



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

Maria Eduarda Pierri

**SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO COMO FASE EXTRATORA NA TÉCNICA DE
EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE MEMBRANA MICROPOROSA DE FIBRA
OCA PARA A DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS EM ÁGUA DE CHUVA**

Florianópolis

2022

Maria Eduarda Pierri

**SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO COMO FASE EXTRATORA NA TÉCNICA DE
EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE MEMBRANA MICROPOROSA DE FIBRA
OCA PARA A DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS EM ÁGUA DE CHUVA**

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. Luciano Vitali

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek

Florianópolis

2022

Pierri, Maria Eduarda

Solvente eutético profundo como fase extratora na técnica de extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em água de chuva / Maria Eduarda Pierri ; orientador, Luciano Vitali, coorientador, Eduardo Carasek, 2022.

77 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Química. 2. Extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca. 3. Solvente Eutético Profundo. 4. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 5. 96-well plate. I. Vitali, Luciano. II. Carasek, Eduardo . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Química. IV. Título.

Maria Eduarda Pierri

Solvente eutético profundo como fase extratora na técnica de extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em água de chuva

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Luciano Vitali

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Eduardo Sidinei Chaves

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Daniel Lazaro Gallindo Borges

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

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

Prof. Dr. Giovanni Finoto Caramori

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Luciano Vitali

Orientador

Florianópolis, 2022.

Dedico aos meus pais, Marcelo e Edilene.

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais, Marcelo e Edilene, por todo o apoio durante os anos de graduação e pós graduação, por todo o amor, auxílio e carinho que foi dado durante essa caminhada facilitando meu dia a dia. Agradeço por todo o incentivo nos estudos e por me darem todo o suporte necessário. Sem vocês eu não teria conquistado nada disso. Amo vocês.

Aos meus irmãos, Junior e Sofia pelo companheirismo dentro de casa e por me apoiarem cada um da sua forma. Aos meus avós que já não estão mais presentes e ao vô Neu, que sempre tiveram grande importância na minha vida e são exemplos de pessoas para mim.

Ao meu namorado, Matheus, por todo amor e alegria que me trouxe nesse tempo, por todo companheirismo e apoio durante essa difícil fase de realizar o mestrado no meio da pandemia. Por sempre me aconselhar em todas as escolhas e me acalmar nos momentos mais difíceis. Obrigada por me proporcionar uma relação maravilhosa, leve e feliz.

As minhas amigas de infância, Elisa, Lari e Thami, por sempre estarem ao meu lado nesses anos de UFSC, mesmo que por muitas vezes distantes. Serei sempre grata por conseguirmos manter essa amizade depois de anos. Obrigada por tudo meninas. Aos amigos que fiz durante a graduação de química e permaneceram até hoje, Ana, Amanda, Vanessa e Vinícius, o apoio de vocês durante esses anos foi essencial e deixaram meus dias mais leves. Obrigada por toda ajuda em matérias, ensinamentos, conselhos e tenho certeza que levarei essa amizade com muito carinho mesmo com qualquer distância.

Um agradecimento especial a Camila, por toda a parceria no trabalho. Uma amizade que construí no laboratório e fará muita falta. Obrigada por tudo que você me ensinou e por sempre estar tão disposta a ajudar. Você é uma pessoa maravilhosa e muito talentosa. Obrigada por ter deixado a experiência de um mestrado na pandemia menos frustrante e por toda a troca que tivemos nesse período.

Aos meus colegas do CroMaas, por todo o companheirismo, pelos momentos de descontração e por sempre estarem prontos para ajudar de alguma maneira. Sou

grata por toda a ajuda para a realização desse trabalho durante o mestrado. Com certeza aprendi um pouquinho com cada um lá dentro.

Ao meu orientador, Professor Doutor Luciano Vitali e ao meu coorientador, Professor Doutor Eduardo Carasek, pela oportunidade de fazer o mestrado, por todo o conhecimento fornecido nesse tempo, seja em sala de aula ou reuniões virtuais, por todo o apoio e paciência. Obrigada pela porta que vocês abriram para mim. A UFSC tem sorte de contar com professores como vocês.

A UFSC e ao Programa de Pós-graduação em química pelo espaço concedido, pela oportunidade de ter acesso ao ensino público de qualidade.

A CAPES pela bolsa de estudos que me permitiu dedicação exclusiva ao programa de pós-graduação em química.

Agradeço aos professores que encontrei nesses anos e tive a sorte de aprender com todos eles. Provavelmente não os encontrarei mais dentro de sala de aula mas nunca esquecerei todos os ensinamentos. Obrigada por me mostrarem que a caminhada é difícil mas é prazerosa, principalmente quando chegamos ao final de uma fase.

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são considerados poluentes orgânicos prioritários em estudos ambientais. A presença desses contaminantes em amostras aquosas pode impactar na qualidade da água e trazer efeitos negativos para a saúde humana, uma vez que, são considerados precursores de ações mutagênicas e tumorais em sistemas biológicos. Neste estudo foi desenvolvido uma metodologia analítica baseada na técnica de extração líquido-líquido em membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE) a qual utiliza reduzido volume de solvente. O solvente extrator utilizado foi o solvente eutético profundo (DES) para a determinação de 11 HPAs em água de chuva. Para a metodologia foram fixados o comprimento de 1 cm da membrana de fibra oca de polipropileno, o volume de 400 μL do DES mantido como fase orgânica nos poros da membrana (fase receptora) e o volume de 1,5 mL de amostra aquosa (fase doadora). Todos os experimentos envolvendo a técnica de HF-MMLLE foram realizadas em um sistema de *96-well plate*. Foram otimizados os parâmetros da metodologia analítica por meio de planejamentos univariados e multivariados de superfícies de resposta. A composição do melhor DES para as extrações foi ácido dodecanoico e o ácido hexanoico. Para o solvente de dessorção, o melhor resultado foi utilizando 100% de acetona. Os tempos ótimos de extração e dessorção foram alcançados em 80 e 40 min, respectivamente. Na avaliação da metodologia desenvolvida, foram obtidos limites de detecção e quantificação de 4,5 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para os HPAs de estudo. O estudo da linearidade revelou coeficientes de correlação maiores ou iguais a 0,9745. A exatidão do método foi avaliada por meio de testes de recuperação e as recuperações relativas dos HPAs indicaram valores que variaram de 85 a 117%. A precisão do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD %) interdia e intradia. A precisão interdia ($n = 9$) variou de 3% a 13% e a precisão intradia variou de 1% a 12% ($n = 3$). A metodologia desenvolvida foi aplicada em amostras de água da chuva da região de Florianópolis (SC), nas quais não foram detectados nenhum dos HPAs avaliados. Os resultados obtidos pela metodologia demonstram que a nova abordagem de HF-MMLLE/DES exibe uma série de vantagens em relação as técnicas convencionais, como o baixo consumo de solvente e amostra, a substituição de solventes tóxicos e alta frequência analítica, possibilitando o uso de HF-MMLLE/DES para diversas aplicações e ainda, a metodologia pode ser utilizada como um indicador de poluição ambiental em amostras de água da chuva.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca. Solvente Eutético Profundo. *96-well plate*.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are considered priority organic pollutants in environmental studies. The presence of these contaminants in aqueous samples can impact water quality and bring negative effects to human health, since they are considered precursors of mutagenic and tumor actions in biological systems. In this study, a simple analytical methodology was developed based on the technique of liquid-liquid extraction in a hollow fiber microporous membrane (HF-MMLLE) which uses a reduced volume of solvent. The extracting solvent used was deep eutectic solvent (DES) for the determination of 11 PAHs in aqueous samples. For the methodology, the length of 1 cm of the polypropylene hollow fiber membrane, the volume of 400 μL of DES maintained as an organic phase in the pores of the membrane (receptor phase) and the volume of 1.5 mL of aqueous sample (phase donor). All assays involving the HF-MMLLE technique were performed on a 96-well plate system. The parameters of the analytical methodology were optimized through univariate and multivariate response surface designs. The composition of the best DES for the extractions was dodecanoic acid and hexanoic acid. For the desorption solvent, the best result was using 100% acetone. The optimal extraction and desorption times were reached at 80 and 40 min, respectively. In evaluating the developed methodology, detection and quantification limits of 4.5 and 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ were obtained, respectively, for the study PAHs. The linearity study revealed correlation coefficients greater than or equal to 0.9745. The accuracy of the method was evaluated by the relative recoveries of PAHs indicating values ranging from 85 to 117%. The precision of the method was evaluated by the interday and intraday relative standard deviation (RSD %). Interday precision ($n = 9$) ranged from 3% to 13% and intraday precision ranged from 1% to 12% ($n = 3$). The technique developed was applied to rainwater samples from the region of Florianópolis (SC), in which none of the evaluated PAHs were detected. The results obtained by the methodology demonstrate that the new HF-MMLLE/DES approach exhibits a series of advantages over conventional techniques, such as low solvent and sample consumption, the substitution of toxic solvents and high analytical frequency, enabling the use of HF-MMLLE/DES for several applications and the methodology can be used as an indicator of environmental pollution in rainwater samples

.Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons. Liquid-liquid extraction of hollow fiber microporous membrane. Deep Eutectic Solvent. 96-well plate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs). Nesta figura estão os 16 HPAs prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA 1987).	18
Figura 2. Partição vapor-partícula e remoção da atmosfera	20
Figura 3. Esquema dos modos de extração utilizados em HF-LPME. <u>Erro! Indicador não definido.-</u>	
Figura 4. Diagrama de fases para a mistura de CHCl_3 e ureia, na respectiva razão molar 1:2, com o ponto eutético.	32 34
Figura 5. Evolução do número de publicações de DES em geral (em azul) e de DES hidrofóbicos nos últimos anos.	34 33
Figura 6. Esquema do preparo da membrana	40 39
Figura 7. Curva de calorimetria diferencial de varredura para o DES.....	47 46
Figura 8. Comparação dos espectros de infravermelho dos componentes individuais e do DES.....	47 46
Figura 9. Curva TGA do DES ácido dodecanoico:ácido hexanoico.	49 48
Figura 10. Cromatograma da separação dos 11 analitos acompanhados em 260 nm. Analitos: Naftaleno (Na), Acenaftileno (Ace), Acenafteno (Ac), Fluoreno (F), Fenantreno (Fen), Antraceno (A), Fluoranteno (Fl), Pireno (Pir), Benzo[b]fluoranteno (BbF), Benzo[a]pireno (BaP) e Indeno (IP).....	50 49
Figura 11. Gráfico de barras obtido para avaliação do solvente extrator.....	51 50
Figura 12. Superfície ternária Simplex Lattice obtida para otimização do solvente de dessorção.....	54 53
Figura 13. Gráfico de barras obtido para avaliação do tempo de dessorção.....	55 54
Figura 14. Gráfico de Pareto com o resultado da triagem das variáveis de influência na eficiência de extração.....	56 55
Figura 15. Gráfico de Pareto do Box-Benken com o resultado da triagem das variáveis de influência na eficiência de extração.....	58 57
Figura 16. Superfície de resposta obtida para a otimização tempo de extração e do pH na amostra.	59 58

Figura 17. Superfície de resposta obtida para a otimização tempo de extração e da % sal na amostra.	60 59
Figura 18. Gráfico de barras obtido pelo estudo do tempo de extração.	61 60
Figura 19. Cromatogramas das amostras coletada e da amostra fortificada.	65 64

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos HPAs explorados neste trabalho: Número de anéis aromáticos; peso molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$); solubilidade ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); pressão de vapor (Pa); H, constante de Henry ($\text{Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$); Log K_{ow} , coeficiente de partição (octanol/água), nd - Não determinado.....	20
Tabela 2. Classificação de alguns HPAs de acordo com os grupos estabelecidos pela IARC, com relação à evidência carcinogenicidade.	22
Tabela 3. O uso de DES como fase extratora em métodos de preparo de amostra	37 36
Tabela 4. Diferentes proporções de HBA e HBD e seu aspecto visual.	41 40
Tabela 5. Planejamento de misturas de superfície ternária Simplex Centroide para escolha do solvente de dessorção.....	43 42
Tabela 6. Planejamento fatorial completo 2^3 para otimização dos parâmetros de extração.....	44 43
Tabela 7. Planejamento Box-Behnken para segunda otimização dos parâmetros de extração.....	45 44
Tabela 8. Tabela ANOVA do Gráfico de Pareto.	57 56
Tabela 9. Tabela ANOVA do Gráfico de Pareto do Box-Benken.....	58 57
Tabela 10. Limites de detecção e quantificação, faixas lineares de trabalho, coeficientes de correlações lineares e equações lineares de 11 HPAs.....	62 61
Tabela 11. Ensaio de precisão (intradia e interdia) e recuperação relativa (%RR) para o método de HF-MMLLE/DES.....	64 63
Tabela 12. Comparação do método de HF-MMLLE/DES proposto com outros presentes na literatura	68 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A-Antraceno (do inglês *Anthracene*)
- Ac- Acenafteno (do ingles *Acenaphthene*)
- ACN – Acetonitrila (do inglês *Acetonitrile*)
- Ace- Acenaftileno (do inglês *Acenaphthylene*)
- Acet – Acetona (do ingles *Acetone*)
- ANOVA – Análise de Variância
- AOAC – Associação de Químicos Analíticos Oficiais (do inglês *Association of Official Analytical Chemist*)
- BbF- Benzo[b]fluoranteno (do inglês *Benzo[b]fluoranthene*)
- BaP- Benzo[a]pireno (do inglês *Benzo[a]pyrene*)
- ChCl – Cloreto de colina (do inglês *Choline chloride*)
- DAD – Detector por Arranjo de Diodos (do inglês *Diode Array Detection*)
- DES – Solvente eutético profundo (do inglês *Deep eutetic solvent*)
- DODECA:HEXA – Ácido dodecanoico:Ácido hexanoico (do inglês *Dodecanoic acid: Hexanoic acid*)
- E_T^N – Polaridade normalizada (do inglês *normalized polarity*)
- F – Fluoreno (do inglês *Fluorene*)
- Fen – Fenantreno (do inglês *Phenanthrene*)
- FID – Detector por ionização em chama (do inglês *Flame Ionization Detector*)
- FI- Fluoranteno (do ingles *fluoranthene*)
- GC – Cromatografia gasosa (do inglês *Gas Chromatography*)
- HBA - um acceptor de ligação de hidrogênio (do inglês *hydrogen bond acceptor*)
- HBD - um doador de ligação de hidrogênio (do inglês *hydrogen bond donor*)
- HPA – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (do inglês *Polycyclic aromatic hydrocarbons*).
- HF-LPME - Microextração em fase líquida suportada com membrana oca (do inglês *Hollow-fiber Liquid-Phase Microextraction*)

HF-MMLLE – – Extração líquido-líquido utilizando membrana oca microporosa (do inglês *Hollow fiber microporous liquid-liquid extraction*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High performance liquid chromatography*).

IARC - Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (do inglês *International Agency for Research on Cancer*)

IP - Indeno[1,2,3-c,d]pireno (do inglês *Indeno[1,2,3-cd]pyrene*)

Lis – Líquidos iônicos (do inglês *Ionic liquids*)

LLE - extração líquido-líquido (do inglês *Liquid-liquid extraction*)

LOD – Limite de detecção (do inglês *Limit of detection*)

LOQ – Limite de quantificação (do inglês *Limit of quantification*)

LPME – Microextração em fase líquida (do inglês *Liquid phase microextraction*)

MeOH – Metanol (do inglês *Methanol*)

Na- Naftaleno (do inglês *Naphthalene*)

NaCl - Cloreto de sódio (do inglês *Sodium chloride*)

NADES - solventes eutéticos profundos naturais (do inglês *Natural deep eutetic solvents*)

Pir – Pireno (do inglês *Pyrene*)

R² - Coeficiente de determinação (do inglês *Determination coefficient*)

RSD(%) – Desvio Padrão Relativo (do inglês *Relative Standard Deviation*)

SLM – Membrana de líquida suportada (do inglês *Supported Liquid Membrane*)

SPE – Extração em fase sólida (do inglês *Solid phase extraction*)

SPME - Microextração em fase sólida (do inglês *solid phase microextraction*)

USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês *United States Environmental Protection Agency*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS.....	17
2.1.1 Fontes de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	18
2.1.2 Propriedades Físico-Químicas dos HPAs.....	19
2.1.3 Toxicidade.....	21
2.2 PREPARO DE AMOSTRA	23
2.2.1 Microextração em fase líquida suportada com membrana oca (HF-LPME)	25
2.2.1.1 Configurações da HF-LPME.....	26
2.2.2 Extração líquido-líquido em membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE) 3029	
2.3 SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO (DES).....	3231
2.3.2 Solventes eutéticos profundos hidrofóbicos	3433
2.3.3 Propriedades físico-químicas do DES.....	3534
2.3.4 Preparação dos DES.....	3736
3 OBJETIVOS	3836
3.1. OBJETIVO GERAL.....	3837
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3837
4 METODOLOGIA	3938
4.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	3938
4.2 MATERIAIS E REAGENTES	38 Erro! Indicador não definido.
4.3 PREPARO DAS MEMBRANA PARA O SISTEMA DE 96-WELL PLATE COM DES 4039	
4.4 PREPARO E OTIMIZAÇÃO DOS SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS DES. 4140	
4.5 OTIMIZAÇÕES	4140
4.5.1 Otimização do solvente de extração.....	4241
4.5.2 Otimização do solvente e tempo de dessorção	4241
4.5.3 Otimização dos parâmetros de extração	4342
4.6 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO	4544
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	4645
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO DES	4645

5.2 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	5048
5.3 OTIMIZAÇÃO DA ESCOLHA DO SOLVENTE EXTRATOR (DES).....	5150
5.4 OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE DESSORÇÃO.....	5251
5.5 OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DESSORÇÃO.....	5453
5.6 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO	5554
5.7 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO	6160
5.8 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA	6463
5.9 COMPARAÇÃO COM OUTRAS METODOLOGIAS	6564
6 CONCLUSÃO	6968
7 REFERÊNCIAS	7069

1 INTRODUÇÃO

A intensificação das ações antropogênicas nos últimos anos tem provocado um aumento no número de poluentes orgânicos presentes no meio ambiente. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) estão entre esses poluentes. Eles são considerados poluentes ambientais prioritários devido ao risco que oferecem à saúde humana, uma vez que, são potenciais carcinogênicos, e ainda trazem riscos aos ecossistemas. Sendo assim, é de grande relevância o monitoramento da exposição dos seres humanos aos HPAs, podendo servir como um indicador da detecção precoce a predisposição ao câncer.

Na maioria das vezes, os HPAs são encontrados em baixas concentrações nas matrizes ambientais. Além disso, como as amostras ambientais podem ser incompatíveis com a introdução direta nos instrumentos de análise e, ainda, serem amostras de alta complexidade e podendo possuir interferentes, é necessária uma etapa de pré-concentração desses compostos antes da injeção no equipamento. Esse é um dos motivos pelo qual o preparo de amostra é uma etapa essencial dentre as etapas de uma metodologia analítica. Além da pré-concentração, é no preparo de amostras que ocorre a remoção de possíveis interferentes, o que torna a amostra adequada ao instrumento analítico. Recentemente, tem se buscado o emprego de técnicas de preparo de amostras que sejam quimicamente mais verdes, ou seja, que utilizem pouco ou nenhum volume de solvente orgânico, e ainda, a utilização de solventes menos tóxicos.

Neste viés, tem se estudado cada vez mais as técnicas de microextração, como a extração líquido-líquido em membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE). Esta técnica baseia-se em uma extração de membrana de duas fases, sendo uma fase doadora aquosa (amostra) e outra, a fase receptora (solvente orgânico). Nos poros da membrana microporosa é onde será impregnado o solvente orgânico. No preparo de amostra, o tempo das extrações torna-se algo determinante, visto que, com grandes números de experimentos a análise requer longo tempo. Então, para aumentar a frequência analítica do método, a técnica de HF-MMLLE pode ser combinada com o sistema de *96-well plate*, permitindo realizar até 96 extrações simultaneamente.

Durante muitos anos, as técnicas de microextração vem utilizando solventes extratores tóxicos. Entretanto, devido a busca de se atender as demandas da química verde, diminuindo o impacto ambiental, surgiram novos solventes que são menos tóxicos que os solventes convencionais, como os solventes eutéticos profundos (DES). Eles são uma excelente alternativa, dado que, apresentam menor custo, menor toxicidade, biodegradabilidade e eficiência para extração de diversos tipos de compostos (orgânicos e inorgânicos). Diante do exposto, o objetivo deste estudo é o desenvolvimento de uma metodologia combinando a técnica HF-MMLLE ao *96-well plate* utilizando DES como solvente extrator para a determinação de HPAs em água da chuva.

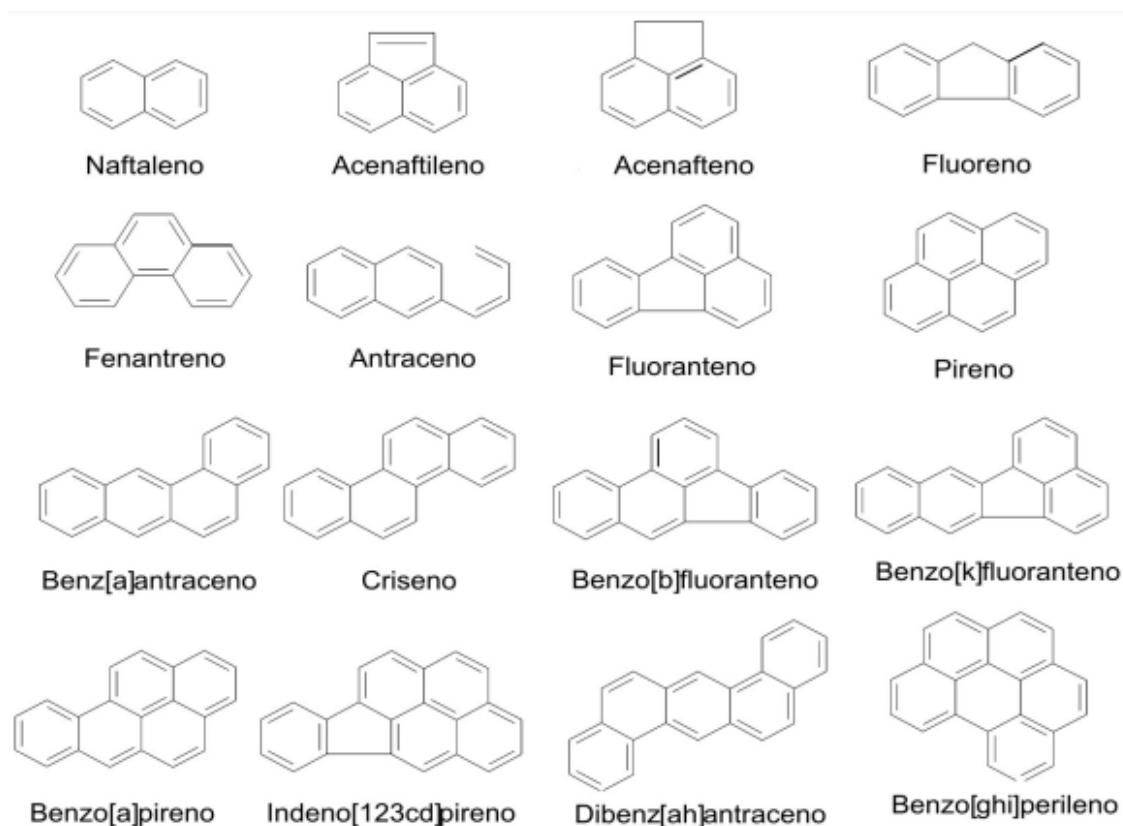
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos cujas estruturas químicas são formadas por carbono e hidrogênio, contendo dois ou mais anéis aromáticos condensados. Os HPAs podem ser subdivididos em dois grupos de acordo com sua massa molar ou número de anéis, sendo classificados em leves e pesados. O que os diferencia quanto à classificação é o número de anéis aromáticos condensados em sua estrutura. Os HPAs leves apresentam até 3 anéis aromáticos condensados em sua estrutura, já os HPAs pesados apresentam de 4 a 6 anéis aromáticos (PURCARO; MORET; CONTE, 2013). Os compostos de baixa massa molecular tem pressão de vapor mais alta e são encontrados principalmente em amostras de ar, enquanto os compostos com alto peso molecular, normalmente, estão ligados a partículas e são mais estáveis e mais tóxicos do que os HPAs leves (QI et al., 2014; WANG et al., 2016).

Os HPAs são considerados poluentes orgânicos prioritários, sendo que alguns deles são relatados como precedentes de ações mutagênicas e tumorais em sistemas biológicos (WHO 1983). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) classifica 16 HPAs como poluentes prioritários por serem os mais tóxicos e exibirem maior possibilidade de exposição à população humana incluindo acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(ghi)perileno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-cd)pireno, naftaleno e pireno (BERIRO et al., 2016). A Figura 1 apresenta a estrutura dos 16 HPAs sugeridos pela USEPA para monitoramento.

Figura 1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA 1987).



Dentre esses 16 HPAs, devido a disponibilidade, o naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno e indeno(1,2,3-cd)pireno foram escolhidos para serem estudados neste trabalho,

2.1.1 Fontes de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

O crescimento da quantidade de HPAs no meio ambiente está associado com uma maior emissão a queima de combustíveis fósseis. Esses compostos são originados de fontes antropogênicas, como produção de asfalto e usinas de liquefação, e fonte naturais, como atividades vulcânicas e queima a céu aberto (WANG 2018). As fontes antropogênicas representam a fração mais significativa da origem desses compostos. Processos mais eficientes emitem menores quantidades

de HPAs, por isso, a quantidade e o tipo de HPA formado dependem de condições específicas do processo e do combustível (SILVA, 2010).

A formação de HPAs acontece por meio de precursores contendo átomos de carbono e hidrogênio em alta temperatura (500 - 700°C). Esses precursores são parcialmente quebrados em fragmentos instáveis menores (pirólise), principalmente radicais, que se recombina para dar HPAs relativamente estáveis. A formação de HPAs pode ocorrer também em temperaturas mais baixas (100 - 150°C), mas requer um período na escala de tempo geológica e uma maior quantidade de HPAs alquilados são originados, como no caso da formação de combustível fóssil natural (PURCARO; MORET; CONTE, 2013). Então, a formação destes compostos depende de fatores como tipo da biomassa presente, quantidade de oxigênio disponível, pressão e, principalmente, de calor, pois a concentração de HPA aumenta linearmente na faixa de temperatura de 400 a 1000°C (CONDE 2004).

2.1.2 Propriedades Físico-Químicas dos HPAs

À temperatura ambiente todos os HPAs são sólidos e apresentam, comumente, altas temperaturas de fusão e ebulição, baixas pressões de vapor e solubilidade em água (Lopes; Andrade, 1996). As características físico-químicas são fatores que direcionam a distribuição desses contaminantes entre a fase solúvel e particulada no ar, na água, como a solubilidade (S) e a pressão de vapor (PV). A solubilidade em água dos HPAs varia entre os pouco solúveis em água (e.g. benzo(a)pireno, 0,003mg/L) a solúveis em água (e.g. naftaleno, 31mg/L), enquanto a pressão de vapor muda entre compostos altamente voláteis (naftaleno) e compostos relativamente pouco voláteis (indeno) (MEIRE 2007). As propriedades físico-químicas estão descritas na Tabela 1.

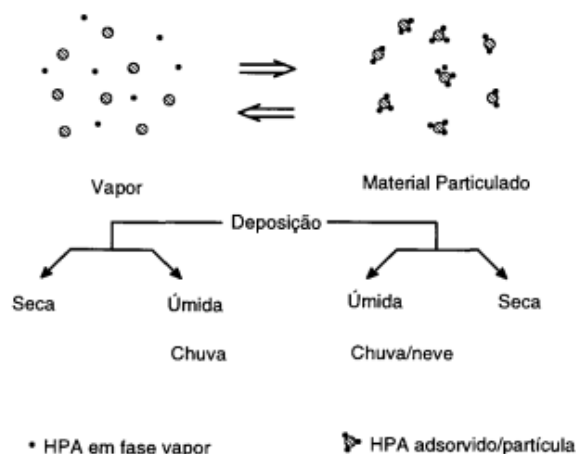
Tabela 1. Algumas propriedades físico-químicas dos HPAs explorados neste trabalho.

HPA	Número de anéis	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)	Pressão de vapor (Pa)	Coefficiente de partição (Log K _{ow})
Naftaleno	2	128	31	10,4	3,37
Acenaftileno	3	150	16,1	9.10 ⁻¹	4,00
Acenafteno	3	154	3,8	3.10 ⁻¹	3,92
Fluoreno	3	166	1,9	9.10 ⁻²	4,18
Fenantreno	3	178	1,1	0,2	4,57
Antraceno	3	178	4,5 .10 ⁻²	1,0.10 ⁻³	4,54
Fluoranteno	4	202	2,6.10 ⁻¹	1,2.10 ⁻³	5,22
Pireno	4	202	1,3.10 ⁻¹	6.10 ⁻⁴	5,18
Benz(b)fluoranteno	5	252	1,5. 10 ⁻³	nd*	5,80
Benzo(a)pireno	5	252	3,8.10 ⁻³	7,0.10 ⁻⁷	6,04
Indeno	6	278	nd*	nd*	nd*

*nd - não determinado. Fonte: Autoria própria (2022)

O coeficiente de partição entre solvente orgânico e água nos possibilita analisar possíveis processos cumulativos em locais como sedimentos e solos, assim como na bioacumulação (NEFF 1984). O transporte dos HPAs no ambiente acontece principalmente por via atmosférica associado ao material particulado fino, ocasionando uma grande distribuição desses poluentes no ambiente. Na medida em que são emitidos na atmosfera, os compostos podem ser depositados sob a forma seca (vapor ou particulada) ou úmida (precipitação sob a forma dissolvida ou particulada) sobre sistemas aquáticos e terrestres (ROSE; RIPPEY 2002). Este processo está esquematicamente representado na Figura 2.

Figura 2. Partição vapor-partícula e remoção da atmosfera



Fonte LOPES 1996

Portanto, a deposição seca e úmida são os principais processos físicos de remoção dos HPAs da atmosfera que existem em fase vapor ou associado a partículas. Estes processos dependem das características físicas e do tamanho das partículas, que também está relacionado diretamente com o transporte atmosférico. O processo de deposição úmida interfere na remoção de HPA atmosférico em ambas as fases (gasosa e particulada). Estudos demonstram que o coeficiente de remoção desses compostos da atmosfera está relacionado com a intensidade de chuva (DICKHUT; GUSTAFSON 1996).

Como pode ser observado na Tabela 1, a massa molecular está inversamente relacionada com a solubilidade dos HPAs em água que diminui com o aumento do número de anéis. Os HPAs apresentam características lipofílicas, onde seus constituintes são classificados como moderadamente a altamente lipossolúveis, apresentando coeficientes de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) que variam entre 3,37 e 6,04 (NETTO et al. 2000). Apesar da baixa solubilidade em água, os mesmos podem ser transportados em meios aquáticos, adsorvidos em partículas em suspensão, ficando posteriormente, depositados nos sedimentos (GODOI et al., 2004). Além disso, é possível relacionar a massa molecular com a pressão de vapor, onde compostos com menores massas moleculares apresentam elevada pressão de vapor e como resultado, ampla disseminação ambiental (BRITO et al., 2005).

Os HPAs são considerados poluentes orgânicos prejudiciais, sendo que aqueles de alta massa molecular são ainda mais prejudiciais ao meio ambiente e a saúde humana. Os fatores que contribuem para a persistências dos HPAs de alta massa molecular são a estabilidade da molécula e a hidrofobicidade e, geralmente, o aumento no tamanho e angularidade de uma molécula de HPA resulta em um aumento na hidrofobicidade e estabilidade (ZANDER 1983, HARVEY 1997).

2.1.3 Toxicidade

A importância do estudo da contaminação por HPAs está no fato de que muitos deles são potencialmente carcinogênicos e mutagênicos (NETTO et

al.,2000). Os HPAs estão entre aqueles poluentes ambientais que apresentam atividade cancerígena e mutagênica, podendo provocar tumoração em animais e mutação em bactérias (Comissão Europeia, 2002). A exposição da população humana a esses compostos pode representar um grande risco a saúde.

Além da classificação feita pela USEPA, a Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC) correlaciona os HPAs em relação ao potencial cancerígeno ao homem. As substâncias são classificadas em cinco grupo diferentes, de acordo com sua toxicidade: Grupo 1 – a substância é cancerígena ao homem; Grupo 2A – a substância é provavelmente cancerígena ao homem; Grupo 2B – a substância é possivelmente cancerígena ao homem; Grupo 3 – a substância não é cancerígena ao homem; Grupo 4 – a substância provavelmente não é cancerígena ao homem (IARC 2006). A Tabela 2 apresenta a classificação de alguns HPAs de acordo com a evidência de sua carcinogenicidade.

Tabela 2. Classificação de alguns HPAs de acordo com os grupos estabelecidos pela IARC, com relação à evidência carcinogenicidade.

HPA	Classificação
Naftaleno	Grupo 3
Fluoreno	Grupo 3
Antraceno	Grupo 3
Fluoranteno	Grupo 3
Pireno	Grupo 3
Benz(a)antraceno	Grupo 2B
Criseno	Grupo 2B
Benz(b)fluoranteno	Grupo 2B
Benzo(a)pireno	Grupo 1
Indeno	Grupo 2B

Adaptado de IARC (2006)

Apesar dos HPAs mais leves terem propriedades carcinogênicas/mutagênicas mais fracas, eles são os mais abundantes na atmosfera urbana e reagem com outros poluentes para formar derivados mais tóxicos. Por isso, é importante a determinação da exposição humana a misturas de HPAs, e não só em suas formas individuais. Os níveis desses poluentes individuais variam em diversas ordens de magnitude e geralmente estão na faixa entre $< 0,1$ e 100 ng/m^3 . (WHO 1997, PARK et al., 2002).

Os efeitos na saúde humana variam de acordo com a duração e da via de exposição, da quantidade ou concentração de HPAs a que se está exposto, além de fatores, como estado de saúde pré-existente e idade. A exposição ocupacional a altos níveis de misturas de poluentes contendo os HPAs resulta em sintomas como irritação nos olhos, náusea, vômito, diarreia e confusão (RENGARAJAN et al., 2015). No entanto, não se sabe quais componentes da mistura foram responsáveis por esses efeitos, e outros compostos comumente encontrados com HPAs podem ser a causa desses sintomas. Misturas desses compostos também são conhecidas por causar irritação e inflamação da pele. O antraceno, benzo(a)pireno e naftaleno são irritantes diretos da pele; e os dois primeiros são relatados como sensibilizadores da pele, ou seja, causam uma resposta alérgica da pele em animais e humanos (KIM et.al 2013).

Os humanos podem ser expostos aos HPAs através de três vias principais: inalação, contato com a pele e ingestão. A maioria dos estudos de toxicidade dos HPAs tem sido realizada por exposição dérmica, subcutânea e inalatória. No entanto, foi demonstrado que a ingestão através de alimentos e água é uma das principais vias de exposição (PURCARO et.al 2013). Sendo assim, a água foi escolhida como a matriz para este trabalho, e por ela ser uma matriz complexa, além de outros fatores, é necessária uma etapa de preparo de amostra antes da injeção no instrumento.

2.2 PREPARO DE AMOSTRA

A maioria dos métodos analíticos requer uma etapa de preparo de amostra, para que as amostras sejam adequadas ao sistema de introdução de amostras da técnica a ser utilizada. É comum que não se analise quimicamente matrizes na sua forma bruta, pois elas podem apresentar interferências e não serem compatíveis com o equipamento analítico (MERIB; CARASEK,2013). Para evitar tais problemas, são realizados procedimentos de preparo de amostra, visando a extração e pré-concentração de analitos, eliminação de compostos interferentes, limpeza ou compatibilização química e/ou física das amostras com o sistema analítico empregado (CAMPOS, 2015). Sendo assim, o preparo de amostras é umas das etapas mais importantes e essenciais para o êxito de qualquer método analítico. No

entanto, o preparo de amostras também é geralmente a etapa mais lenta e uma das principais fontes de erros em uma análise química.

A importância desta etapa analítica contribuiu para que fossem desenvolvidas diversas técnicas e métodos de preparo de amostras, principalmente para amostras com matrizes complexas, tais como fluídos biológicos, amostras ambientais, alimentos, etc. Assim, foram desenvolvidas e consolidadas as tradicionais técnicas de extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction* - LLE) e a extração em fase sólida (*solid phase extraction* - SPE) (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Entretanto, essas técnicas tradicionais geralmente são demoradas, trabalhosas e envolvem o uso de grande volume de solventes orgânicos, o que é custoso e gera uma quantidade considerável de resíduos prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente (CUNHA; FERNANDES, 2018).

Para superar essas limitações, durante anos tem se buscado técnicas que tenham um menor impacto ambiental. Nesse sentido, há a tendência do desenvolvimento de metodologias simplificadas, miniaturizadas e automatizadas levando a uma redução na utilização de solventes e o desenvolvimento de processos menos agressivos ao meio ambiente, mantendo ao mesmo tempo uma boa eficiência de extração (ASENSIO-RAMOS, 2011). Dentre as técnicas desenvolvidas, ganharam destaque as chamadas técnicas miniaturizadas de preparo de amostras, as quais tiveram grande impulso com o desenvolvimento da microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*) proposta por Pawliszyn e colaboradores no ano de 1990. Em seguida, foram apresentados os primeiros trabalhos sobre a utilização da microextração em fase líquida (LPME, do inglês *liquid phase microextraction*) introduzidos em 1996 por Dasgupta et al. e Cantwell et al., (1996).

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de extração que não utiliza solvente e tornou-se muito popular nos últimos anos. A SPME utiliza diferentes materiais extratores em várias configurações para a extração de uma ampla gama de analitos (TOBISZEWSKI et al., 2010). A microextração em fase líquida (LPME) compreende uma gama de técnicas ligeiramente diferentes, caracterizadas pelo uso de pequenas quantidades de amostra e pequenos volumes de solventes orgânicos. A partir desses primeiros trabalhos realizados com microextração em fase líquida foram desenvolvidas diferentes variantes para a

LPME, cada uma delas apresentando características específicas. (CUNHA; FERNANDES, 2018). Dentre estas diversas configurações destacam-se: a microextração em fibra oca (HF-LPME) e a extração líquido-líquido em membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE).

2.2.1 Microextração em fase líquida suportada com membrana oca (HF-LPME)

A técnica de microextração em fase líquida suportada com membrana oca (HF-LPME) foi introduzida em 1999 por Pedersen-Bjegaard et al. Nesse estudo foi utilizado um solvente orgânico, 1-octanol, para se analisar amostras de urina e plasma humano. O solvente foi imobilizado nos poros de uma membrana de polipropileno, formando uma membrana líquida suportada (SLM, do inglês *supported liquid membrane*). Além do solvente, foi adicionado no interior da fibra uma solução receptora ácida e a amostra teve seu meio ajustado para básico pela adição de NaOH. O analito foi extraído da fase doadora (amostra) para o solvente orgânico e em seguida conduzido para a fase receptora (solução ácida). Ao final, a fase receptora contendo os analitos extraídos foi analisada por eletroforese capilar, demonstrando que extração de metanfetamina em amostras aquosas com o uso da técnica obteve resultados satisfatórios (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 1999).

Dessa forma, utiliza-se para a extração um solvente orgânico imiscível na amostra que fica imobilizado em uma fina membrana líquida suportada. A imobilização do solvente é realizada com a imersão da membrana no solvente orgânico, por alguns segundos. O solvente vai fluir para os poros da membrana por força capilar. A fase orgânica é suportada por uma membrana hidrofóbica, que mantém o solvente em posição. A parte de dentro da membrana oca é preenchida com alguns μL de uma solução receptora, em seguida, a membrana é colocada na solução da amostra para a extração dos analitos. Os compostos de interesse são extraídos a partir da amostra (aquosa) por meio da SLM (orgânica) e migram para a solução receptora (aquosa ou orgânica) localizada no interior da membrana oca. Ao fim da extração, uma microsseringa coleta a fase receptora do lúmen da membrana e o extrato obtido é encaminhado para análise final em equipamento compatível com os analitos e a fase receptora (MERIB; CARASEK, 2013).

A membrana mais utilizada para HF-LPME é a composta por polipropileno, geralmente apresentando porosidade de aproximadamente 70%, tamanho de poros de 0,2 μm , espessura de parede de aproximadamente 200 μm e diâmetro interno de 600 μm . O tamanho da membrana pode variar, geralmente, de 1,5 a 10 cm, dependendo da aplicação (MERIB; CARASEK, 2013).

2.2.1.1 Configurações da HF-LPME

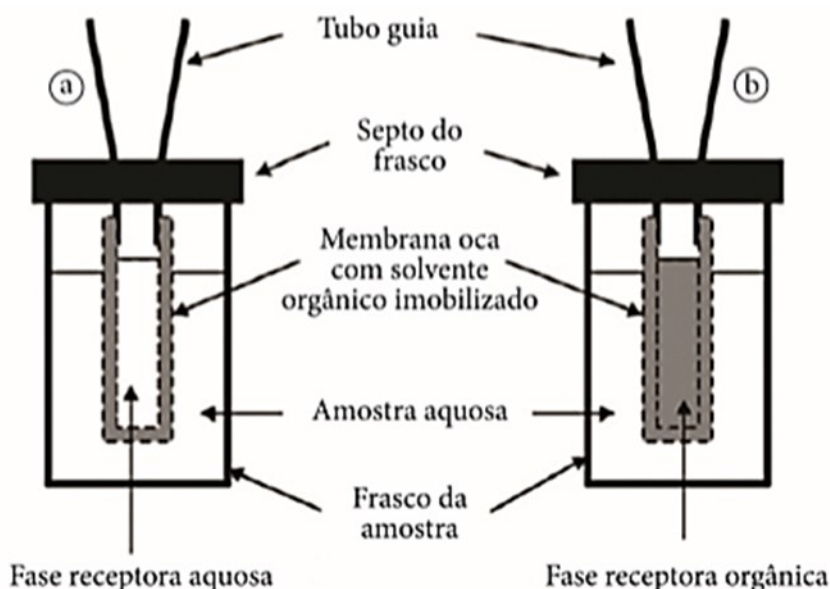
A microextração em fase líquida utilizando membrana oca apresenta duas formas básicas: utilização de duas ou três fases. No sistema utilizando duas fases, o analito é extraído de uma amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente imiscível com a água, o qual é imobilizado nos poros da membrana para formar a membrana líquida suportada (SLM), e utiliza-se também esse mesmo solvente orgânico no interior dessa membrana (fase extratora). Neste sistema, os analitos são extraídos por difusão passiva da amostra aquosa (solução doadora) diretamente para a solução orgânica receptora (MERIB; CARASEK, 2013).

No sistema utilizando três fases, como mostra a Figura 3, o analito é extraído de uma solução aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imobilizado nos poros de uma membrana oca (fase orgânica) para uma nova fase aquosa (fase receptora) presente no interior da fibra oca. A fase orgânica, nesse caso, funciona como uma barreira entre a solução receptora e a solução doadora, essa barreira não permite a mistura dessas duas fases aquosas. Quando se usa três fases, a solução receptora é aquosa e os compostos utilizados são os que ionizam. Assim na matriz aquosa esses analitos encontram-se na forma neutra para possuir afinidade pela membrana e quando eles entram em contato com a fase receptora são ionizados, garantindo assim que os analitos não irão migrar para a amostra novamente (OLIVEIRA et al., 2008).

A escolha do modo de HF-LPME a ser empregado depende na maioria das vezes das características dos analitos a serem analisados. O uso do sistema de duas fases é indicado para analitos com hidrofobicidade moderada a alta, enquanto o sistema de três fases tem uso preferencial para compostos ionizáveis ácidos ou básicos (SIMÃO et al., 2016). Na Figura 3 estão representados esquemas dos

constituintes de um dos sistemas de HF-LPME utilizados, um com três fases (a) e outro com duas (b).

Figura 3. Esquema dos modos de extração utilizados em HF-LPME. Onde a representa 3 fases e b 2 fases.



Fonte: adaptado de Lee et al., 2008

Para melhores resultados utilizando a técnica de HF-LPME, é necessário o ajuste de alguns parâmetros, como pH da amostra, ajuste da força iônica e de tempo extração, e as condições otimizadas dependem diretamente dos analitos a serem determinados e da análise seguinte para detecção.

A fim de obter resultados bons e confiáveis, alguns parâmetros devem ser avaliados cuidadosamente durante o desenvolvimento do método, tais como a escolha do solvente orgânico, ajuste do pH da amostra, força iônica, escolha da membrana, agitação do sistema e o tempo de extração. A escolha do solvente orgânico é considerada uma variável de extrema importância em um procedimento de microextração em fase líquida. O solvente utilizado deve possuir algumas características tais como: ter alta eficiência de extração para os analitos de interesse, ter boa seletividade, ser imiscível em água ou baixa solubilidade, para que não ocorra a dissolução da fase orgânica durante a extração, possuir compatibilidade com a membrana e com a técnica de determinação analítica, por exemplo a fase móvel, e apresentar alta pureza para análise via HPLC, ou seja, não ter interferentes ou contaminantes que prejudiquem a análise (KOLOSA; PRZYJAZNY; JEANNOT, 2009).

Outro parâmetro que pode afetar a eficiência de extração é o ajuste do pH, pois pode afetar o equilíbrio de dissociação e a solubilidade dos analitos ácidos ou básicos. Os analitos precisam estar na sua forma neutra, para garantir que ocorra a interação entre analito e fase orgânica, por isso, de acordo com Merib e Carasek (2013), o pH deve ser ajustado em um valor de pelo menos 1,5 unidade menor em relação ao pKa para as espécies ácidas e, em caso contrário, em pelo menos 1,5 unidade acima do pKa para qualquer soluto básico. Normalmente, para analitos ácidos, o pH da amostra é ajustado entre 0,1 e 3,5, enquanto para analitos básicos o ajuste varia entre 10 e 14. Para um sistema de HF-LPME de três fases, para garantir a extração dos compostos de interesse para a fase receptora e para que eles não retornem para a fase orgânica nos poros da membrana, o pH da solução receptora deve ser ajustado a valores que garantam a ionização dos analitos. Por isso, soluções receptoras básicas devem ser usadas para analitos ácidos e soluções receptoras ácidas devem ser utilizadas para analitos básicos (ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007).

A mudança da força iônica está relacionada com o efeito *salting-out* e varia de acordo com os analitos que são estudados. A adição de sal e a consequente mudança da força iônica da solução da amostra podem afetar significativamente os resultados obtidos com a microextração em fase líquida. A adição de sal pode diminuir a solubilidade dos analitos e, dessa forma, aumentar a eficiência de extração em virtude do efeito *salting-out*. Para alguns analitos, a presença de um sal pode não ser significativa e dependerá da natureza de cada analito em estudo (MERIB; CARASEK, 2013).

No que se refere a escolha da membrana, deve-se optar por membranas que possuem certa hidrofobicidade, para que o uso do solvente orgânico seja compatível e tenha uma melhor interação. Outra característica é escolher membranas que possuem alta porosidade, assim os solventes orgânicos ficarão imobilizados nas paredes da membrana (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). As membranas mais utilizadas são as de polipropileno, disponíveis comercialmente pela empresa Membrana (Wuppertal, Alemanha), a qual disponibiliza membranas capilares e planas que podem ser utilizadas para aplicação da técnica (SIMÃO et al., 2016).

A agitação da amostra é normalmente utilizada para acelerar a cinética de extração. Sendo assim, o aumento da taxa de agitação da solução doadora acelera

a extração, bem como a difusão dos analitos através da camada interfacial da membrana é facilitada (BURATO et al., 2019). Na HF-LPME, como o solvente orgânico da membrana líquida suportada e a fase receptora estão protegidos nos poros, podem ser utilizadas velocidades de agitação mais elevadas e isso não compromete a eficiência de extração do método. De acordo com Kolosa, Przyjazny e Jeannot (2009), taxas de agitação próximas de 2000 rpm podem ser utilizadas para sistemas de duas fases e 1500 rpm em sistemas de três fases.

E por fim, um dos fatores mais importantes é a otimização do tempo de extração, uma vez que o processo de transferência de massa depende do tempo para que o equilíbrio entre a fase aquosa/orgânica (sistema bifásico) ou aquosa/orgânica/aquosa (sistema trifásico) seja alcançado. O tempo de extração pode depender de algumas características do analito, tais como a massa molecular e sua volatilidade (KOLOSA; PRZYJAZNY; JEANNOT, 2009). Sendo assim, na técnica de HF-LPME a recuperação do analito aumenta com o tempo de extração até atingir o equilíbrio, na qual a distribuição do analito entre as fases permanece constante. Vale destacar, que em alguns casos, o tempo necessário para que o equilíbrio seja alcançado é longo; por isso, a extração é realizada em condições de não equilíbrio, controlando-se precisamente o tempo de extração (RASMUSSEN; PEDERSENBJERGAARD, 2004).

2.2.2 Extração líquido-líquido em membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE)

A extração líquido-líquido em membrana microporosa (MMLLE) foi desenvolvida com base nos princípios químicos da extração líquido-líquido (LLE) e nas configurações da técnica HF-LPME de duas fases. Essa técnica foi utilizada pela primeira vez em 2007 por Zorita, Barri e Mathiasson, a configuração proposta utiliza o interior da membrana para inserção de um suporte e fixação em um êmbolo de seringa (ZORITA; BARRI; MATHIASSON, 2007). A HF-MMLLE é uma técnica de extração de duas fases, sendo uma fase aquosa que é chamada de fase doadora (amostra) e uma fase orgânica chamada de fase receptora. A fase orgânica é suportada por uma membrana hidrofóbica que mantém o solvente.

A escolha do solvente orgânico que será impregnado nos poros da membrana é uma etapa importante em HF-MMLLE e para todas as técnicas de LPME, sendo

suas propriedades físico-químicas de grande importância para que ocorra a extração. Propriedades como densidade, coeficiente de partição, viscosidade e solubilidade em água devem ser levadas em consideração (KOKOSA et al., 2019). A MMLLE é uma técnica preferencialmente usada para compostos hidrofóbicos que tendem a ser extraídos com facilidade pela fase receptora orgânica (FONTANALS; BARRI; BERGSTRÖM; JÖNSSON, 2006)

As principais vantagens das técnicas de extração baseadas em membrana, como a HF-MMLLE são o baixo consumo de solvente orgânico, baixo custo de análise e o fácil manuseio (ZORITA; BARRI; MATHIASSEN, 2007). Além disso, é possível adaptar as membranas em um sistema de placas semiautomatizado de 96 poços, aumentando consideravelmente o número de amostras a serem extraídas simultaneamente (LOPES; MERIB; CARASEK, 2018).

Na técnica MMLLE a extração ocorre por difusão passiva dos analitos presentes na fase doadora (amostra) para o solvente orgânico imobilizado nos poros da membrana. A Equação 1 relaciona a concentração de analito (A) no equilíbrio entre a amostra (A amostra) e a fase extratora orgânica receptora (A fase orgânica) para um sistema de HF-LPME com duas fases.

$$A_{\text{amostra}} \rightleftharpoons A_{\text{fase orgânica}} \quad (\text{Eq. 1})$$

A extração dos analitos está relacionada com o coeficiente de partição entre a solução orgânica receptora e a solução doadora ($K_{r/d}$), conforme a Equação 2:

$$K = \frac{[\text{Analito}]_{\text{fase receptora}}}{[\text{Analito}]_{\text{fase doadora}}} \quad (\text{Eq. 2})$$

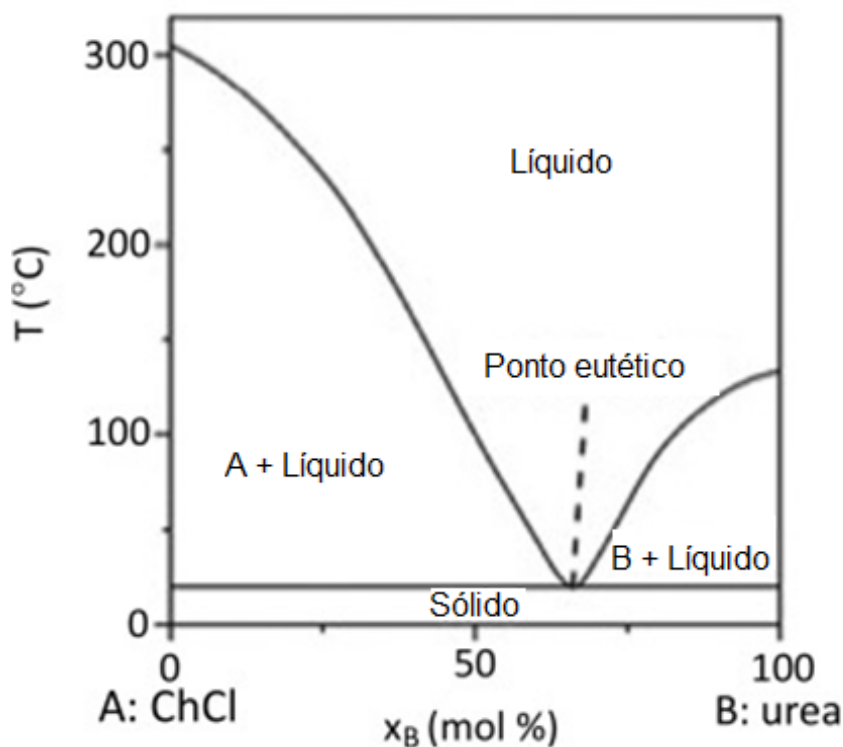
Onde, K é o coeficiente de partição, [Analito] fase doadora é a concentração do analito orgânico na fase doadora e [Analito] fase receptora é a concentração do analito orgânico na fase receptora (MERIB; CARASEK, 2013). O valor de coeficiente de partição pode variar de acordo com o solvente orgânico selecionado como fase receptora. O solvente ideal para uma utilização específica deve apresentar baixa viscosidade para proporcionar altos coeficientes de partição e ter compatibilidade com a membrana selecionada para o estudo, apresentar imiscibilidade em água e baixa volatilidade (ESRAFILI et al., 2018).

Até alguns anos atrás, os solventes utilizados nas técnicas de microextração sempre estavam associados a um certo grau de toxicidade, mas o recente desenvolvimento de uma notável geração de novos solventes de extração, como os Solventes Eutéticos Profundos (DES) está mudando esse cenário.

2.3 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS

Os DES começaram a ser relatados por Abbot et al. (2001), onde uma mistura de cloreto de colina e um sal metálico (cloreto de zinco) poderia formar um líquido em temperaturas abaixo de 100 °C. Dois anos depois, o mesmo grupo de pesquisa (ABBOT et al. 2003) desenvolveu uma mistura eutética combinando cloreto de colina (ChCl) e ureia, e assim, foi publicado o primeiro trabalho utilizando DES. Neste trabalho, a mistura eutética formada apresentava um decaimento no ponto de fusão, quando comparada aos componentes individuais. A Figura 4 mostra o diagrama de fases para a mistura na razão molar 1:2 (SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014).

Figura 4. Representação esquemática de um ponto eutético em um diagrama de fases do cloreto de colina e ureia.



Fonte: adaptado de Smith, Abbott e Ryder (2014)

A figura acima mostra que o DES apresentou ponto de fusão igual a 12 °C (ponto eutético). Já seus precursores, cloreto de colina e ureia, apresentam ponto de fusão de 302 e 133 °C, respectivamente. Sendo assim, ocorreu um abaixamento da temperatura de fusão. Dessa forma, os DES são formados por duas moléculas, um receptor de ligação de hidrogênio (HBA) e um doador de ligação de hidrogênio (HBD), gerando um líquido homogêneo em determinada temperatura resultante das ligações de hidrogênio entre os componentes. São caracterizados por terem ponto de fusão menor que seus componentes individuais (CUNHA; FERNANDES, 2018). Os HBA mais comuns são sais quaternários de amônio, com destaque para cloreto de colina e sais de tetrabutílamônio, como cloreto e brometo de tetrabutílamônio. Entre os HBD, destacam-se álcoois, ácidos graxos, amidas, como exemplo ácido decanóico e ureia (FLORINDO; BRANCO; MARRUCHO, 2019).

Os DES são considerados menos tóxicos quando comparados com solventes orgânicos convencionais utilizados em extrações e muitas vezes biodegradáveis, tornando-os alternativas valiosas de solventes para aplicações em Química Analítica Verde. Porém, alguns podem apresentar alta viscosidade e estado sólido à temperatura ambiente, o que limita sua utilização nas técnicas de extração líquido-líquido (SHISHOV et al., 2017). Outra alternativa são os solventes eutéticos profundos naturais (NADES), os quais foram introduzidos na prática analítica como um tipo alternativo de solvente de extração. Choi e colaboradores (2011) exploraram produtos naturais como fonte de solventes de DES.

Os NADES podem ser encontrados na natureza, portanto, essas misturas são baseadas em compostos naturais, principalmente metabólitos primários que estão naturalmente presentes em todos os tipos de células e organismos. Os compostos em geral do NADES são açúcares como glicose, sacarose, frutose e ácidos orgânicos como láctico, málico, cítrico. Além disso, também são utilizados ureia e cloreto de colina. As interações intermoleculares que ocorrem na mistura eutética dependem dos componentes individuais, podendo ser ligações de hidrogênio ou forças de Van der Waals (DAI; VAN SPRONSEN; WITKAMP; VERPOORTE; CHOI, 2013).

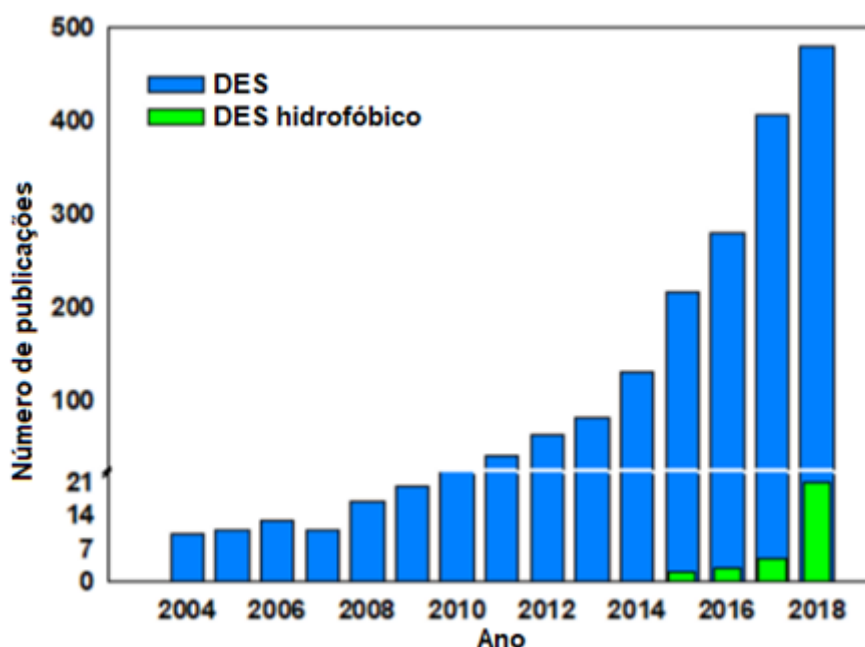
Os NADES apresentam propriedades adequadas para serem usados como solventes alternativos em técnicas de extração líquido-líquido incluindo serem líquidos à temperatura ambiente (e às vezes até abaixo de 0 °C), terem uma

viscosidade que pode ser facilmente ajustada com aquecimento, além de serem sustentáveis e seguros. Como o NADES pode dissolver metabólitos polares e apolares, então, eles podem servir como solvente extrator de muitas classes de compostos, dependendo das propriedades físico-químicas de cada NADES (PAIVA et al.,2014).

2.3.2 Solventes eutéticos profundos hidrofóbicos

Os primeiros DES estudados apresentaram caráter hidrofílico, ou seja, eram miscíveis em água. E apesar de serem muito aplicados, estes DES apresentam uma certa limitação na extração e na separação dos analitos. Uma vez que, os DES não seriam capazes de formar fases diferentes em processos de extração em fase aquosa, o que dificulta a separação do analito de interesse da fase aquosa para a fase eutética (TANG; DAI; ROW, 2018). Com a necessidade de se introduzir uma nova classe de DES, surgiu o primeiro DES hidrofóbico em 2015. A Figura 5 mostra o número de publicações empregando DES e DES hidrofóbico nos últimos anos.

Figura 5. Evolução do número de publicações de DES em geral (em azul) e de DES hidrofóbicos (em verde) nos últimos anos.



Fonte: Adaptado (FLORINDO; BRANCO; MARRUCHO, 2019).

Van Osch e colaboradores (2015) prepararam pioneiramente os DES hidrofóbicos utilizando como HBD ácido decanóico e, como HBA, diferentes tipos de sais de amônio quaternários com o intuito de usá-los em procedimentos de extração.

Os DES hidrofóbicos podem ser divididos em neutros e iônicos. Os DES hidrofóbicos formados por componentes individuais neutros, como álcoois de cadeia longa e ácidos graxos, apresentam uma menor diminuição da temperatura de fusão e apresentam maior fluidez quando comparado aos DES hidrofóbicos com precursores iônicos, como sais de amônio quaternários (SHISHOV, 2020).

2.3.3 Propriedades físico-químicas dos DES

O uso dos DES como solventes em processos de extração líquido-líquido depende de suas propriedades físicas, como viscosidade, densidade, miscibilidade e polaridade. É interessante escolher solventes que tenham baixa viscosidade para facilitar a mistura, mas com grande diferença de densidade da matriz para facilitar a separação das fases (HUDDLESTON; WILLAUER; SWATLOSKI; VISSER; ROGERS, 1998). As principais propriedades que influenciam a escolha do DES são o ponto de fusão, densidade, viscosidade, condutividade.

A viscosidade é um ponto importante, pois parte dos DES exibe viscosidade relativamente alta (> 100 cP) a temperatura ambiente. Isto está relacionado com a presença de uma extensa rede de ligações de hidrogênio entre cada componente, resultando em uma menor mobilidade de espécies livres dentro do DES. Devido ao interesse em se aplicar o solvente em técnicas de preparo de amostra, o desenvolvimento de DES com baixas viscosidades é altamente desejável. O que pode afetar a viscosidade das misturas eutéticas são a natureza química dos componentes do DES, temperatura e o teor de água (ABBOTT; CAPPER; GRAY, 2006).

A viscosidade da maioria das misturas eutéticas muda significativamente em função da temperatura. Os perfis viscosidade-temperatura seguem um comportamento semelhante ao de Arrhenius. À medida que a temperatura aumenta, a viscosidade diminui (ZHANG; VIGIER; ROYER; JÉRÔME, 2012). Devido à essas viscosidades relativamente altas, a maioria deles exibem baixa condutividade (inferiores a 2 mS cm^{-1} à temperatura ambiente). No entanto, as condutividades dos

DES geralmente aumentam significativamente à medida que a temperatura aumenta devido a diminuição da viscosidade do DES (CUNHA; FERNANDES, 2018).

A densidade dos DES é influenciada pela temperatura e proporção molar. Com o aumento da proporção do HBD no DES o valor da densidade tende ao valor da densidade do HBD puro, podendo ser maior que esse valor (DAI et al., 2013; LERON et al., 2012). A maioria dos DES exibe densidades mais altas que a água. Esta notável diferença de densidade pode ser atribuída a uma organização molecular diferente ou empacotamento do DES (ABBOTT; BARRON; RYDER; WILSON, 2007).

Uma das principais características dos DES é o ponto de fusão muito mais baixo do que o de qualquer um de seus precursores. Isto ocorre pela influência dos componentes do DES (HBD e HBA), por exemplo, o ponto de fusão de um DES derivado de sal de colina combinado com ureia diminui na ordem $F > NO_3^- > Cl^- > BF_4^-$ indicando uma correlação com a força da ligação de hidrogênio. A razão molar também tem um efeito no ponto de fusão, quando o ChCl foi misturado com ureia em uma razão molar de 1:1 e 1:2, o DES resultante mostrou um ponto de fusão de 50°C e 12°C, respectivamente (ZHANG; VIGIER; ROYER; JÉRÔME, 2012).

Por isso, o uso dos DES como solvente de extração tem muitas vantagens, como seu baixo custo, a facilidade de preparação que proporciona uma série de vantagens em relação aos solventes orgânicos convencionais e líquidos iônicos, uma grande capacidade de ter diferentes tipos de DES mudando apenas um de seus componentes, baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e a capacidade de solubilizar espécies orgânicas e inorgânicas (FAROOQ; ABBASI; ANDERSON, 2020).

A Tabela 3 apresenta alguns métodos da literatura que fizeram uso de DES como fase extratora.

Tabela 3. O uso de DES como fase extratora em métodos de preparo de amostra.

Analitos	Amostra	Método preparo de amostra	DES utilizado	Técnica de separação	Referência
Parabenos	Água	DES-LLME	DL-mentol e ácido decanóico	HPLC-DAD	(GE, 2019)
Pesticidas	Suco de frutas e vegetais	DES-DLLME	ChCl: p-clorofenol	GC-FID	(FARAJZADEH; MOGADDAM; AGHANASSAB, 2016)
Compostos fenólicos	Azeite virgem	DES-LLE	ChCl: xilitol	HPLC-UV	(GARCÍA et.,al 2016)
Dopamina, epinefrina e norepinefrina	Urina e soro	DES-DSPE	ChCl:ureia	HPLC- UV	(KHEZELI; DANESHFAR, 2015)
Terpenóides Bioativos	Folhas de <i>Chamaecyparis obtusa</i>	DES-HS-SME	ChCl:etilenoglicol	GC-FID	(TANG; BI; ZHANG; ROW, 2013)
Cádmio	Água	DES	ZnCl ₂ :acetamida	FAAS	(TUZEN, 2016)

LLME- Microextração líquido-líquido; DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva; DSPE- extração em fase micro-sólida dispersiva; HS-SME - Microextração de solvente headspace; F AAS - espectrometria de absorção atômica com chama. Fonte: Autoria própria (2022)

De acordo com as informações apresentadas na Tabela 3, muitos estudos já foram realizados com diferentes analitos, utilizando variadas técnicas de microextração como DLLME, LLME, DSPE E HS-SME (GARCÍA et.,al 2016, KHEZELI; DANESHFAR, 2015, TANG; BI; ZHANG; ROW, 2013) . Um desses métodos, utiliza a microextração líquido-líquido com solvente eutético profundo in situ, juntamente com cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de parabenos em amostras aquosas (GE, 2019). Além dos trabalhos utilizando HPLC, o DES já foi usado para pré-concentração de Cádmio com determinação por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) (TUZEN,2016).

Assim, a utilização dos DES como fase extratora pode ser considerada um solvente em expansão, portanto, é bastante interessante a exploração de todas as suas capacidades e características. Eles já foram usados para extração de diversos tipos de analitos, em diferentes configurações e amostras, porém existem poucos estudos que avaliam a eficiência do DES em análise de HPA em água de chuva.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia analítica eficiente utilizando HF-MMLLE ligada a um sistema de *96-well plate* para a determinação de HPAs em amostras de água de chuva empregando DES como fase extratora e quantificação por HPLC-DAD.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Preparar diferentes DES e avaliar qual se aplica melhor a técnica de HF-MMLLE; Caracterização do DES com escolhido.
- (ii) Otimizar a separação cromatográfica dos HPA no HPLC-DAD;
- (iii) Preparar as membranas de polipropileno para a HF-MMLLE e DES no sistema de *96-well plate*;
- (iv) Otimizar os principais parâmetros da HF-MMLLE/DES, incluindo etapa de extração (escolha do DES, tempo, pH da amostra e efeito *salting-out*) e dessorção (tempo e solvente ou mistura de solventes);
- (v) Determinar e avaliar os principais parâmetros analíticos de mérito como coeficiente de determinação (R^2), limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), faixa linear de trabalho, recuperação relativa e precisão intradia e interdia;
- (vi) Aplicar a metodologia desenvolvida para determinação de HPAS em amostras de água de chuva.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Para a metodologia proposta foi utilizado uma solução padrão estoque contendo a mistura dos 11 HPAs (Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Pireno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)pireno, Indeno(1,2,3-cd)pireno) com concentração de 200 mg L⁻¹ em metanol obtida da Supelco (Bellefonte, PA, EUA). A partir dessa solução, foi preparada uma solução com a mistura dos analitos em uma concentração de 10 mg L⁻¹ para realizar a separação cromatográfica. Para a produção dos DES foram adquiridos cânfora (96%), timol (≥98,5%), D-sorbitol (≥98%), ácido hexanóico (GC, ≥98%), ácido dodecanóico (GC, ≥99%), ácido butírico (≥99%) da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Acetona (Ace), metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) com pureza >99,8% foram adquiridos da Merck (Kenilworth, NJ, EUA). Água ultrapura (18,2 MΩ cm) foi obtida através de um sistema de purificação de água Mega Purity (Billerica, MA, EUA). A membrana oca usada neste estudo foi de polipropileno PP300/1200 Accurel® com 1,2 mm de diâmetro interno, 300 µm de espessura, 0,2 µm de tamanho do poro e foi obtida da Membrane (Wuppertal, Germany).

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

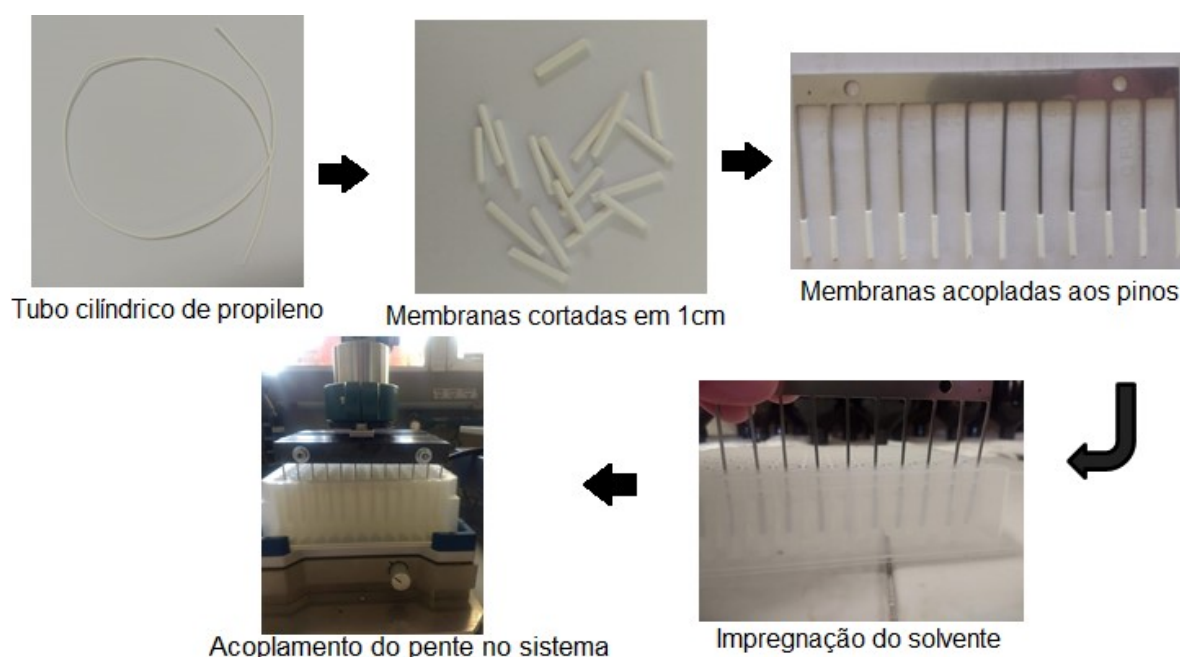
As amostras foram analisadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo LC-20AT (Shimadzu, Japão), utilizando um detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A, um injetor manual (Rohnert Park, CA, EUA) com loop de injeção de 20 µL a vazão de 1,5 mL min⁻¹. A separação foi realizada em uma coluna em fase reversa C18 (250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 5 µm) da Phenomenex. A composição da fase móvel foi composta pela fase A sendo acetonitrila (ACN) 60% e a fase B sendo água (40%). Foi empregado o modo gradiente e a fase móvel constituiu de: ACN (A) 60% e água (B) 40% de 0-3,0 min; a concentração de A aumentou até 75% de 3,0-10,0 min; a concentração de A aumentou novamente até 100% de 10,0-15,5 min e de 15,51 min a concentração de A retornou novamente a 60% e manteve-se até o fim da corrida

em 21,0 min. Os comprimentos de onda selecionados para monitoramento dos HPA foram de 235, 250, 265 e 295nm. Entre as injeções foi realizado um procedimento de limpeza com 100% de (A) durante 5 min.

4.3 PREPARO DAS MEMBRANAS NO SISTEMA DE 96-WELL PLATE COM DES

O preparo das membranas de polipropileno (PP) foi feito de acordo com Lopes *et al.* (2018). Tubos cilíndricos de PP de 1 cm de comprimento foram usados nos experimentos. Estes tubos foram lavados com Ace para limpeza de possíveis contaminantes e interferentes. Após secos, os tubos foram encaixados nos pinos do *96-well plate*, deixando um pequeno espaço da base do pino exposto, para garantir que todo o interior da membrana fosse preenchido pelo pino e não houvesse espaços vazios. Em seguida, os poros das membranas fixadas nas hastes foram impregnados com o solvente. Para a impregnação do solvente na fibra oca, 29 μ L de cada DES foram colocados nos poços do sistema de 96 poços e as fibras suportadas foram deixadas em imersão por 10 min de acordo com MORELLI *et al.*, (2020). A Figura 6 mostra o esquema do preparo da membrana de PP para o sistema de *96 well-plate*

Figura 6. Esquema do preparo da membrana



Fonte: Autoria própria (2022)

4.4 PREPARO E OTIMIZAÇÃO DOS SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS

Os DES foram preparados pela combinação de diferentes HBA e HBD. As frações molares dos HBA e HBD avaliadas no presente trabalho estão apresentadas na Tabela 4. As quantidades dos precursores do DES foram pesadas, transferidas para um tubo aquecidas a uma temperatura de 60°C e mantidos sob agitação magnética por 2 h (MORELLI *et al.*, 2020). Em seguida, a mistura foi deixada resfriar até a temperatura ambiente e foi observado se a mistura permaneceria homogênea.

Tabela 4. Diferentes proporções de HBA e HBD e seu aspecto visual.

HBA	HBD	Fração molar HBA:HBD	Aparência (temperatura ambiente)
Ácido Dodecanóico	Ác. Butírico	1:3	Líquido
	Ác. Hexanóico	1:3	Líquido
Cânfora	Timol	1:1	Líquido

Fonte: Autoria própria (2022)

O DES com melhor eficiência foi caracterizado por calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia no infravermelho (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA).

4.5 OTIMIZAÇÕES DOS PARÂMETROS DA HF-MMLLE

Para otimização do método HF-MMLLE foram utilizadas abordagens uni e multivariadas. Para realizar a otimização do método analítico foi utilizada uma solução de 10 mg L⁻¹ dos HPA em MeOH. Os ensaios foram realizados em uma solução contendo 45 µL da solução de padrões (300 µg L⁻¹) e 1455 µL de água ultra-pura. Os resultados dos experimentos envolvendo planejamentos multivariados foram avaliados com o auxílio do Excel e do *software Statistica* utilizando como resposta a média geométrica das áreas dos picos para cada HPA.

4.5.1 Otimização do solvente de extração

Para escolha do melhor solvente de extração foi realizado um planejamento univariado. Foram avaliados três DES hidrofóbicos: ácido dodecanoico:ácido hexanoico, ácido dodecanoico:ácido butírico e timol:cânfora que foram impregnados na membrana para a extração dos analitos. O tempo de extração utilizado nessa otimização foi de 1 h, onde foram colocados nos poços de extração 1,5 mL de uma solução de água contendo os analitos ($300 \mu\text{g L}^{-1}$). Em seguida, o poço de extração foi substituído por um poço de dessorção contendo 300 μL de uma solução de ACN:MeOH (1:1) (v/v) e deixado por 30 min em agitação, seguido de injeção manual no HPLC-DAD. Todo o processo foi realizado em triplicata para cada DES.

4.5.2 Otimização do solvente e tempo de dessorção

Para escolha do melhor solvente de dessorção foi realizado um planejamento de misturas de superfície ternária Simplex Centróide com três solventes orgânicos: Ace, MeOH e ACN. O planejamento foi executado conforme a Tabela 5.

Tabela 5. Planejamento de misturas de superfície ternária Simplex Centroide para escolha do solvente de dessorção.

Experimento	ACN (μL)	MeOH (μL)	Ace (μL)
1	50	200	50
2	0	300	0
3	300	0	0
4	150	150	0
5	100	100	100
6	50	50	200
7	150	0	150
8	100	100	100
9	0	150	150
10	100	100	100
11	0	0	300
12	200	50	50

Fonte: Autoria própria (2022)

Para otimização do tempo de dessorção foram realizados experimentos univariados com tempos de 10, 25, 40 e 60 min. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.3 Otimização dos parâmetros de extração

Os parâmetros de extração foram otimizados com base em um planejamento fatorial completo 2^3 (níveis: +1; 0 e -1) para uma avaliação preliminar da significância em um nível de 95% de confiança dos seguintes fatores: tempo de extração; pH e efeito *salting-out*. Variou-se o tempo de extração (40, 60 e 80 min), pH (4, 6 e 8) e a concentração de NaCl (0, 10 e 20 % (m/v)). O planejamento foi executado conforme a Tabela 6.

Tabela 6. Planejamento fatorial completo 2^3 para otimização dos parâmetros de extração.

Experimento	pH	NaCl (%)	Tempo (min)
1	4	0	40
2	8	0	40
3	8	20	40
4	4	20	40
5	6	10	60
6	6	10	60
7	6	10	60
8	4	0	80
9	4	20	80
10	8	0	80
11	8	20	80

Fonte: Autoria própria (2022)

Após obter os resultados deste planejamento e para um aprimoramento da otimização dos parâmetros avaliados foi necessário um novo planejamento com o tempo de extração, pH e concentração de NaCl. Assim, foi realizado um planejamento Box-Behnken com 15 experimentos com tempo variando de 40 a 80 min, pH de 4 a 8 e NaCl de 0 a 20 %. O planejamento foi executado conforme a Tabela 7.

Tabela 7. Planejamento Box-Behnken para segunda otimização dos parâmetros de extração.

Experimento	NaCl (%)	pH	Tempo (min)
1	0	6	80
2	10	4	80
3	10	6	60
4	0	6	40
5	20	4	60
6	0	4	60
7	0	8	60
8	10	4	40
9	10	8	40
10	20	8	60
11	20	6	80
12	10	8	80
13	20	6	40
14	10	6	60
15	10	6	60

Fonte: Autoria própria (2022)

Por fim, o último parâmetro a ser otimizado foi o tempo de extração. Esse parâmetro foi avaliado com análise univariada usando os tempos de 60, 80, 100 e 120 min.

4.6 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

Os parâmetros analíticos de mérito foram obtidos com a construção de curvas de calibração por calibração externa, utilizando como matriz a água ultrapura fortificada em ao menos 5 níveis de concentração realizados em triplicata e as extrações foram feitas nas condições otimizadas. Os parâmetros avaliados através da curva analítica foram o limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD). O limite de quantificação (LOQ) foi considerado o primeiro ponto da faixa linear e o limite de detecção (LOD) foi calculado como o LOQ dividido por 3,33. A construção

da curva de calibração também permitiu obter a faixa linear de trabalho, os coeficientes de determinação (R^2) e a equação da reta.

Ensaio de precisão intradia foram realizados em três níveis de concentração (50, 200 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) sendo representados pelo desvio padrão relativo de uma triplicata em cada concentração. A precisão interdia também foi avaliada através do desvio padrão relativo de nove medidas em três dias consecutivos para as concentrações 50, 200 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. A exatidão do método proposto foi avaliada com ensaios de recuperação relativa realizados em três níveis de concentração (50, 200 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) em triplicata feitas em amostras de água de chuva fortificadas.

4.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Para aplicação do método, foram coletadas duas amostras reais de água de chuva com auxílio de frascos de vidro âmbar, uma foi coletada em Palhoça e outra em São José, e foram armazenadas em refrigerador a 4°C até a análise que foi realizada com o método otimizado e validado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

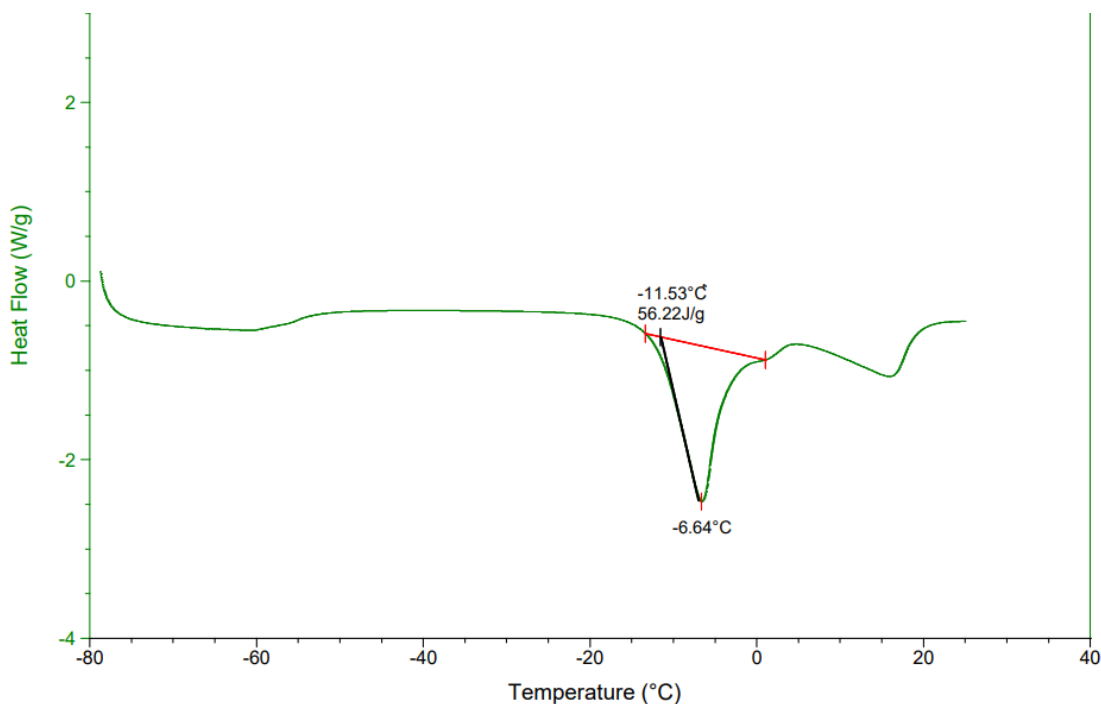
5.1 ANÁLISES DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL, INFRAVERMELHO E TERMOGRAVIMÉTRICA DO DES

Antes da caracterização do DES, testes preliminares de extração foram realizados e o melhor DES foi composto por ácido dodecanoico e ácido decanoico. Mais informações dessas extrações que justificam o solvente eutético escolhido serão descritas na seção 2.3.

As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC), infravermelho (IV) e termogravimetria (TGA) foram realizadas para caracterização do DES. As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) permitem analisar as energias nas quais ocorrem fenômenos como a cristalização, fusão e, ponto eutético. O ácido hexanoico e o ácido dodecanoico individualmente apresentam pontos de fusão de $-3,4^\circ\text{C}$ e $43,8^\circ\text{C}$, respectivamente (KIRK, 1994; LIDE, 2005). Após a mistura dos dois componentes formando o DES, pode-se observar que

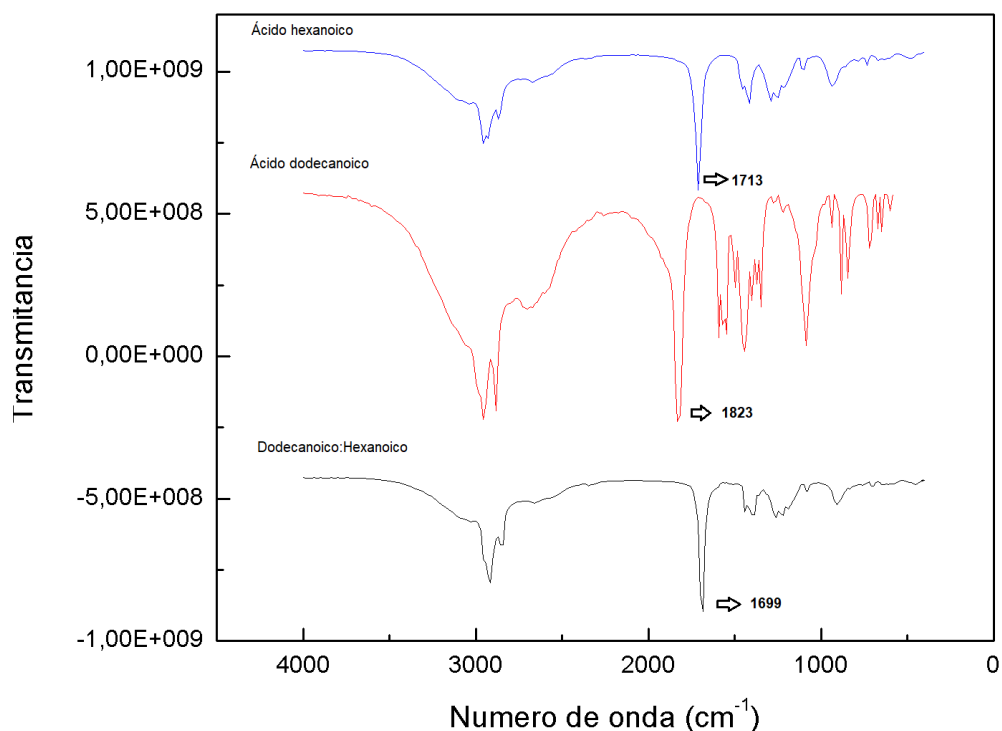
através do termograma na Figura 7 que foi possível observar pelo DSC um pico de fusão no intervalo avaliado, o ponto de fusão da mistura eutética passa para -11,53°C. O DES tem seu ponto de fusão menor comparado com seus componentes individuais, sendo este um indicativo da sua formação.

Figura 7. Curva de calorimetria diferencial de varredura para o DES.



Outra importante análise realizada foi a IV, que é uma ferramenta para explicar a estrutura e as características das ligações químicas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 8.

Figura 8. Espectros de infravermelho dos componentes individuais e do DES



Fonte: Autoria própria (2022)

A indicação da formação da interação entre HBA e HBD pode ser observada por mudanças em bandas dos espectros dos precursores quando comparadas as bandas da mistura eutética. Essas mudanças podem ser pelo deslocamento e/ou mudança na intensidade do sinal ou pelo desaparecimento da banda no espectro do DES. De acordo com Yousefi, Shemirani e Ghorbanian (2018) é possível ter evidências da formação da ligação de hidrogênio entre HBA e HBD a partir do espectro de infravermelho da mistura e dos compostos individuais.

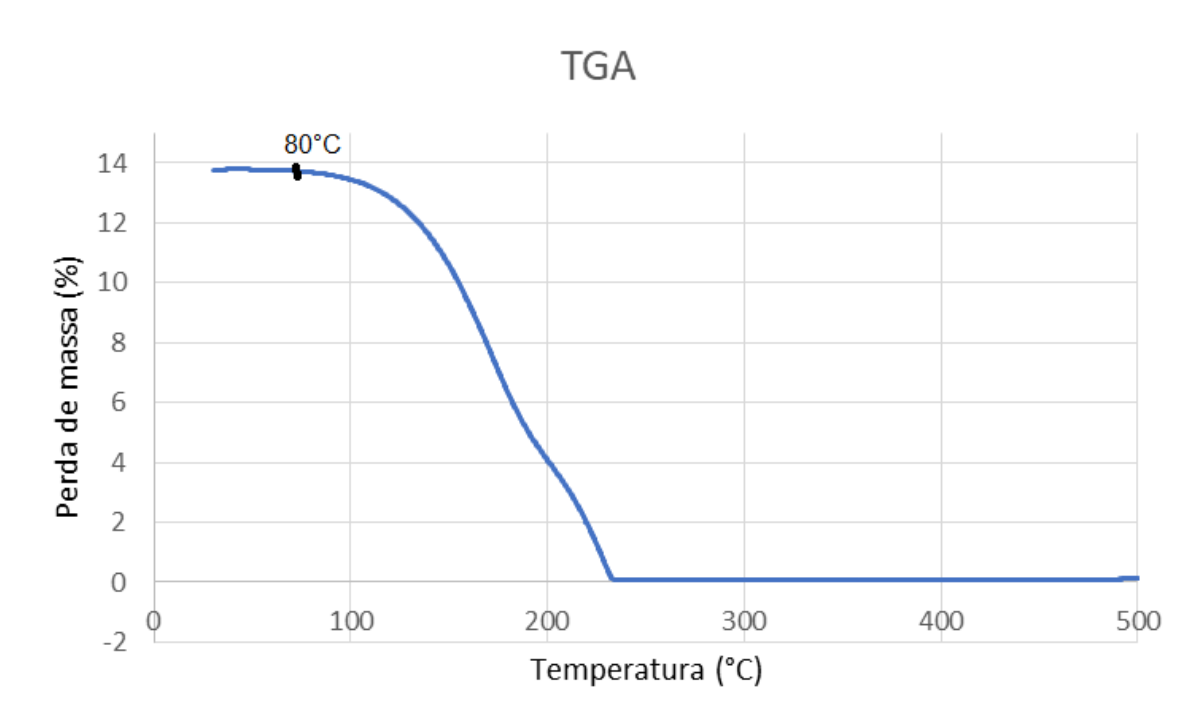
Os ácidos hexanoico e dodecanoico apresentam uma banda larga de estiramento da ligação O-H resultante da função orgânica ácido carboxílico presente na estrutura desses ácidos graxos. Esta banda de estiramento está presente na região de 3300 a 2500 cm⁻¹. Bandas de estiramento mais fracas da ligação C-H muitas vezes estão sobrepostas à essa ampla banda da ligação O-H. Na Figura 6 é possível observar a mudança na intensidade da banda da hidroxila no DES. (SILVERSTEIN; BASSELER; MORRIL, 2006).

Outra banda importante a ser considerada nos espectros dos ácidos, é a banda de estiramento da ligação C=O, que está presente na região de 1720 a 1706 cm⁻¹. As interações internas de ligação de hidrogênio podem reduzir a frequência de

absorção dessas bandas, deslocando para números de onda menores. Pode se observar na figura 6 que a banda de C=O, quando comparada com os compostos individuais, foi deslocada para a região de 1699 cm^{-1} (SILVERSTEIN; BASSELER; MORRIL, 2006). Portanto, o deslocamento e mudanças de intensidade sugerem a existência de ligação de hidrogênio entre o ácido dodecanoico e o ácido hexanoico, corroborando com as informações para comprovação da obtenção do DES.

A técnica TGA foi utilizada para caracterização dos DES, com o objetivo de observar variações no perfil de degradação do DES quando aquecido. O termograma obtido está apresentado na Figura 9. As curvas TGA exibiram uma região de perda de massa significativa (95%) entre 80°C e 230°C . Então, a partir de 80°C a mistura eutética começa a se degradar. A temperatura inicial de decomposição é uma propriedade notável, pois determina a temperatura máxima na qual os DES podem manter seu estado líquido sem decomposição e, portanto, sua faixa de uso como solventes. Portanto, os resultados das análises de calorimetria exploratória diferencial, infravermelho e termogravimetria indicam a formação do DES a partir dos seus compostos individuais.

Figura 9. Curva TGA do DES ácido dodecanoico:ácido hexanoico.

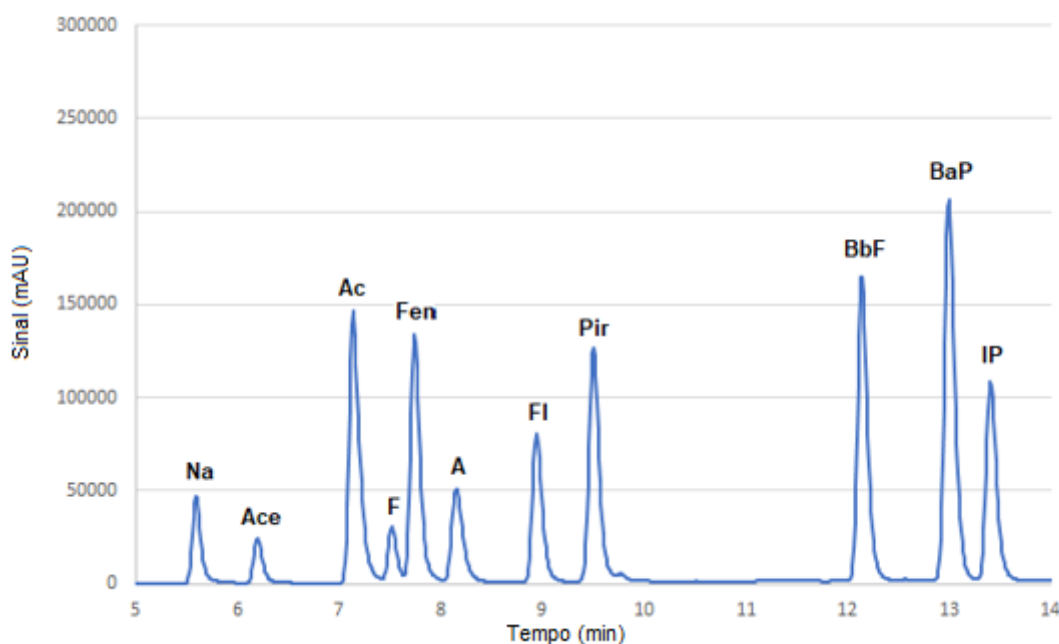


Fonte: Autoria própria (2022)

5.2 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Com a finalidade de verificar os tempos de eluição dos analitos foi feita a separação cromatográfica a partir da injeção direta de 20 μL da mistura de padrões de HPA na concentração de 10 mg L^{-1} preparada em metanol. A separação foi feita empregando modo gradiente de solvente totalizando 21 min de corrida cromatográfica. A separação dos analitos está apresentada na Figura 10.

Figura 10. Cromatograma da separação dos 11 HPA monitorados em 260 nm. Analitos: Naftaleno (Na), Acenaftileno (Ace), Acenafteno (Ac), Fluoreno (F), Fenantreno (Fen), Antraceno (A), Fluoranteno (Fl), Pireno (Pir), Benzo[b]fluoranteno (BbF), Benzo[a]pireno (BaP) e Indeno (IP).



Fonte: Autoria própria (2022)

Pelo cromatograma pode-se observar uma boa separação dos compostos que pode ser comprovado calculando o número de pratos teóricos e a resolução. Para o cálculo de números de pratos teóricos foi utilizado a fórmula:

$N = 16 (t_i/w_i)^2$, onde t_i é o tempo de retenção do analito em minutos e w_i é a largura do pico na base.

E para a resolução foi utilizada a fórmula:

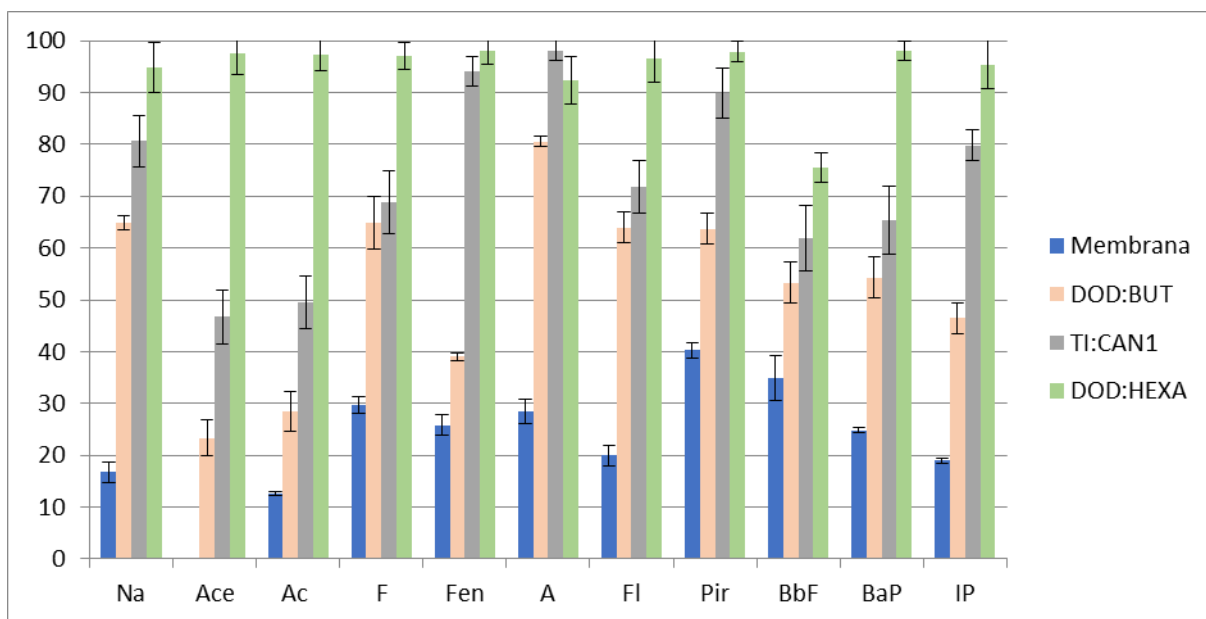
$R_s = 2 (t_n - t_{n-1}) / (w_n + w_{n-1})$, onde t_n é o tempo de retenção e t_{n-1} o tempo de retenção do analito anterior e w_n é a largura do pico escolhido e w_{n-1} é a largura do pico anterior ao escolhido.

Utilizando as fórmulas acima, foi obtido uma variação de 4.610 até 16.540 de número de pratos da coluna e o cálculo da resolução foi realizado entre todos os analitos e foi obtido uma variação de 1,27 até 2,4. Segundo Ribani et. al (2004), os valores recomendados devem ser maiores que 2 para a resolução e número de pratos teóricos com valores maiores que 2.000 para o HPLC

5.3 OTIMIZAÇÃO DA ESCOLHA DO DES COMO SOLVENTE EXTRATOR

A escolha do solvente extrator é uma etapa crucial em técnicas de microextração, esse fato vai determinar a eficiência da extração. É necessário o recobrimento da membrana oca de polipropileno para que ocorra a extração dos compostos de interesse. Sem o solvente, não haverá a formação de uma fina camada na membrana hidrofóbica. Algumas características do solvente são fundamentais para que apresente compatibilidade com a membrana, como possuir baixa volatilidade, imiscibilidade com a fase doadora (fase aquosa), alta eficiência de extração e seletividade para os analitos, ter uma viscosidade adequada. Os DES avaliados foram compostos de ácido dodecanoico:ácido butírico, ácido dodecanoico:ácido hexanoico e o timol:cânfora. Para este estudo foi realizado um planejamento univariado fixando os demais parâmetros da HF-MMLLE. Com isso, foi possível obter um gráfico de barras da área de sinal normalizada dos HPA e suas respectivas barras de erros, como mostrado na Figura 11.

Figura 11. Gráfico de barras de área de sinal normalizada dos HPA obtido para avaliação dos DES usados como solvente extrator e da membrana. Legenda: DOD:BUT – ácido dodecanoico:ácido butírico; TI:CAN1 – TIMOL;CÂNFORA; DOD:HEXA – ácido dodecanoico:ácido hexanoico.



Fonte: Autoria própria (2022)

O DES composto por DOD:HEXA extraiu mais analitos com melhores áreas que os outros DES. Todos os DES são hidrofóbicos, não são voláteis e não são tão viscosos quanto os hidrofílicos, mas ainda possuem viscosidade suficiente para serem mantidos impregnados na membrana porosa, o que é um fator importante para as técnicas baseadas em membrana. Porém a escolha do DOD:HEXA pode ser justificada por sua longa cadeia de átomos de carbono, caracterizada como apolar, que proporciona uma melhor interação com os analitos hidrofóbicos. O DES DOD:HEXA é mais apolar que o DOD:BUT por possuir cadeias carbônicas maiores. E em relação ao TIMOL:CÂNFORA, os DESs hidrofóbicos podem ser classificados como solventes apolares ($E_T^N = 0,0051-0,0201$) ou relativamente polares ($E_T^N = 0,5151-0,5997$) com base nos valores de polaridade normalizada (E_T^N). Sendo assim, o DES TIMOL:CÂNFORA tem polaridade igual a 0,5885, segundo Li et al., (2020). Portanto, a mistura eutética TIMOL:CÂNFORA é menos apolar e possui menor interação com os analitos quando comparado com o DODECA:HEXA. Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos, optou-se por utilizar o DES DODECA:HEXA como solvente de extração.

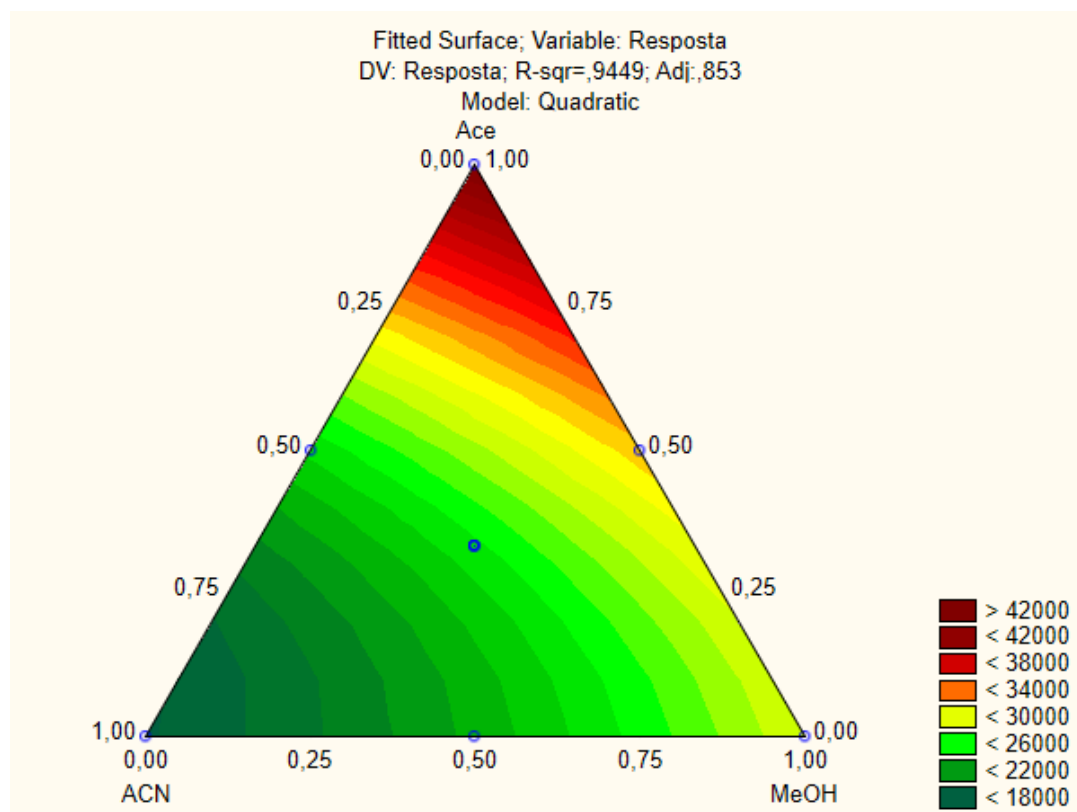
5.4 OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE DESSORÇÃO

A escolha do solvente de dessorção deve atender alguns fatores para ter os melhores resultados. Os solventes usados nesta etapa foram selecionados com

base na compatibilidade HPLC-DAD e na solubilidade dos componentes individuais do DES. Os três solventes orgânicos selecionados para realizar a dessorção dos analitos da fase receptora, ACN, Ace e MeOH, foram escolhidos a partir desses critérios e avaliados de acordo com seus desempenhos na dessorção dos 11 HPAs. Os demais parâmetros foram fixados, como o solvente de extração (DES DODECA:HEXA); tempo de extração (60 min) e o tempo de dessorção (30 min). A fase doadora (água ultrapura) foi mantida em 1,455 mL e foram adicionados 45 µL da mistura de 11 HPAs com concentração igual a 300µg/L..

Os resultados dos experimentos foram expressos como a média geométrica da área dos picos cromatográficos dos analitos e tratados com o auxílio do *software Statsoft Statistica*. O gráfico de superfície ternária Simplex Lattice (Figura 12) foi obtido por meio do modelo matemático quadrático aplicado para interpretação dos dados. Por meio do gráfico, observou-se uma tendência de melhor resposta analítica utilizando 100% de Ace como solvente de dessorção. O coeficiente de determinação R^2 de 0,9449 indica que 94,5% dos dados estão ajustados ao modelo matemático, mostrando, portanto, boa correlação do modelo matemático proposto e dos dados obtidos e que não apresenta falta de ajuste.

Figura 12. Superfície ternária Simplex Lattice obtida para otimização do solvente de dessorção empregando acetonitrila (ACN), acetona (Ace) e metanol (MeOH).



Fonte: Autoria própria (2022)

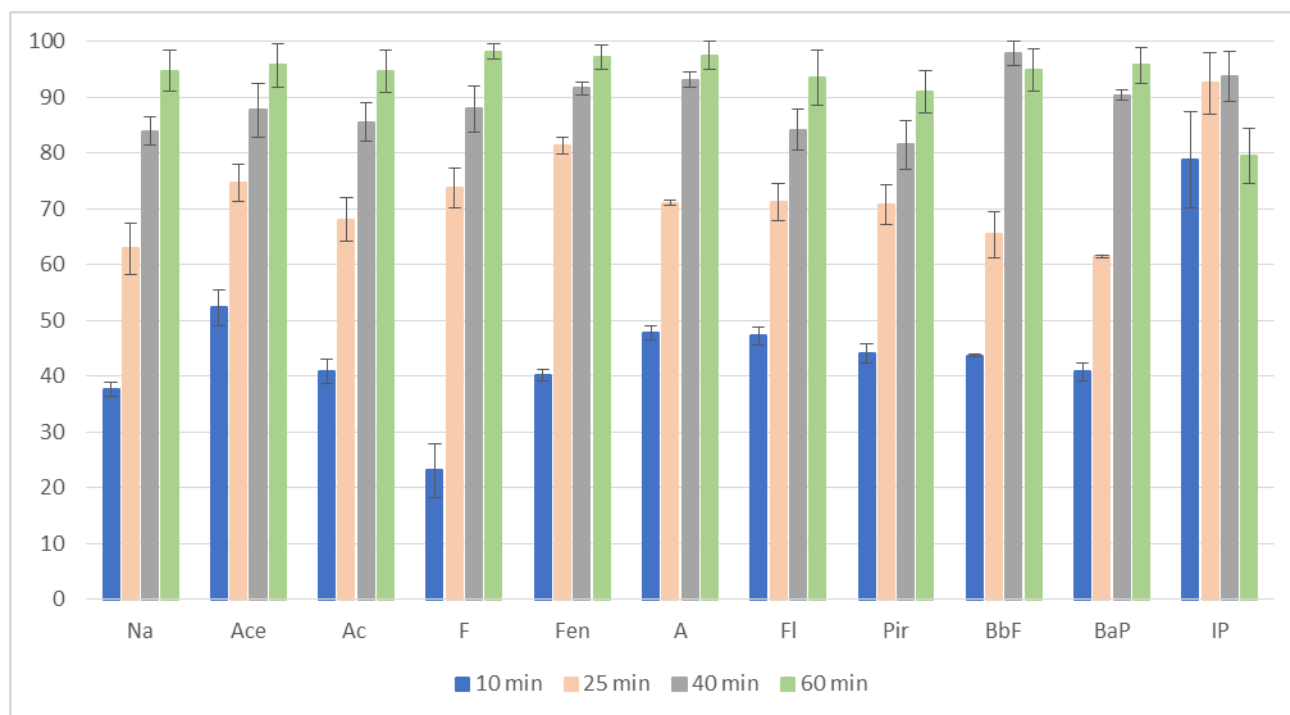
O comportamento analisado pelo gráfico de superfície ternária Simplex Lattice obtido mostrou que Ace, como solvente de dessorção, foi capaz de interagir com os analitos e com o DES de modo a estabelecer um equilíbrio entre a fase receptora e o solvente orgânico de dessorção, foi o solvente que melhor permitiu a passagem dos analitos extraídos para o solvente orgânico para posterior análise cromatográfica. Além disso, como a membrana branca oca muda de cor em contato com o DES, tornando-se mais transparente, quando entra em contato com o solvente de dessorção ela volta a cor original, branca. Confirmando então, que o solvente de dessorção removeu todo o DES impregnado nos poros da fibra oca.

5.5 OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DESSORÇÃO

Para determinar as condições ideais do tempo de dessorção, foi realizado uma otimização univariada. Para que ocorra a dessorção dos analitos é necessário

um determinado tempo para estabelecer um novo equilíbrio entre a fase receptora e o solvente de dessorção, desse modo, seu estudo é fundamental. Os demais parâmetros foram fixados (solvente de extração DES DODECA:HEXA; tempo de extração 60 min e solvente de dessorção Ace). A fase doadora (água ultrapura) foi mantida em 1.455 μL e foram adicionados 45 μL da mistura de 11 HPA a 300 $\mu\text{g/L}$. para esta otimização. A Figura 13 apresenta a área de sinal normalizada para todos os analitos nos tempos estudados.

Figura 13. Gráfico de barras obtido para avaliação do tempo de dessorção.



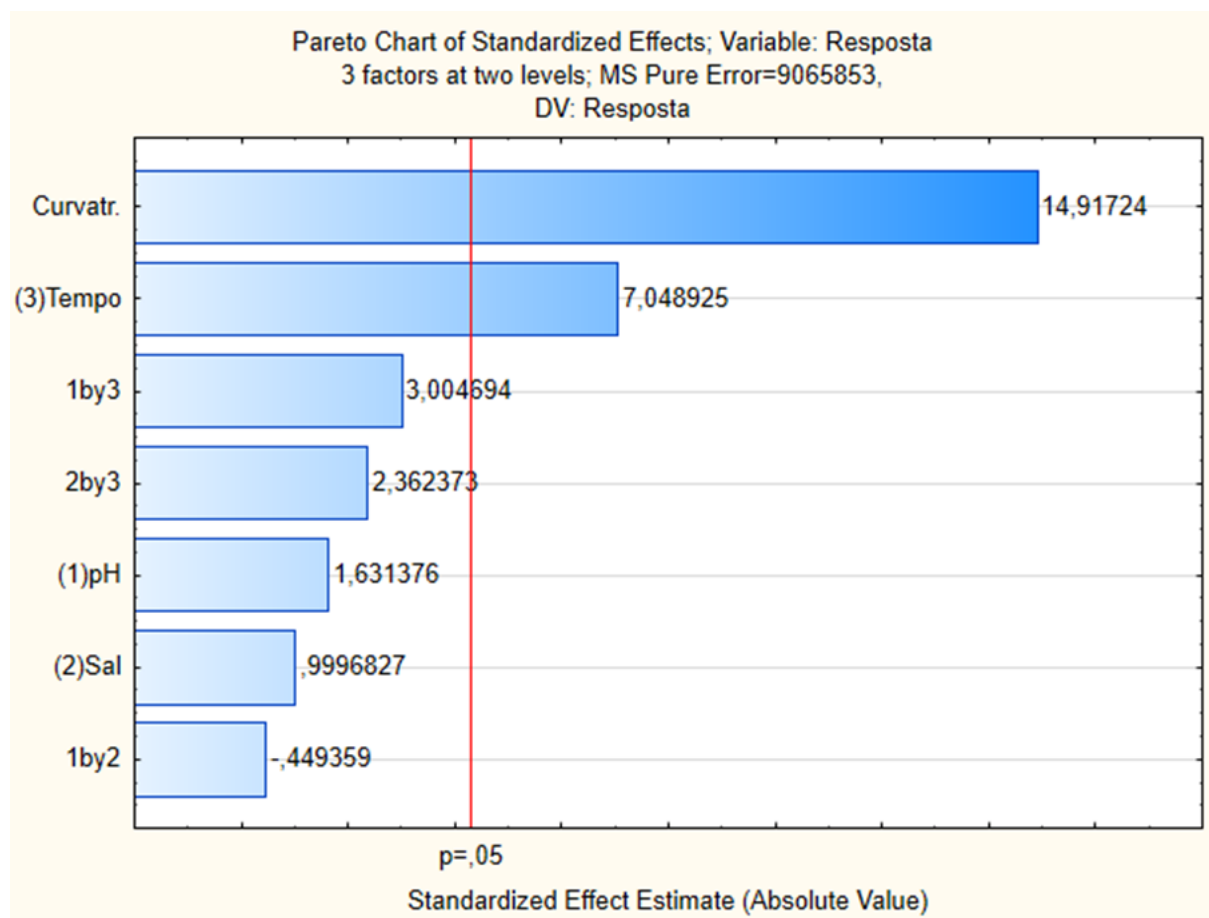
Fonte: Autoria própria (2022)

É possível observar que, para a maioria dos analitos, 40 min foi o tempo suficiente para a dessorção. Nesse tempo, observa-se que pelo menos 80% dos analitos já haviam sido dessorvidos. Apesar de 60 min ter resultado semelhante, alguns analitos podem sofrer retroextração, retornando do DES para a membrana, o que explica alguns valores serem menores. Assim, 40 min proporcionou valores próximos em geral quando comparado a 60 min e gerou uma melhor frequência analítica.

5.6 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO

Após a otimização dos parâmetros de dessorção, os parâmetros de extração foram selecionados. O planejamento experimental através de superfícies de respostas é possível utilizando planejamentos fatoriais para avaliar se os parâmetros são significativos. O planejamento é definido por matrizes, compostas por diferentes níveis dos parâmetros em estudo. Através dos resultados desse planejamento é possível obter boas estimativas quanto à significância dos parâmetros estudados. O planejamento fatorial 2^3 foi utilizado para avaliar o tempo de extração, pH e efeito da adição de sal. A resposta utilizada para a geração do Gráfico de Pareto foi a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos dos analitos em cada experimento, resultando no gráfico da Figura 14. Além da influência individual de cada parâmetro, foram avaliados os comportamentos das variáveis quando combinadas entre si, interações de segunda ordem.

Figura 14. Gráfico de Pareto com o resultado da triagem das variáveis de influência na eficiência de extração.



Fonte: Autoria própria (2022)

A tabela ANOVA do Gráfico de Pareto mostrada na Tabela 8 resultou em um coeficiente de determinação (r^2) de 0,99507, o que demonstra que os resultados obtidos experimentalmente se adequam aos dados preditos pelo modelo estatístico utilizado.

Tabela 8. Tabela ANOVA do Gráfico de Pareto.

ANOVA; Var.:Resposta; R-sqr=,99507; Adj.,97781 (Spreadsheet8; 3 factors at two levels; MS Pure Error=9065853, DV: Resposta					
Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	2,017369E+09	1	2,017369E+09	222,5239	0,004464
(1)pH	2,412774E+07	1	2,412774E+07	2,6614	0,244392
(2)Sal	9,060100E+06	1	9,060100E+06	0,9994	0,422772
(3)Tempo	4,504582E+08	1	4,504582E+08	49,6873	0,019538
1 by 2	1,830609E+06	1	1,830609E+06	0,2019	0,697175
1 by 3	8,184821E+07	1	8,184821E+07	9,0282	0,095209
2 by 3	5,059477E+07	1	5,059477E+07	5,5808	0,141993
Pure Error	1,813171E+07	2	9,065853E+06		
Total SS	3,677035E+09	9			

Fonte: Autoria própria (2022)

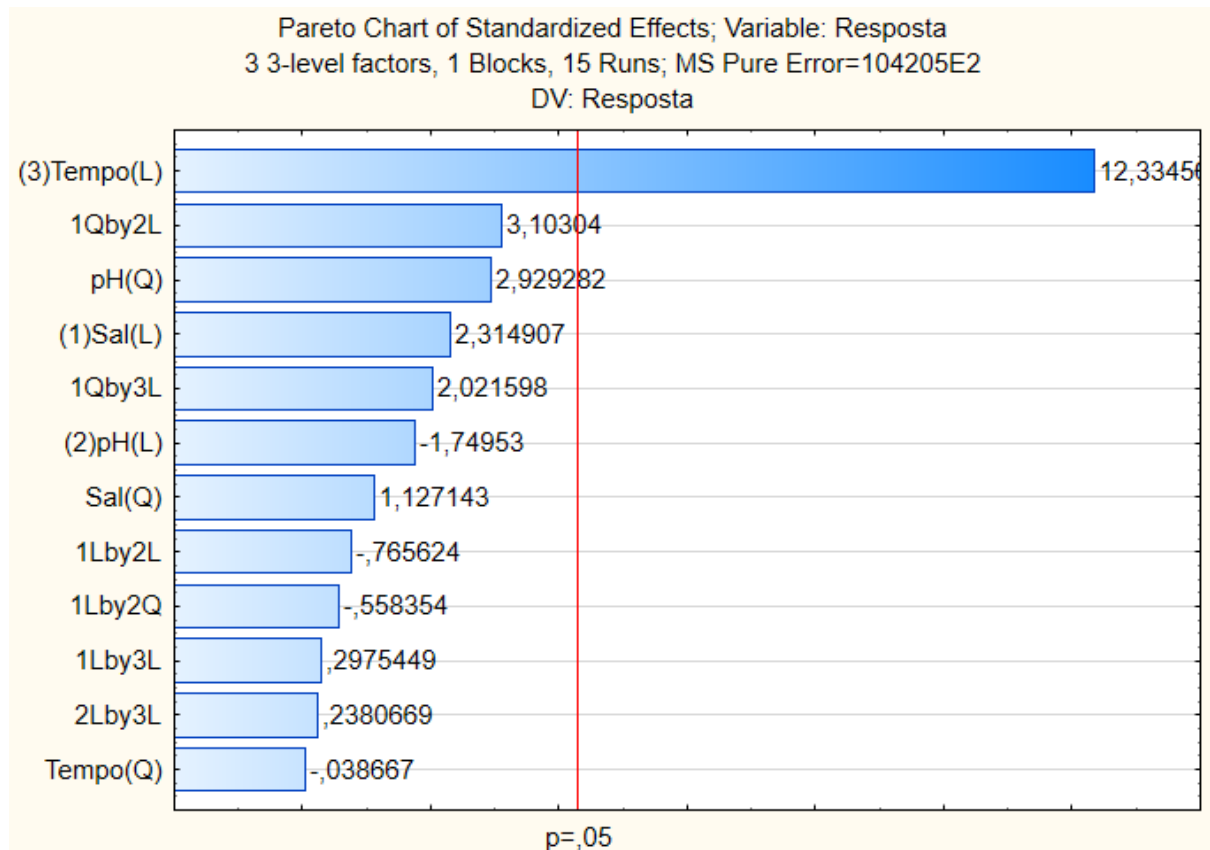
Observa-se que a variação de pH não afeta significativamente a extração dos analitos, ou seja, não há mudança significativa nos resultados obtidos, uma vez que os HPA são compostos não ionizáveis. A variação da porcentagem de sal na amostra também não teve significância, ou seja, o sal não influenciou na eficiência da extração. O único parâmetro avá que apresentou ser significativo foi o tempo de extração. O Gráfico de Pareto mostra que o tempo de extração apresentou maiores respostas quando tendendo a tempos maiores.

Além das respostas dos parâmetros variados, o gráfico de pareto mostrou que a curvatura é significativa. Isso ocorre devido ao planejamento fatorial permitir a construção de modelos lineares nos fatores através do método dos mínimos quadrados, os quais descrevem superfícies de resposta planas. Entretanto, a superfície de resposta pode possuir curvatura, sendo necessária a construção de modelos quadráticos. Para esse fim, são adicionados novos níveis ao planejamento fatorial, permitindo o cálculo dos coeficientes quadráticos (BREITKREITZ; SOUZA;

POPPI, 2014). Dentre os planejamentos que podem ser empregados, foi utilizado o Box-Benken.

Sendo assim, um planejamento Box-Behnken com 15 experimentos com tempo variando de 40 a 80 min, pH de 4 a 8 e NaCl de 0 a 20 % foi realizado para alcançar o melhor resultado. E o resultado dessa otimização está demonstrado na Figura 15.

Figura 15. Gráfico de Pareto do Box-Behnken com o resultado da triagem das variáveis de influência na eficiência de extração.



Fonte: Autoria própria (2022)

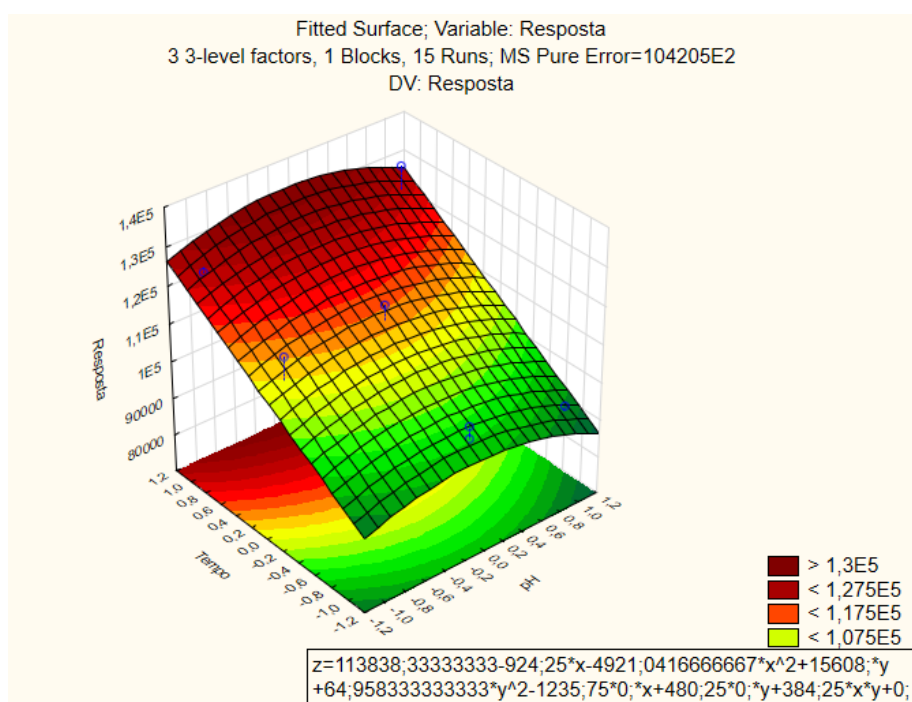
A função quadrática apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,9234 conforme demonstrado na ANOVA da Tabela 9. O resultado obtido foi muito satisfatório para esse tipo de superfície resposta, pois quanto mais próximo de 1, melhor é o ajuste do modelo predito aos resultados obtidos experimentalmente. A Figura 15 mostra que apenas o tempo de extração é significativo. Além do Gráfico de Pareto e da tabela ANOVA, é possível obter com base nos experimentos realizados uma superfície de resposta que está apresentada nas Figuras 16 e 17.

Tabela 8. Tabela ANOVA do Gráfico de Pareto do Box-Behnken.

ANOVA; Var.:Resposta; R-sqr=,92348; Adj:,8661 (Spreadshe 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=104205E; DV: Resposta						
Factor		SS	df	MS	F	p
(1)Sal	L+Q	6,618082E+07	2	33090410	3,1755	0,239492
(2)pH	L+Q	9,624923E+07	2	48124616	4,6183	0,177991
(3)Tempo	L+Q	1,948893E+09	2	974446446	93,5122	0,010581
Lack of Fit		1,537952E+08	6	25632527	2,4598	0,316993
Pure Error		2,084105E+07	2	10420526		
Total SS		2,282366E+09	14			

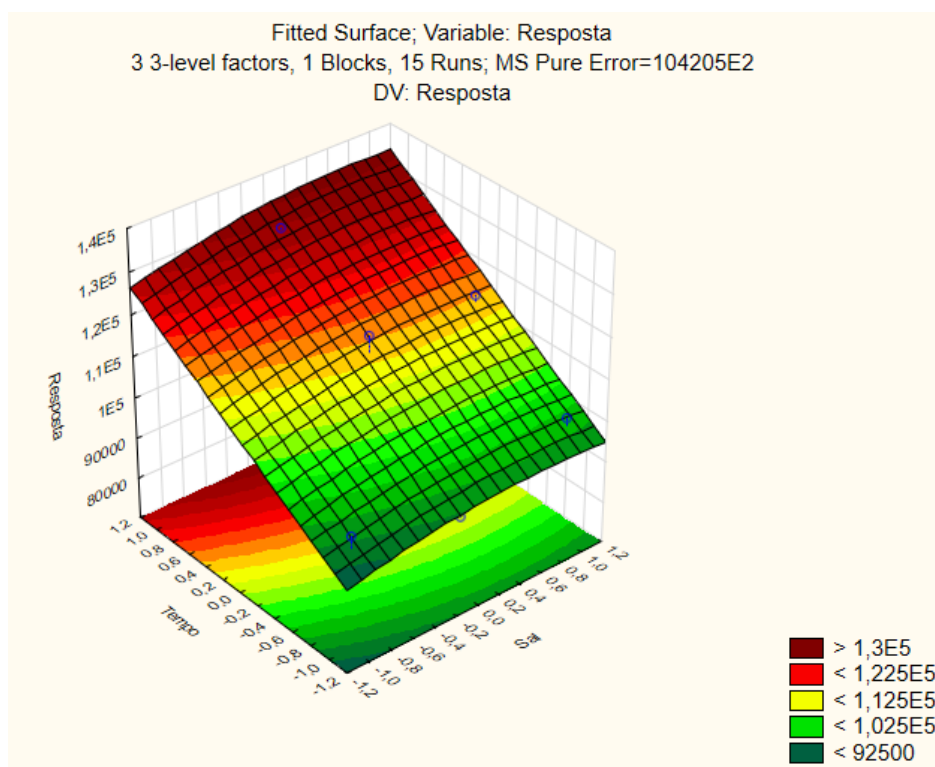
Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 16. Superfície de resposta obtida para a otimização tempo de extração e do pH na amostra.



Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 17. Superfície de resposta obtida para a otimização tempo de extração e da % sal na amostra.

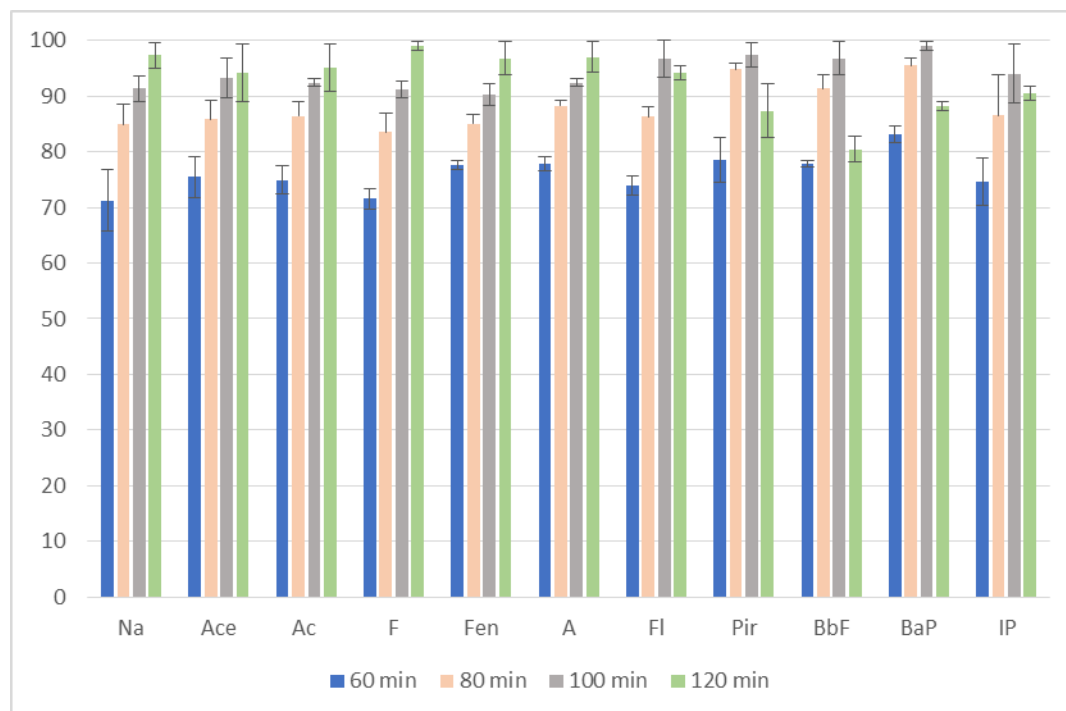


Fonte: Autoria própria (2022)

A partir das Figuras 16 e 17 pode-se concluir que tempos de extrações maiores atingem os melhores resultados, já que essa condição está na região de coloração vermelha mais intensa, na qual indica as condições que se obtém o maior valor de média geométrica de todos os compostos. Por isso, como pode ser visto na figura 15 e 16, mudanças de pH e sal não afetaram significativamente os resultados, pode-se ver isso que na faixa de tempo de melhor resultado não há variação com relação a pH e sal.

Com base nos resultados apresentados no planejamento experimental estudado através do Box-Behnken, o tempo de extração foi otimizado por um planejamento univariado para melhor compreensão e discussão dos resultados. O resultado do planejamento utilizando como resposta a média das áreas obtidas para cada um dos analitos normalizadas para a maior resposta obtida está apresentado no gráfico de barras na Figura 18.

Figura 18. Gráfico de barras obtido pelo estudo do tempo de extração.



Fonte: Autoria própria (2022)

Como é possível perceber, as respostas mais altas para a maioria dos analitos ocorre em 100 min, entretanto, com 80 min os analitos são extraídos em mais de 80%. E como a barra de erros de 80 min chega próximo em quase todas as barras de erros de 100 min, mostrando que são valores bem próximos com os resultados de 100 min, a condição de 80 min já é suficiente para obter uma boa eficiência de extração. O valor de 120 min não foi escolhido devido a ocorrer retroextração nos últimos analitos, como pode-se observar para os analitos Pir, BbF, BaP e IP. Por isso, a condição de 80 min foi escolhida para o método, e assim, é possível ter uma boa frequência analítica do método.

5.7 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

Após definidas as condições otimizadas, foram construídas curvas de calibração por simulação de matriz, onde concentrações conhecidas dos analitos foram adicionadas na água UP e submetidas à extração. Foram obtidas três faixas de calibração para os HPAs, explorando o menor sinal detectável possível, obtendo assim, os principais parâmetros analíticos de mérito que estão na Tabela 10.

Os coeficientes de determinação apresentaram valores maiores ou iguais a 0,9745, o que indica uma boa relação linear entre a concentração dos analitos na amostra e a resposta obtida para a faixa estudada. Os limites de quantificação (LOQ) foram estabelecidos como sendo o menor valor da faixa linear. O Valor de LOQ variou de 15 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os valores de limites de detecção foram obtidos pelo valor de LOQ dividido por 3,3.

Tabela 9. Limites de detecção e quantificação, faixas lineares de trabalho, coeficientes de correlações lineares e equações lineares de 11 HPAs.

Analito	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa Linear de Trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R²	Equação da Reta
Naftaleno	4,5	15	15-500	0,9947	$y = 70,51x + 192,45$
Acenaftileno	4,5	15	15-500	0,9897	$y = 138,8x + 5363,9$
Acenafteno	4,5	15	15-500	0,9986	$y = 148,89x - 1266,8$
Fluoreno	4,5	15	15-500	0,9902	$y = 116,91x - 1446,6$
Fenantreno	4,5	15	15-500	0,9745	$y = 483,69x - 6765,6$
Antraceno	4,5	15	15-500	0,9865	$y = 2131,2x + 82879$
Fluoranteno	15,2	50	50-500	0,9848	$y = 112,02x - 4116,7$
Pireno	15,2	50	50-500	0,9933	$y = 124x - 5359,8$
Benzo(b)fluoranteno	7,6	25	25-500	0,9974	$y = 132,87x - 883,02$
Benzo(a)pireno	7,6	25	25-500	0,9866	$y = 160,24x - 1416,2$
Indeno	7,6	25	25-500	0,9906	$y = 148x - 4721,2$

Fonte: Autoria própria (2022)

Os ensaios de exatidão foram realizados com amostra de água da chuva. A exatidão do método foi expressa através da recuperação relativa dos analitos. Inicialmente foi realizada uma extração na amostra aplicando-se o método otimizado neste estudo para verificar a presença de HPA e/ou possíveis interferências. Por meio da análise na amostra, foi possível concluir que nenhum analito avaliado foi encontrado acima do limite de detecção do método e não foram encontrados compostos interferentes. As recuperações relativas, foram realizadas em três

diferentes níveis de concentração, são apresentadas na Tabela 11. Os resultados que variam de 85% a 117% indicam para maioria dos analitos houve uma boa recuperação estando dentro da faixa aceitável (Os intervalos aceitáveis de recuperação geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 22\%$.)

Os ensaios de precisão intradia e interdia avaliados em três níveis de concentração, também foram feitos com amostra de água da chuva (Tabela 11). Os resultados foram expressos pelo desvio padrão relativo da resposta analítica da extração realizada em triplicata para cada nível de concentração. Os ensaios de precisão intradia apresentaram valores entre 1% e 12%, já a precisão interdia variou de 3% até 13%, foram obtidos ótimos resultados, com valores menores que 20% estando de acordo com os parâmetros estabelecidos pela AOAC (2016).

Tabela 10. Ensaio de precisão (intradia e interdia) e recuperação relativa (%RR) para o método de HF-MMLLE/DES.

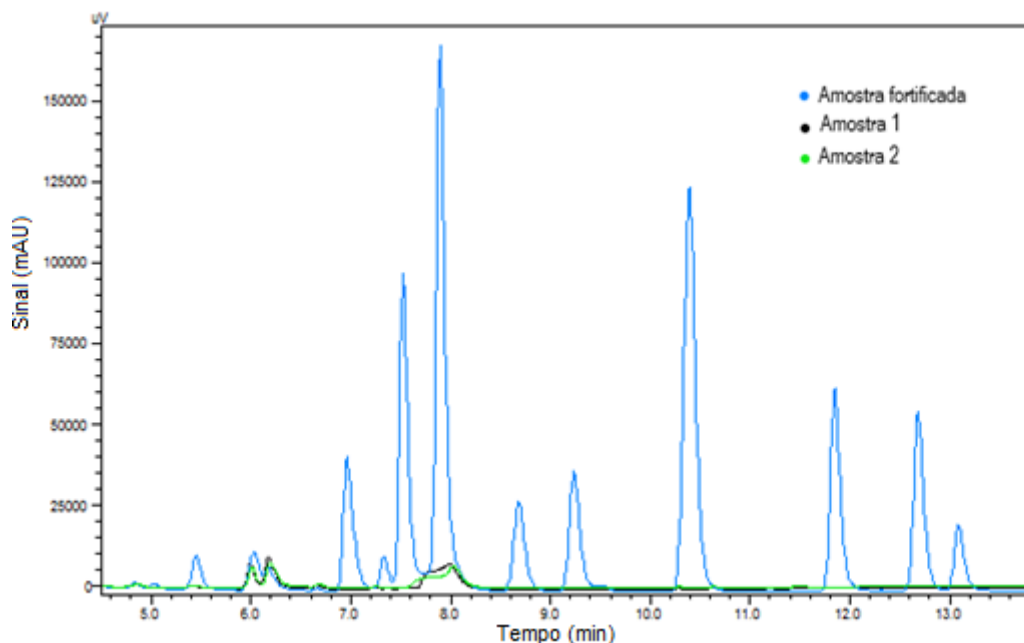
Analito	Fortificação (ug L ⁻¹)	Recuperação Relativa (%)	Precisão	Precisão
			Intradia (%) n=3	Interdia (%) n=9
Naftaleno	50	113 ± 3	12	13
	200	114 ± 7	6	10
	500	92 ± 7	5	6
Acenaftileno	50	101 ± 16	10	11
	200	117 ± 6	4	6
	500	95 ± 4	3	3
Acenafteno	50	112 ± 2	8	9
	200	110 ± 8	2	10
	500	99 ± 2	4	4
Fluoreno	50	105 ± 6	7	8
	200	85 ± 5	6	9
	500	92 ± 4	1	7
Fenantreno	50	114 ± 8	5	12
	200	98 ± 2	2	3
	500	107 ± 4	3	4
Antraceno	50	110 ± 2	3	3
	200	109 ± 3	5	4
	500	96 ± 2	9	6
Fluoranteno	50	116 ± 4	6	8
	200	103 ± 6	8	8
	500	105 ± 5	3	5
Pireno	50	117 ± 4	2	4
	200	96 ± 4	8	8
	500	103 ± 4	4	4
Benzo(b)fluoranteno	50	91 ± 2	2	4
	200	108 ± 6	1	5
	500	98 ± 5	2	4
Benzo(a)pireno	50	115 ± 5	4	12
	200	93 ± 7	6	6
	500	96 ± 6	3	4
Indeno	50	115 ± 2	5	5
	200	117 ± 5	3	9
	500	95 ± 3	4	4

Fonte: Autoria própria (2022)

5.8 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA

Por fim, o método foi aplicado em duas amostras de água de chuva. A amostra 1 foi coletada em Florianópolis e a amostra 2 foi coletada em Palhoça. A Figura 19 mostra os cromatogramas das amostras analisadas.

Figura 19. Cromatogramas das amostras coletada e da amostra fortificada em 260 nm.



A partir dos cromatogramas é possível evidenciar que nenhum dos analitos foi detectado pelo método desenvolvido, podendo estar abaixo do limite de detecção do método. A metodologia poderia ser aplicada para uma quantidade maior de amostras com a finalidade de avaliar águas contaminadas com HPAs para estudos ambientais.

5.9 COMPARAÇÃO COM OUTRAS METODOLOGIAS

A fim de comparar as principais características do método desenvolvido foi construída a Tabela 11. Como pode ser visto os LODs obtidos são semelhantes quando comparado a uma metodologia que também utiliza HPLC-DAD (AKVAN; AZIMI; PARASTAR, 2019), mas são maiores quando comparados com metodologias que utilizam o equipamento GC-MS ou GC-FID, isso ocorre devido ao GC apresentar uma maior sensibilidade que o HPLC, chegando a resultados melhores. Porém, quando comparados as quantidades de amostra, a metodologia que utiliza o GC faz uso de um grande consumo de amostra, o que poderia ser outro motivo que explica resultados melhores de LODs, e que quando comparados com o método deste trabalho, o consumo de amostra tem seu valor bem reduzido. Portanto, o

método realizado proporciona um resultado satisfatório. A metodologia proposta apresenta alto desempenho por utilizar o *96 well-plate*, o tempo total de extração seria de 80 minutos caso fosse utilizado apenas uma replicata, porém é possível realizar extrações simultâneas onde o preparo de amostra é realizado em menos de 1 min para cada amostra quando é utilizada a capacidade total do sistema, o que proporciona extrações com tempos menores quando comparado com outros métodos presentes na Tabela 11 (AKVAN; AZIMI; PARASTAR, 2019). O método também avalia os 11 HPAs simultaneamente, enquanto alguns trabalhos fazem quatro ou cinco deles ((SHAMSIPU R; HASHEMI, 2015; KHEZELI; DANESHFAR; SAHRAEI, 2015). Outra comparação é a quantidade de fase extratora utilizada que neste trabalho é menor quando comparado a outros métodos que utilizam quantidades superiores (GUTIÉRREZ-SERPA et al., 2018). Em alguns casos, utilizam quantidades menores de solventes, entretanto, fazem uso de solventes com toxicidade bastante elevada como no caso do tetracloroetileno (AKVAN; AZIMI; PARASTAR, 2019). Enquanto neste trabalho é utilizado um solvente natural como solvente de extração. Além disso, o uso dos DES como fase extratora é um campo pouco explorado e, como apresentado, possui grande potencialidade para ser usado no campo de preparo de amostras.

Tabela 11. Comparação do método de HF-MMLLE/DES proposto com outros presentes na literatura

Técnica de extração	Técnica de separação/detecção	Tempo de extração	Analitos	Fase extratora	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Quantidade de fase extratora	Amostra e volume	Referência
USAEME	HPLC-DAD	13,5 min	Na, Ace, Ac, F, Fen, A, FI, Pir, BbF, BaP, IP	Tetracloroetileno	15,7-54,8	4,8-13,1	25 μL	Água do rio	(AKVAN; AZIMI; PARASTAR, 2019)
ELLME-DES	HPLC-UV	20 min	F, Fen, A, Pir, BaP	ChCl:Ph	0,06-22	0,02-6,8	100 μL	Água; 1,5mL	(KHEZELI; DANESHFAR; SAHRAEI, 2015)
MSPE	GC-MS	10 min	Na, Ace, Ac, F, Fen, A, FI, Pir,	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -porfirina	-	0,002-0,01	20 mg	Água subterrânea; 40mL	(YU et al., 2018)
M- μ -SPE	GC-FID	20 min	Na, Ace, F, Fen, FI, Pir, BaP	Composto magnético b-CD-CNT	2,0–10,0	0,6-3,0	15 mg	Água da chuva; 10 mL	(YAZDANPANA H M, NOJAVAN S, 2019)
SBSE-DLLME-SFO	HPLC-UV	>60 min	F, FI, Pir, BaP	PDMS	-	6,7 - 10	24 μL	Água; 100mL	(SHAMSIPUR; HASHEMI, 2015)
SPME	GC-FID	60 min	Na, Ace, Ac, F, Fen, A, FI, Pir, BbF, BaP, IP	AgNO ₃	-	0,7-14	5 mL	Água; 5 mL	(GUTIÉRREZ-SERPA et al., 2018)
HF-MMLLE	HPLC-DAD		Na, Ace, Ac, F, Fen, A, FI, Pir, BbF, BaP, IP	Ácido dodecanoico: Ácido hexanoico 1:3	10-50	4,5-15,2	29 μL	Água da chuva; 1,5 mL	Presente trabalho

ELLME: Microextração líquido-líquido de emulsificação. MSPE: Extração magnética em fase sólida. M- μ -SPE: Extração em fase micro-sólida magnética. SBSE-DLLME-SFO: Extração por sorção de barra de agitação combinada com microextração líquido-líquido dispersiva baseada na solidificação de gota orgânica flutuante. SPME: Microextração em fase sólida. USA-DLLME: Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom. USAEME: Microextração de emulsificação assistida por ultra-som. Fonte: Autoria própria (2022).

6 CONCLUSÃO

A abordagem utilizada neste trabalho empregando como solvente DES como fase extratora numa técnica baseada no uso da membrana apresentou resultados satisfatórios em quantificar os HPAs propostos. A metodologia realizada foi otimizada, validada e aplicada em amostras de água da chuva com sucesso, mostrando como os DES são excelentes substitutos para os solventes normalmente utilizados quando combinados com as técnicas de microextração. A possibilidade de acoplar a técnica de membrana com o *sistema 96-well plate* proporciona a vantagem de realizar até 96 extrações simultaneamente, reduzindo o tempo de preparo da amostra. O tempo total de execução é baixo, cerca de 1 min para cada amostra, o que o torna rápido, portanto, com uma boa frequência analítica. Além disso, o procedimento utiliza baixos volumes de amostra e solvente. A quantidade de solvente orgânico utilizado é de apenas 300 µL na etapa de dessorção, tornando o custo benefício do método adequado e gerando uma pequena quantidade de resíduos. A abordagem desenvolvida é uma boa alternativa para a extração dos onze compostos estudados, empregando o uso de uma técnica de membrana rápida, de fácil execução, além de apresentar boa frequência analítica e valores satisfatórios de LOD. Pontos importantes para o desenvolvimento de um método que atenda aos princípios da Química Analítica Verde. Como possíveis estudos futuros, poderia ser a aplicação em diferentes compostos e matrizes.

7 REFERÊNCIAS

ABBOTT, A.P.; CAPPER, G.; DAVIES, D.L.; MUNRO, H.L.; RASHEED, R.K. & TAMBYRAJAH, V. "Preparation of novel, moisture-stable, Lewisacidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains". **Chemical Communications**, 19: 2, 2001.

ABBOTT, A.P.; CAPPER, G.; DAVIES, D.L.; RASHEED, R.K. & TAMBYRAJAH, V. "Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures". **Chemical Communications**: 2, 2003.

ABBOTT, Andrew P.; CAPPER, Glen; GRAY, Stephen. Design of Improved Deep Eutectic Solvents Using Hole Theory. **Chemphyschem**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 803-806, 4 abr. 2006.

ABBOTT, Andrew P.; BARRON, John C.; RYDER, Karl S.; WILSON, David. Eutectic-Based Ionic Liquids with Metal-Containing Anions and Cations. **Chemistry - A European Journal**, [S.L.], v. 13, n. 22, p. 6495-6501, 27 jul. 2007

AKVAN, Nadia; AZIMI, Gholamhasan; PARASTAR, Hadi. Chemometric assisted determination of 16 PAHs in water samples by ultrasonic assisted emulsification microextraction followed by fast high-performance liquid chromatography with diode array detector. **Microchemical Journal**, [S.L.], v. 150, p. 104056, nov. 2019

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis: Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC International: Mayland, 2016.

ARTHUR CL, PAWLISZYN J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry** 1990; 62(19):2145-2148

ASENSIO-RAMOS M, RAVELO-PÉREZ LM, GONZÁLEZCURBELO MA, HERNÁNDEZ-BORGES J. Liquid phase microextraction applications in food analysis. **Journal of Chromatography A** 2011; 1218(42):7415- 7437.

BERIRO, D. J., CAVE, M. R., MARK, R., WRAGG, J., THOMAS, R., WILLS, G., EVANS, F. A review of the current state of the art of physiologically-based tests for measuring human dermal in vitro bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 305, p. 240–259, 2016

BREITKREITZ, Márcia Cristina; SOUZA, André Marcelo de; POPPI, Ronei Jesus. A didactic chemometrics experiment for design of experiments (DOE): evaluation of experimental conditions in the spectrophotometric determination of iron ii witho-phenanthroline. a tutorial, part iii. **Química Nova**, [S.L.], v. 37, n. 3, p. 564-573, jan. 2014.

BRITO, E.M.S.; VIEIRA; E.D.R.; TORRES, J.P.M. & MALM, O. 2005. Persistent organic pollutants in two reservoirs along the Paraíba do sul-Guandu river system, Rio de Janeiro, Brazil, **Química Nova**, 28(6): 941-942

BURATO, Juliana Soares da Silva; MEDINA, Deyber Arley Vargas; TOFFOLI, Ana Lúcia; MACIEL, Edvaldo Vasconcelos Soares; LANÇAS, Fernando Mauro. Recent

advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. **Journal Of Separation Science**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 202-225, 23 dez. 2019.

CAMPOS, Camila D. M.; CAMPOS, Richard P. S. de; SILVA, José A. Fracassi da; JESUS, Dosil P.; ORLANDO, Ricardo M.. SAMPLE PREPARATION ASSISTED BY ELECTRIC FIELDS: fundamentals, advances, applications, and trends. **Química Nova**, Campinas, p. 1093-1106, jun. 2015.

CHOI, Young Hae; VAN SPRONSEN, Jaap; DAI, Yuntao; VERBERNE, Marianne; HOLLMANN, Frank; ARENDS, Isabel W.C.e.; WITKAMP, Geert-Jan; VERPOORTE, Robert. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? **Plant Physiology**, [S.L.], v. 156, n. 4, p. 1701-1705, 1 ago. 2011.

Conde FJ, Ayala JH, Afonso AM, González V. Optimization of a sampling method to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke from incomplete biomass combustion. **Anal Chim Acta** 2004; 524:287-94

CUNHA, Sara C.; FERNANDES, José O.. Extraction techniques with deep eutectic solvents. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 105, p. 225-239, ago. 2018

DAI, Y. **Natural Deep Eutectic Solvents and their application in natural product research and development**. 2013. 193f. Tese – Universiteit Leiden. 2013.

DAI, Yuntao; VAN SPRONSEN, Jaap; WITKAMP, Geert-Jan; VERPOORTE, Robert; CHOI, Young Hae. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 766, p. 61-68, mar. 2013.

DICKHUT, Rebecca M.; GUSTAFSON, Kurt E.. Atmospheric Washout of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Southern Chesapeake Bay Region. **Environ. Sci. Technol**, Virginia, v. 29, n. 6, p. 1518-1525, jan. 1996.

ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY - EPA 1986. Quality criteria for water 1986. EPA 440/5-86-001. **US Environmental Protection Agency**, Washington, DC.

ESRAFILI, A.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. **Analytica Chimica Acta**, v. 604, n. 2, p. 127- 133, 2007

European Commission. Health and Consumer Protection Directorate-General. Polycyclic aromatic hydrocarbons – Occurrence in foods, dietary exposure and health effects. SCF/CS/CNTM/PAH/29 ADD1 Final. Brussels, 2002.

FARAJZADEH, Mir Ali; MOGADDAM, Mohammad Reza Afshar; AGHANASSAB, Mahdi. Deep eutectic solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction. **Analytical Methods**, [S.L.], v. 8, n. 12, p. 2576-2583, 2016.

FAROOQ, Muhammad Qamar; ABBASI, Nabeel Mujtaba; ANDERSON, Jared L.. Deep eutectic solvents in separations: methods of preparation, polarity, and applications in extractions and capillary electrochromatography. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1633, p. 461613, dez. 2020

FONTANALS, Núria; BARRI, Thaer; BERGSTRÖM, Staffan; JÖNSSON, Jan-Åke. Determination of polybrominated diphenyl ethers at trace levels in environmental waters using hollow-fiber microporous membrane liquid–liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1133, n. 1-2, p. 41-48, nov. 2006

FLORINDO, Catarina; BRANCO, Luís C.; MARRUCHO, Isabel M.. Quest for Green-Solvent Design: from hydrophilic to hydrophobic (deep) eutectic solvents. **Chemsuschem**, [S.L.], v. 12, n. 8, p. 1549-1559, 8 abr. 2019.

FLORINDO, C.; OLIVEIRA, F.S.; REBELO, L.P.N.; FERNANDES, A.M.; MARRUCHO, I.M.J.A.S.C. & ENGINEERING "Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids". **ACS Sustainable Chem. Eng.**, 2: 10, 2014.

GARCÍA, Aránzazu; RODRÍGUEZ-JUAN, Elisa; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, Guillermo; RIOS, José Julian; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, Juan. Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESS). **Food Chemistry**, [S.L.], v. 197, p. 554-561, abr. 2016.

GE, Dandan; WANG, Ying; JIANG, Qian; DAI, Enrui. A Deep Eutectic Solvent as an Extraction Solvent to Separate and Preconcentrate Parabens in Water Samples Using in situ Liquid-Liquid Microextraction. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], p. 1203-1210, jan. 2019.

Godoi AF, Ravindra K, Godoi RHM, Andrade SJ, SantiagoSilva M, Vaeck LV, Grieken RV. Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning. **J Chromatogr A** 2004; 1027:49-53

GUTIÉRREZ-SERPA, Adrián; NAPOLITANO-TABARES, Patricia I.; PINO, Verónica; JIMÉNEZ-MORENO, Francisco; JIMÉNEZ-ABIZANDA, Ana I.. Silver nanoparticles supported onto a stainless steel wire for direct-immersion solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons prior to their determination by GC-FID. **Microchimica Acta**, [S.L.], v. 185, n. 7, p. 1-10, 26 jun. 2018.

HYDER, M., AGUILAR, L. L., GENBERG, J., SANDAHL, M., WESÉN, C., JÖNSSON, J. A. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from organic aerosols using hollow fiber micro – porous membrane liquid – liquid extraction (HF-MMLLE) followed by gas chromatography – mass spectrometry analysis. **Talanta**, v. 85, p. 919–926, 2011.

HAYYAN, M.; MJALLI, F. S.; HASHIM, M. A.; ALNASHEF, I. M. A novel technique for separating glycerine from palm oil-based biodiesel using ionic liquids. **Fuel Processing Technology**, 91, p. 116-120, 2010.

HUDDLESTON, Jonathan G.; WILLAUER, Heather D.; SWATLOSKI, Richard P.; VISSER, Ann E.; ROGERS, Robin D.. Room temperature ionic liquids as novel media for 'clean' liquid–liquid extraction. **Chem. Commun.**, [S.L.], n. 16, p. 1765-1766, 1998.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons,

2006b. [Acesso em 24/02/22]. Disponível em: http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/92_pahs.pdf.

JEANNOT, Michael A.; CANTWELL, Frederick F.. Solvent Microextraction into a Single Drop. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 68, n. 13, p. 2236-2240, 1 jul. 1996. American Chemical Society (ACS).

KHEZELI, Tahere; DANESHFAR, Ali; SAHRAEI, Reza. Emulsification liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent: an extraction method for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and seven polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1425, p. 25-33, dez. 2015.

KHEZELI, T.; DANESHFAR, A.. Dispersive micro-solid-phase extraction of dopamine, epinephrine and norepinephrine from biological samples based on green deep eutectic solvents and Fe₃O₄@MIL-100 (Fe) core-shell nanoparticles grafted with pyrocatechol. **Rsc Advances**, [S.L.], v. 5, n. 80, p. 65264-65273, 2015.

KIM, Ki-Hyun; JAHAN, Shamin Ara; KABIR, Ehsanul; BROWN, Richard J.C.. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. **Environment International**, [S.L.], v. 60, p. 71-80, out. 2013

KIRK, Othmer. Encyclopedia of Chemical Technology, 4th Ed., Vol. 10. *M. Howe-Grant* (Editor). John Wiley & Sons, New York 1993.

KOKOSA, John M.. Selecting an extraction solvent for a greener liquid phase microextraction (LPME) mode-based analytical method. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 118, p. 238-247, set. 2019.

Kolosa JM, Przyjazny A, Jeannot MA. Solvent Microextraction - Theory and Practice. New Jersey: Wiley ed; 2009.

LATIMER, J.S. & ZHENG, J. 2003. The sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment. In: PAHs: An ecotoxicological perspective. John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 0-471-56024-3. Pp 9-33 389

Lee J, Lee HK, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review. **Analytica Chimica Acta** 2008

LERON, R. B.; LI, M.H. High-pressure volumetric properties of choline-chloride-ethylene glycol based deep eutectic solvent and its mixtures with water. **Thermochimica Acta**, p. 54-60, 2012.

LI, Ke; JIN, Yan; JUNG, Dasom; PARK, Keunbae; KIM, Hireem; LEE, Jeongmi. In situ formation of thymol-based hydrophobic deep eutectic solvents: application to antibiotics analysis in surface water based on liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1614, p. 460730, mar. 2020.

LIDE, David R. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 86th ed., 2005. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, FL 2005, p.3 -224

LIU, Hanghui; DASGUPTA, Purnendu K.. Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 68, n. 11, p. 1817-1821, 1 jun. 1996. American Chemical Society (ACS).

LOPES, DANIELA; MERIB, JOSIAS ; CARASEK, EDUARDO . Hollow-fiber renewal liquid membrane extraction coupled with 96-well plate system as innovative high-throughput configuration for the determination of endocrine disrupting compounds by high-performance liquid chromatography-fluorescence and diode array detection. **ANALYTICA CHIMICA ACTA**, v. 1040, p. 33-40, 2018.

Lopes WA, Andrade JB. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. **Quim Nova**, 19(5):497-516, 1996.

MEIRE, Rodrigo Ornellas. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecol. Bras**, rio de janeiro, v. 2, n. 11, p. 188-201, jan. 2007.

MERIB, Josias; CARASEK, Eduardo. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 249-262, 2013.

NEFF, J.M. 1984. Bioaccumulation of organic micropollutants from sediments and suspended particulates by aquatic animals. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, 319: 132-136.

NETTO, A.D.P.; DIAS, J.C.M.; ARBILLA, G.; OLIVEIRA, L.F. & BAREK, J. 2000. Avaliação da contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e seus derivados nitratos: Uma revisão metodológica, **Química Nova**, 23(6): 765-773

OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (lpme): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Quim. Nova**. v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

PAIVA, Alexandre; CRAVEIRO, Rita; AROSO, Ivo; MARTINS, Marta; REIS, Rui L.; DUARTE, Ana Rita C.. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, [S.L.], v. 2, n. 5, p. 1063-1071, 26 mar. 2014.

Park SS, Kim YJ, Kang CH (2002) Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Seoul, Korea. **Atmos Environ** 36:2917–2924

NETTO, Annibal D. Pereira; MOREIRA, Josino C.; DIAS, Ana Elisa X. O.; ARBILLA, Graciela; FERREIRA, Luiz Filipe V.; OLIVEIRA, Anabela S.; BAREK, Jiri. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 765-773, dez. 2000.

PURCARO, G.; MORET, S.; CONTE, L. S. Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons : Occurrence , legislation and innovative determination in foods. **Talanta**, v. 105, p. 292–305, 2013

QI, Hong; LI, Wen-Long; ZHU, Ning-Zheng; MA, Wan-Li; LIU, Li-Yan; ZHANG, Feng; LI, Yi-Fan. Concentrations and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor

dust in China. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 491-492, p. 100-107, set. 2014.

QUEIROZ, Sonia C. N.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F.. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 68-76, fev. 2001.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 1-10, Jan 2004.

RENGARAJAN, T., RAJENDRAN, P., NANDAKUMAR, N., LOKESHKUMAR, B., RAJENDRAN, P., NISHIGAKI, I. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, p. 182– 189, 2015.

RIBANI, Marcelo; BOTTOLI, Carla Beatriz Grespan; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes; MELO, Lúcio Flávio Costa. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 771-780, out. 2004.

ROSE, N.L. & RIPPEY, B. 2002. The historical record of PAH, PCB, trace metal and fly-ash particle deposition at a remote lake in north-west Scotland. **Environmental pollution**, 117: 121-132.

SHAMSIPUR, Mojtaba; HASHEMI, Beshare. Extraction and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples using stir bar sorptive extraction (SBSE) combined with dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop (DLLME-SFO) followed by HPLC-UV. **Rsc Advances**, v. 5, n. 26, p.20339-20345, 2015.

SHISHOV, Andrey; BULATOV, Andrey; LOCATELLI, Marcello; CARRADORI, Simone; ANDRUCH, Vasil. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review. **Microchemical Journal**, [S.L.], v. 135, p. 33-38, nov. 2017.

SHISHOV, A.; POCHIVALOV, A.; NUGBIENYO, L.; ANDRUCH, V. & BULATOV, A.J.T.T.I.A.C. "Deep eutectic solvents are not only effective extractants". **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 129: 13, 2020.

SILVA, Patrícia Maria Freire da. **A quantidade e os tipos de HPAs formados dependem das condições específicas do processo e do tipo de combustível, sendo que processos mais eficientes emitem menores quantidades de HPAs**. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Química, Ufrn, Natal, 2010.

SILVERSTEIN, R.; BASSELER, G. & MORRIL, T., Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7 ed. 2006, LTC. p.

SIMÃO, VANESSA ; MERIB, JOSIAS ; DIAS, ADRIANA N. ; CARASEK, EDUARDO. Novel analytical procedure using a combination of hollow fiber supported liquid membrane and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of

afatoxins in soybean juice by high performance liquid chromatography - Fluorescence detector. **Food Chemistry**, v. 196, p. 292-300, 2016.

SMITH, Emma L.; ABBOTT, Andrew P.; RYDER, Karl S.. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 114, n. 21, p. 11060-11082, 10 out. 2014.

TANG, Baokun; BI, Wentao; ZHANG, Heng; ROW, Kyung Ho. Deep Eutectic Solvent-Based HS-SME Coupled with GC for the Analysis of Bioactive Terpenoids in *Chamaecyparis obtusa* Leaves. **Chromatographia**, [S.L.], v. 77, n. 3-4, p. 373-377, 28 nov. 2013.

TANG, W.; DAI, Y.; ROW, K.H.J.A. & CHEMISTRY, B. "Evaluation of fatty acid/alcohol-based hydrophobic deep eutectic solvents as media for extracting antibiotics from environmental water". **Analytical bioanalytical chemistry**, 410: 12, 2018.

TOBISZEWSKI, Marek; MECHLIŃSKA, Agata; NAMIEŚNIK, Jacek. Green analytical chemistry—theory and practice. **Chemical Society Reviews**, [S.L.], v. 39, n. 8, p. 2869, 2010. Royal Society of Chemistry (RSC).

TUZEN, Mustafa. Green and Deep Eutectic Solvent Microextraction Method for FAAS Determination of Trace Level Cadmium in Water Samples Using Multivariate Strategic Approach. **Atomic Spectroscopy**, [S.L.], v. 37, n. 6, p. 244-251, 25 dez. 2016.

VAN OSCH, D.J.; ZUBEIR, L.F.; VAN DEN BRUINHORST, A.; ROCHA, M.A. & KROON, M.C.J.G.C. "Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants". **Green Chemistry**, 17: 4, 2015.

WANG, Lijun; XU, Xue; LU, Xinwei. Composition, source and potential risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in vegetable soil from the suburbs of Xianyang City, Northwest China: a case study. **Environmental Earth Sciences**, [S.L.], v. 75, n. 1, p. 1-13, 21 dez. 2015

WANG, Juan; TIAN, Zhe; HUO, Yingbin; YANG, Min; ZHENG, Xingcan; ZHANG, Yu. Monitoring of 943 organic micropollutants in wastewater from municipal wastewater treatment plants with secondary and advanced treatment processes. **Journal Of Environmental Sciences**, [S.L.], v. 67, p. 309-317, maio 2018. .

WILEY, Ronald G. Harvey.. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Journal Of Chemical Education**. New York, p. 1-667. nov. 1998.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1983. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, chemical environmental and experimental data, 32. International Agency for Research on Cancer, **World Health Organization**. Pp 477

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for drinking-water quality. Surveillance and control of community supplies. **World Health Organization Geneva**. 2nd ed. Vol.3. Pp 123–152. 1997

YAZDANPANA, Mina; NOJAVAN, Saeed. Micro-solid phase extraction of some polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples using magnetic β -cyclodextrin-carbon nano-tube composite as a sorbent. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1585, p. 34-45, jan. 2019

YU, Jing; ZHU, Shukui; PANG, Liling; CHEN, Pin; ZHU, Gang-Tian. Porphyrin-based magnetic nanocomposites for efficient extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1540, p. 1-10, mar. 2018.

M, Zander. **Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**: physical and chemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. New York: Ed. A. Bjorseth, 1983. 26 p

ZHANG, Qinghua; VIGIER, Karine de Oliveira; ROYER, Sébastien; JÉRÔME, François. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. **Chemical Society Reviews**, [S.L.], v. 41, n. 21, p. 7108, 2012

ZHU, Lingyan; EE, Kim Huey; ZHAO, Limian; LEE, Hian Kee. Analysis of phenoxy herbicides in bovine milk by means of liquid-liquid-liquid microextraction with a hollow-fiber membrane. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 963, n. 1-2, p. 335-343, jul. 2002.

ZORITA, S., BARRI, T., MATHIASSEN, L. A novel hollow-fibre microporous membrane liquid – liquid extraction for determination of free 4-isobutylacetophenone concentration at ultra trace level in environmental aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, p. 30–37, 2007.

