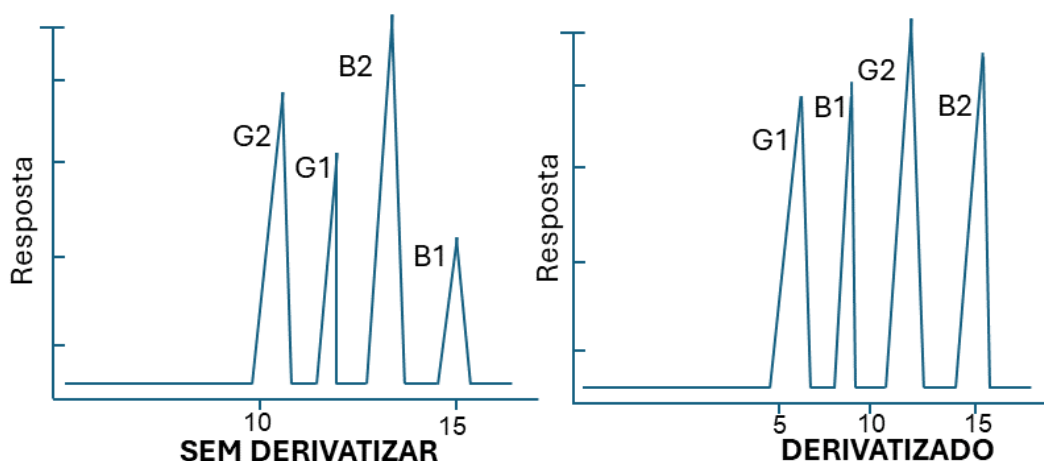
Fonte: Adaptado de Sultana et al., 2024.

O controle e monitoramento efetuado por órgãos reguladores sobre produtos com possibilidade de contaminação com aflatoxinas, é factível com as capacidades termolábeis das aflatoxinas com ponto de fusão entre 237 a 289 °C, o que permite ser resistente a métodos tradicionais de descontaminação. Além disso, são compostos fluorescentes permitindo a sua detecção em comprimentos de excitação e emissão, 450 e 350 nm, respectivamente. Entretanto, em meio aquoso são sensíveis a luz ultravioleta (Vijaya Kumar, 2018).

Porém, na maioria dos métodos analíticos utilizados é explorado ferramentas para o aumento da sensibilidade dos analitos em relação aos sistemas de detecção. Neste sentido, como as aflatoxinas B1 e G1 possuem redução da capacidade fluorescente em meio aquoso, para contornar este problema, processos de derivatização são incluídos nas etapas de preparo de amostra a fim de aumentar a

sensibilidade do método analítico, sendo realizada por duas vias principais: Utilizando uma pré-coluna com meio ácido para hidratar as ligações duplas da B1 e G1, produzindo espécies similares a B2 e G2, respectivamente. Diante disso, como esta reação é proporcional a concentração de H^+ , comumente utiliza-se ácidos fortes como o ácido trifluoracético (TFA) originado pelo anidrido trifluoracético (TFAA) em contato com água. O outro modo, é a utilização de uma pós coluna eletroquímica com Iodo ou Bromo, o qual interage com a estrutura da B1 e G1 modificando a sua emissão fluorescente. Porém, as etapas de derivatização consomem tempo do método, principalmente se for realizado de maneira *offline*, na qual é necessário adicionar à solução específica (para a derivatização ácida) à amostra, após a reação, evapora-se o solvente e então a amostra é readmitida no solvente adequado para a fase móvel (Aliakbarzadeh; Mahmoudi-Meymand; Mazaheri, 2023; Kok, 1994; Simão et al., 2016). A Figura 4 ilustra um cromatograma com e sem derivatização.

Figura 4 - Cromatograma das aflatoxinas



Fonte: Adaptado de (Kok, 1994).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta por meio do RDC nº 722/22, os limites máximos toleráveis (LMTs) de aflatoxinas em diversos alimentos. Sendo estabelecido para o milho o limite $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e para grãos cereais (incluindo a cevada maltada) o valor de $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de AFs totais (ANVISA, 2022). Comparativamente, a União Europeia (EU) por meio do Regulamento nº 915/2023 determina um valor de $2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para a B1 e $4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para o somatório

das AFs presentes em cevada maltada, em milho o valor é de $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para a B1 e $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para o somatório das AFs (European Commission, 2023).

2.3. CONTAMINAÇÃO NA CERVEJA

No processo cervejeiro cinco *comodities* são envolvidas, sendo elas: cevada, lúpulo, água, leveduras e adjuntos. A qualidade dessa matéria-prima implica diretamente nas características organolépticas da cerveja. Sendo o processo incluído pelas etapas de malteação, moagem, mosturação, fermentação, maturação, filtração, estabilização e envase. Entre estas etapas, há a possibilidade contaminação com aflatoxinas, as quais são resistentes a temperatura e pH extremos, portanto, no processo cervejeiro no qual as condições são brandas, a contaminação com aflatoxinas pode ser perpetuada até o produto (Pascari et al., 2018).

Na malteação ocorre a germinação da cevada de maneira controlada (a depender do tipo de malte desejado) nas seguintes etapas: *steeping* (maceração), germinação e torra/forneamento. No *steeping* controla-se a temperatura e a umidade da cevada até atingir cerca de 42 – 48% de água, esse passo é essencial para garantir a ativação das enzimas envolvidas na germinação da cevada. Entretanto, essas condições são favoráveis ao desenvolvimento de fungos, e por conseguinte, das aflatoxinas, podendo ocorrer uma contaminação cruzada entre a presença de micotoxinas na água e na própria cevada contaminada (Pascari et al., 2018).

A fermentação do mosto é iniciada pelas leveduras de *Saccharomyces genus*, diferentes cepas são utilizadas referente ao tipo de cerveja desejada, as mais comuns: cerveja do tipo *ale*, fermentada pela *Saccharomyces cerevisiae* e a *lager* pela *Saccharomyces pastorianus*. Neste processo, ocorrerá a transformação, por meio dos lúpulos, dos açúcares em álcoois e dióxido de carbono, em uma ampla gama de compostos secundários, como ésteres e grandes álcoois. Entretanto, para funcionalização deste processo a temperatura mais comum de fermentação é em torno de 7 a 25°C e 7 a 9 dias, diante disto, a presença de aflatoxinas pode ocorrer, visto que em Resíduos de Fermentação da Cerveja (BFR) encontrou-se uma taxa de adsorção de cerca de 48,1% para AF B1 (Campagnollo et al., 2015; Pascari et al., 2018).

Portanto, com o intuito de avaliar a perpetuação de uma concentração conhecida de aflatoxinas através do processo cervejeiro até o produto. Pietri et al.,

2010 avaliou quatro processos cervejeiros distintos na Itália, conhecendo a concentração inicial das aflatoxinas em comparação com o produto, chegou a um resultado de uma taxa de transferência de 10,5% para a AF B1. Okoye, 1986, encontrou uma taxa de 41,4% para AF B1 em cerveja de milho, Inoue et al., 2013 avaliou amostras em cada etapa do processo, acompanhando a redução de micotoxinas referente a concentração inicial, concluindo que menos de 20% é transferido para a cerveja. Entretanto, não há um método de remoção das aflatoxinas definido, o que ocorre no processo cervejeiro para redução das aflatoxinas no produto, pode estar relacionado com a baixa solubilidade em água, e bem como o processo de filtragem após a fermentação, logo, não há uma eliminação completa destes contaminantes (Ruiz-Medina; Fernández-de Córdoba, 2015; Campagnollo et al., 2015; Kłosowski et al., 2010; Pascari et al., 2018).

No Brasil, Penha et al., 2025 encontraram a presença de AF B1 e B2 em torno de 3 a 16% das amostras de cervejas comerciais analisadas, com o valor médio maior de 0,77 ng.mL⁻¹ para B1, para a B2 apenas 3% das amostras foram encontradas em valores baixos, a G1 e a G2 ficaram abaixo do valor de LOQ. Os autores indicam que a elevada concentração da B1 associada as demais micotoxinas que foram analisadas, além das aflatoxinas, pode ser resultado de um problema de contaminação generalizada nos ingredientes cervejeiros.

Além disso, Rocha et al. (2023) conduziu um trabalho com amostras de cervejas no Brasil, o qual constatou a presença do total de aflatoxinas em 100% das amostras analisadas (60) acima do valor de LOQ. Os autores também avaliaram a hipótese relacionada a presença de adjuntos cervejeiros com o aumento de aflatoxinas, no entanto, encontraram que as amostras de cerveja puro malte (sem adjuntos) possuíam maiores concentrações de B1, diferentemente de outros trabalhos, como o de Burdaspal P. A., et al. (2013), o qual encontrou uma concentração maior de B1 para a cerveja de milho.

De toda a forma, a qualidade da matéria-prima é crucial para que valores risíveis de aflatoxinas estejam presentes no produto, porém, tipicamente em países emergentes, como o Brasil, é comum que a matéria-prima de qualidade seja destinada ao mercado estrangeiro, os grãos de qualidade mediana para o consumo interno, e o restante, a pior parte da produção, é destinado a alimentos processados (Piacentini et al., 2017; Leslie; Logrieco, 2014).

Diante disto, faz-se necessário análises para monitoramento das aflatoxinas nos produtos, no entanto, estas análises não podem ser realizadas de maneira direta, necessitando um preparo da amostra para evitar os interferentes da matriz, concentrar os analitos, garantindo uma reprodutibilidade, e permitir que o analito esteja em uma fase apropriada para os equipamentos analíticos (Soares da Silva Burato et al., 2020; Nováková; Vlčková, 2009).

2.4. PREPARO DE AMOSTRA

A necessidade em avaliar a qualidade da cerveja, monitorando os contaminantes e os seus compostos essenciais impulsiona o desenvolvimento de novas metodologias analíticas (Anderson et al., 2019). As metodologias analíticas são compostas pela chamada “marcha analítica”, e nesta incluem os seguintes passos: Definição do objetivo/analito; Seleção do método; Obtenção da amostra; Preparo da amostra; Medida da propriedade mensurável; Cálculo dos resultados; Estimativa da confiabilidade dos resultados (Skoog et al., 2006).

Esta sequência de etapas bem definidas permite alcançar uma resposta satisfatória em relação ao objetivo da análise. Contudo, é o preparo de amostra que desempenha um papel crucial na metodologia analítica, porque a sua função de pré-concentrar os analitos, mitigar os efeitos da matriz e adequar a amostra à um solvente compatível com a fase móvel de instrumentos analíticos é de suma importância para o sucesso metodológico (Nováková; Vlčková, 2009).

À vista disto, o preparo de amostras desencadeia um papel crucial da metodologia analítica, e, portanto, é um fator determinante para obtenção de sucesso na análise. A fim de alcançar este sucesso analítico, técnicas clássicas foram desenvolvidas como a Extração em Fase Sólida (SPE) e Extração Líquido-Líquido (LLE), as quais foram amplamente difundidas e aplicadas em análises, fazendo parte de métodos oficiais das normativas credenciadas (Zhang; Banerjee, 2020).

Porém, estas técnicas tradicionais eram limitadas a questões pertinentes como o alto consumo de solventes orgânicos, técnicas laboriosas e lentas, dificuldade em lidar com amostras complexas, solventes tóxicos para a exposição do analista, grande geração de resíduos nocivos ao meio ambiente, demanda de

grande quantidade de amostra dificultando o trabalho com amostras *in vivo*, como sangue e saliva, além da dificuldade em automatização (Martins et al., 2025).

Diante deste cenário, a partir do século XX surge as denominadas técnicas miniaturizadas, as quais alinhadas com os princípios da Química Analítica Verde (GAC), possuem o objetivo de reduzir ou substituir solventes orgânicos tóxicos, incrementar a capacidade em integrar etapas em um único processo para facilitar a automatização, reduzir a geração de resíduos, e utilizar materiais ambientalmente amigáveis para aplicação, como por exemplo na etapa de extração (Gałuszka; Migaszewski; Namieśnik, 2013; Martins et al., 2025).

2.5. TÉCNICAS MINIATURIZADAS

As técnicas miniaturizadas foram desenvolvidas a partir das técnicas convencionais, porém, superando as suas limitações, utilizando equilíbrios não exaustivos, ou seja, sem a necessidade de extrair todo o analito da amostra para entrar em equilíbrio, permitindo um aumento da agilidade nas metodologias analíticas, além dos avanços em enriquecimento, automação, entre outros (Carasek; Scur; Bernardi, 2023).

Entre as principais técnicas miniaturizadas a Microextração em Fase Sólida (SPME) desenvolvida em 1990 por Janusz Pawliszyn e colaboradores, surgiu como um aprimoramento dos cartuchos da SPE (Pawliszyn; Arthur, 1990). A partir desta técnica ocorreu uma grande busca pela miniaturização de outras técnicas. À vista disto, as técnicas de Microextração em Fase Líquida (LPME) surgem a partir de 1995, com a introdução de uma nova técnica que utiliza gotas líquidas como fase extratora chamada de Microextração em gota única (SDME), sendo a gota uma interface para a amostra, visando, inicialmente, uma análise de compostos voláteis (Liu; Dasgupta, 1995; Jeannot; Cantwell, 1996).

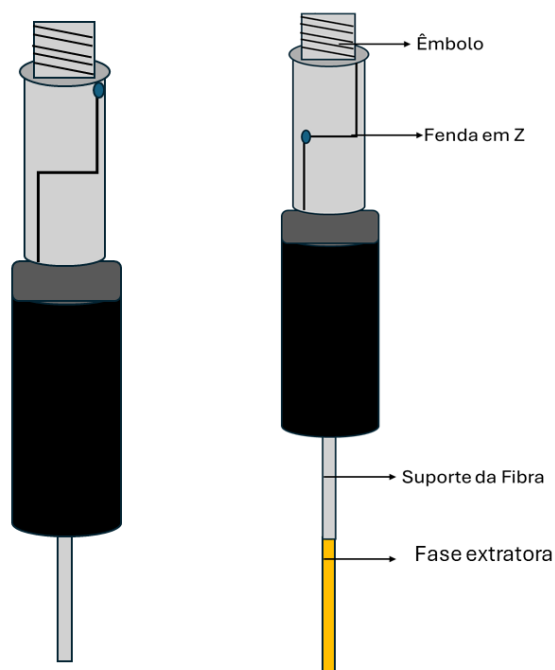
Após estas técnicas pioneiras, e a percepção do sucesso destas, outras variações começaram a surgir. A partir da LPME surgiram outras variações, sendo as mais comuns: a microextração líquido-líquido por si (LLME), a mencionada anteriormente, SDME, microextração em fase líquida em fibra oca (HF-LPME) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). No entanto, as técnicas de microextração em fase sólida por serem versáteis, livres de solventes, e que necessitam de poucas etapas para introdução da amostra em instrumentos

analíticos foram amplamente investigadas (Soares da Silva Burato et al., 2020; Wang et al., 2026).

2.5.1. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

A microextração em fase sólida (SPME), a qual utiliza um suporte de sílica fundida em formato de bastão recoberta por uma camada de fase extratora acoplada a uma estrutura similar a uma seringa. É uma das técnicas miniaturizadas baseada em sorção mais utilizada, desenvolvida para simplificar etapas de preparo de amostra reduzindo o tempo de análise, além da redução do uso de solventes. Esta técnica pode ser aplicada no modo de imersão direta (DI) ou *headspace* (HS), sendo adequada para análises de amostras alimentícias, drogas, gasosas ou líquidas (Soares da Silva Burato et al., 2020).

Figura 5 - Ilustração da SPME.



Fonte: Autoria Própria (2026)

Na ilustração apresentada na Figura 5, observa-se o conjunto completo da SPME sendo a exposição e retração da fibra controlada pelo êmbolo, a agulha de aço inoxidável permite a proteção da fibra quando retraída (suporte da fibra), além disto, o pino em formato de Z, denominado *Holder*, permite realizar o movimento de exposição mencionado (Pawliszyn; Arthur, 1990).

A exposição controlada possibilita a extração dos analitos, após o equilíbrio de extração, a fibra é retraída e exposta, novamente, em um injetor de GC para realizar uma dessorção térmica dos analitos. Esta etapa é direcionada para analitos voláteis e normalmente empregada no modo HS, entretanto, há também o emprego no modo de imersão direta, indicada para analitos de média a baixa volatidade, e em situações que não apresentam riscos de danos para a fibra (Jalili; Barkhordari; Ghiasvand, 2020).

A SPME é uma técnica de extração não exaustiva na qual, apenas uma parcela da totalidade do analito é extraído, no modo HS um sistema trifásico está presente, no qual os analitos migram entre a matriz, o volume do HS, e a fase extratora, a extração encerra-se quando o equilíbrio é atingido, portanto, em um tempo específico, além disso, este tempo está relacionado com as propriedades físico-químicas dos analitos, a agitação da matriz, a interface entre a amostra e o HS e o aquecimento da matriz ou resfriamento da fibra (Jalili; Barkhordari; Ghiasvand, 2020)(Lancioni et al., 2022). Essa transferência de massa ocorre de acordo com as condições de equilíbrio descritas na Equação 1 (Jalili; Barkhordari; Ghiasvand, 2020).

Equação 1 – Condições de Equilíbrio da SPME.

$$C_0 V_S = C_S^\infty V_S + C_f^\infty V_f$$

Na qual, C_S^∞ e C_f^∞ são a concentração do analito no equilíbrio na amostra e na fibra, respectivamente, juntamente com os seus volumes respectivos. A partir da Equação 1, calcula-se pela Equação 2 o coeficiente de distribuição (K_{fs}) entre a amostra e a fase extratora (Jalili; Barkhordari; Ghiasvand, 2020).

Equação 2 – Coeficiente de Distribuição.

$$K_{fs} = \frac{C_f^\infty}{C_S^\infty}$$

Com isto, esta equação descreve o equilíbrio estabelecido entre a fase extratora e a amostra, com a combinação da Equação 1 com a Equação 2 calcula-se a Equação 3.

Equação 3 - Concentração do analito em equilíbrio na fibra.

$$C_f^\infty = C_0 \frac{K_{sf} V_s}{K_{sf} V_f + V_s}$$

Diante desta equação, observa-se a relação do coeficiente de distribuição entre a fase extratora e a amostra com a concentração inicial do analito, permitindo encontrar o valor de concentração final, no equilíbrio, na fase extratora. Além disso, assumindo que o volume da amostra (V_s) é muito maior que o volume da fibra (V_f), pode se calcular por meio da Equação 4, a quantidade total de mols de analito extraído pela fase extratora (Pawliszyn; Arthur, 1990).

Equação 4 - Total de mols de analito extraído.

$$n = C_f^\infty V_f = C_0 \frac{K_{fs} V_s V_f}{K_{fs} V_f + V_s}$$

Esta equação revela que o número de mols de analito extraído (n) é proporcional a concentração do analito na matriz, ou seja, mesmo sendo uma extração não-exaustiva, a SPME pode ser utilizada como análise quantitativa (Lancioni et al., 2022; Jalili; Barkhordari; Ghiasvand, 2020; Pawliszyn; Arthur, 1990).

Na SPME, observa-se pela Equação 4 que o volume da fase extratora (V_f) está relacionado com o número de mols de analito, sendo assim, o aumento deste volume, bem como, o aumento da área superficial e porosidade, aumentam a eficiência desta técnica. Para isto, é necessário realizar uma mudança geométrica na disposição da fase extratora, como na SPME a geometria é um cilindro, uma forma geométrica a qual aumenta o volume, é a fórmula retangular presente na

técnica de microextração em fase sólida em filme fino (TF-SPME)(Piri-Moghadam; Alam; Pawliszyn, 2017;Jiang; Pawliszyn, 2012;Wieczorek, 2024).

2.5.2. MICROEXTRAÇÃO EM FILME FINO

A TF-SPME foi apresentada em 2003 por Bruheim e colaboradores, com o objetivo de superar as limitações da técnica precursora a SPME. Entre as limitações, a necessidade de altas temperaturas para dessorção térmica de alguns analitos polares, a qual degradava a fibra e, muitas vezes, o próprio analito, a fragilidade da fibra, e principalmente, a limitação de área superficial (Bruheim; Liu; Pawliszyn, 2003).

Diferentemente da SPME, o formato retangular da TF-SPME permite que uma quantidade maior de mols de analito seja extraída, incrementando diretamente a sensibilidade do método analítico, sem prejudicar o tempo de equilíbrio de extração, como apresentado na Equação 4, similarmente a SPME. De mesma maneira, a TF-SPME pode ser aplicada no modo *Headspace* e no modo de imersão direta, com uma distribuição de sorvente em uma espessura menor, entretanto, com uma área superficial maior. A teoria cinética de extração da TF-SPME, presente na Equação 5, ilustra como a modificação geométrica resulta em uma melhor eficiência de extração (Jiang; Pawliszyn, 2012).

Equação 5 – Cinética de Extração da TF-SPME.

$$t_{95\%} = 3 \frac{\delta K_{fs}(b - a)}{D}$$

Na qual exprime a relação entre o tempo de equilíbrio de extração ($t_{95\%}$), com o coeficiente de partição dos analitos no equilíbrio entre as fases (K_{fs}), a espessura de recobrimento do sorvente ($b - a$), a espessura da camada limite (δ), presente ao redor da fase extratora, e por fim, o coeficiente de difusão dos analitos (D). Diretamente, observa-se a relação entre o tempo de equilíbrio e a espessura de recobrimento do sorvente, a qual demonstra que menores espessuras de fase extratora resultam em tempos de equilíbrio menores. Além disso, uma fase extratora com uma área superficial maior acelera a taxa de extração dos analitos, como

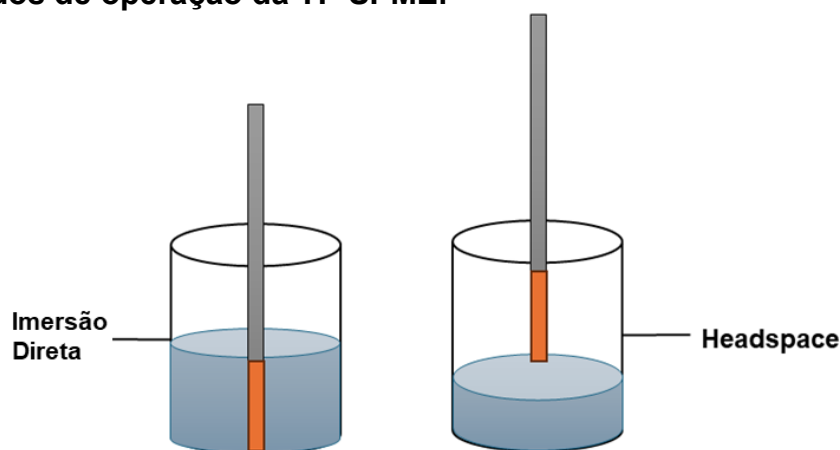
demonstrado na Equação 6, sendo que a taxa de extração inicial (dn/dt) é proporcional a área superficial da fase extratora (A), o coeficiente de difusão do analito (D) e a concentração de analito na amostra (C_s) (Jiang; Pawliszyn, 2012).

Equação 6 – Taxa de extração em relação a área superficial.

$$\frac{dn}{dt} = \left(\frac{DA}{\delta} \right) C_s$$

A Figura 6 ilustra os modos de aplicação da TF-SPME, *headspace* e imersão direta.

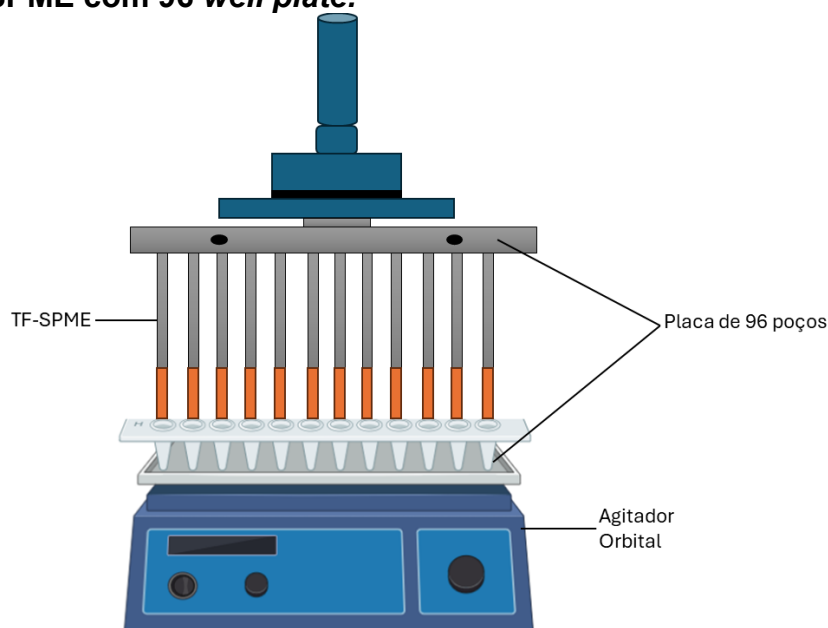
Figura 6 - Modos de operação da TF-SPME.



Fonte: Autoria Própria (2026)

Além disto, esta técnica pode ser adaptada em instrumentos automatizados, os quais permitem alcançar maiores rendimentos analíticos, como é o caso do sistema de placa de 96 poços (*96 well plate*), o qual permite processar até 96 amostras simultâneas, sendo um conjunto adaptado recentemente, com aplicações relacionadas a cromatografia líquida de alta eficiência (Zhou; Wieczorek; Pawliszyn, 2023). Na figura 7 é representado um sistema TF-SPME com a placa de 96 poços, idêntico ao comercialmente disponível (Professional Analytical Systems Technology, Magdala, Germany).

Figura 7 - TF-SPME com 96 *well plate*.



Fonte: Autoria própria (2026).

No instrumento ilustrado pela Figura 7, pode-se realizar etapas de condicionamento da fase extratora, extração, dessorção, de forma semi-automática (automática em alguns casos), e simultânea. Além disso, algumas versões do conjunto contam com sistema de evaporação de solventes para maior concentração dos analitos, e configuração para realização automática de todos os passos desejados no preparo da amostra designada, contribuindo significativamente para a redução de erros, ampliando assim, a robustez da técnica estabelecida (Zhou; Wieczorek; Pawliszyn, 2023).

Esse conjunto opera utilizando poços de polipropileno com volume de 2 mL para extrações de amostra, e 0,5 mL para dessorção, além disso, com a capacidade de realizar cada etapa simultaneamente com até 96 amostras (Mirnaghi; Monton; Pawliszyn, 2012). Neste processo, utiliza-se um agitador do tipo orbital para garantir agitação da amostra durante as etapas do preparo, no sistema automático a TF-SPME fica em pinos retidos a um pente, no qual, cada pente contém 8 pinos, o total de 12 pentes é o correspondente ao sistema completo (Zhou; Wieczorek; Pawliszyn, 2023). No entanto, na versão semi-automatizada, Figura 7, a construção dos pinos e pentes é a mesma, porém neste, cada pente possui 12 pinos, e o total de 8 pentes resulta no sistema completo dos 96 poços (Morés; Dias; Carasek, 2018).

Outra alternativa que pode incrementar a eficiência da técnica, é a modificação da fase extratora de acordo com as características do analito. Em um

primeiro momento, utilizou-se polidimetilsiloxano (PDMS) como fase extratora para a TF-SPME (Bruheim; Liu; Pawliszyn, 2003). No entanto, ao perceber a facilidade em realizar a substituição de fases extratoras na técnica, surgiram materiais alternativos aos comercialmente disponíveis, entre eles, temos os polímeros biomiméticos.

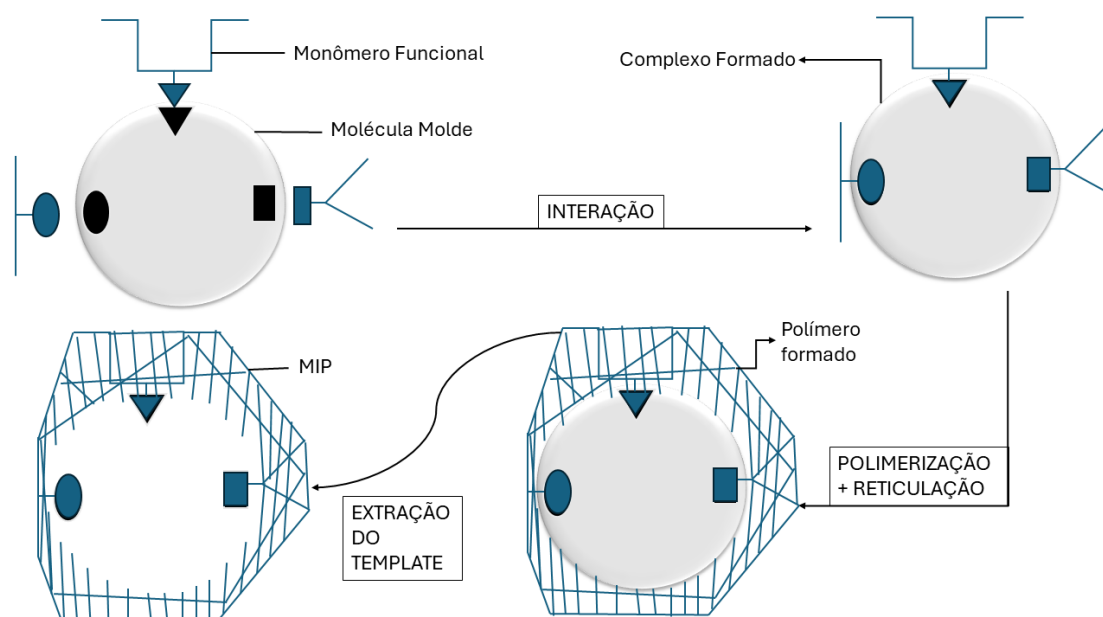
2.5.3. POLÍMEROS BIOMIMÉTICOS

Conhecidos também como Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs) são compostos químicos que mimetizam a função de um anticorpo, ou seja, possuem cavidades únicas para determinados compostos alvo, análogo, a relação ocorrida na natureza entre os anticorpos e os antígenos (Tse Sum Bui; Mier; Haupt, 2023).

Os MIPs incrementam substancialmente a seletividade para determinados compostos ou classe de compostos, a depender da molécula utilizada como molde (Thati et al., 2024a). Esse efeito de seletividade é gerado pela sua síntese específica, na qual uma molécula de molde (*template*), geralmente o analito de interesse, interage com monômeros funcionais (ex.: Ácido Metacrílico) complexando o molde por meio de interações covalentes ou não covalentes, posteriormente, a adição de um agente reticulante (*crosslinker*) (ex.: Divinilbenzeno, DVB) que promove reações cruzadas no complexo formado para enrijecimento da estrutura polimérica. Juntamente com a adição do *crosslinker*, um agente de iniciação radicalar é incrementado para gerar a polimerização. Por fim, a molécula molde é retirada da matriz polimérica gerando cavidades e funcionalidades específicas, as quais são utilizadas para a extração específica de compostos alvo, promovendo a alta capacidade de reconhecimento molecular (Tarley; Sotomayo; Kubota, 2005; Chmangui et al., 2021).

O comportamento do MIP pode ser explicado pela ideia de “chave e fechadura”, na qual o polímero funcionalizado é a “fechadura”, ou seja, possui tamanho, formato, e grupos funcionais ao da molécula de molde, a qual é atribuída como sendo a “chave” (Mostafa et al., 2021). Além disto, o MIP possui robustez significativa, por conseguir atuar em uma ampla faixa de temperatura, solvente e condições de pH, sendo assim, a sua versatilidade é um potencial para diversas aplicações (Martins et al., 2024). Na Figura 8, é apresentando um esquema de síntese do MIP e a sua relação de “chave e fechadura”.

Figura 8 - Ilustração da síntese do MIP.



Fonte: Autoria Própria (2026)

A primeira aplicação de MIP em preparo de amostra ocorreu em 1994 por Sellergren, no qual aplicou o material extrator em SPE, a partir disto, diversas aplicações com MIP foram sendo realizadas em diversas áreas distintas (Liang et al., 2020).

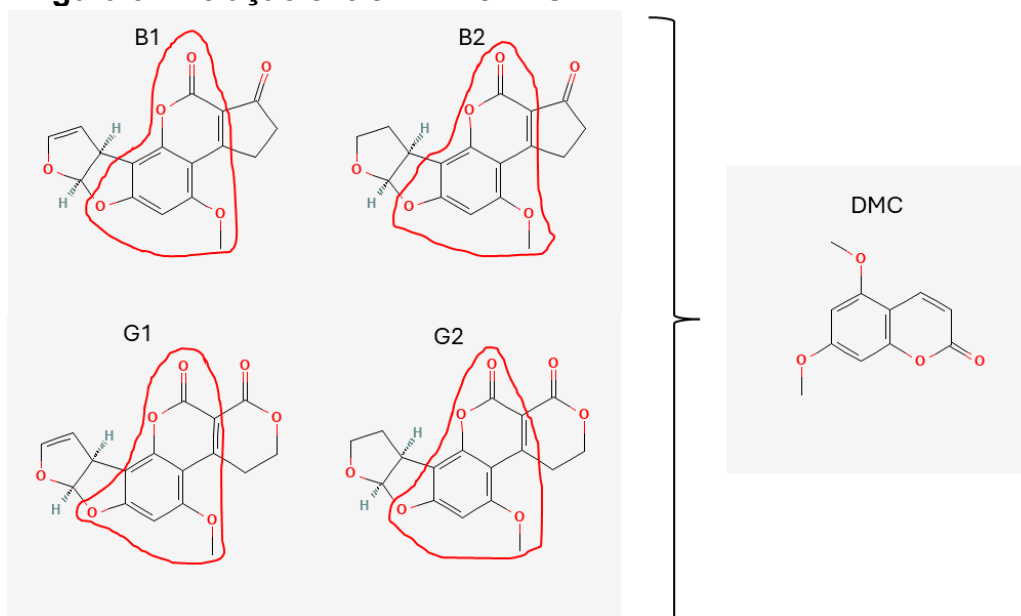
Desta forma, diversos métodos de síntese foram desenvolvidos, alguns deles como o *bulk*, no qual é formado em gel de poliacrilamida; via polimerização de precipitação, a qual permite a formação mais homogênea do MIP e com uma área superficial maior por conta da formação de microesferas; a mais recente técnica de síntese é a impressão em superfície, a qual permite a síntese de MIP em materiais magnéticos e superfícies diversas, por exemplo (Hasanah et al., 2021; Dong et al., 2021).

Entretanto, apesar dos benefícios do MIP, existem limitações, principalmente, relacionadas ao uso das moléculas de molde, em alguns casos, o molde como analito pode ser tóxico, caro, instável, não-reativo, indisponível, ou pouco solúvel. Esta barreira, impede a síntese adequada do MIP resultando em uma baixa transferência de massa, baixa capacidade de ligação, efeito de impressão reduzido, de forma geral, não sendo efetivo para a proposta almejada. Diante disto, como a seleção da molécula molde é crucial para uma síntese de sucesso, o uso de moldes substitutos (*dummy templates*) é uma alternativa para superação destas limitações.

Os moldes substitutos possuem estrutura similar ao analito de interesse, porém, geralmente, são menos tóxicos, acessíveis, estáveis, com as características físico-químicas semelhantes à molécula de interesse, o molde substituto consegue produzir sítios de ligação similares aos do analito (Abdella; Ulber, 2025; Sadeghi Googheri et al., 2025).

Desta forma, uma aplicação importante de MIP para a determinação de aflatoxinas é com o uso de um molde substituto, isto é necessário porque as aflatoxinas são tóxicas, instáveis em luz ultra-violeta, além de serem caras e não serem com alto grau de pureza, nesta situação, emprega-se como *template* a molécula de 5,7-dimetóxicumarina (DMC), a qual possui a estrutura de furanocumarina presente em todas as aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), representado na Figura 9, sendo um derivado da cumarina natural, o DMC não é tóxico, pode ser obtido em alto grau de pureza, com alta estabilidade e sendo mais acessível economicamente (Thati et al., 2024; Chmangui et al., 2021; Jayasinghe et al., 2020).

Figura 9 - Relação entre DMC e AFs.



Fonte: Aatoria Própria (2026).

Portanto, a substituição da molécula molde amplia as possibilidades de MIPs sintéticos, permitindo novas abordagens do material nos mais diversos segmentos (Abdella; Ulber, 2025). Desta forma, é possível a aplicação do MIP como fase extratora para análise de aflatoxinas em diversas matrizes, entre elas, a cerveja. Consequentemente, a utilização da TF-SPME como uma técnica robusta e eficiente

para a extração de analitos, com a possibilidade de empregá-la em um sistema semi-automático de placa de 96 poços utilizando o MIP como fase extratora, torna-se uma opção razoável visto que a cerveja é uma matriz complexa, existem diversas amostras distintas de cervejas, e as aflatoxinas são presentes em concentrações consideradas baixas.

2.6. METODOLOGIA SUSTENTÁVEL

Além disso, um projeto envolvendo uma técnica recente com material extrator substituto ao convencional empregada de maneira semi-automática para analisar um grupo de toxinas que contaminam alimentos, relaciona-se diretamente com os princípios propostos pelos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODSs) presentes na Agenda 2030 desenvolvida pela Organização das Nações Unidas (ONU) em parceria com o Brasil. São 17 objetivos, os quais são orientados em direção a um crescimento socioeconômico sustentável, entre esses ODSs, o ODS 2, relacionado à fome zero e agricultura sustentável, ressalta a importância da segurança alimentar sem acarretar na redução de produtividade agrícola. Em relação a isto, o ODS 3, saúde e bem-estar, exprime a necessidade de reduzir significativamente a presença de contaminantes, os quais podem ser responsáveis por mortes. Ambos ODSs relacionam-se com o projeto proposto, e além destes relativos à segurança da sociedade, o ODS 12, consumo e produção responsáveis, relaciona-se diretamente com a ideia de redução de solventes e reutilização de materiais, como o é o caso da reutilização do MIP como material extrator.

Consequentemente, este trabalho propõe o desenvolvimento de uma metodologia analítica utilizando a TF-SPME com MIP com molde substituído em um sistema semi-automatizado para a determinação de aflatoxinas em amostras de cerveja sem realizar derivatização, a plausibilidade do projeto é nítida diante da robusta quantidade de trabalhos desenvolvidos explorando temas próximos ao proposto (Thati et al., 2024; Zhou; Wieczorek; Pawliszyn, 2023; Chmangui et al., 2021; Krumplewski; Rykowska, 2024).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de metodologia de alta frequência combinando MIP-TF-SPME com HPLC-FLD na extração e determinação de aflatoxinas em amostras de cerveja brasileira.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleção e obtenção das amostras de cerveja, visando uma gama maior de marcas de diferentes produtores a fim de garantir uma maior homogeneidade dos resultados obtidos;
- Separação dos analitos no HPLC-FLD, a fim de avaliar os tempos de retenção dos analitos, comprimentos de onda de excitação e relaxação, gradiente da fase móvel e temperatura do módulo de aquecimento da coluna;
- Sínteses do MIP e do NIP com parceria do laboratório do Professor Dr. Alexandre Parize – Departamento de Química – UFSC;
- Caracterização do MIP e do NIP, com as técnicas de FT-IR, MEV e TGA, para comprovação do material sintetizado;
- Aplicação do MIP como fase extratora na TF-SPME, e avaliar a sua capacidade inicial de extração;
- Otimizar os parâmetros de influência na extração pela técnica, como a fita adesiva para suporte do material extrator no pente da TF-SPME, condicionamento da técnica antes da extração, diluição da amostra, limpeza, solvente e tempo de dessorção, tempo de extração e pH da amostra;
- Determinação e avaliação dos parâmetros analíticos de mérito, como LOQ, LOD, faixa linear de trabalho, R^2 e precisão, avaliados por meio de experimentos intradia;

4. METODOLOGIA

4.1. MATERIAIS E REAGENTES

A mistura de padrão analítico contendo as 4 aflatoxinas avaliadas (B1, B2, G1 e G2) adquiridos pela Restek (Cotia, São Paulo) com concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Este padrão foi utilizado para preparar uma solução de trabalho 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, em acetonitrila, obtida da J.T. Baker (Center Valley, EUA). Demais solventes grau HPLC, como Metanol (MeOH), Acetonitrila (ACN) foram obtidos da Merck (Rio de Janeiro, BR), J.T. Baker (Center Valley, EUA), respectivamente. Para síntese do MIP e do NIP, utilizou-se como reagente de reação cruzada o Divinilbenzeno (DVB) 99,9% e o Ácido Metacrílico (MAA) 99,9%, como monômero funcional, ambos obtidos pela Merck (Rio de Janeiro, BR), para o *template dummy* utilizou-se a 5,7 - dimetóxicumarina (DMC) 99% e o iniciador radicalar o 2,2'-Azobis(2-metilpropionitrila) (AIBN) obtidos pela Sigma Aldrich (Missouri, EUA).

4.2. INSTRUMENTAÇÃO

A etapa de descarbonatação das amostras foi realizada em um banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner 28x, Neytech, EUA), as etapas do preparo de amostra, bem como, as otimizações foram realizadas em um sistema semiautomatizado de placas de 96 poços (Brüder Mannesmann Werkzeuge, Remscheid, Alemanha), com poços de capacidade de 500 μL e 2,0 mL. Água ultrapura ($18,3 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida através do sistema de purificação de água Mega Purity (Billerica, EUA). Um cromatógrafo líquido Shimadzu LC 20AT (Kyoto, Japão), equipado com um detector de fluorescência da série RF-20A, um forno de coluna modelo CTO-20AC, injetor automático modelo SIL-20AC. Com os comprimentos de onda de excitação e emissão selecionados para 360 e 440 nm, respectivamente. Uma coluna C18 Phenomenex Kinetex (250 mm x 4,6 mm x 5 μm) (Califórnia, EUA), em modo de fase reversa. O modo isocrático foi estabelecido com 55% H_2O ultrapura (B) e 45% MeOH (C) durante 25 minutos. Para monitoramento durante a extração do *template* DMC do MIP, utilizou-se a mesma configuração de HPLC, com exceção do detector, o qual foi substituído por Detector por Arranjo de Diodos (DAD), modelo SPD-M20A, com uma combinação binária de solventes em gradiente

de água (B) e acetonitrila (A). A programação do gradiente foi de: 0-10 min, 18-23% de A; 10-15 min, 23% de A; 15-30 min, 23-50% de A; 30-40 min, 50-100% de A; 40-45 min 100% de A; por fim, 5 min de recondicionamento para as condições iniciais da corrida cromatográfica.

4.3. SÍNTESE DO MIP E DO NIP

A síntese dos polímeros segue uma polimerização de precipitação via radicalar baseada nos trabalhos de Jayasinghe, 2020 e Chmangui, 2021. A síntese segue as etapas de: (1) Interação e complexação com o template; (2) Polimerização e Reações Cruzadas. Em um balão de fundo redondo, adicionou-se cerca de 70 mg de DMC como molécula *template*, 115 μ L de MAA como monômero funcional e 25 mL de uma solução de solvente porogênico, sendo esta composta por Acetonitrila:Tolueno (3:1), agita-se esta solução por 5 min. O balão após agitação é coberto com papel alumínio e sem agitação passa a noite para que ocorra auto-organização (1) entre a molécula *template* e o monômero funcional. Sequencialmente, adiciona-se ao balão cerca de 1,25 mL de DVB, o reagente de reação cruzada (*crosslinker*), e 0,1 g de AIBN, o iniciador radicalar (início da polimerização) (2), agita-se por 1 min. Em seguida, o balão é purgado com N₂ por 5 min é selado e lentamente agitado (33 rpm) a 60 °C por 24h.

Por fim, realiza-se uma filtração a vácuo e lava-se com ACN, 20 mL três repetições, para retirada de solventes que não reagiram. Deste modo, o material sintetizado é secado em estufa por 12h a 40°C. Para o NIP, utiliza-se todo o procedimento, porém, com exceção da adição da molécula *template*.

4.4. CARACTERIZAÇÃO MIP E NIP

Utilizou-se para obtenção dos grupos funcionais do MIP e do NIP um Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Shimadzu IRPrestige-21 (Kyoto, Japão) com pastilhas de KBr e análises realizadas na faixa spectral de 4000 a 400 cm^{-1} , resolução de 2 cm^{-1} , com um total de 35 aquisições por amostra. Foi realizado uma análise termogravimétrica (TGA) simultaneamente para compreender a estabilidade térmica dos materiais, utilizando um Shimadzu DTG-60H (Kyoto, Japão), no qual amostras de 5 a 10 mg foram colocadas em cadinhos de alumina e

aquecidos de 25 a 600°C a uma taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹ em uma atmosfera inerte de nitrogênio (N₂) (50 mL min⁻¹). Um Microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi utilizado para realizar um estudo morfológico do MIP e do NIP, as micrografias foram obtidas por um Tescan VEGA (Brno, República Tcheca), com voltagem de operação de 5 a 10 kV, filamento de tungstênio no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) – UFSC. As amostras foram posicionadas sobre stubs recobertas com uma camada fina de ouro.

4.5. EXTRAÇÃO DO TEMPLATE

Para permitir a utilização do MIP como fase extratora é necessário retirar a molécula de *template* que está ocupando os sítios seletivos do material. Para isto, utilizou-se a extração *Soxhlet*, na qual, 300 mg do MIP seco foi colocado dentro de papel celulose e tratado no sistema com 200 mL de uma solução de MeOH/H₂O/CH₃COOH (85:10:5). Para garantir a retirada de todo o *template* realizou-se 4 ciclos de lavagem de 4 horas cada ciclo, renovando a solução a cada ciclo. Monitorou-se a concentração do DMC via HPLC-DAD, com as especificações da corrida cromatográfica descritas anteriormente, no solvente de lavagem do *Soxhlet*. Após a retirada do DMC, o MIP foi lavado com água UP e secado por 12h a 40°C, antes do uso.

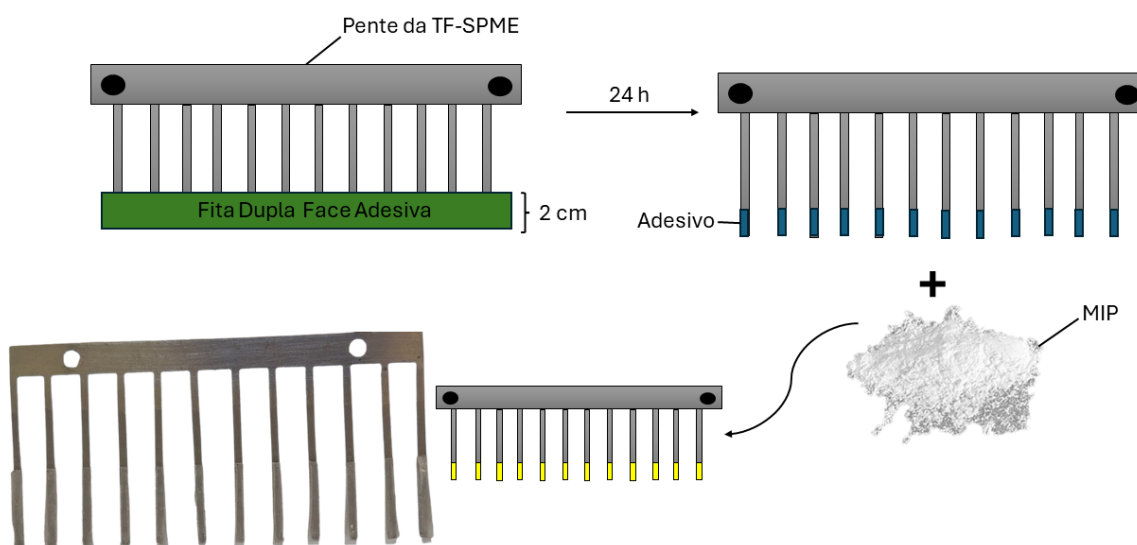
4.6. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO MIP

A fim de avaliar na prática a eficiência do MIP como fase extratora, realizou-se um ensaio em triplicata em água UP fortificada com 16 µg.L⁻¹ de cada analito para observar o perfil cromatográfico gerado e selecionar, de fato, o MIP como fase extratora eficiente, por meio da comparação entre o resultado obtido da extração e a injeção da mesma concentração dos analitos de forma direta, sem preparo de amostra.

4.7. FABRICAÇÃO DO FILME FINO

Para utilização da TF-SPME foi necessário a fabricação do filme fino, o qual foi elaborado utilizando uma fita dupla face adesiva sob a superfície de aço inoxidável do pente da TF-SPME. O procedimento foi realizado aderindo a fita dupla face no pente, para que ocorra aderência da fita adesiva com a superfície é mantido o contato da fita por 24 h antes de adicionar a fase extratora (MIP). Após isto, é realizado a adição do MIP sobre a fita dupla face, a adição é realizada com excesso do polímero para que todo o filme fino esteja coberto com o MIP, o restante do polímero não aderido a fita é retirado com leves batidas no pente. A Figura 10 ilustra o processo de fabricação.

Figura 10 - Fabricação do Filme Fino.



Fonte: Autoria Própria (2026).

4.7.1. CONDICIONAMENTO DA FASE EXTRATORA

Um protocolo de condicionamento do material sólido extrator é essencial para garantir que qualquer impureza da fase sólida seja retirada, bem como, possíveis grânulos da fase que não estejam aderidos ao suporte. Além disso, emprega-se o condicionamento para reduzir a tensão superficial da fase sólida e permitir maior eficiência na etapa de extração. Desta forma, empregou-se um estudo

experimental em quadruplicata, no qual, fortificou-se Água UP com 16 µg L⁻¹ de cada analito, variando a combinação de solventes na etapa de condicionamento com um tempo definido de 20 min, sendo eles: ACN, H₂O, ACN + H₂O (50:50) e sem condicionamento. Após o condicionamento, seguiu-se para a extração e dessorção, as quais foram definidas provisoriamente, como sendo: 1,5 mL de amostra em 60 min de extração a 500 rpm e 30 min de dessorção a 300 rpm com 400 µL de ACN. Este ensaio foi tratado de forma univariada, selecionando-se o melhor resultado pelas maiores áreas normalizadas dos picos cromatográficos (com RSD > 20%) e ANOVA.

4.7.2. EFEITO DO SUPORTE DA FITA ADESIVA

O emprego do MIP como fase extratora foi realizado através de um suporte de fita adesiva dupla face colado à superfície dos pentes da TF-SPME, entretanto, existem diversas fitas disponíveis comercialmente, diante disto, optou-se pela seleção de duas fitas de marcas distintas, com largura e espessura diferentes para comparação com a eficiência de extração, e seus efeitos na capacidade de extrair sem a necessidade do material extrator.

O ensaio foi conduzido em quadruplicatas em Água UP fortificada com 16 µg L⁻¹ de cada analito, utilizando a configuração do preparo definida inicialmente, para comparação do efeito de cada fita, com e sem MIP, permitindo avaliar a reprodutibilidade das fitas e a sua capacidade de extração dos analitos. Os dados foram avaliados univariavelmente por meio da ANOVA de dois fatores e das médias normalizadas dos picos cromatográficos, permitindo a seleção da melhor fita que foi utilizada em todas as etapas seguintes.

4.7.3. DILUIÇÃO DA CERVEJA

Estudou-se o efeito da diluição da amostra de cerveja na eficiência de extração dos analitos, para isto, planejou-se de maneira univariada as seguintes situações: Sem diluir, 10%, 25% e 50%. Todas as situações foram realizadas em triplicata, e a amostra foi descarbonatada por cerca de 20 min em banho ultrassônico até não observar formação de bolhas de CO₂, após, a mesma foi

fortificada com 16 µg L⁻¹ de cada analito. Seguidamente, avaliou-se os resultados pela média normalizada dos picos cromatográficos e ANOVA, selecionando-se a melhor situação.

4.8. OTIMIZAÇÕES

4.8.1. EFEITO DE LIMPEZA – CARRY OVER

O equilíbrio durante a dessorção pode resultar em resquícios de analito presente na fase extratora, os quais não foram dessorvidos. A fim de avaliar este efeito de memória (*carry over*) presente na fase extratora, realizou-se em quadruplicata a extração de uma amostra fortificada com os analitos. Após a extração a amostra foi submetida a dessorção, seguida de duas etapas de limpeza com os mesmos parâmetros da dessorção. Por fim a dessorção e as duas etapas de limpeza foram injetadas no HPLC. A avaliação dos resultados foi realizada univariavelmente através das médias normalizadas dos picos cromatográficos e ANOVA.

4.8.2. SOLVENTE DE DESSORÇÃO

Para avaliação do solvente de dessorção, empregou-se um planejamento multivariado com o *Simplex-centróide*, no qual, investigou-se a relação entre 3 solventes distintos na eficiência de dessorver os analitos. Neste caso, explorou-se os solventes: ACN, H₂O e MeOH. Estes solventes foram escolhidos por apresentarem relação com capacidade de dessorção destes analitos observada na literatura, disponibilidade no laboratório e compatibilidade com a fase móvel do HPLC. Além disso, esse planejamento multivariado resultou em 12 experimentos (incluindo triplicata no ponto central), utilizando as proporções descritas na Tabela 1. Os resultados foram obtidos por meio de superfície de mistura, ANOVA e desejabilidade.

Tabela 1 - Experimentos do *Simplex-centróide*.

Experimentos	ACN		MeOH		H2O	
	Cod.	V(μL)	Cod.	V(μL)	Cod.	V(μL)
1	1,00	400,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	1,00	400,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	400,00
4	0,50	200,00	0,50	200,00	0,00	0,00
5	0,50	200,00	0,00	0,00	0,50	200,00
6	0,00	0,00	0,50	200,00	0,50	200,00
7	0,33	133,33	0,33	133,33	0,33	133,33
8	0,33	133,33	0,33	133,33	0,33	133,33
9	0,33	133,33	0,33	133,33	0,33	133,33
10	0,67	266,68	0,17	66,68	0,17	66,68
11	0,17	66,68	0,67	266,68	0,17	66,68
12	0,17	66,60	0,17	66,68	0,67	266,68

Fonte: Autoria Própria (2025).

4.8.3. OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE DESSORÇÃO

Para otimizar o tempo de dessorção, foi conduzido um estudo univariado abordando os seguintes tempos estabelecidos: 10, 20 e 30 min de dessorção. Os ensaios foram realizados em quadruplicata em amostra de cerveja previamente descarbonatada e fortificada com os analitos na concentração de 16 μg L⁻¹. O melhor resultado foi selecionado por meio da média normalizada dos picos cromatográficos e ANOVA.

4.8.4. OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO E pH

Um planejamento multivariado de superfície de resposta, *Doehlert*, foi proposto para avaliação das variáveis, utilizando aplicativo GAMMA para gerar o planejamento do ensaio apresentado na Tabela 2. Os níveis estabelecidos das variáveis foram os seguintes: Mínimo: 30 min e pH 4; Máximo: 90 min e pH 7, levando em consideração que a variável de maior significância foi o tempo de extração (cinco níveis) e menor significância, pH, com três níveis. Esta superfície de

resposta é composta por 9 experimentos, incluindo triplicata no ponto central. Os dados utilizados para gerar a superfície de resposta foram de maneira global, a média ponderada do experimento, e os valores de área dos picos individuais de cada analito para confirmação do comportamento da superfície de resposta. Além disso, verificou-se por meio do ANOVA a significância dos resultados ($p < 0,05$), e a falta de ajuste e o ponto ótimo obtido por meio da otimização *Simplex* e Desejabilidade.

Tabela 2 - Matriz Doehlert.

Experimentos	Codificadas		Decodificadas	
	Tempo de Extração	pH	Tempo de Extração (min)	pH
1	0	0	60	5,5
2	0	0	60	5,5
3	0	0	60	5,5
4	1	0	90	5,5
5	0,5	1	75	7
6	-1	0	30	5,5
7	-0,5	-1	45	4
8	0,5	-1	75	4
9	-0,5	1	45	7

Fonte: Autoria Própria (2025).

4.9. PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

Os parâmetros como o coeficiente de determinação (R^2), faixa linear de trabalho, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e precisão, foram determinados por meio da metodologia otimizada. Sendo que, as curvas de calibração foram realizadas por adição padrão em amostras de cerveja com no mínimo cinco concentrações ($n=3$).

Para avaliação da precisão, expressa como o RSD%, da metodologia, foi conduzido experimentos de precisão intradia, avaliado no mesmo dia em triplicata e em três concentrações diferentes, sendo elas, um ponto mínimo, médio e máximo baseados na faixa linear de trabalho. O LOQ foi definido como a menor concentração da faixa linear de trabalho, e o LOD foi calculado como sendo o $LOQ/3,3$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. MIP E NIP

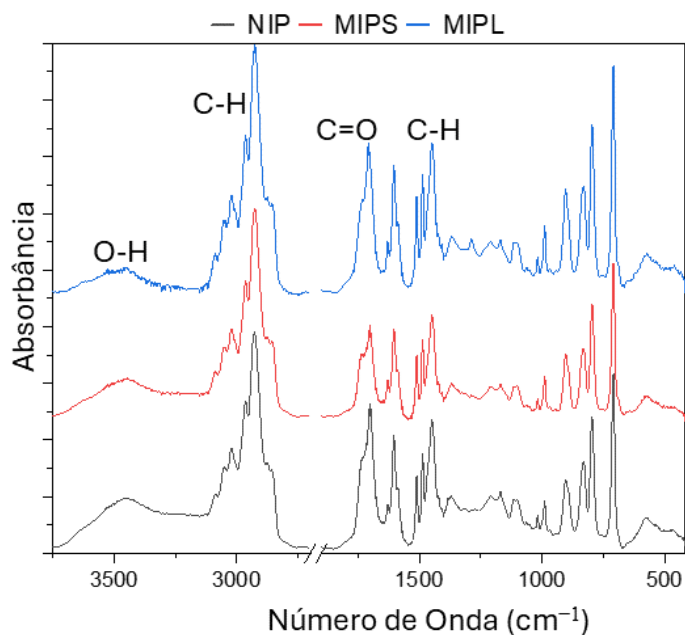
5.1.1. CARACTERIZAÇÃO DO MIP e DO NIP

5.1.1.1. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

As estruturas químicas do NIP, MIPS (com o *template*) e MIPL (após a lavagem, *sem o template*) foram caracterizadas por espectroscopia FTIR, com o objetivo de confirmar a polimerização bem-sucedida e a remoção do molde. Todos os espectros ilustrados pela Figura 10, apresentaram as bandas características da matriz polimérica, incluindo uma forte vibração de estiramento da carbonila (C=O) em aproximadamente 1650 cm^{-1} , bandas de estiramento (C–H) em 3000 e 1500 cm^{-1} e um forte estiramento em 3500 cm^{-1} da O-H, sendo esta a principal interação não covalente que permite a estabilização do DMC com o MAA. Desta forma, os grupos funcionais caracterizados são consistentes com a formação da rede metacrílica (Jayasinghe et al., 2020; Thati et al., 2024; (Mbisana et al., 2025).

A elevada similaridade entre os espectros do NIP e do MIPL sugere que o processo de impressão molecular preservou com sucesso a integridade química dos grupos funcionais. Além disso, o desaparecimento de características específicas associadas ao molde (ou o retorno a um perfil semelhante ao do NIP) no espectro do MIPL confirma a eficiência do procedimento de lavagem na extração das moléculas molde dos sítios molecularmente impressos (Chmangui et al., 2019).

Figura 11 – Resultado do FT-IR.



Fonte: Autoria Própria (2026).

5.1.1.2. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

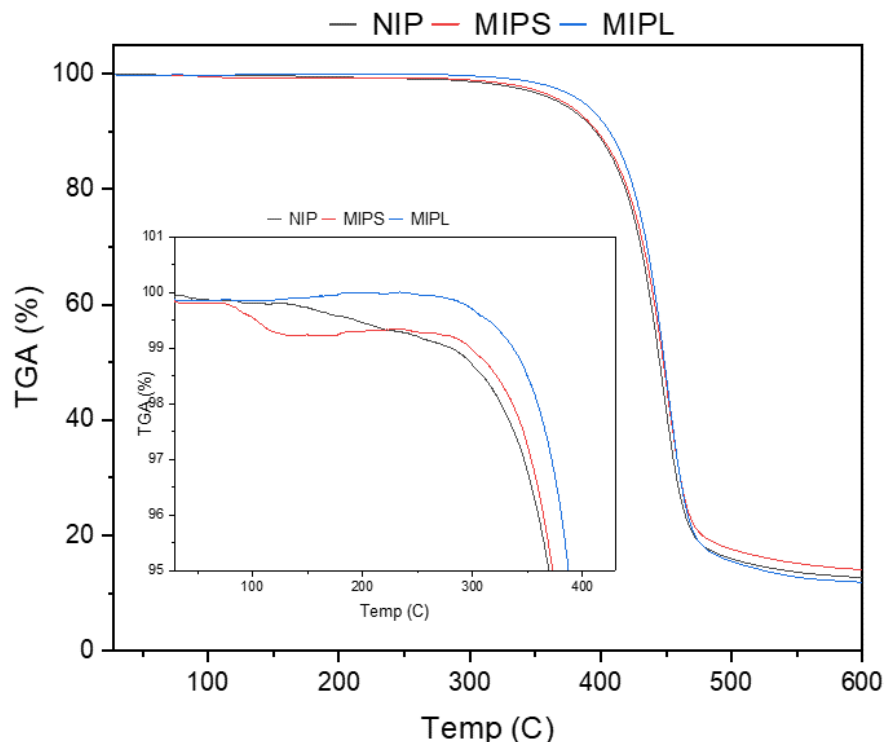
A estabilidade térmica e os perfis de decomposição, apresentados na Figura 11, do polímero molecularmente impresso (MIPL), de seu precursor contendo o *template* (MIPS) e do polímero não impresso (NIP), utilizado como controle, foram investigados por TG-DTA simultânea. Todas as amostras apresentaram alta estabilidade térmica, com o principal estágio de degradação ocorrendo entre 400 °C e 500 °C, atribuído à ruptura térmica da rede polimérica (Wei et al., 2024).

A amostra MIPL apresentou a maior temperatura inicial de decomposição de 419,34 °C, seguida pelo MIPS (418,38 °C) e pelo NIP (416,65 °C). Esse leve aumento na resistência térmica dos MIPS sugere que o processo de impressão molecular, mesmo após a remoção do molde, resulta em uma estrutura mais robusta ou com maior grau de reticulação em comparação ao NIP (Zunngu et al., 2017; Martínez Saavedra et al., 2018).

A eficiência do processo de remoção do *template* (DMC) foi confirmada pelos dados de TGA. Na região entre 100 °C e 300 °C, a amostra MIPS apresentou uma perda de massa mais pronunciada em comparação ao MIPL. Essa perda inicial está associada à degradação ou volatilização da molécula *template*, e de compostos

orgânicos absorvidos durante a síntese, ainda presentes nos sítios impressos. Em contraste, a curva do MIPL nessa região se assemelha estreitamente ao perfil do NIP, indicando que o procedimento de lavagem extrai com sucesso o molde, deixando uma matriz molecularmente impressa e “limpa”, evitando o risco de “sangramento” do *template* durante o uso do material (Martínez Saavedra et al., 2018).

Figura 12 - Resultado TGA.



Fonte: Autoria Própria (2026).

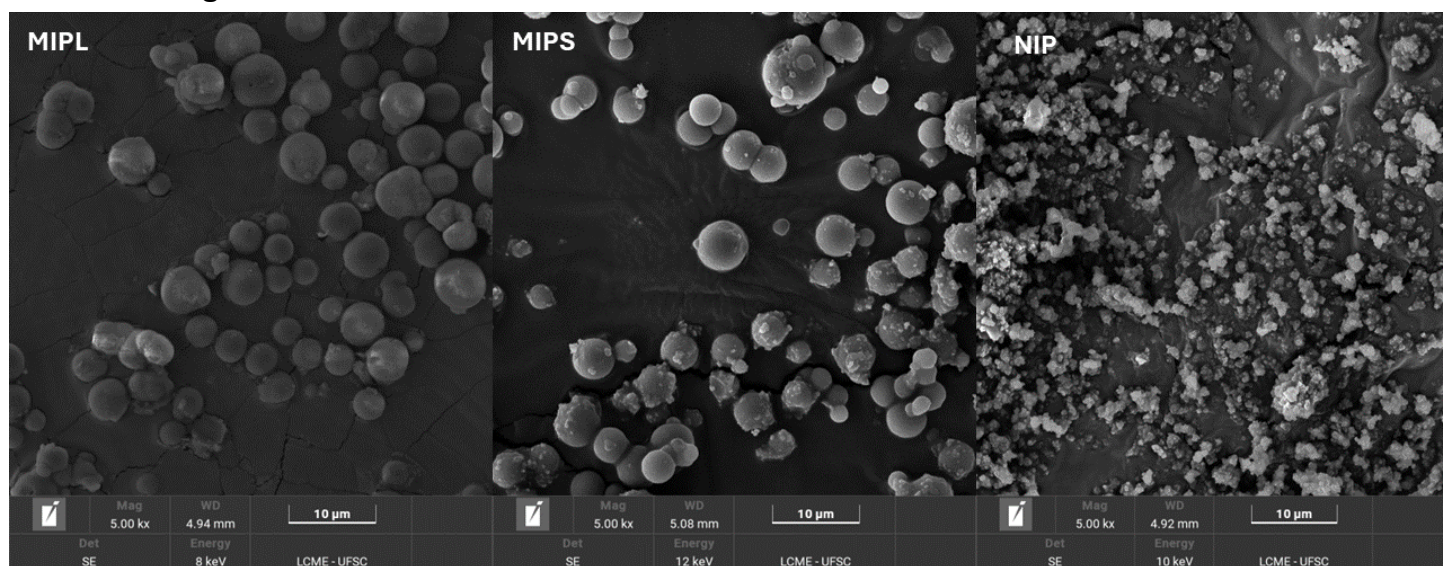
5.1.1.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As imagens de MEV apresentados na Figura 12, revelam a diferença entre o MIP e o NIP, na qual o fato de adicionar uma molécula de *template* na síntese resulta em uma formação polimérica esférica, neste caso, o NIP, com a ausência do *template*, forma estruturas heterogêneas com baixa seletividade e uniformidade. O MIPL (após processo de extração do *template*) apresenta uma superfície lisa, uniforme, e em esferas micrométricas adequadas para um material extrator que requer uma ampla área superficial para extração, conforme esperado pela síntese via polimerização por precipitação, a qual visa a formação de microesferas homogêneas. Este resultado reafirma a estabilidade do MIP visto que após o

processo de extração a estrutura polimérica continuou estável e com pequenas cavidades seletivas demonstrando o sucesso da impressão molecular (Jayasinghe et al., 2020; Wei et al., 2024; Thati et al., 2024).

O MIPS (sem o processo de extração do *template*) possui rugosidades e materiais retidos na superfície, como a própria molécula de molde e outros compostos utilizados síntese, apesar disto, observa-se a formação esférica característica da presença do molde como indicador da estrutura polimérica durante a impressão molecular. Além disso, percebe-se a importância da etapa de extração do molde, pois nesta além da retirada do molde, os compostos que não reagiram durante a síntese são extraídos da superfície esférica, permitindo assim, uma estrutura “limpa” (comparação entre MIPL com MIPS) adequada para a extração seletiva (González; Hernando; Alegría, 2006; Shafqat et al., 2023).

Figura 13 - Resultado MEV.



Fonte: Autoria Própria (2026).

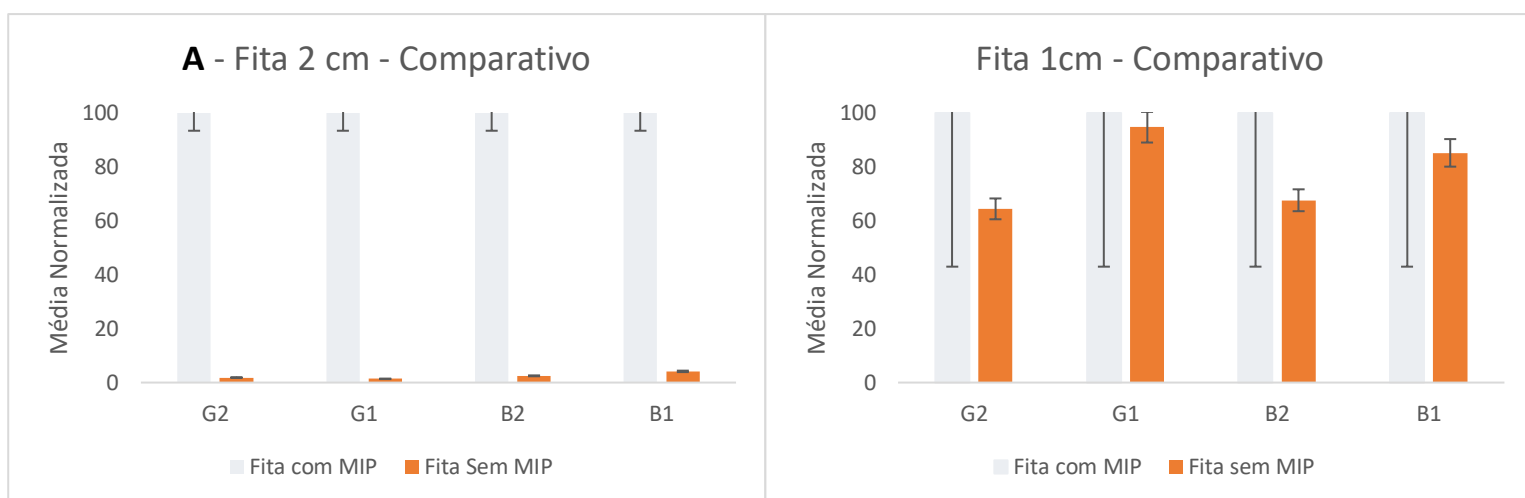
5.1.2. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO MIP

Inicialmente, para compreender se o emprego do MIP como fase extratora seria efetivo para extração das AFs, se ocorreria deslocamento do perfil cromatográfico, houvesse a presença de algum interferente da fase extratora ou no suporte de fita adesiva e de forma prática avaliar o sucesso da síntese, submeteu-se o MIP aderido ao pente da TF-SPME à extração dos analitos de uma amostra preparada em água UP.

5.2 EFEITO DO SUPORTE DE FITA ADESIVA

Para selecionar o melhor suporte de fita adesiva dupla face, realizou-se um experimento univariado para comparação entre duas fitas distintas com largura distintas (2 e 1 cm), avaliando a resposta gerada entre as fitas com e sem a fase extratora aderida. Obtendo-se os resultados apresentados na Figura 14.

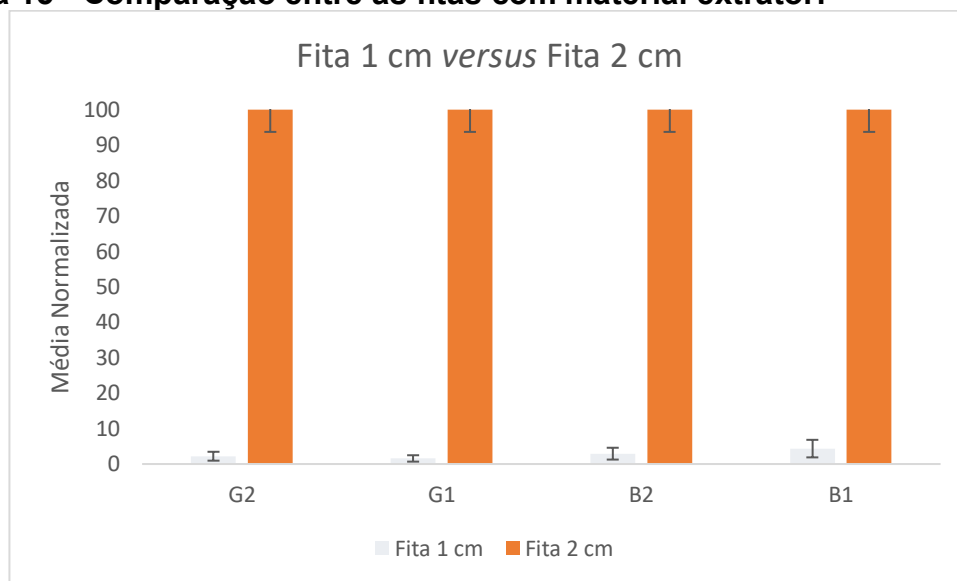
Figura 14 - Gráfico de Efeito da Fita.



Fonte: Autoria Própria (2025).

Utilizou-se as medias normalizadas dos picos cromatográficos para gerar os gráficos A e B observados na Figura 14. Deste modo, é possível avaliar através da ANOVA Dupla presente no Anexo 1 que os dados são significativos e o gráfico **A** apresenta a resposta ideal, na qual, a fita com o material extrator possibilita uma eficiência de extração maior que a fita na ausência do MIP. O gráfico **B**, além da falta de reprodutibilidade ($RSD > 20\%$), revela que a fita de 1 cm não é ideal para a aplicação, por não permitir que o MIP realize uma extração efetiva, possivelmente relacionado a obstrução dos poros do material sólido, por conta disto, observa-se que a resposta entre a fita com o material extrator e sem o mesmo, são muito próximas.

Diante disto, comparou-se as duas fitas com o MIP, Figura 15, e a partir disso, observou-se a melhor resposta para a fita de 2 cm como a ideal para esta aplicação.

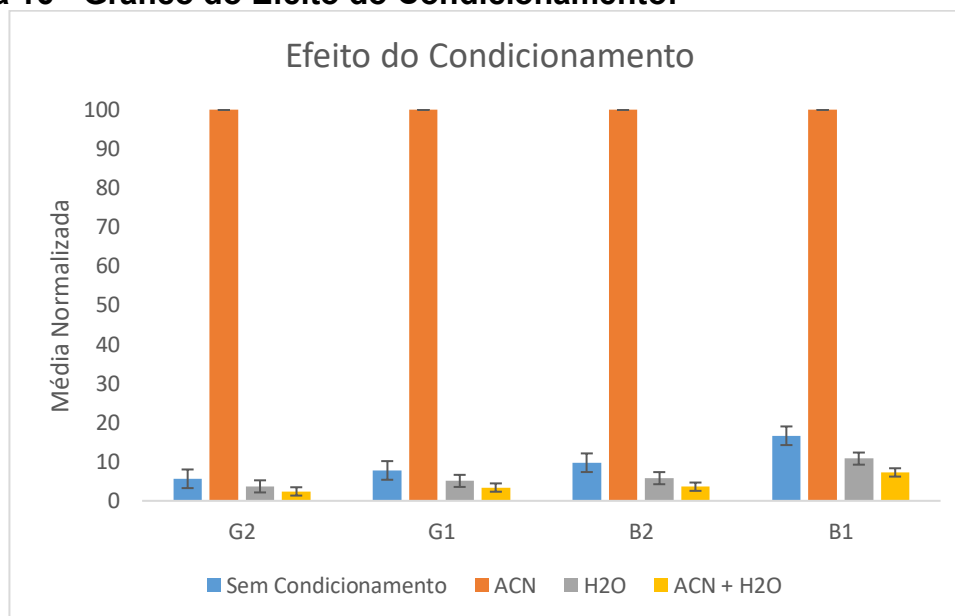
Figura 15 - Comparação entre as fitas com material extrator.

Fonte: Autoria Própria (2026).

5.3 CONDICIONAMENTO DA FASE EXTRATORA

Fases extratoras sólidas apresentam tensão superficial que dificulta a migração dos analitos em fase aquosa, a fim de reduzir a tensão superficial, retirar qualquer interferente presente, e por consequência, dessorver analitos extraídos (efeito de memória), estudou-se o efeito do condicionamento da fase extratora em relação a eficiência de extração.

Foi realizado um experimento com quatro ensaios distintos, sendo eles: Sem condicionamento, com ACN, com H₂O, com ACN + H₂O (50%). Em todos eles, o tempo de 20 minutos foi estabelecido, e a resposta ideal foi obtida através da ANOVA (significância do modelo), presente no Anexo 2, e a comparação dos dados por média normalizada dos picos cromatográficos, observada na Figura 16.

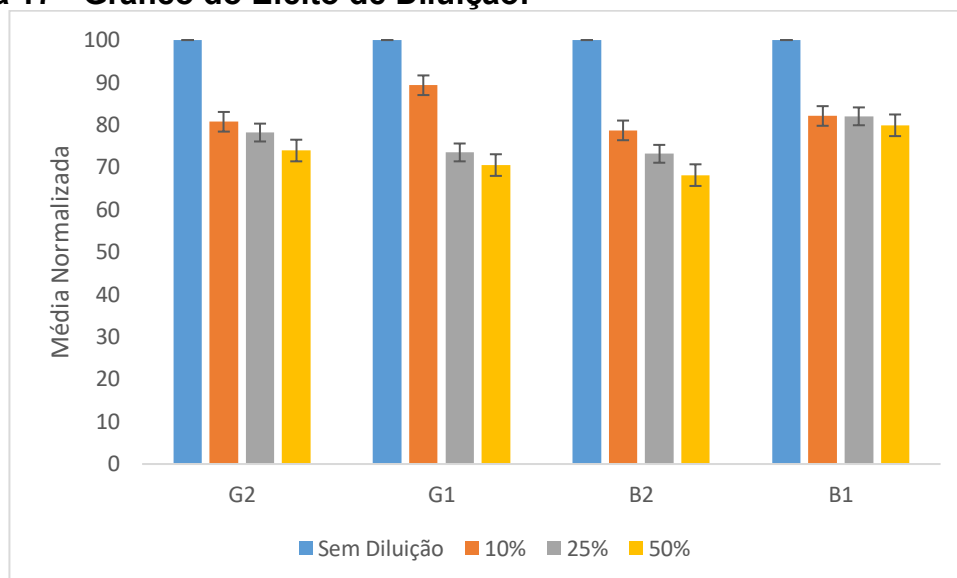
Figura 16 - Gráfico do Efeito do Condicionamento.

Fonte: Autoria Própria (2025).

Diante do observado na Figura 16, a resposta ideal é o condicionamento com ACN por 20 min. Este efeito ocorre porque o MIP foi sintetizado com um solvente porogênico, com a maior parcela sendo ACN, isto resulta em que o solvente tem a capacidade de ativar os sítios de ligação do MIP, similar ao efeito ocorrido durante a síntese do polímero, além de reduzir a tensão superficial do material, resultando em uma maior eficiência de extração dos analitos (Tarley; Sotomayor; Kubota, 2005; Maranata; Surya; Hasanah, 2021).

5.4 EFEITO DA DILUIÇÃO DA AMOSTRA

Para avaliar a relação da diluição da amostra com água ultrapura e a eficiência de extração, realizou-se um experimento univariado estudando as seguintes condições: Sem diluição, em 10%, 25% e 50%. Os resultados obtidos foram avaliados, através da ANOVA presente no Anexo 3, a qual revela que não existe diferença significativa entre os fatores, logo, optar por não diluir reduz etapas mantendo uma reposta adequada. Além disso, avaliou-se em função da média normalizada das áreas dos picos cromatográficos, e estão apresentados na Figura 17.

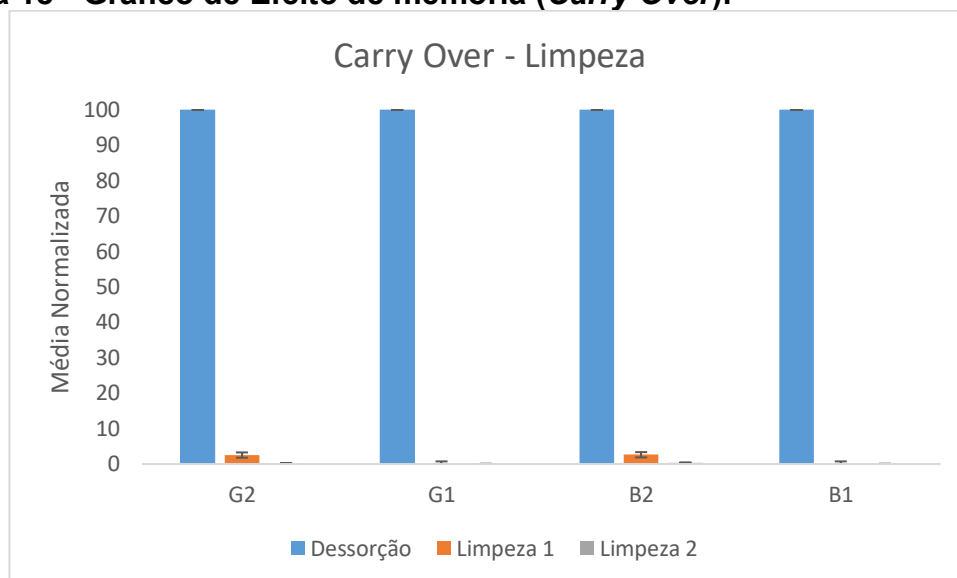
Figura 17 - Gráfico do Efeito de Diluição.

Fonte: Autoria Própria (2025).

Através do resultado observado é possível concluir que o aumento da diluição, ou seja, aumento de água ultrapura, resulta em um impedimento do deslocamento do equilíbrio para a fase extratora (MIP), podendo ser visto pelo decréscimo do resultado da média normalizada das áreas conforme aumenta a diluição. Por conta disso, a melhor resposta obtida foi sem diluir a amostra, o parâmetro, o qual foi selecionado para a metodologia.

5.5 EFEITO DE MEMÓRIA (CARRY OVER)

Para constatar se haveria resquícios de analitos na fase extratora após a dessorção, realizou-se uma experimentação avaliando o efeito de limpeza da fase extratora após a dessorção. A Figura 18 ilustra o resultado obtido pelo experimento.

Figura 18 - Gráfico de Efeito de memória (Carry Over).

Fonte: Autoria Própria (2025).

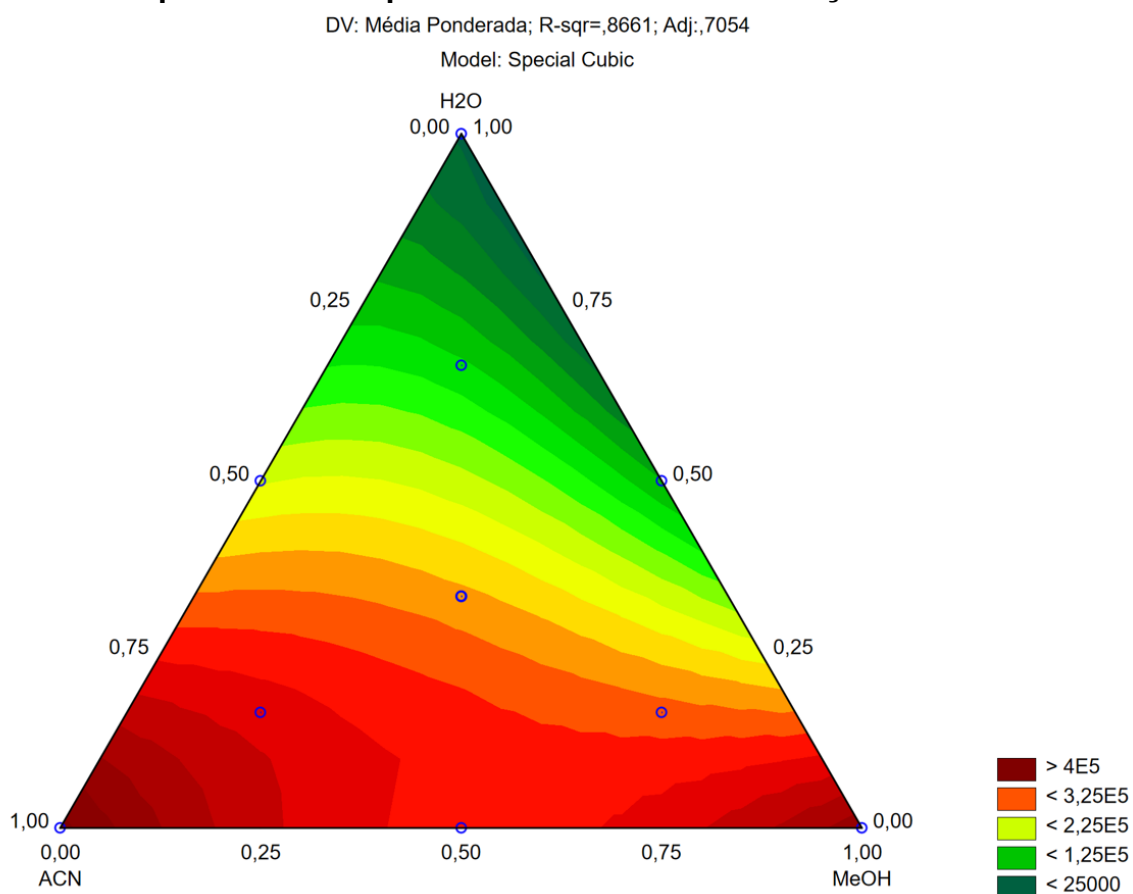
Constata-se que após a dessorção resta apenas um valor ínfimo dos analitos presentes na fase extratora, cerca de 1% (média normalizada) na primeira limpeza e cerca de 0,5% na segunda limpeza. Os dados foram avaliados por ANOVA, Anexo 4, evidenciando uma diferença significativa. Estes valores de concentração encontrado não são capazes de promover uma interferência significativa nas extrações subsequentes, portanto, não há necessidade de uma etapa de limpeza após a dessorção.

5.6. OTIMIZAÇÕES

5.6.1. SOLVENTE DE DESSORÇÃO

Após a seleção dos parâmetros iniciais da amostra e da fase extratora, seguiu-se para a seleção do solvente de dessorção, o qual possui papel fundamental no deslocamento do equilíbrio de partição dos analitos da fase extratora para o solvente. Os ensaios e suas respectivas proporções previstos na abordagem *simplex-centróide* estão presentes na Tabela 01. O resultado com melhor resposta foi obtido com o modelo cúbico especial com um R^2 de 0,8661, significativo ($p > 0,05$) sem falta de ajuste conforme a ANOVA presente no Anexo 5, e as regiões das respostas podem ser vistas na superfície presente na Figura 19.

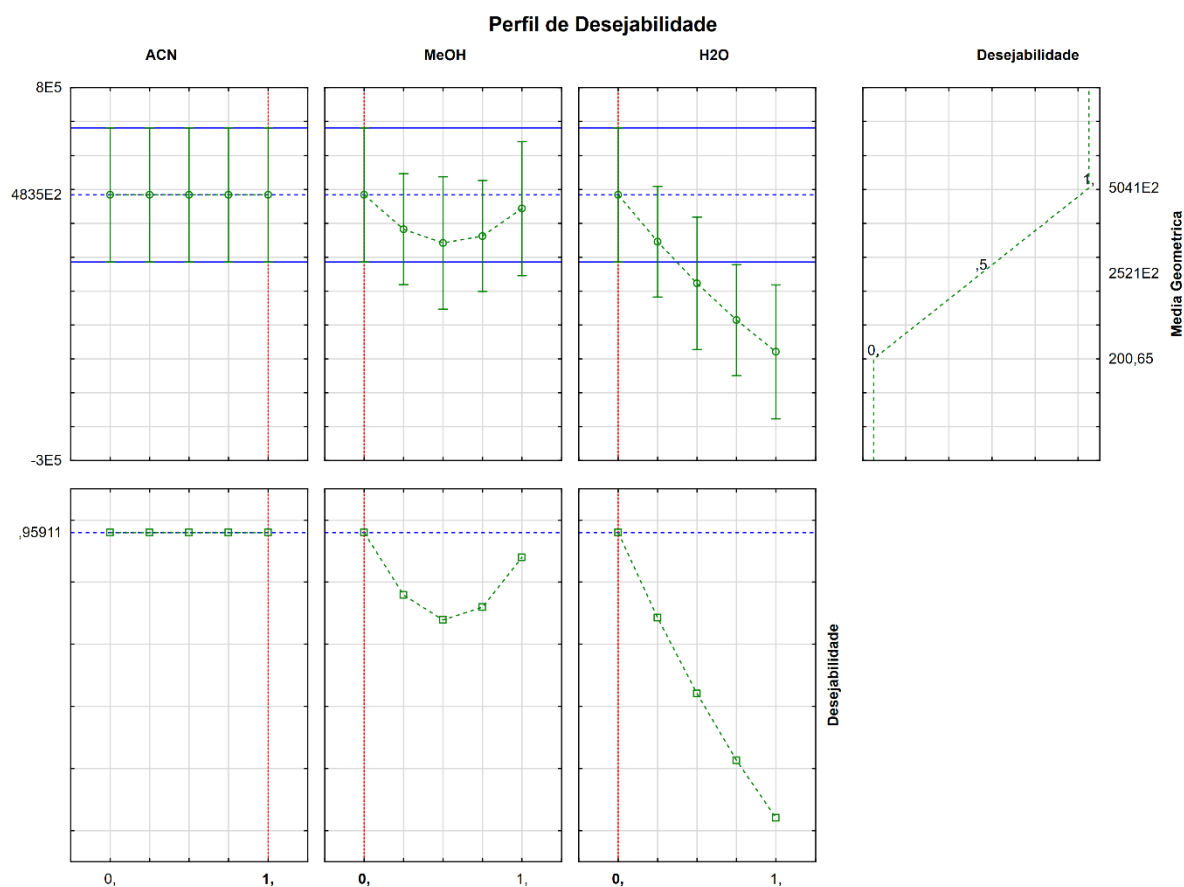
Figura 19 - Superfície de Resposta do Solvente de Dessorção.



Fonte: Autoria Própria (2025).

Portanto, é possível concluir que há duas regiões de respostas que tendem a ser ótimas, sendo elas, solvente de dessorção com apenas MeOH ou ACN. Optou-se pela escolha da ACN, pois a partir da desejabilidade a resposta ótima global foi a ACN. A desejabilidade é uma função baseada na conversão das respostas estimadas do modelo, em uma função individual de desejabilidade que é agregada a uma função composta (aritmética ou geométrica) pode ser minimizada ou maximizada, respectivamente, alcançando, desta forma, uma resposta ótima (Costa; Lourenço; Pereira, 2011). No ANEXO 5 é apresentado as desejabilidades individuais dos analitos, as quais estão conforme a média geométrica apresentada na Figura 20.

Figura 20 - Perfil de Desejabilidade da Média Geométrica.

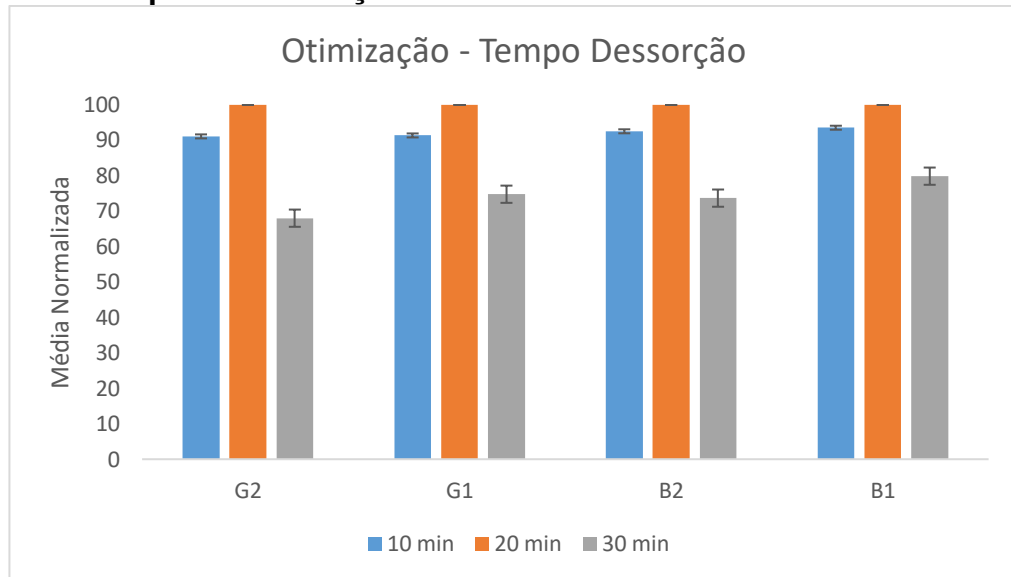


Fonte: Autoria Própria (2026).

Além disso, o solvente é menos volátil, ou seja, maior segurança ao analista. Diante disto, a ACN foi selecionada para ser o solvente de dessorção da metodologia.

5.6.2. TEMPO DE DESSORÇÃO

A fim de encontrar o tempo de equilíbrio ótimo da dessorção, realizou-se um experimento univariado, com os seguintes parâmetros de tempo avaliados: 10, 20 e 30 min. O resultado foi obtido através de ANOVA, disponível no Anexo 6, a qual demonstra que existe diferença significativa entre os fatores, e pela média normalizada das áreas dos picos, conforme observado na Figura 21.

Figura 21 - Tempo de Dessorção.

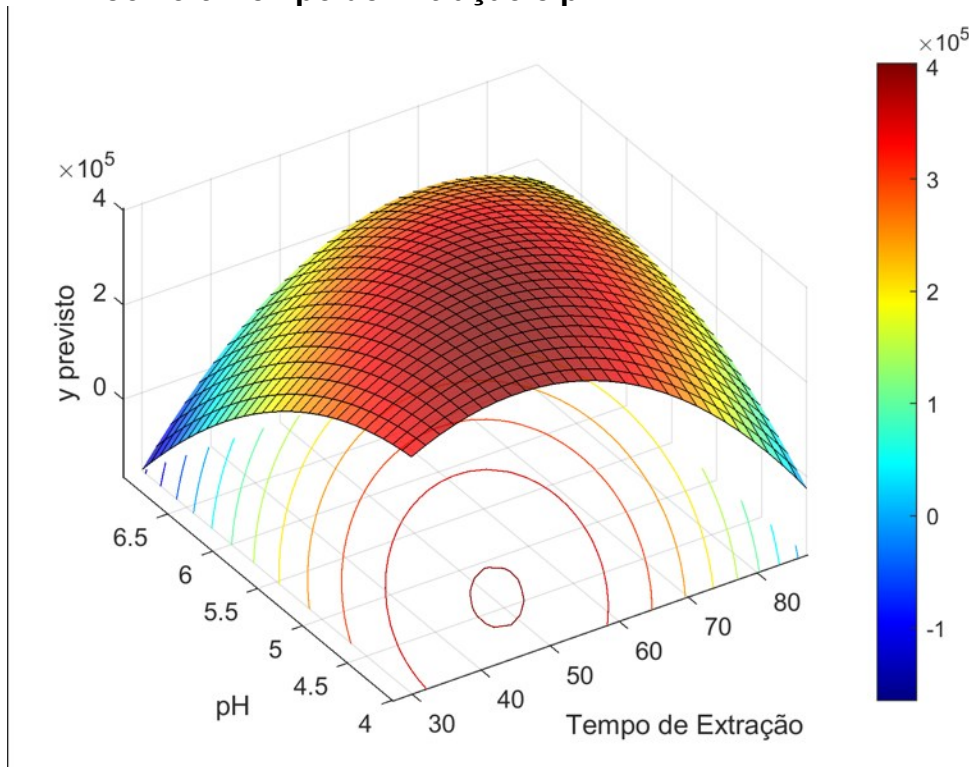
Fonte: Autoria Própria (2025).

Percebe-se que a melhor resposta é encontrada no tempo de 20 min de dessorção, a partir deste tempo, ocorre deslocamento do equilíbrio novamente no sentido da extração para o MIP (retro-extração), portanto, este tempo foi selecionado para a metodologia (Olomukoro; DeRosa; Gionfriddo, 2023).

5.6.3. TEMPO DE EXTRAÇÃO E PH

Conforme a Tabela 02, para estudar a relação do pH e do tempo de extração com uma maior eficiência de extração, realizou-se um experimento multivariado via *Doehlert*, obteve-se um R^2 de 0,9481, e não houve falta de ajuste no modelo de superfície gerado, de acordo com a Figura 22.

Figura 22 - Doehlert: Tempo de Extração e pH.



Fonte: Autoria Própria (2025).

Desta forma, pode se concluir que os parâmetros ótimos para a extração são encontrados com pH 4,6 e tempo de extração de 50 min. A confirmação destes valores foi realizada através da otimização *Simplex* Super modificado via app GAMMA, a otimização *Simplex* é uma forma de varrer a superfície de resposta a fim de encontrar o ponto ótimo, um triângulo equilátero “caminha” sobre a superfície buscando a resposta maximizada (neste caso), o Super modificado é uma forma acelerada deste processo, no qual os vértices do triângulo são estendidos até encontrar um platô de resposta ótima (Bona et al., 2000). A partir do modelo de *Doehlert* gerado foi avaliado os resultados por meio do *Simplex* e ANOVA, Anexo 7, apresentando um modelo significativo ($p < 0,05$) e sem falta de ajuste ($p > 0,05$), com desejabilidade em 0,9209. Por meio do tempo percebe-se que a partir de 50 minutos ocorre retro extração reduzindo a eficiência do estágio. O pH influencia na disponibilidade de sítios ativos na fase extratora para interagir com os analitos, desta forma, no pH 4,6 observa-se uma maximização desta ativação dos sítios ativos do MIP (Chmangu et al., 2019; Wei et al., 2015).

A partir destas variáveis otimizadas estima-se os parâmetros de mérito analíticos relacionados à metodologia proposta.

5.7. PARÂMETROS ANALÍTICOS

Após as otimizações da metodologia proposta, por adição padrão, desenvolveu-se curvas de calibração para cada um dos analitos com no mínimo cinco pontos de concentração em cada curva. Os parâmetros analíticos estão apresentados na Tabela 3.

Sendo que a faixa de trabalho linear variou de 1 a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para a maioria dos analitos, com o coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,9811, LOQ e LOD de 1 e 0,33 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Precisão intradia ($n=3$), no qual o primeiro nível foi estabelecido como o LOQ da faixa linear de cada analito, o segundo nível (*) sendo o ponto médio de cada faixa linear, e o terceiro nível (**) como sendo o último ponto da faixa linear. Os resultados da precisão variaram de 8,89 a 17,64% no primeiro nível, 7,35 a 12,37% no segundo nível e 15,81 a 17,97% no terceiro nível. Os quais estão de acordo com os valores estabelecidos da AOAC, definidos para este valor de LOQ (0-10 $\mu\text{g.L}^{-1}$), sendo no máximo 31% para a repetibilidade (AOAC, 2025.003).

Tabela 3 - Parâmetros Analíticos.

Parâmetros Analíticos							
Analito				Faixa Linear ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	precisão intradia (RSD%)		
	LOQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	R^2		primeiro nível (LOQ)	segundo nível*	terceiro nível**
G2	1	0,303	0,9867	1 a 10	8,89	11,81	16,04
G1	4	1,212	0,9956	4 a 10	16,31	7,35	15,81
B2	1	0,303	0,9834	1 a 10	11,54	12,37	16,51
B1	1	0,303	0,9811	1 a 10	17,64	11,49	17,97

Fonte: Autoria Própria (2026).

A ANVISA através do RDC nº 166/17 define que o valor para o coeficiente de correlação deve ser acima de 0,990, o valor alcançado no método proposto está acima deste limiar ressaltando a viabilidade do modelo gerado. (Simão et al., 2016; ANVISA, 2017).

Em relação a metodologia proposta engloba os LMTs estabelecidos pela ANVISA, a qual determina valores para o total de AFs sendo de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para a cevada maltada, para o milho o valor é 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ o qual está acima da faixa linear da

metodologia proposta (RDC nº 722/22, ANVISA). Em comparação a isto, o regulamento nº 915/2023 da União Europeia, estima um valor de 2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para a B1 e 4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para o somatório das AFs presentes em cevada maltada, em milho o valor é de 5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para a B1 e 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para o somatório das AFs, para este, a metodologia apresenta-se adequada.

5.8. COMPARAÇÃO DE RESULTADOS

A fim de avaliar o impacto da metodologia proposta no cenário das análises de aflatoxinas em amostras alimentícias, elaborou-se a Tabela 4 comparando os resultados encontrados na literatura com os desta metodologia.

Tabela 4 - Comparação com outros trabalhos.

Técnica Extração	Derivatização	Instrumentação	Matriz	Analitos	LOQ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Tempo total por amostra (min)	Faixa Linear ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Referência
HF-DLLME	offline TFA 65°C/9 min	HPLC-FLD	Suco de Soja	B1, B2, G1 e G2	0,03 a 0,01	80	B1: 0,1-21; B2:0,03-6; G2: 0,03-6; G1: 0,1-21.	(Simão, et al. 2016)
Coluna de Imunoafinidade	*	HPLC/ESI-MS/MS	Cervejas	B1, B2, G1 e G2	0,86 a 1,005	145	1 a 5	(Andronaco et al., 2025)
Cromatografia líquida bidimensional com múltiplos cortes de frações (heart-cutting)	*	HPLC/ESI-MS/MS	Cervejas	B1, B2, G1 e G2	0,017 a 0,833	38	1 a 50 para B1 e G1; 0,25 a 12 para B2 e G2.	(Campone et al., 2020)
D- μ SPE - MOF-bimetálico-nanomagnético	Não informado	HPLC-FLD	Arroz e Água	B1, B2, G1 e G2	G1 e B1: 0,15; G2:0,11; B2:0,04.	26	G1 e B1: 0,15 a 79,2; G2: 0,11 a 69,5; B2: 0,04 a 64,8	(Rezaei; Masrournia; Pordel, 2023)
Coluna de Afinidade com aptâmero	Pós-coluna fotoquímica	HPLC-FLD	Grãos	B1	5	30	5 a 20	(Ji et al., 2024)

MIP-TF-SPME	Não realizado	HPLC-FLD	Cervejas	B1, B2, G1 e G2	B1, B2, G2: 1; G1: 4.	1,25	B2 e G2: 1 a 10; B1: 1 a 7; G1: 4 a 10.	Este trabalho
Coluna de Imunoafinidade	offline TFA 40°C/30 min	HPLC-FLD	Cervejas	B1, B2, G1 e G2	B1 e G1: 0,015; B2 e G2: 0,010	66	B1 e G1: 0,015 a 0,5; B2 e G2: 0,045 a 1,50.	(Rocha et al., 2023)

Fonte: Autoria Própria (2026).

(*: nos instrumentos analíticos que utilizam detectores de massas não é necessário realizar a derivatização dos analitos durante o preparo de amostra).

Diante das informações apresentadas, observa-se que as metodologias que empregam HPLC-FLD realizam derivatizações para atingir LOQs menores, no entanto, esses métodos apresentam tempo de preparo de amostra mais elevado do que a metodologia proposta. Além disso, observa-se que nestas metodologias utilizam-se colunas de imuno afinidade que possuem algumas desvantagens como custo elevado, e problemas com desnaturação das proteínas (anticorpos) presentes neste formato de preparo de amostra, logo a reutilização é limitada e dependente da disponibilidade dos anticorpos (Liu et al., 2018).

Nos outros trabalhos observa-se a utilização de espectrômetros de massas, o que dispensa a necessidade de derivatização, aprimora a sensibilidade do método, o que justifica os melhores resultados de faixa linear e limites de quantificação. Porém, nestes casos ocorre aumento significativo do custo instrumental e operacional, visto o valor para se adquirir e manter em funcionamento este instrumento.

Um trabalho utilizando HPLC-FLD com bons LOQs e faixas lineares foi observado no estudo comparativo, no entanto, não foi descrito a etapa de derivatização, sugerindo, possivelmente, que houve a etapa, mas não foi descrita, visto que os valores dos parâmetros analíticos relativamente baixos, o que não é, comumente, possível de atingir sem realizar a etapa de derivatização.

De modo geral, a metodologia proposta supera os demais trabalhos no tempo de preparo por amostra, demonstrando a vantagem na utilização do sistema semi automático, com menor custo (materiais fabricados em laboratório e instrumentação acessível), enquanto atinge as faixas de limites estabelecidos pelos regulamentos.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu o desenvolvimento bem-sucedido de uma metodologia analítica inovadora para a determinação simultânea das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, sem derivatização, em amostras de cerveja, integrando a microextração em fase sólida em filme fino (TF-SPME) com o uso de polímero molecularmente impresso (MIP) como fase extratora acoplado a um sistema semi-automático de placa de 96 poços. A síntese do MIP, utilizando um *template dummy*, mostrou-se uma estratégia eficaz para conferir seletividade ao método, além de reduzir riscos ao analista e impactos ambientais, atendendo aos princípios da Química Analítica Verde.

As técnicas de caracterização confirmaram a formação adequada do polímero e sua estabilidade térmica. A aplicação de planejamentos experimentais permitiu a otimização racional das variáveis críticas do processo de extração e dessorção, resultando em ganhos significativos de eficiência analítica e reprodutibilidade.

Os parâmetros analíticos de mérito obtidos indicaram que a metodologia apresenta sensibilidade e precisão adequadas para o monitoramento de aflatoxinas em cerveja, mesmo em baixas concentrações, além de minimizar interferências da matriz. A compatibilidade do método com sistemas semiautomatizados, como o uso de placas de 96 poços, destaca seu potencial para análises de alta frequência, reduzindo o tempo de análise e a exposição do analista.

Dessa forma, a metodologia proposta constitui uma alternativa viável, robusta e sustentável para o controle de qualidade e segurança de cervejas, podendo contribuir para o monitoramento regulatório de aflatoxinas e para o avanço de estratégias analíticas mais seletivas e ambientalmente responsáveis no campo da Química Analítica.

Além disso, nas perspectivas futuras deste trabalho estão previstas a realização dos ensaios de precisão interdia, ensaios de recuperação para determinação da exatidão do método, bem como, a aplicação do método em outras amostras de cerveja, avaliando cervejas puro-malte (sem adjuntos cervejeiros) e cervejas que possuem milho em sua composição para examinar a presença das aflatoxinas nestes produtos.

REFERÊNCIAS

ABDELLA, Aya A.; ULBER, Roland. **Dummy-template molecularly imprinted polymers as an approach for improved efficiency for analytical applications: A mini review**. *Microchemical Journal* Elsevier Inc., , 1 fev. 2025.

ALIAKBARZADEH, Ghazaleh; MAHMOUDI-MEYMAND, Masoumeh; MAZAHERI, Mansoureh. Verification of a standard method based on immunoaffinity column cleanup and HPLC-FLD analysis for determination of aflatoxins in peanut kernels. **Food Control**, v. 152, 1 out. 2023.

ANDERSON, Hailee E. *et al.* **A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control**. *Analytica Chimica Acta* Elsevier B.V., , 28 nov. 2019.

ANVISA. **RDC nº166 de 24 de julho de 2017**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0166_24_07_2017.pdf. Acesso em 05/02/2026.

ANVISA. **RDC nº 722 de 1 de julho de 2022**. Disponível em: https://anvisa.gov.br/legis/datalegis/net/action/ActionDatalegis.php?acao=abrirTextoAto&link=S&tipo=RDC&numeroAto=00000722&seqAto=002&valorAno=2022&orgao=RDC/D/ANVISA/MS&codTipo=&desItem=&desItemFim=&cod_modulo=134&cod_menu=1696. Acesso em 05/02/2026.

BAMFORTH, C. W. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. **Journal of Cereal Science**, 2009.

BAUER, BS. Legitimization of the State in Inca Myth and Ritual. **American Anthropologist**, 1996.

BOGDAN, Paulina; KORDIALIK-BOGACKA, Edyta. **Alternatives to malt in brewing**. *Trends in Food Science and Technology* Elsevier Ltd., , 1 jul. 2017.

BONA, Evandro *et al.* Aplicativo para otimização empregando o método simplex seqüencial. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 5, p. 1201–1206, 2000.

BRASIL. **Decreto nº 12.709 de 31 de outubro de 2025**. https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2023-2026/2025/Decreto/D12709.htm#art240, , 2026.

BRUHEIM, Inge; LIU, Xiaochuan; PAWLISZYN, Janusz. Thin-film microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 1002–1010, 15 fev. 2003.

CADENAS, Raquel *et al.* **Brewing with starchy adjuncts: Its influence on the sensory and nutritional properties of beer**. **Foods**MDPI AG, , 1 ago. 2021.

CAMPAGNOLLO, Fernanda B. *et al.* In vitro evaluation of the ability of beer fermentation residue containing *Saccharomyces cerevisiae* to bind mycotoxins. **Food Research International**, v. 77, p. 643–648, 1 nov. 2015.

CARASEK, Eduardo; SCUR, Rafael; BERNARDI, Gabrieli. **High-throughput analytical methods employing microextraction techniques: Towards fast analyses lasting a few seconds**. **Advances in Sample Preparation**Elsevier B.V., , 1 out. 2023.

CHMANGUI, Anis *et al.* Aflatoxins screening in non-dairy beverages by Mn-doped ZnS quantum dots – Molecularly imprinted polymer fluorescent probe. **Talanta**, v. 199, p. 65–71, 1 jul. 2019.

CHMANGUI, Anis *et al.* Assessment of trace levels of aflatoxins AFB1 and AFB2 in non-dairy beverages by molecularly imprinted polymer based micro solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 13, n. 30, p. 3433–3443, 14 ago. 2021.

COSTA, Nuno R.; LOURENÇO, João; PEREIRA, Zulema L. Desirability function approach: A review and performance evaluation in adverse conditions.

Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, v. 107, n. 2, p. 234–244, jul. 2011.

CUMMINS, T. Toasts with the Inca: Andean Abstraction and Colonial Images on Quero Vessels. **University of Michigan Press**, 2002.

DIETRICH O, et al. The role of cult and feasting in the emergence of Neolithic communities. New evidence from Gobekli Tepe, south-eastern Turkey. **Antiquity**, 2012.

DONG, Chengya *et al.* **Molecularly imprinted polymers by the surface imprinting technique. European Polymer Journal** Elsevier Ltd, , 15 fev. 2021.

EUROPEAN COMISSION. **Regulamento (UE) 2023/915 da Comissão de 25 de abril de 2023**. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj>, , 2023.

GAŁUSZKA, Agnieszka; MIGASZEWSKI, Zdzisław; NAMIEŚNIK, Jacek. **The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. TrAC - Trends in Analytical Chemistry** Elsevier B.V., , 2013.

GONZÁLEZ, Gema Paniagua; HERNANDO, Pilar Fernández; ALEGRÍA, J. S. Durand. A morphological study of molecularly imprinted polymers using the scanning electron microscope. *In*: 31 jan. 2006.

HASANAH, Aliya Nur *et al.* **Factors affecting preparation of molecularly imprinted polymer and methods on finding template-monomer interaction as the key of selective properties of the materials. Molecules** MDPI, , 2 set. 2021.

HAYDEN, B; CANUEL, N.; SHANSE, J. What Was Brewing in the Natufian? An Archaeological Assessment of Brewing Technology in the Epipaleolithic. **J Archaeol Method Theory**, 2012.

HOCKINGS, K;; DUNBAR, R. Alcohol and Humans: A Long and Social Affair. **Oxford University Press**, 2019.

INOUE, Tomonori *et al.* Fate of mycotoxins during beer brewing and fermentation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 77, n. 7, p. 1410–1415, 2013.

JALILI, Vahid; BARKHORDARI, Abdullah; GHIASVAND, Alireza. **A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews. Microchemical Journal** Elsevier Inc., , 1 jan. 2020.

JAYASINGHE, G. D. Thilini Madurangika *et al.* Ultrasound assisted combined molecularly imprinted polymer for the selective micro-solid phase extraction and determination of aflatoxins in fish feed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1609, 4 jan. 2020.

JEANNOT, Michael A.; CANTWELL, Frederick F. Solvent Microextraction into a Single Drop. **Anal. Chem**, v. 68, p. 2236–2240, 1996.

JIANG, Ruifen; PAWLISZYN, Janusz. **Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction. TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, out. 2012.

JOFFE, AH. Alcohol and social complexity in ancient Western Asia. **Current Anthropology**, 1998.

KIM, G. History of Korean brewing industry. **Food Science and Industry**, 2020.

KŁOSOWSKI, Grzegorz *et al.* The influence of raw material contamination with mycotoxins on alcoholic fermentation indicators. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3147–3152, maio 2010.

KOK, WTh. **Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection** *Journal of Chromatography B*. [S.l.: S.n.].

KRUMPLEWSKI, Witold; RYKOWSKA, Iwona. **New Materials for Thin-Film Solid-Phase Microextraction (TF-SPME) and Their Use for Isolation and Preconcentration of Selected Compounds from Aqueous, Biological and Food Matrices**. *Molecules* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 nov. 2024.

LANCIONI, Carlina *et al.* Headspace solid-phase microextraction: Fundamentals and recent advances. **Advances in Sample Preparation**, v. 3, 1 ago. 2022.

LEE, Y. B. ;. KO, D. J. ;. CHEONG, C. A study on the quality characteristics of rice beer using brewing yeast isolated from Nuruk. **Journal of the Korea Academia** , 2019.

LESLIE, John F.; LOGRIECO, Antonio F. **Mycotoxin Reduction in Grain Chains**. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2014.

LIANG, Yutao *et al.* An amino-functionalized zirconium-based metal-organic framework of type UiO-66-NH₂ covered with a molecularly imprinted polymer as a sorbent for the extraction of aflatoxins AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ from grain. **Microchimica Acta**, v. 187, n. 1, 1 jan. 2020.

LIU, Shaorong; DASGUPTA, Pumendu K. Liquid Droplet. A Renewable Gas Sampling Interface. **Anal. Chem**, v. 67, p. 2042–2049, 1995.

MARANATA, Gabriella Josephine; SURYA, Natasha Octavianti; HASANAH, Aliya Nur. **Optimising factors affecting solid phase extraction performances of molecular imprinted polymer as recent sample preparation technique**. *Heliyon* Elsevier Ltd, , 1 jan. 2021.

MARTÍNEZ SAAVEDRA, Liz Nayibe *et al.* Molecularly imprinted polymers for selective adsorption of quinoline: theoretical and experimental studies. **RSC Advances**, v. 8, n. 50, p. 28775–28786, 2018.

MARTINS, Rafael Oliveira *et al.* Integration of miniaturized sample preparation and molecularly imprinted polymers in food analysis. **Green Analytical Chemistry**, v. 10, 1 set. 2024.

MARTINS, Rafael Oliveira *et al.* **Advances in miniaturized liquid sample preparation techniques for environmental analysis: A special look towards green solvents and automation.** *Journal of Chromatography Open* Elsevier B.V., , 1 nov. 2025.

MIRNAGHI, Fatemeh S.; MONTON, Maria Rowena N.; PAWLISZYN, Janusz. Thin-film octadecyl-silica glass coating for automated 96-blade solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for analysis of benzodiazepines. **Journal of Chromatography A**, v. 1246, p. 2–8, 13 jul. 2012.

MORÉS, Lucas; DIAS, Adriana Neves; CARASEK, Eduardo. Development of a high-throughput method based on thin-film microextraction using a 96-well plate system with a cork coating for the extraction of emerging contaminants in river water samples. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 3, p. 697–703, 1 fev. 2018.

MOSTAFA, Aya M. *et al.* **Review on molecularly imprinted polymers with a focus on their application to the analysis of protein biomarkers.** *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* Elsevier B.V., , 1 nov. 2021.

NARDINI, M. ;. FODDAI, M. S. Phenolics profile and antioxidant activity of special beers. **Molecules**, 2020.

NOVÁKOVÁ, Lucie; VLČKOVÁ, Hana. **A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation.** *Analytica Chimica Acta*, 10 dez. 2009.

OKOYE, Z. S. C. Carryover of Aflatoxin B1 in Contaminated Substrate Corn into Nigerian Native Beer. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, v. 37, p. 482–489, 1986.

OLOMUKORO, Aghogho A.; DEROSA, Charlotte; GIONFRIDDO, Emanuela. Investigation of the adsorption/desorption mechanism of perfluoroalkyl substances on HLB-WAX extraction phases for microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 1260, 15 jun. 2023.

PARK, J. S. ;; KANG, S. T. Quality characteristics of beer with pine bark extract. **Food Engineering Progress**, 2020.

PASCARI, Xenia *et al.* **Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. Food Research International** Elsevier Ltd, , 1 jan. 2018.

PAWLISZYN, Janus; ARTHUR, Catherine L. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145–2148, 1990.

PENHA, Gilmar F. C. *et al.* Occurrence and Exposure Assessment of Mycotoxins from Beers Commercially Traded in Brazil. **Beverages**, v. 11, n. 3, 1 jun. 2025.

PIACENTINI, Karim C. *et al.* Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B1 and deoxynivalenol in beer quality. **Food Chemistry**, v. 218, p. 64–69, 1 mar. 2017.

PIETRI, Amedeo *et al.* Transfer of aflatoxin B1 and fumonisin B1 from naturally contaminated raw materials to beer during an industrial brewing process. **Food Additives and Contaminants - Part A**, v. 27, n. 10, p. 1431–1439, 2010.

PIRI-MOGHADAM, Hamed; ALAM, Md Nazmul; PAWLISZYN, Janusz. **Review of geometries and coating materials in solid phase microextraction:**

Opportunities, limitations, and future perspectives. *Analytica Chimica Acta* Elsevier B.V., , 1 set. 2017.

REGLITZ, Klaas *et al.* The impact of caramel and roasted wheat malts on aroma compounds in top-fermented wheat beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 128, n. 4, p. 138–149, 2022.

RICARDO TEIXEIRA TARLEY, César; DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR LAURO TATSUO KUBOTA, Maria. **POLÍMEROS BIOMIMÉTICOS EM QUÍMICA ANALÍTICA. PARTE 1: PREPARO E APLICAÇÕES DE MIP (“MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS”) EM TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO** *Quim. Nova*. [S.l.: S.n.].

ROCHA, Andrea Rebouças *et al.* Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in beers produced in Brazil and their carcinogenic risk evaluation. **Food Control**, v. 145, 1 mar. 2023.

RUIZ-MEDINA, Antonio; FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA, Ma Luisa. Aflatoxin B1 in Beer at Different Stages of Production. *In: Processing and Impact on Active Components in Food*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2015. p. 517–523.

SADEGHI GOOGHERI, Mohammad Sadegh *et al.* Dummy Template Molecularly Imprinted Polymers for Electrochemical Detection of Cardiac Troponin I: A Combined Computational and Experimental Approach. **Chemosensors**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2025.

SHAFQAT, Syed Rizwan *et al.* Template-assisted synthesis of molecularly imprinted polymers for the removal of methyl red from aqueous media. **BMC Chemistry**, v. 17, n. 1, 1 dez. 2023.

SHOPSKA R.; DENKOVA-KOSTOVA, M.; DZHIVODEROVA-ZARCHEVA, D. Comparative study on phenolic content and antioxidant activity of different malt types. **Antioxidants**, 2021.

SIMÃO, Vanessa *et al.* Novel analytical procedure using a combination of hollow fiber supported liquid membrane and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of aflatoxins in soybean juice by high performance liquid chromatography - Fluorescence detector. **Food Chemistry**, v. 196, p. 292–300, 1 abr. 2016.

SKOOG, Douglas A. *et al.* **Fundamentos de química analítica**. 8^a ed. São Paulo: Thomson, 2006.

SOARES DA SILVA BURATO, Juliana *et al.* **Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques**. **Journal of Separation Science**Wiley-VCH Verlag, , 1 jan. 2020.

SOHRABVANDI, S.; MOUSAVI, S.; RAZAVI, S. H. Alcohol-free beer: Methods of production, sensorial defects, and healthful effects. **Food Reviews International**, 2010.

STATISTA. **Alcoholic Drinks - Worldwide**. 2022.

SULTANA, Tahira *et al.* **Aflatoxins in Peanut (*Arachis hypogaea*): Prevalence, Global Health Concern, and Management from an Innovative Nanotechnology Approach: A Mechanistic Repertoire and Future Direction**. **ACS Omega**American Chemical Society, , 18 jun. 2024.

THATI, Ramya *et al.* Molecularly imprinted dispersive micro solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of four aflatoxins in various foods. **Food Chemistry**, v. 433, 1 fev. 2024.

TSE SUM BUI, Bernadette; MIER, Alejandra; HAUPT, Karsten. **Molecularly Imprinted Polymers as Synthetic Antibodies for Protein Recognition: The Next Generation**. **Small**John Wiley and Sons Inc, , 29 mar. 2023.

VIJAYA KUMAR, Vankayalapati. Aflatoxins: Properties, Toxicity and Detoxification. **Nutrition & Food Science International Journal**, v. 6, n. 5, 25 maio 2018.

WANG, Mei-di *et al.* Trends of microextraction methods for opioids in complex samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1768, p. 466713, fev. 2026.

WEI, Shoulian *et al.* Molecularly imprinted solid phase extraction coupled to high performance liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 and B1 in foods and feeds. **RSC Advances**, v. 5, n. 27, p. 20951–20960, 2015.

WEI, Zehui *et al.* Preparation and application of a pseudo-templated multi-monomer aflatoxins imprinted polymer. **Microchimica Acta**, v. 191, n. 10, 1 out. 2024.

WIECZOREK, Martyna Natalia. Comparison of Different Solid-Phase Microextraction Formats Dedicated to the Analysis of Volatile Compounds—A Comprehensive Study. **Molecules**, v. 29, n. 21, 1 nov. 2024.

WORLD POPULATION REVIEW. **Alcohol Consumption by Country 2026**.

YU, Seung Min *et al.* Chemical composition, aroma profile, antioxidant activity, and sensory attributes of beer according to roasting degree and malt type. **Food Chemistry**, v. 31, 1 out. 2025.

ZHANG, Kai; BANERJEE, Kaushik. **A Review: Sample Preparation and Chromatographic Technologies for Detection of Aflatoxins in Foods**. **Toxins**MDPI AG, , 1 set. 2020.

ZHOU, Wei; WIECZOREK, Martyna N.; PAWLISZYN, Janusz. High throughput and automated solid-phase microextraction and determination by liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of mycotoxins in beer. **Food Chemistry**, v. 426, 15 nov. 2023.

ZUNNGU, Silindile Senamile *et al.* Synthesis and application of a molecularly imprinted polymer in the solid-phase extraction of ketoprofen from wastewater. **Comptes Rendus Chimie**, v. 20, n. 5, p. 585–591, 1 maio 2017.

ANEXO 1 – ANOVA DO CONDICIONAMENTO DA FASE EXTRATORA

Tabela 5 - Resultado da ANOVA do condicionamento.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>Gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2,86E+13	15	1,91E+12	2,129851	0,02437	1,880175
Dentro dos grupos	4,3E+13	48	8,97E+11			

Fonte: Autoria Própria (2026)

ANEXO 2 – ANOVA DO EFEITO DA DILUIÇÃO DA AMOSTRA

Tabela 6 - Resultado da ANOVA do efeito da diluição

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,4E+11	11	1,27E+10	0,070059	0,999977	2,066608
Dentro dos grupos	6,53E+12	36	1,81E+11			

Fonte: Autoria Própria (2026)

ANEXO 3 – ANOVA DO EFEITO DE MEMÓRIA

Tabela 7 - Resultado da ANOVA do efeito de memória

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2,82E+12	11	2,57E+11	2,097016	0,046698	2,066608
Dentro dos grupos	4,41E+12	36	1,22E+11			

Fonte: Autoria Própria (2026).

ANEXO 4 – ANOVA DO EFEITO DA FITA

Tabela 8 - Resultado da ANOVA no estudo do efeito da fita

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>Gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
	1,02347E+1					
Amostra	3	1	1,02E+13	1718,729	3,04E-39	4,042652
	3,23294E+1					
Colunas	3	7	4,62E+12	775,5932	4,17E-47	2,207436
	3,00148E+1					
Interações	3	7	4,29E+12	720,0649	2,44E-46	2,207436
	2,85829E+1					
Dentro	1	48	5,95E+09			

Fonte: Autoria Própria (2026).

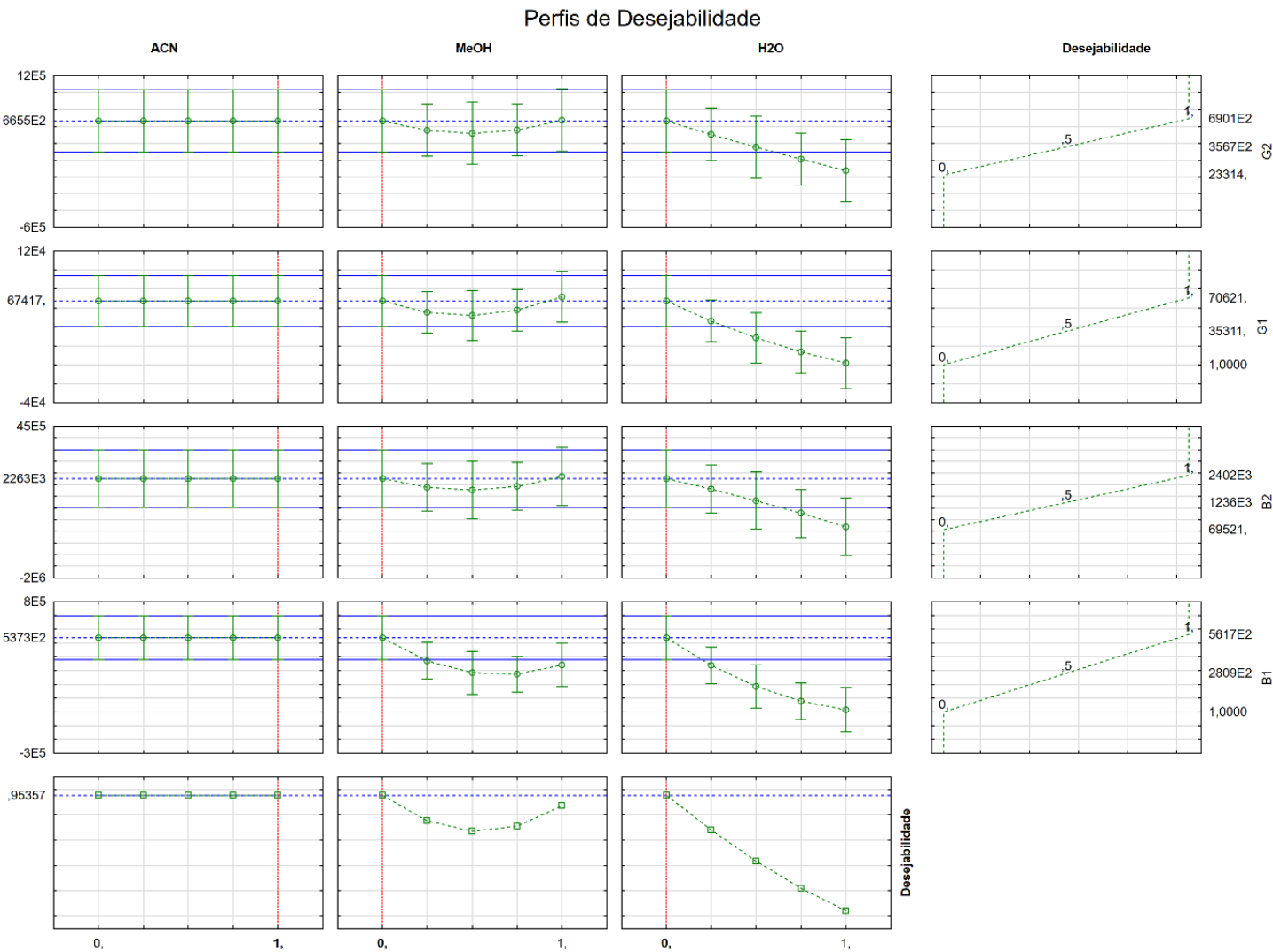
ANEXO 5 – ANOVA E DESEJABILIDADE DO MODELO *SIMPLEX CENTRÓIDE*

Tabela 9 - Resultado da ANOVA para o modelo *simplex-centróide*

ANOVA					
Fonte	SS	df	MS	F	p
Modelo	2,04^11	6	3,40^10	5,38	0,042
Erro Total	3,16^10	5	6,32^9		
Falta de Ajuste	2,66^10	3	8,88^9	3,59	0,22
Erro Puro	4,94^9	2	2,47^9		
Total Ajustado	2,36^11	11	2,15^10		

Fonte: Autoria Própria (2026).

Figura 23 - Perfis de Desejabilidade entre os analitos



Fonte: Autoria Própria (2026).

ANEXO 6 – ANOVA DO TEMPO DE DESSORÇÃO

Tabela 10 - Resultado da ANOVA para o tempo de dessorção

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1412,161	2	706,0805	84,96898	1,44E-06	4,256495
Dentro dos grupos	74,788757	9	8,309862			

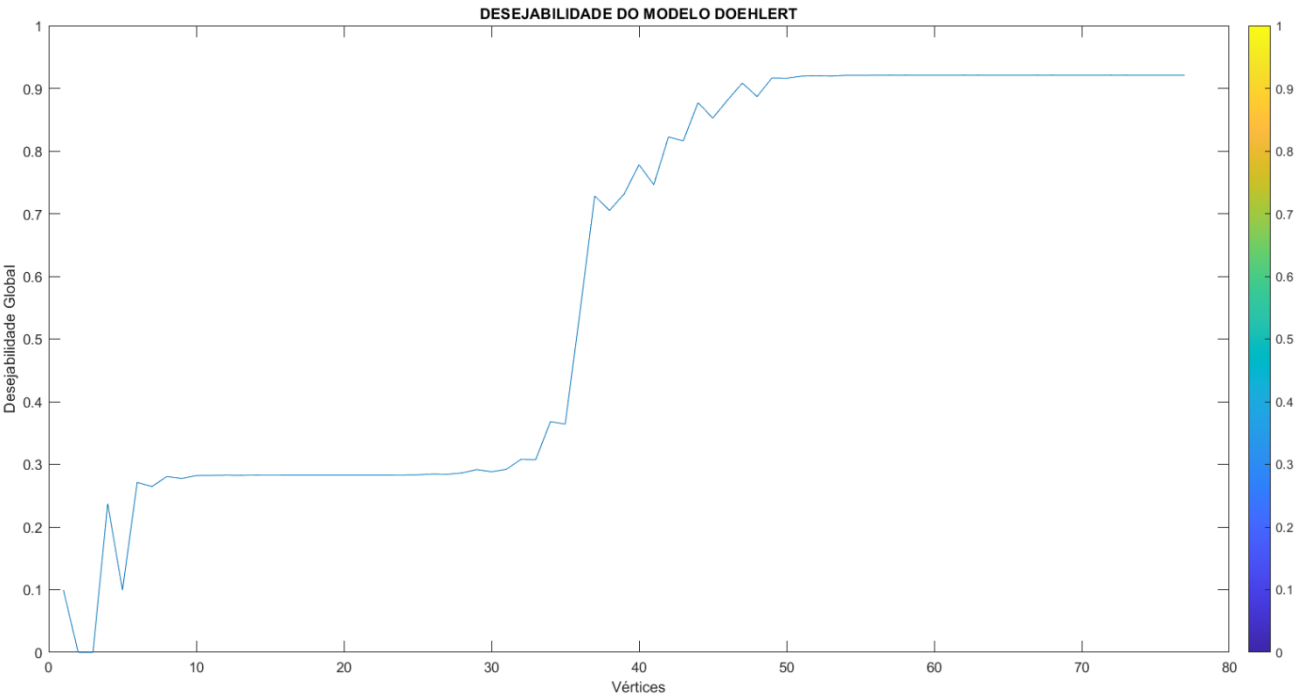
Fonte: Autoria Própria (2026).

ANEXO 7 – ANOVA DO RESULTADO DO MODELO DOEHLERT

Tabela 11 - Resultados da otimização de tempo de extração e pH pelo planejamento *Doehlert*

ANOVA - Modelo Quadrático					
	SumSQ	DF	MeanSQ	F	p
Total	1,29^11	8	1,62^10	*	*
Modelo	1,22^11	5	2,447^10	10,25	0,042
Linear	2,31^10	2	1,15^10	4,84	0,1149
Não Linear	9,92^10	3	3,30^10	13,85	0,029
Residual	7,16^9	3	2,38^9	*	*
Lack of Fit	5,74^9	1	5,74^9	8,1	0,104
Erro Puro	1,41^9	2	7,08^8	*	*
Otimização Simplex					
Tempo de Extração (min)		pH			
Resultado em					
X	50,54	4,62			

Figura 24 - Desejabilidade Global - Modelo Doehlert



Fonte: Autoria própria (2026)