



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

Amanda Vitória Santos

**USO DE SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO NATURAL COMO FASE
EXTRATORA ASSOCIADA À MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE
MEMBRANA MICROPOROSA DE FIBRA OCA PARA DETERMINAÇÃO DE
BIOMARCADORES DE CÂNCER DE PULMÃO EM URINA**

Florianópolis

2023

Amanda Vitória Santos

**USO DE SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO NATURAL COMO FASE
EXTRATORA ASSOCIADA À MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE
MEMBRANA MICROPOROSA DE FIBRA OCA PARA DETERMINAÇÃO DE
BIOMARCADORES DE CÂNCER DE PULMÃO EM URINA**

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

Orientador: Prof. Dr Eduardo Carasek da Rocha.
Coorientadora: Msc Camila Will.

Florianópolis

2023

Santos, Amanda Vitória

Uso de solvente eutético profundo natural como fase extratora associada à microextração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca para determinação de biomarcadores de câncer de pulmão em urina / Amanda Vitória Santos ; orientador, Eduardo Carasek, coorientadora, Camila Will, 2023.

75 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Química. 2. microextração líquido-líquido de membrana porosa de fibra oca. 3. solventes eutéticos profundos . 4. hexanal. 5. heptanal. I. Carasek, Eduardo. II. Will, Camila . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Amanda Vitória Santos

Uso de solvente eutético profundo natural como fase extratora associada à microextração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca para determinação de biomarcadores de câncer de pulmão em urina

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 28 de julho de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Adriana Neves Dias
Instituto Federal Catarinense (IFC)

Prof. Dr. Daniel Lazaro Gallindo Borges
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Eduardo Sidinei Chaves
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

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

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Dr Eduardo Carasek da Rocha
Orientador

Florianópolis, 2023.

“Nobody said it was easy
No one ever said it would be so hard.”
(Coldplay, 2002)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Débora e Carlos, pelo amor e apoio incondicional, sendo suporte emocional em todos os momentos difíceis e acreditando em mim quando eu mesma desacreditei. Estendo os agradecimentos a Letícia, Sandra, Francisco e Thiago. Ao Jorge, pelo apoio nos momentos difíceis, me lembrando o motivo de estar nessa trajetória. À toda a minha família, pelo amor e apoio. Amo vocês.

Ao meu orientador, Prof. Eduardo Carasek, pela orientação durante o mestrado e a oportunidade de crescimento e aprendizado durante esse período.

Aos meus amigos do laboratório CROMAAS, Camila, Cristian, Diogo, Francielle, Augusto, Morés, Gabriela Garcia, Gabrieli, Natália e Ricardo agradeço aos momentos de risadas e trocas de conhecimento, que fizeram total diferença nesse período. Aos amigos que fiz durante a graduação e se mantém presentes. A todos obrigada pela companhia durante toda trajetória, o caminho fica mais leve quando compartilhado.

A Camila, agradeço por todo suporte na realização desse trabalho, pela paciência e disponibilidade, por todos os ensinamentos e por sempre me lembrar de ter calma diante dos problemas enfrentados. Obrigada por ter tornado a experiência do mestrado menos estressante.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e a Universidade Federal de Santa Catarina pela estrutura e ensino gratuito. Aos professores por todo conhecimento que me foi passado

A CAPES pela bolsa de estudos que tornou possível a dedicação exclusiva ao mestrado.

RESUMO

Hexanal e heptanal são considerados biomarcadores de câncer de pulmão que podem ser encontrados em diferentes matrizes biológicas, tais como sangue e urina. Eles têm sua determinação em HPLC-DAD dificultada devido a sua volatilidade, baixa absorção na região UV, complexidade da matriz e as baixas concentrações em que são encontrados nas amostras. Neste trabalho desenvolveu uma metodologia para a determinação de hexanal e heptanal analitos em urina utilizando solventes eutéticos profundos naturais como fase extratora para microextração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE) acoplada a um sistema de placas de 96 poços de amostragem. A membrana de polipropileno (PP) foi utilizada com 1 cm de comprimento submetida a impregnação em 300 μL de DES seguida pelo processo de extração em 1,5 mL de amostra de urina. Os experimentos foram realizados acoplando a técnica de HF-MMLLE ao sistema de placas de 96 poços de amostragem que permite a realização de até 96 extrações simultâneas. As otimizações de parâmetros importantes para extração e dessorção foram realizadas através de planejamentos uni e multivariados. O solvente extrator que apresentou melhores respostas foi a mistura eutética de ácido dodecanóico e ácido hexanóico (1:3). O estudo do modo de derivatização apresentou melhores eficiências de extração quando a reação de derivatização foi realizada após o processo de extração. O solvente de dessorção otimizado foi uma mistura de 50% metanol e 50% acetonitrila (v/v), sendo que o tempo de dessorção ótimo foi de 5 minutos. Um planejamento fatorial completo mostrou que apenas o tempo de derivatização não foi significativo para o processo de extração e então este foi fixado em 30 minutos, já para o tempo de extração, pH e quantidade de derivatizante foi realizado um estudo através de um planejamento box behnken que mostrou melhores resultados quando o pH da amostra foi mantido em 6, a quantidade de derivatizante em proporção 1:30 (aldeído:derivatizante) e extrações de 60 minutos. Os parâmetros analíticos de mérito para a metodologia foram determinados avaliando uma faixa linear de 100 a 800 (ng mL^{-1}), apresentando coeficientes de determinação (R^2) de 0,9973 para o hexanal e 0,9935 para o heptanal. Os LODs obtidos foram de 0,3 e 0,26 nmol mL^{-1} para hexanal e heptanal respectivamente, e os LOQs de 1,00 nmol mL^{-1} para hexanal e 0,87 nmol mL^{-1} para heptanal, valores adequados para auxílio no diagnóstico de câncer de pulmão. Ensaio de precisão intradia e interdia foram realizados nas concentrações de 100, 400 e 800 ng mL^{-1} que variaram de 9 a 20% e de 17 a 20%, respectivamente. A exatidão do método foi avaliada pela recuperação relativa em concentrações de 100 e 500 ng mL^{-1} e apresentou resultados variando de 55,2 a 97,3%. A metodologia foi aplicada em amostras de urina de 3 voluntários nas quais as respostas apresentaram abaixo do limite de detecção do método. O estudo realizado neste trabalho é pioneiro na utilização de solventes eutéticos profundos naturais (NADES) como solvente extrator para técnica de HF-MMLLE na determinação de hexanal e heptanal em urina humana, mostrando vantagens relacionadas a alta frequência analítica do método proporcionada pelo tempo de preparo de amostra de 1,09 minutos por amostra, aliado a substituição de solventes orgânicos normalmente utilizados na técnica por um solvente verde atendendo a parâmetros da química analítica verde.

Palavras-chave: hexanal; heptanal; microextração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca; solventes eutéticos profundos.

ABSTRACT

Hexanal and heptanal are considered lung cancer biomarkers that can be found in different biological matrices, such as blood and urine. Their analysis is difficult due to their volatility, low absorption in the UV region, complexity of the matrix and the low concentrations at which they are found in the samples. This work developed a methodology for the determination of hexanal and heptanal in urine using natural deep eutectic solvents as an extractor phase for liquid-liquid microextraction of hollow fiber microporous membrane (HF-MMLLE) coupled to a 96-well system. A 1 cm polypropylene (PP) membrane was used, subjected to impregnation in 300 μL of DES followed by the extraction process in 1.5 mL of urine sample. The experiments were carried out coupling the HF-MMLLE technique to the 96-well plate system that allows the simultaneous extraction of up to 96 samples. Optimizations of important parameters for extraction and desorption were carried out through univariate and multivariate designs. The extractor solvent that showed the best responses was the eutectic mixture of dodecanoic acid and hexanoic acid (1:3). For the derivatization mode it was selected as optimum condition the derivatization performed after the extraction process. The optimized desorption solvent was a mixture of 50% methanol and 50% acetonitrile (v/v), and the optimal desorption time was 5 minutes. A full factorial design showed that only the derivatization time was not significant for the extraction process and so this was fixed at 30 minutes, as for the extraction time, pH and amount of derivatizer, a study was carried out through a box behnken planning which showed better results when the pH of the sample was maintained at 6, the amount of derivatizing agent in a proportion of 1:30 (aldehyde:derivatizing) and extractions of 60 minutes. The analytical parameters of merit for the methodology were determined by evaluating a linear range from 100 to 800 ng mL^{-1} , with coefficients of determination (R^2) of 0.9973 for hexanal and 0.9935 for heptanal. The LODs obtained were 0.3 and 0.26 nmol mL^{-1} for hexanal and heptanal respectively, and the LOQs of 1.00 nmol mL^{-1} for hexanal and 0.87 nmol mL^{-1} for heptanal, adequate values to aid in the diagnosis of cancer lung. Intraday and interday precision tests were performed at concentrations of 100, 400 and 800 ng mL^{-1} , which ranged from 9 to 20% and from 17 to 20%, respectively. The accuracy of the method was evaluated by the relative recovery at concentrations of 100 and 500 ng mL^{-1} , with results ranging from 55.2 to 97.3%. The methodology was applied to urine samples from 3 volunteers in which none of the analytes were detected. The study carried out in this work is a pioneer in the use of natural deep eutectic solvents (NADES) as extractor solvent for the HF-MMLLE technique in the determination of hexanal and heptanal in human urine, showing advantages related to the high analytical frequency of the method provided by the sample preparation time of 1.09 minutes per sample, combined with the replacement of organic solvents normally used in the technique by a green solvent, meeting the parameters of green analytical chemistry.

Keywords: hexanal; heptanal; hollow fiber-membrane microporous liquid-liquid microextraction; deep eutectic solvent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de derivatização de aldeídos com DNPH.	20
Figura 2. Ilustração das configurações da HF-LPME.....	25
Figura 3. Ilustração da técnica de HF-MMLLE.....	27
Figura 4: Ilustração da redução do ponto de fusão na formação do DES. ..	31
Figura 5. HBA e HBD para obtenção de DES.....	32
Figura 6. Componentes de DES hidrofóbicos.	33
Figura 7: Esquema de preparo das membranas de polipropileno.	39
Figura 8: Procedimento experimental otimizado.....	41
Figura 9: Separação cromatográfica dos analitos a 1 mg L ⁻¹ (azul) em 360 nm.	47
Figura 10: Resultados obtidos para a otimização do solvente eutético profundo como fase extratora.....	48
Figura 11: Fórmulas estruturais dos componentes do DES e dos analitos, hexanal e heptanal.	50
Figura 12: Membranas de PP antes da impregnação e após a impregnação do DES.....	50
Figura 13: Infravermelho do ácido hexanóico, ácido dodecanóico e a mistura eutética entre eles.	52
Figura 14: Resultados de otimização do modo de derivatização.....	53
Figura 15: Moléculas de aldeídos após reação de derivatização com DNPH.	53
Figura 16: Superfície de resposta obtida para a otimização do solvente de dessorção.....	55
Figura 17: Resultados da otimização do tempo de dessorção.	56
Figura 18: Respostas obtidas através do planejamento fatorial completo 2 ⁴	58
Figura 19: Superfície de resposta para otimização de tempo de extração e quantidade de derivatizante.	59
Figura 20: Superfície de resposta para otimização de pH e quantidade de derivatizante.....	60
Figura 21: Superfície de resposta para otimização de pH e tempo de extração.	60

Figura 22. Cromatogramas dos extratos derivatizados utilizando o método desenvolvido, em 360 nm. Amostra fortificada 100 nmol mL⁻¹ (A); Amostra 1 (B); Amostra 2 (C); Amostra 3 (D).....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Faixas de concentração de hexanal e heptanal em indivíduos saudáveis e com câncer de pulmão.	19
Tabela 2. Propriedades físico-químicas do hexanal e heptanal.	19
Tabela 3. Estudos de determinação de hexanal e heptanal em amostras biológicas.	21
Tabela 4. Estudos utilizando a técnica de HF-MMLLE.	28
Tabela 5: Aplicação dos solventes eutéticos profundos em preparo de amostra.	35
Tabela 6. Solventes eutéticos profundos estudados.	40
Tabela 7. Planejamento simplex Lattice para otimização de solvente de dessorção.	43
Tabela 8. Planejamento fatorial completo para estudo dos parâmetros de extração.	44
Tabela 9: Planejamento box-behnken para pH, tempo de extração e quantidade de derivatizante.	45
Tabela 10: Resultados obtidos pela análise de variância para hexanal (ANOVA).	49
Tabela 11: Resultados obtidos pela análise de variância para heptanal (ANOVA).	49
Tabela 12: Análise de variância para estudos do tempo de dessorção para o analito hexanal.	56
Tabela 13: Análise de variância para estudos de tempo de dessorção para o analito heptanal.	57
Tabela 14. Limites de detecção e quantificação, faixa linear de trabalho, coeficiente de determinação e equação da reta dos analitos estudados, hexanal e heptanal.	62
Tabela 15. Resultados de ensaios de precisão intradia e interdia.	62
Tabela 16. Resultados de ensaios de recuperação relativa.	63
Tabela 17: Tabela comparativa de métodos de análise de hexanal e heptanal em urina.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACN acetonitrila
- Ac.Et acetato de etila
- ANOVA Análise de variância
- AOAC Associação oficial dos químicos analíticos
- BA μ E Microextração em barra adsortiva
- CZE-AD: Eletroforese de zona capilar com detecção amperométrica.
- DES solvente eutético profundo
- DSC análise de calorimetria exploratória diferencial
- DLLME microextração líquido-líquido dispersiva
- DNPH 2,4-dinitrofenilhidrazina
- DODECA:HEX ácido dodecanóico: ácido hexanóico
- EME extração por eletromembrana
- FT-IR infravermelho com transformada de Fourier
- GC-FID cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama.
- GC-MS cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas
- GC-NPD cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo.
- HBA aceptor de ligação de hidrogênio
- HBD doador de ligação de hidrogênio
- HF-LPME microextração em fase líquida de fibra oca
- HF-MMLLE microextração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca
- HFRLM extração por membrana líquida de renovação de fibra oca
- HPLC-DAD cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por arranjo de diodos.
- HPLC-FLD cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência
- HPLC-UV cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta
- HOESY RMN espectroscopia de overhauser heteronuclear
- LC-MS cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas
- LLE extração líquido-líquido
- LOD limite de detecção
- LOQ limite de quantificação

MeOH metanol

M-HS-AME microextração adsortiva de headspace magnético

MSPE extração em fase sólida magnética

NADES solvents eutéticos profundos naturais

NOESY RMN espectroscopia de overhauser nuclear de hidrogênio

PFBHA O-2,3,4,5,6-(pentafluorobenzil) hidroxilamina

PMME: microextração de monólitos poliméricos

PP polipropileno

SDME microextração em gota única

SLM membrana líquida suportada

SPE Extração em fase sólida

SPME microextração em fase sólida

TGA análise termogravimétrica

TFME microextração em filme fino

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	HEXANAL E HEPTANAL COMO BIOMARCADORES DE CÂNCER DE PULMÃO.....	18
2.2	PREPARO DE AMOSTRAS	21
2.2.1	Microextração em fase líquida de fibra oca (HF-LPME). 23	
2.2.2	Microextração líquido-líquido em membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE). 26	
2.3	SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES).....	29
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4	METODOLOGIA	38
4.1	MATERIAIS E REAGENTES	38
4.2	INSTRUMENTAÇÃO	38
4.3	PREPARO DA MEMBRANA DE POLIPROPILENO E DO SOLVENTE EXTRATOR.....	39
4.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL OTIMIZADO.	40
4.5	OTIMIZAÇÕES DA TÉCNICA HF-MMLLE	41
4.5.1	Otimização do solvente extrator (DES).....	41
4.5.2	Otimização do modo de derivatização.....	42
4.5.3	Otimização do solvente e tempo de dessorção.....	43
4.5.4	Otimização dos parâmetros de extração.....	44
4.6	PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO.....	45
4.7	APLICAÇÃO EM AMOSTRA	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1	SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA.....	46
5.2	OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO EXTRATOR	47
5.3	OTIMIZAÇÃO DO MODO DE DERIVATIZAÇÃO.....	52
5.4	OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE DE DESSORÇÃO.....	54
5.5	OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE DESSORÇÃO	55

5.6	PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO.....	57
5.7	PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN	59
5.8	PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO.....	61
5.9	COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM METODOLOGIAS REPORTADAS NA LITERATURA PARA ANÁLISE DE HEXANAL E HEPTANAL EM AMOSTRAS DE URINA.....	64
6	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

Em estágios iniciais, muitos casos de câncer de pulmão não apresentam sintomas, ou estes podem ser confundidos com outras doenças. O diagnóstico tardio pode reduzir as chances de recuperação da doença e por isso o câncer de pulmão é o mais mortal em todo o mundo.

Biomarcadores são moléculas que indicam um processo biológico normal ou patogênico e por isso são importantes para triagem, diagnóstico e prognóstico de tumores. Hexanal e heptanal são aldeídos considerados biomarcadores de câncer de pulmão, porém sua determinação em HPLC-DAD é dificultada devido a sua volatilidade, baixa absorção na região do ultravioleta e necessidade de uma reação de derivatização para realização de análises cromatográficas. Além disso, eles são determinados como biomarcadores de câncer de pulmão em matrizes de alta complexidade, como urina, saliva e sangue, e sua concentração nessas matrizes pode ser baixa, sendo necessário o uso de preparo de amostras para determinação desses biomarcadores.

Mesmo após diversos avanços em instrumentação analítica uma etapa de preparo de amostras é necessária para análise de matrizes complexas. Esse procedimento torna possível análises de compostos em baixa concentração e encontrados em matrizes com diversos interferentes como é o caso de amostras biológicas. A escolha da técnica de preparo de amostras é crucial para o sucesso do procedimento analítico, e está relacionada as propriedades do analito e da matriz.

Agências internacionais recomendam como metodologias oficiais técnicas clássicas como extração em fase sólida (SPE) e extração líquido-líquido (LLE). Porém, essas técnicas apresentam limitações relacionadas ao grande volume de solventes e conseqüentemente de resíduos produzidos, alto custo, riscos ao meio ambiente e ao analista, além disso, são técnicas bastante laboriosas e que envolvem diversas etapas que podem aumentar a possibilidade de erros.

A fim de contornar estes problemas surgiram as técnicas de microextração iniciando com a microextração em fase sólida (SPME) em 1990, e desde então essas técnicas têm ganhado destaque em laboratórios de análises. Elas podem reduzir o tempo de preparo de amostras, aumentar frequência analítica das análises, simplificar os procedimentos, além de tornar as análises mais verdes através da redução do volume de solventes e de amostra.

Técnicas de microextração utilizando membranas foram inseridas através da microextração em fase líquida de fibra oca (HF-LPME). Aprimoramentos da HF-LPME levaram ao desenvolvimento da microextração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE) que é uma técnica simples e precisa, onde o solvente é imobilizado nos poros da membrana microporosa e este age como a fase extratora da técnica. A técnica de HF-MMLLE torna possível seu acoplamento ao sistema de 96 poços de extração, onde é possível realizar 96 extrações simultâneas e aumentar significativamente a frequência analítica da técnica. Esta técnica permite o uso de diferentes solventes como fase extratora o que faz com que sua escolha seja uma etapa crucial e o estudo de suas propriedades como densidade, viscosidade, ponto de fusão, solubilidade em água e compatibilidade com a instrumentação analítica é de extrema importância. Inicialmente solventes orgânicos tradicionais como o 1-octanol, clorofórmio e tolueno foram utilizados nesta técnica, porém recentemente alternativas como os solventes eutéticos profundos (DES) vêm sendo explorados com sucesso.

Solventes orgânicos tradicionais estão relacionados a problemas de saúde humana e danos ao meio ambiente. Seguindo os princípios da química verde alguns solventes alternativos têm ganhado destaque para técnicas de microextração a fim de tornar a técnica mais segura e ambientalmente amigável, como os líquidos iônicos e os DES.

Os DES são considerados misturas de componentes que interagem através de ligações de hidrogênio, sendo que um dos seus componentes se comporta como o receptor de ligação de hidrogênio (HBA) e o outro como doador de ligação de hidrogênio (HBD). Em determinadas razões molares essas interações de hidrogênio são capazes de causar uma redução no ponto de fusão da mistura ideal desses compostos. O uso de componentes naturais como açúcares e ácidos orgânicos para a mistura eutética forma os solventes eutéticos profundos naturais (NADES). A variedade de combinações possíveis para formação de solventes eutéticos torna possível a modulação das propriedades físico-químicas de acordo com o interesse de aplicação dos DES, como é o caso da miscibilidade do DES em água.

O presente estudo apresenta o uso de solventes eutéticos profundos naturais como fase extratora para a técnica de microextração líquido-líquido de membrana porosa de fibra oca acoplada ao sistema de 96 poços de extração como alternativa para a determinação de biomarcadores de câncer de pulmão em urina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hexanal e heptanal como biomarcadores de câncer de pulmão

O câncer com maior mortalidade em todo mundo é o de pulmão. Este tem seus casos relacionados ao fumo ativo e passivo, histórico de doenças pulmonares, poluição do ar e histórico familiar de câncer. Nos estágios iniciais pode não existir sintomas e quando apresentados podem passar despercebidos, como tosse, fadiga, alteração no apetite e distúrbios do sono (HU *et al.*, 2023). Estes fatores podem levar a um diagnóstico tardio e assim perdendo o melhor momento para o tratamento, já que a intervenção precoce reduz significativamente as taxas de mortalidade (HUANG *et al.*, 2022; MHANDU; MCGONIGLE, 2023). Atualmente o diagnóstico de câncer de pulmão é realizado através de exames como a tomografia computadorizada, raio-X ressonância magnética, tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET-TC) seguido por uma biópsia com a retirada de parte do tecido a ser analisado (CACKOWSKI *et al.*, 2023; PFIZER, 2019).

Atualmente, estudos relacionam alguns compostos como biomarcadores de câncer de pulmão, a fim de acelerar e simplificar o diagnóstico. Institutos Nacionais de Saúde definem biomarcadores como “característica medida e avaliada como indicador de processos biológicos normais ou patogênicos e respostas farmacológicas de uma intervenção terapêutica”. (SEIJO *et al.*, 2019). Estas moléculas são de extrema importância para triagem, diagnóstico e prognóstico de tumores a fim de auxiliar no tratamento precoce. Hexanal e heptanal, por exemplo, podem ser metabolizados e secretados por tecidos tumorais e vêm sendo relacionados a casos de câncer de pulmão (HUANG *et al.*, 2022).

Aldeídos, como o hexanal e o heptanal, são substâncias orgânicas geradas a partir de reações desencadeadas por radicais livres com lipídios celulares, os quais são formados por conta do metabolismo. Estas moléculas orgânicas possuem uma cadeia carbônica pequena, terminada em um centro carbonílico (OENNING *et al.*, 2017). Altas concentrações desses aldeídos resultam em um grande estresse oxidativo (YAZDANPANA *et al.*, 1997). Um estudo relacionou a presença de 22 compostos orgânicos voláteis, presentes na respiração, a pacientes com câncer de pulmão, dentre eles o hexanal. Através de uma análise discriminante previu-se com êxito 71,7% dos pacientes com câncer de pulmão (DENG; ZHANG; LI, 2004; PHILLIPS *et al.*, 1999). Outros estudos realizados mostram maiores concentrações

de hexanal e heptanal em pacientes que apresentaram câncer de pulmão comparado a pacientes saudáveis, conforme mostrado na tabela 1 (LI *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2007).

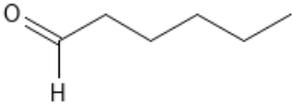
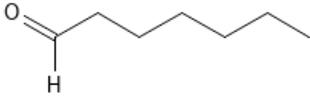
Tabela 1. Faixas de concentração de hexanal e heptanal em urina de indivíduos saudáveis e com câncer de pulmão.

Aldeído	Faixa de concentração em pacientes saudáveis (nmol mL ⁻¹)	Faixa de concentração em pacientes com câncer de pulmão (nmol mL ⁻¹)
Hexanal	0,12 -0,97	0,99-6,70
Heptanal	0,09-1,30	2,50-6,40

Fonte: Oenning, 2017.

Estudos envolvendo aldeídos são dificultados devido a sua alta volatilidade e baixa absorção na região do ultravioleta, necessitando assim de uma reação de derivatização prévia a análise em HPLC-DAD(XU *et al.*, 2011). As propriedades físico-químicas dos analitos utilizados neste trabalho são listadas na tabela 2.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do hexanal e heptanal.

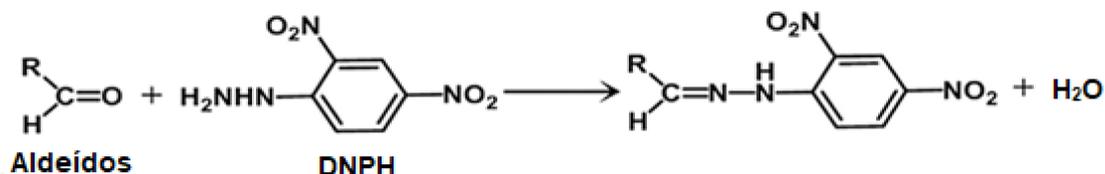
Analito	Fórmula Estrutural	Log P	Ponto de Ebulição (°C)	Solubilidade (mg mL ⁻¹)
Hexanal		1,8	129,6	5,64
Heptanal		2,3	307	1,00

Fonte: PubChem (2023). (PUBCHEM, [s.d.]

As reações de derivatização do hexanal e heptanal para análise cromatográfica, são geralmente realizadas utilizando cloridrato de O-2,3,4,5,6-(pentafluorobenzil) hidroxilamina (PFBHA) e 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O DNPH é o reagente mais utilizado quando os produtos da reação são analisados por cromatografia líquida com detecção na região do UV-Visível, devido a presença de grupos cromóforos no produto da reação de derivatização. O derivatizante possui um

grupo hidrazina (-NH-NH₂), onde a amina reage com o carbono carbonílico presente no aldeído e ocorre a formação de 2,4-DNPhidrazonas (LILI *et al.*, 2010). A figura 1 mostra a reação de derivatização entre os aldeídos e o derivatizante utilizado, DNPH.

Figura 1. Reação de derivatização de aldeídos com DNPH.



Fonte: Adaptado de Oenning *et al.* (2017)

O uso do derivatizante DNPH acarreta na formação de estereoisômeros (*E,Z*) da 2,4-DNPhidrazonas, causados pela ligação dupla entre carbono e nitrogênio. A isomerização é catalisada por um próton ácido, além de sofrer influência da radiação UV, e o fenômeno pode ser observado pela alteração do ponto de fusão e deslocamento nos comprimentos de onda máximos dos analitos. Para contornar essa problemática é utilizado um agente redutor que transforme a ligação dupla entre carbono e nitrogênio em uma ligação simples. Alguns agentes redutores foram desenvolvidos para essa finalidade, como cianoborohidreto de sódio (NaBH₃CN), borohidreto de zinco/sílica gel (Zn(BH₄)₂/SiO₂) e piridina-borano (Pir-BH₃). No entanto, estudos presentes na literatura relatam que ajustes na fase móvel podem minimizar ou eliminar erros analíticos causados pela presença destes isômeros ao coeluir os dois picos cromatográficos gerados pelos isômeros (MORÉS, 2022; OENNING *et al.*, 2017; UCHIYAMA; INABA; KUNUGITA, 2011).

Este trabalho propõe a não utilização de mais um reagente no decorrer do preparo de amostras, tendo como base a funcionalidade do método sem o uso de agente redutor observado em outros trabalhos. Dessa forma, atendendo a conceitos da química analítica verde onde fatores como redução do uso de reagentes e produção de resíduos devem ser levados em conta no desenvolvimento de um método, além de não adicionar mais uma etapa no preparo de amostras que pode aumentar erros analíticos (KAYA; CETINKAYA; OZKAN, 2022; MORÉS, 2022; OENNING *et al.*, 2017).

Mesmo que os produtos da reação de derivatização sejam analisados por técnicas cromatográficas acopladas a detectores sensíveis, as análises enfrentam

problemáticas referente a concentração dos analitos na amostra, além da complexidade da mesma e, a fim de solucionar isto, procedimentos de preparo de amostras, são necessários (XU *et al.*, 2010). Hexanal e heptanal podem ser encontrados em matrizes biológicas como urina, sangue, saliva, plasma e ar exalado. As determinações destes analitos ocorrem utilizando variadas técnicas de preparo de amostras como por exemplo microextração em fase sólida (SPME), microextração em fase sólida em headspace (HS-SPME), microextração adsortiva de headspace magnético (M-HS-AME), e microextração em barra adsortiva (BA μ E) e análises em instrumentos analíticos como HPLC e GC, conforme mostrado na tabela 3.

Tabela 3. Estudos de determinação de hexanal e heptanal em amostras biológicas.

Amostra	Técnica de preparo de amostras	Instrumentação	Reagente de derivatização	Referência
Urina	MSPE-ISD	HPLC-UV	DNPH	(LIU; YUAN; FENG, 2015)
Plasma	PMME	HPLC-DAD	DNPH	(ZHANG <i>et al.</i> , 2007)
Ar exalado	SPME	GC-MS	PFBHA	(POLI <i>et al.</i> , 2010)
Saliva	M-HS-AME	GC-MS	-	(AZORÍN <i>et al.</i> , 2023)
Sangue	HS-SPME	GC-MS	PFBHA	(DENG; LI; ZHANG, 2004)
Ar exalado	SPME	GC-FID	-	(YU <i>et al.</i> , 2018)
Urina	BA μ E	HPLC-DAD	DNPH	(OENNING <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: Autoria própria.

2.2 Preparo de amostras

No caso de matrizes complexas com compostos de diferentes propriedades, como é o caso de amostras biológicas pode-se conter uma variação grande de interferentes. Além disso, essas matrizes muitas vezes não são adequadas a análise

direta em instrumentações analíticas. Esses fatores são somados as baixas concentrações em que os compostos de interesse são encontrados fazendo com que uma etapa de preparo de amostras seja necessária. A adição de mais uma etapa no procedimento analítico pode resultar no aumento da quantidade de produtos químicos utilizados e na produção de resíduos. O grande objetivo de estudos sobre preparo de amostras é atingir um patamar onde as análises possam ocorrer de forma rápida, sensível, seletiva para diversas matrizes sem abrir mão de técnicas mais verdes. (KAYA; CETINKAYA; OZKAN, 2023).

Em análises cromatográficas, as técnicas tradicionais de preparo de amostras como extração em fase sólida (SPE) e extração líquido-líquido (LLE), são frequentemente encontradas como metodologias oficiais em agências internacionais. Essas técnicas iniciam-se por um procedimento de extração através da sorção seletiva dos analitos utilizando um material extrator, seguida da dessorção, que pode ser térmica, diretamente no cromatógrafo, ou líquida, fazendo uso de solventes (AUGUSTO *et al.*, 2010).

O uso da técnica de SPE, onde a fase extratora está em sua forma sólida, possui vantagens, como bons resultados de reprodutibilidade e recuperações, utilizando um método simples e que pode ser aplicável a diferentes matrizes. No entanto, estudos atribuem a SPE desvantagens como várias etapas com demanda de tempo, uso de grande volume de solventes tóxicos tanto para o analista quanto ao meio ambiente, além de um alto custo para a aplicação (CARASEK; MORÉS; HUELSMANN, 2022). Nos casos em que a fase extratora é um líquido, a técnica é conhecida como LLE e possui ampla aplicabilidade, porém os fatores de pré-concentração obtidos são limitados devido as razões de volume de solvente extrator e de amostra serem limitadas, além de apresentar problemas na formação de emulsão e separação de fases levando a grandes tempos de preparo e também o uso de grande volume de solvente que resulta em elevadas quantidades de resíduos orgânicos (CARASEK *et al.*, 2018; PENA-PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2010).

Sistemas miniaturizados, como as técnicas de microextração têm se mostrado uma tendência no preparo de amostras, pois são altamente eficientes para extração de pesticidas, drogas e biomarcadores. A miniaturização de técnicas de preparo de amostra pode reduzir tempo de análise, reduzir o volume de amostra e de solvente, tornando a técnica mais verde (TABIBPOUR *et al.*, 2020). Pawliszyn introduziu as técnicas de microextração através da microextração em fase sólida (SPME) em 1990,

abrindo caminho para o desenvolvimento de outras técnicas de microextração, como a microextração em fase líquida (LPME) (CARASEK; MORÉS; HUELSMANN, 2022).

As técnicas de LPME fazem uso de pequenos volumes de solventes orgânicos, como fase extratora, e de amostras (CUNHA; FERNANDES, 2018). A LPME surgiu para contornar problemas encontrados na extração líquido-líquido e pode ser utilizada de diversos modos como microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), microextração em gota única (SDME) e a microextração em fase líquida de fibra oca (HF-LPME) a qual será discutida na seção seguinte (KANU, 2021).

2.2.1 Microextração em fase líquida de fibra oca (HF-LPME).

A HF-LPME foi apresentada em 1999, com a denominação de microextração líquido-líquido-líquido para análises de metanfetamina em urina e plasma. A membrana líquida suportada (SLM) foi composta por 1-octanol impregnado nos poros de uma membrana. A fase doadora, a amostra, foi ajustada para pH's maiores. Já a fase receptora, contida dentro do lúmen da membrana, foi ajustada para pH's menores (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 1999). Após a inserção do uso de membranas como técnica de preparo de amostras, observou-se grande aplicabilidade destas em amostras complexas ou com moléculas que possam interferir na eficiência da extração (CARASEK; MERIB, 2015).

A microextração líquido-líquido-líquido posteriormente passou a ser denominada como microextração em fase líquida de fibra oca (HF-LPME). Nesta técnica ocorre a formação da membrana líquida suportada nos poros da membrana hidrofóbica, onde acontecerá o processo de extração dos analitos seguido pela migração destes para uma fase receptora presente no interior da membrana (CARASEK; MERIB, 2015).

Essa técnica possui duas configurações utilizadas tradicionalmente, que diferem pelo número de fases presentes, de duas fases (HF(2)-LPME) e três fases (HF(3)-LPME). A membrana mais utilizada para a realização da técnica é constituída de polipropileno, e por isso possui características hidrofóbicas (CARASEK; MERIB, 2015).

Na HF(3)-LPME, ilustrada na figura 2 (A) os analitos migram da fase doadora, que é a amostra, para uma fase receptora, que se encontra no lúmen da membrana, passando por uma fase orgânica suportada nos poros da membrana, que é

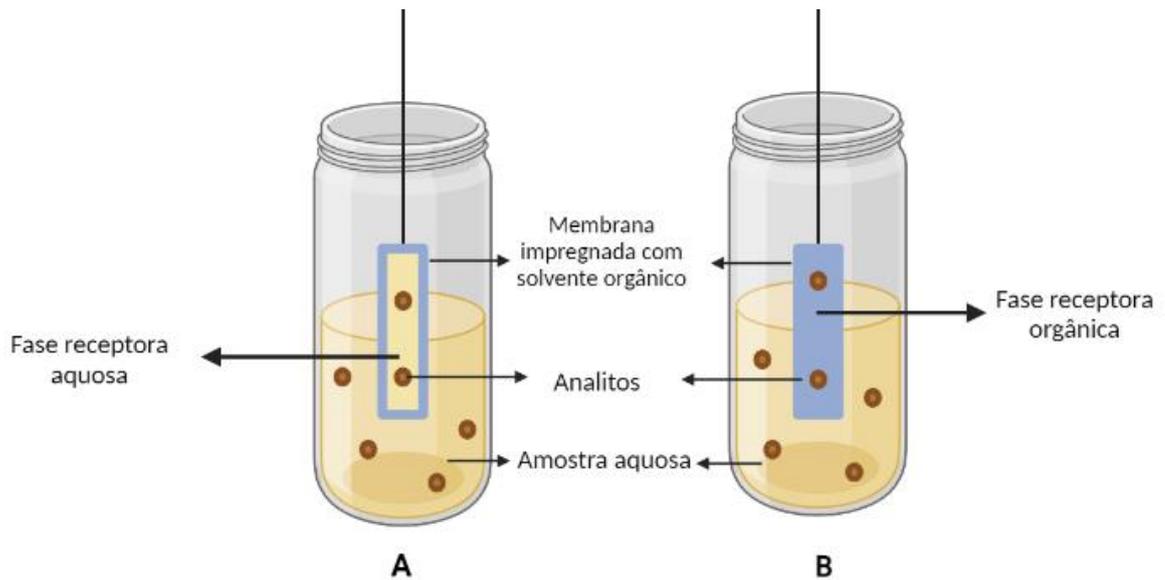
denominada membrana líquida suportada (SLM, do inglês supported liquid membrane) e pode ser criada quando a membrana é mergulhada no solvente orgânico hidrofóbico como n-octanol ou tolueno. Com a SLM já formada, o ajuste de pH das fases doadora e receptora garante a transferência dos analitos entre as fases. A fibra oca é preenchida com uma fase receptora aquosa onde o pH mantém os analitos em sua forma ionizada, garantindo que estes não retornem para a fase doadora. Já a fase doadora possui um pH onde os analitos estão em sua forma neutra para facilitar a interação com a SLM formada por um solvente orgânico, e assim obtêm-se o sistema com 3 fases. A extração é baseada na relação de equilíbrio das concentrações dos analitos entre as fases e pode ser demonstrado na equação 1 (CARASEK; MERIB, 2015; HERCE-SESA; LÓPEZ-LÓPEZ; MORENO, 2021).

$$[analitos]_{amostra} \rightleftharpoons [analitos]_{fase\ orgânica} \rightleftharpoons [analitos]_{fase\ receptora} \quad (\text{Eq 1})$$

Na configuração da HF(2)-LPME de duas fases, ilustrada pela figura 2 (B), após o solvente impregnar na fibra oca, um pedaço desta fibra é suportada por uma seringa que contém o mesmo solvente dos poros da fibra e então o sistema é colocado em contato com a amostra e os analitos, onde ocorrerá a extração. O solvente orgânico (fase orgânica receptora) presente tanto nos poros da membrana como no lúmen é responsável pela extração. A relação de equilíbrio estabelecida na HF(2)-LPME entre os analitos na amostra e na fase extratora orgânica é representada na equação 2 (CARASEK; MERIB, 2015).

$$[analitos]_{amostra} \leftrightarrow [analitos]_{fase\ orgânica} \quad (\text{Eq 2})$$

Figura 2. Ilustração das configurações da HF-LPME.



Fonte: Autoria própria.

O uso de membranas de polipropileno é feito devido às suas características, como a alta porosidade e sua hidrofobicidade, fatores importantes para garantir uma interação forte com o solvente, o suficiente para que este mantenha-se suportado na membrana durante o processo de preparo de amostras. Além da escolha da membrana, alguns fatores são de importante avaliação para obtenção de bons resultados nessa técnica (CARASEK; MERIB, 2015).

A fase extratora é um parâmetro de extrema importância para as técnicas de microextração, sendo que neste caso trata-se de um líquido, algumas características dele devem ser levadas em consideração para sua escolha, como a seletividade, eficiência de extração, dissolução de gotas do líquido na amostra, evaporação, toxicidade e compatibilidade com a técnica analítica que será utilizada. Para uma escolha adequada é necessário ter conhecimento das propriedades tanto da fase extratora quanto dos analitos a serem extraídos. Devido ao tempo necessário para que ocorra a transferência de massa dos analitos da amostra para fase extratora, o tempo de extração é outro parâmetro que deve ser estudado em LPME, mesmo que maiores sensibilidades e reprodutibilidades sejam atingidas quando existe a condição de equilíbrio, na LPME não é necessário o completo equilíbrio para uma análise precisa, sendo isto uma grande vantagem da técnica (OLASUPO; SUA, 2022).

Outros parâmetros como temperatura, ajuste de pH e força iônica também podem ser avaliados para observar suas influências nas extrações. Em alguns casos

o uso da temperatura da amostra pode aumentar o coeficiente de difusão dos analitos e diminuir o tempo para que o equilíbrio seja atingido, porém a temperatura afeta a viscosidade da amostra e a solubilidade do solvente extrator na amostra podendo levar a degradação da SLM. O pH pode estar diretamente relacionado com a eficiência de extração visto que se relaciona com a solubilidade dos analitos ácidos ou básicos. No sistema de HF(2)-LPME o ajuste de pH da amostra é responsável por manter os analitos em suas formas neutras a fim de facilitar a interação com o solvente orgânico. Em analitos ácidos o pH deve ser mantido em 1,5 abaixo do pKa, já para analitos básicos 1,5 acima do pKa, a fim de assegurar que os analitos estejam neutros. Já para os sistemas de três fases, HF(3)-LPME o pH da fase receptora presente dentro do lúmen da membrana é mantido de forma que garanta a ionização dos analitos, evitando que esses retornem para amostra e por isso a extração de compostos ácidos é realizada em uma fase receptora básica enquanto que para compostos básicos a fase receptora é ácida (CARASEK; MERIB, 2015).

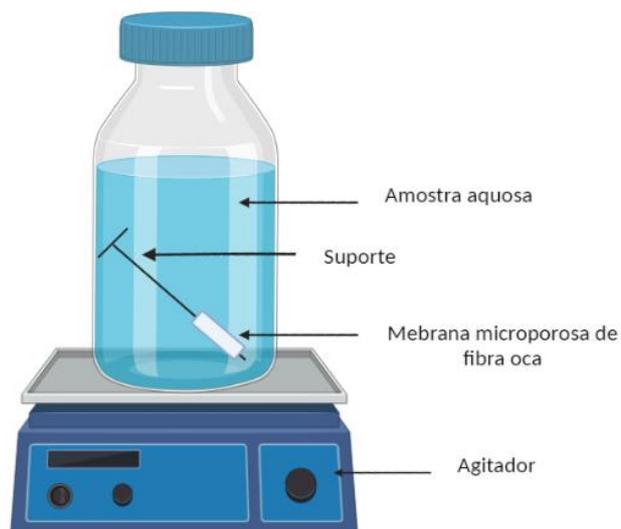
O ajuste da força iônica pode levar a melhora de resultados de extração dependendo do analito de interesse. O aumento da força iônica pode promover o efeito *salting-out*, em que a solubilidade dos analitos na amostra é reduzida na presença de sal e assim facilitando a migração destes para a fase extratora, nestes casos pode-se observar melhoras nos resultados da extração. Porém a avaliação do uso ou não deste parâmetro é necessário, visto que em alguns casos ele é um parâmetro insignificante ou limitador para eficiência de extração (CARASEK; MERIB, 2015).

Algumas variações da HF-LPME já foram desenvolvidas, como a extração por membrana líquida de renovação de fibra oca (HFRLM), onde é adicionado o solvente extrator na amostra para que ocorra a renovação do líquido presente na membrana durante a extração. Avanços na de HF-LPME já são encontrados como a técnica microextração em fase sólida protegida por membrana (MP-SPME), a extração por eletromembrana (EME) e a microextração líquido-líquido em membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE) sendo esta explorada pelo presente estudo. (CARASEK; MERIB, 2015).

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

A partir do crescente interesse no uso de membranas Zorita, Barri e Mathiasson propuseram uma nova configuração para o uso de membrana como fase extratora que foi denominada como microextração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE). Esta técnica ofereceu uma extração simples e precisa, onde o solvente orgânico é imobilizado apenas nos poros da membrana como fase receptora. Neste estudo inicial, a HF-MMLLE foi utilizada para determinar um produto de degradação tóxico em amostras ambientais empregando um GC-MS. Para o preparo das membranas, foram utilizadas membranas de 1 cm, limpas em acetona em ultrassom, e após secas foram inseridas por completo em um suporte e posteriormente impregnadas com o solvente extrator, em seguida foram submetidas a extração (ZORITA; BARRI; MATHIASSON, 2007). A figura 3 ilustra a configuração da extração realizada no primeiro estudo utilizando HF-MMLLE.

Figura 3. Ilustração da técnica de HF-MMLLE.



Fonte: Adaptado de Zorita, Barri e Mathiasson (2007).

O uso do solvente orgânico como fase extratora faz com que esse tenha grande destaque na técnica, sendo a sua escolha um fator determinante para o sucesso da extração. As propriedades do solvente como densidade, coeficiente de partição 1-octanol/água (K_{ow}), tensão superficial, viscosidade, ponto de fusão e ebulição, solubilidade em água, compatibilidade com o instrumento analítico e a interação com os analitos e a membrana, além de questões econômicas e ambientais são fatores importantes para sua seleção. Os solventes comumente utilizados nesta técnica são 1-octanol, clorofórmio e tolueno (KOKOSA, 2019; MORELLI *et al.*, 2020a).

Procedimentos de HF-MMLLE são de fácil aplicação, baixo custo, alta eficiência de extração e utilizam um pequeno volume de solventes, usualmente microlitros (OENNING *et al.*, 2017). Com o surgimento do sistema de placas de 96 poços de amostragem, é possível acoplar a técnica de HF-MMLLE para aumentar a frequência analítica do método, devido a possibilidade de se realizar 96 amostras simultaneamente (LOPES *et al.*, 2022).

Técnicas com membrana, como a HF-MMLLE possuem diversas vantagens como a extração de diversos analitos em matrizes complexas. Em decorrência disso, crescentes estudos têm sido realizados explorando a técnica em diversas matrizes e analitos. Estudos reportados na tabela 4 mostram a ampla aplicabilidade desta técnica, visto que ela pode ser aplicada a uma ampla classe de analitos em diversas amostras incluindo em matrizes complexas, como biológicas, alimentícias e ambientais. A técnica introduzida por Zorita *et al.* (2007) mostra sua potencialidade através dos estudos já realizados que confirmam a eficiência de extração. Porém, estudos ainda são necessários para que toda a potencialidade da técnica seja conhecida, visto que está possui uma grande versatilidade, devido a possibilidade do uso de diversos solventes, amostras e analitos.

Tabela 4. Estudos utilizando a técnica de HF-MMLLE.

Analitos	Amostra	Solvente extrator	Instrumentação	Referência
Disruptores endócrinos	Urina	1-octanol	HPLC-DAD	(PIERRI <i>et al.</i> , 2022)
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	Aerossóis	n-undecano	GC-MS	(HYDER <i>et al.</i> , 2011)
Hormônios	Urina	1-octanol	HPLC-FLD	(LOPES <i>et al.</i> , 2022)
Pesticidas	Suco de laranja	Tolueno: Acetato de etila	LC-MS/MS	(BEDENDO; JARDIM; CARASEK, 2012)
Hormônios esteróis	Água de torneira e esgoto	di-n-hexileter	GC-MS	(ZORITA; HALLGREN;

Contaminantes emergentes	Água	Timol:Cânfora	HPLC-DAD	MATHIASSEN , 2008) (MORELLI et al., 2020a) (GARCÍA-LÓPEZ; RODRÍGUEZ; CELA, 2008) (PEREIRA-COELHO et al., 2021)
Ésteres organofosforados	Água	1-Octanol	GC-NPD	
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	Extratos lixiviados	Pd-NPs	GC-MS	

Fonte: Autoria própria (2023).

A fim de atender a parâmetros da química analítica verde, novos solventes têm sido desenvolvidos e estudados em técnicas de preparo de amostras, sendo um deles os solventes eutéticos profundos (DES). Morelli *et al* (2020), utiliza um DES obtido a partir da mistura de timol e cânfora para extração de 11 contaminantes emergentes em amostras de água, assim mostrando a compatibilidade dos DES com a técnica. acoplada ao sistema semi-automático de 96 poços de extração (MORELLI *et al.*, 2020).

2.3 Solventes eutéticos profundos (DES)

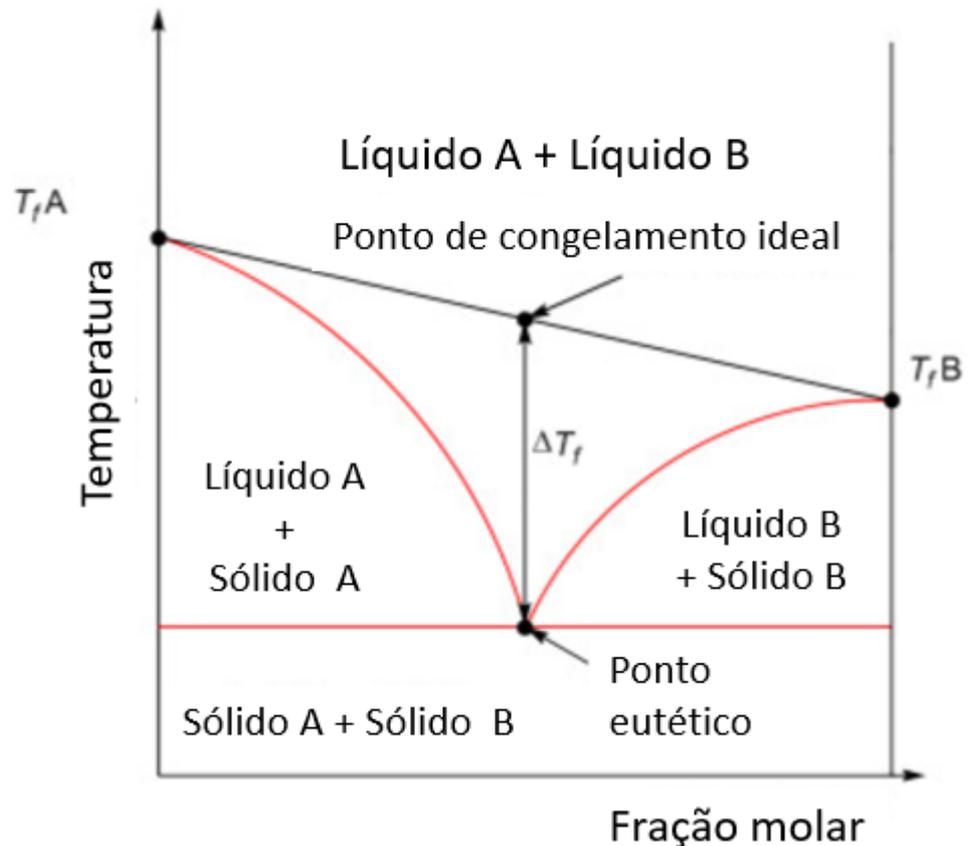
Já tem sido relatados estudos que relacionam os solventes orgânicos voláteis com riscos à saúde (MASIH *et al.*, 2017). Muitos solventes orgânicos tradicionais estão relacionados a casos de câncer, problemas no sistema nervoso central e reprodutor, mutações genéticas e danos ambientais. Álcoois como isopropanol, etilenoglicol e metanol possuem toxicidade devido a formação e acúmulo de ácido fórmico gerado pelo metabolismo do álcool, podendo levar a problemas de visão. Já solventes orgânicos como benzeno e tolueno são tóxicos ao sistema nervoso central. Esses solventes, quando não tratados de forma adequada, causam graves danos ao meio ambiente. E por conta disso esforços têm sido realizados para substituição desses solventes por solventes verdes que ofereçam um menor risco ao analista e ao meio ambiente (JOARDER *et al.*, 2023).

Com o crescimento do interesse pela química verde e seus princípios, solventes alternativos têm ganhado destaque, como os líquidos iônicos, os solventes eutéticos profundos e solventes eutéticos profundos naturais. Os líquidos iônicos, que foram desenvolvidos com o intuito de atender como solventes verdes, passaram a apresentar problemas como acúmulo na natureza e biomagnificação. Estudos de toxicidade dos líquidos iônicos disponíveis na literatura, relatam caráter tóxico para diversas linhagens celulares (JOARDER *et al.*, 2023).

Os solventes eutéticos profundos foram introduzidos por Abbott *et al.* em 2001, como uma alternativa sustentável para os solventes tradicionais. Abbott e colaboradores misturaram cloreto de colina e ureia em baixas temperaturas e obtiveram uma mistura transparente e de temperatura de fusão baixa (ABBOTT *et al.*, 2001; DELLA POSTA *et al.*, 2022; HU *et al.*, 2023). Essa mistura de compostos quando realizada em uma proporção molecular específica leva a uma depressão na temperatura de fusão de uma mistura ideal. Esse fenômeno é frequentemente atribuído a ligações de hidrogênio entre os componentes da mistura e interações de Van der Waals, onde ocorre uma deslocalização de carga entre o ânion chamado de receptor de ligação de hidrogênio (HBA) e o doador de ligação de hidrogênio (HBD), aliados a efeitos estéricos e contribuições iônicas (ESPINO *et al.*, 2016; MARTÍNEZ; TOWNLEY; MARTÍNEZ-ESPINOSA, 2022).

A Figura 4 ilustra a redução do ponto de fusão observada na formação do DES, esse fenômeno está relacionado com a força das ligações de hidrogênio, maiores interações resultam em uma maior redução do ponto de fusão, que é contrabalanceado por um enfraquecimento de outras interações. Outros efeitos podem estar relacionados com a formação dos DES, como efeitos estéricos e iônicos. Abbott consolidou essa afirmação através de estudos de espectroscopia de overhauser heteronuclear (HOESY RMN) e infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) em DES de ureia e fluoreto de colina e cloreto de colina e glicerol, onde é possível observar respostas de viscosidade e condutividade características de uma rede intermolecular de ligações de hidrogênio (ABBOTT *et al.*, 2003; S. HAMMOND; T. BOWRON; J. EDLER, 2016). Já Dai *et al.* mostra através de espectroscopia de overhauser nuclear de hidrogênio (NOESY RMN) e FT-IR a formação de ligações de hidrogênio em misturas eutéticas em NADES compostos de álcoois e ácidos carboxílicos (DAI *et al.*, 2015; MARTÍNEZ; TOWNLEY; MARTÍNEZ-ESPINOSA, 2022).

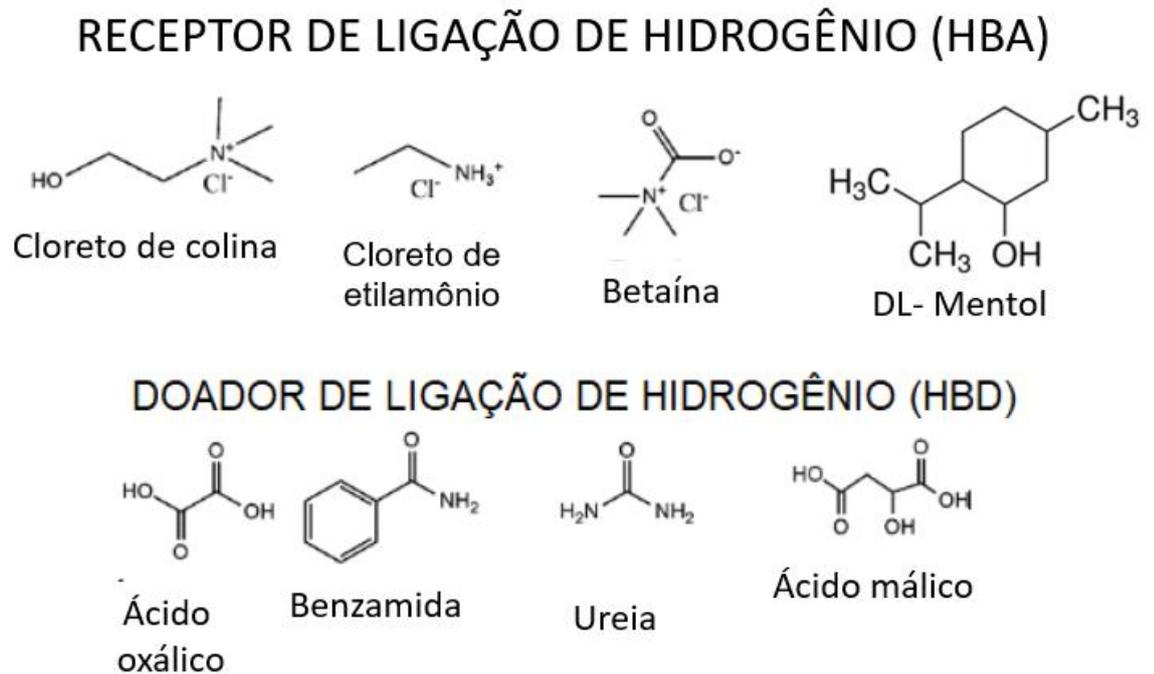
Figura 4: Ilustração da redução do ponto de fusão na formação do DES.



Fonte: Martinez et al, 2022.

Algumas características dos DES têm feito com que esses solventes sejam uma alternativa atraente para os solventes orgânicos. Os DES são considerados ambientalmente amigáveis devido às suas características como biodegradabilidade e o uso de compostos naturais para sua obtenção, que resultam em uma menor toxicidade desse solvente. Esses fatores associados a um baixo custo e simplicidade na sua produção, torna-os solventes atrativos na substituição de solventes orgânicos tradicionais. Além disso, os DES podem possuir diferentes polaridades, baixa volatilidade e pressão de vapor, estabilidade térmica e química, que são atrativos para escolha desse solvente (BASHIR *et al.*, 2023). A sua diversidade se dá pelo número de combinações possíveis entre HBA e HBD (10^6), atingindo assim uma ampla aplicabilidade já que suas propriedades alteram de acordo com os componentes participantes das ligações de hidrogênio, a razão molar entre eles, polaridade, temperatura e teor de água (SILVA *et al.*, 2019). Alguns compostos comumente utilizados para obtenção de solventes eutéticos profundos são apresentados na figura 5.

Figura 5. HBA e HBD para obtenção de DES.



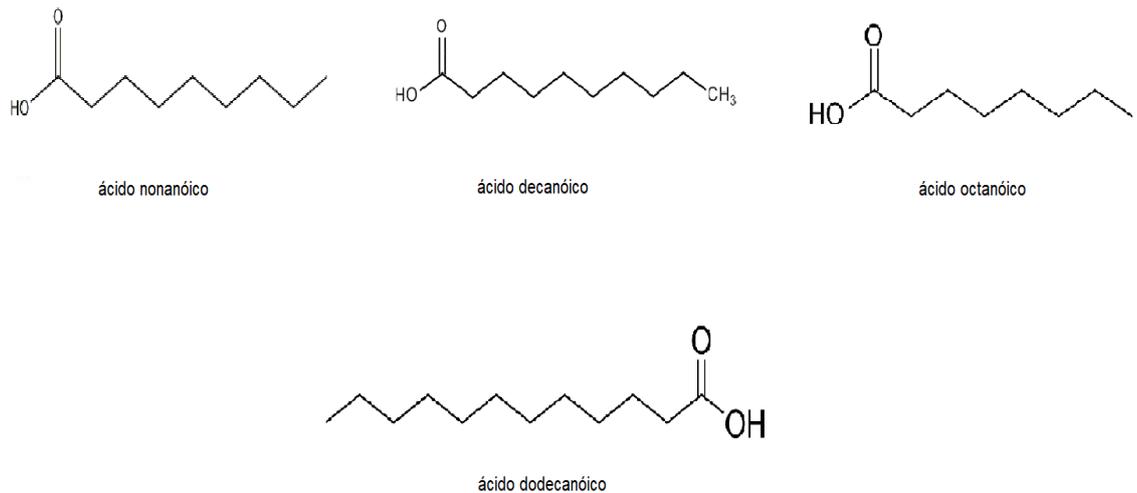
Fonte: Autoria própria.

Compostos de origem natural como aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, álcoois e aminas que são metabólitos primários, podem ser usados na produção dos DES, que neste caso são conhecidos como solventes eutéticos profundos naturais (NADES). Esses metabólitos encontrados normalmente em células estão envolvidos em processos biológicos e acredita-se que atuam como um meio líquido polar nas células (PRABHUNE; DEY, 2023; USMANI *et al.*, 2023). O preparo dos NADES se dá pela mistura dos componentes citados acima, que pode ser realizada a partir de uma mistura de soluções aquosas concentradas de cada um dos componentes ou a partir da mistura dos componentes sólidos aquecida a temperatura determinada (PAIVA *et al.*, 2014).

Uma importante propriedade dos DES é sua miscibilidade em água. Os primeiros DES estudados apresentavam características hidrofílicas devido à forte ligação de hidrogênio entre HBA e HBD. Porém, a alta hidrofiliabilidade limitava suas aplicações visto que não podiam ser utilizados em sistemas aquosos (TANG; AN; ROW, 2021). A instabilidade dos DES hidrofílicos em água resultava na perda do solvente durante o processo de extração devido a sua solubilidade na amostra (OSCH *et al.*, 2015).

Ácidos graxos de cadeias longas podem atuar tanto como HBA quanto HBD. A combinação de ácidos octanóico, nonanóico e decanóico com ácido dodecanóico em diferentes razões molares é capaz de formar DES hidrofóbicos estáveis quimicamente (CAO; SU, 2021). A figura 6 ilustra as fórmulas estruturais desses ácidos participantes das misturas eutéticas hidrofóbicas.

Figura 6. Componentes de DES hidrofóbicos.



Fonte: Autoria própria.

Tendo em vista todos os benefícios oferecidos pelo uso dos DES como sua flexibilidade de aplicação visto a possibilidade de obter diversas características pela alteração de um dos seus componentes, esse solvente tem despertado o interesse em diversas áreas de aplicação. Porém ainda existe espaço para pesquisadores explorarem as potencialidades deles (SULTHAN; REGHUNADHAN; SAMBHUDEVAN, 2023).

Uma área onde os DES têm sido explorados é como solvente extrator para técnicas de microextração. A tabela 5 traz algumas aplicações dos solventes eutéticos profundos como fase extratora em técnicas de extração como LLE, DLLME e poucos estudos deste solvente em técnicas que utilizam membrana como a HF-MMLLE, mostrando a necessidade de exploração dessas técnicas. Em sua maioria, a literatura descreve técnicas de microextração não automatizadas como a DLLME, que podem acarretar em erros devido a manipulação humana e em uma menor frequência analítica do método.

Além disso, na tabela 5 é possível observar a aplicabilidade deste solvente em diversas matrizes, sendo elas alimentícias como leite, molho de pimenta e suco de frutas, ambientais como água, biológicas como plasma, urina e sangue, e farmacêuticas. A compatibilidade destes solventes com diversas instrumentações analíticas como HPLC e GC aumenta a aplicabilidade deste solvente. O uso de DES hidrofóbicos ainda é pouco explorado quando comparado a trabalhos com DES hidrofílicos, por isso estudos envolvendo DES hidrofóbicos são importantes para conhecer suas aplicabilidades e aumentar a versatilidade desses solventes.

A atratividade do DES aumenta quando existe a possibilidade do uso da técnica de microextração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca acoplada ao sistema de 96 poços, onde é possível realizar 96 extrações simultâneas e assim aumentar significativamente a frequência analítica.

Tabela 5: Aplicação dos solventes eutéticos profundos em preparo de amostra.

Analitos	Amostra	Método de preparo de amostra	Solvente eutético extrator	Instrumentação analítica	Referência
Contaminantes emergentes	Água	HF-MMLLE	Cloreto de colina: timol	HPLC-DAD	(MORELLI <i>et al.</i> , 2020a)
Procainamida	Saliva	LLE	Cloreto de colina: Glicerol	HPLC-UV	(NUGBIENYO <i>et al.</i> , 2017)
Ácido carboxílico	Água	USA-DLLME	Cloreto de colina: 4-Metilfenol	GC-MS	(MAKOŚ <i>et al.</i> , 2018)
Compostos fenólicos	Água	GA-LLME	Ácido octanóico: ácido nonanóico: ácido dodecanóico	HPLC-UV	(YANG <i>et al.</i> , 2019)
Cetoprofeno e diclofenaco	Fígado	EA-DLLME	Mentol: ácido fórmico	HPLC-MS/MS	(SHISHOV <i>et al.</i> , 2020)
Antibióticos	Água	LLME	Timol: ácido nonanóico	HPLC-FLD	(POCHIVALOV <i>et al.</i> , 2023)
Fluoroquinolinas	Leite, mel e água	SO-DLLME	N ₈₈₈₁ -Br: ácido decanóico	MECC	(YU <i>et al.</i> , 2020)
BTEX	Água	SPME	N ₈₈₈₁ -Cl: 4-hidroxibenzoato	GC-FID	(LI <i>et al.</i> , 2020)

Analitos	Amostra	Método de preparo de amostra	Solvente eutético extrator	Instrumentação analítica	Referência
Procainamida	Saliva	LLE	Cloreto de colina: Glicerol	HPLC-UV	(NUGBIENYO <i>et al.</i> , 2017)
Paracetamol	Ureia sintética e amostras farmacêuticas	AS-LPME	Betaina: ácido oxálico	UV-VIS	(DOĞAN; ELIK; ALTUNAY, 2020)
β-Caroteno e Licopeno	Suco de frutas	LLME	Ácido nonanóico: ácido decanóico: ácido undecanóico	HPLC-UV	(LI <i>et al.</i> , 2019)
Antidepressivos	Plasma	AA-EME	Cloreto de colina: Fenol	HPLC-UV	(MOGHADAM; RAJABI; ASGHARI, 2018)
Corantes	Molho de pimenta	LLME	Mentol: ácido hexanóico	HPLC-DAD	(SHISHOV <i>et al.</i> , 2023)
Metadona	Urina e sangue	AAE-LLME	Cloreto de colina: TNO	GC-FID	(LAMEI; EZODDIN; ABDI, 2017)

Fonte: Autoria própria, (2023)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia analítica utilizando a HF-MMLLE acoplado ao sistema de 96 poços de extração para determinação de aldeídos biomarcadores de câncer de pulmão (hexanal e heptanal), em amostras de urina utilizando NADES como fase extratora.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar diferentes DES e sua aplicabilidade para a técnica de HF-MMLLE;
- b) Otimizar a separação cromatográfica do hexanal e heptanal em HPLC-DAD;
- c) Otimizar os parâmetros envolvidos na extração (solvente extrator, tempo de extração, forma de derivatização, quantidade de derivatizante e pH da amostra) e dessorção da HF-MMLLE (solvente e tempo de dessorção);
- d) Determinar os principais parâmetros analíticos de mérito como coeficiente de determinação (R^2), limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), faixa linear de trabalho, precisão intra e interdia e recuperação relativa;
- e) Aplicar a metodologia em amostras de urina para determinação de hexanal e heptanal.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os padrões analíticos de alto grau de pureza (>99%) de hexanal e heptanal, utilizados para o desenvolvimento do trabalho, foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Uma mistura dos analitos foi preparada na concentração de 100 mg L⁻¹ em metanol (MeOH) grau HPLC obtido da J.T. Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA), assim como acetonitrila (ACN) grau HPLC. A solução de derivatizante 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) preparada em ACN na concentração de 2 g L⁻¹ foi adquirida da Sigma Aldrich. Para o preparo dos DES testados foram adquiridos timol (≥98,5%), ácido butírico (≥99%), ácido decanóico (≥98%), ácido dodecanóico (GC, ≥99%), ácido hexanóico (GC, ≥98%), ácido levulínico (≥98) e ácido octanóico (≥99%). Soluções de ácido cítrico (0,0192 g mL⁻¹) e fosfato de sódio (0,0285g mL⁻¹) utilizadas para o preparo da solução tampão foram preparadas com sais obtidos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio, ambos 0,1 mol L⁻¹, foram utilizadas para ajuste de pH (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil). A membrana oca de polipropileno PP300/1200 Accurel® com 1,2 mm de diâmetro interno, 300 µm de espessura, 0,2 µm de tamanho do poro foi obtida da Membrane (Wuppertal, Germany).

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

Foi utilizado um cromatógrafo líquido modelo LC-20AT (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A, injeção manual modelo Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, EUA) e loop de injeção de 20 µL. A separação foi realizada em uma coluna Supelcosil C-18 (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm de tamanho da partícula) a um fluxo de 1mL min⁻¹. A fase móvel foi constituída de 88% de metanol (A) e 12% de água (B). Esta condição foi mantida durante os 10 minutos de corrida em modo isocrático. A detecção e quantificação dos analitos foi realizada em detector de arranjo de diodos (DAD) monitorados no comprimento de onda de 360 nm.

4.3 PREPARO DA MEMBRANA DE POLIPROPILENO E DO SOLVENTE EXTRATOR

Foi adaptado o procedimento descrito por MORELLI *et al.* (2020) para preparar as membranas de polipropileno utilizadas. Os tubos de polipropileno (PP) foram cortados com 1 cm de comprimento e, com o intuito de eliminar possíveis interferentes, foram lavados em ACN:MeOH (1:1) durante 10 minutos em banho ultrassônico e por fim secos em estufa. Para o processo de impregnação, os tubos foram inseridos no pente do sistema de 96 poços de extração conforme figura 7, garantindo que a membrana tenha seu interior totalmente ocupado pelo pente. As membranas são imersas em 300 μ L de DES para impregnação, e mantidas sob agitação por 10 minutos.

Figura 7: Esquema de preparo das membranas de polipropileno.



Fonte: Pierri (2022).

O preparo dos solventes eutéticos profundos hidrofóbicos foi realizado de acordo com Morelli (2023). As misturas foram realizadas com diferentes HBAs e HBDs em suas frações molares, conforme descrito na Tabela 6. A mistura foi mantida em aquecimento a 60°C durante 2 h sob agitação. Após a mistura retornar a temperatura ambiente, foi verificado se a mesma se mantinha de forma homogênea.

Tabela 6. Solventes eutéticos profundos estudados.

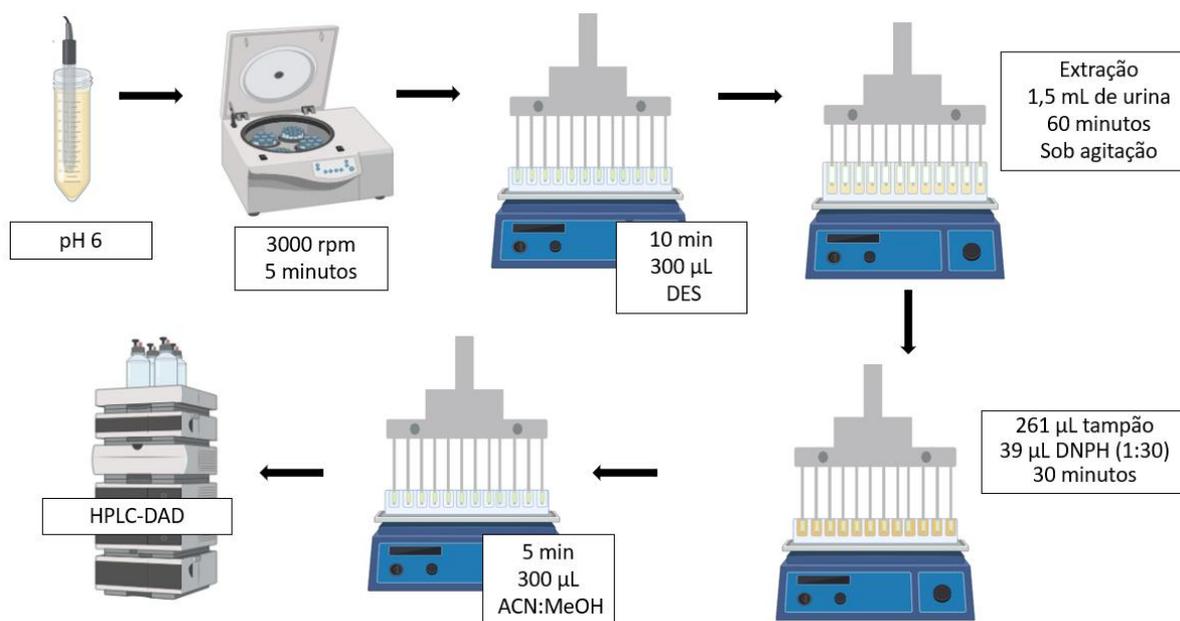
DES	HBA	HBD	Frações molares (HBA:HBD)
CAN:TY	Canfora	Timol	1:1
DODECA:BUT	Ácido Dodecanóico	Ácido Butírico	1:3
DODECA:HEX	Ácido Dodecanóico	Ácido Hexanóico	1:3
LEV:TY	Ácido Levulínico	Timol	1:1
DODECA:OCT	Ácido Dodecanóico	Ácido Octanóico	1:3

Fonte: Autoria própria (2023).

CAN – Cânfora; BUT – ácido butanóico; DODECA – ácido dodecanóico; HEX- ácido hexanóico; LEV- ácido levulínico; TY- timol; OCT: ácido octanóico.

4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL OTIMIZADO.

A urina teve seu pH ajustado em 6 e então centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos, para precipitação das proteínas presentes na urina. As membranas foram impregnadas em 300 µL de DES (ácido dodecanóico: ácido hexanóico) durante 10 minutos sob agitação. Após o processo de impregnação, as extrações ocorreram sob agitação em 1,5 mL de urina em poços de extração com capacidade máxima de 2 mL por 60 minutos. Posteriormente, foi realizada a derivatização dos aldeídos, utilizando uma solução de DNPH e solução tampão ácido cítrico-hidrogenofosfato dissódico, em poços com capacidade máxima de 500 µL durante 30 minutos sob agitação. Os poços de 500 µL foram substituídos para a dessorção, que ocorreu em 300 µL solvente de dessorção (ACN:MeOH 1:1) durante 5 minutos sob agitação. As análises foram realizadas utilizando um HPLC-DAD. O procedimento experimental otimizado é mostrado na figura 8.

Figura 8: Procedimento experimental otimizado.

Fonte: Autoria própria (2023).

4.5 OTIMIZAÇÕES DA TÉCNICA HF-MMLLE

As otimizações do método foram realizadas de forma uni e multivariadas. O programa Excel e o software Statsoft Statistica 7 foram utilizados para planejamento de experimentos e análise de resultados, onde a média da área normalizada dos picos cromatográficos foi utilizada para análises univariadas e a média geométrica das áreas dos analitos foi utilizada para planejamentos multivariados.

4.5.1 Otimização do solvente extrator (DES)

Os solventes eutéticos profundos hidrofóbicos foram selecionados previamente, buscando a melhor eficiência de extração. Foram avaliados 5 solventes extratores, que estão listados na tabela 4. Neste primeiro momento alguns parâmetros foram fixados para o estudo do solvente extrator, sendo eles: modo de derivatização, quantidade de derivatizante, solvente de dessorção, tempo de extração e de dessorção. Para reação de derivatização, a proporção estequiométrica aldeído:DNPH foi fixada em 1:4. A derivatização foi realizada previamente, onde 1,5 mL de tampão foram adicionados a 10 mL de urina fortificada com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos e a mistura foi centrifugada durante 5 minutos a 3000 rpm e posteriormente adicionado 37 µL de

DNPH, mantendo uma proporção (1:4). E então manteve-se sob agitação pelo período de 45 minutos. Os solventes foram impregnados na membrana e submersos em poços de extração contendo 1,5 mL da urina com os analitos previamente derivatizados e mantidos em agitação durante a extração por 45 minutos. Posteriormente foi realizada a dessorção em poços de capacidade máxima de 500 μL , utilizando 300 μL de solvente de dessorção ACN:MeOH (1:1) (v/v), mantido sob agitação por 15 minutos e por fim o solvente de dessorção foi injetado no HPLC-DAD.

4.5.2 Otimização do modo de derivatização.

Três modos de derivatização foram avaliados, sendo a derivatização dos analitos antes do processo de extração, *in situ*, ou seja, durante o processo de extração, e depois do processo de extração. O solvente extrator utilizado foi a mistura de ácido dodecanóico: ácido hexanóico (DODECA:HEX) (1:3). A proporção molar de derivatizante foi fixada em 1:4 (aldeído:DNPH).

Para a derivatização antes da extração foram adicionados 1,5 mL de tampão a 10 mL de urina fortificada em 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e centrifugada durante 5 minutos a 3000 rpm. Ao sobrenadante foram adicionados 37 μL de DNPH e essa mistura foi mantida sob agitação por 45 minutos. Posteriormente 1,5 mL dessa solução foi transferida para os poços de extração. Com a membrana previamente impregnada com solvente extrator, o tempo de extração foi de 45 minutos. A dessorção foi realizada em 300 μL de ACN:MeOH (1:1) durante 15 minutos.

Para realização da derivatização *in situ*, o DES e DNPH foram juntamente impregnados na membrana, esse processo foi realizado utilizando uma mistura de 288 μL de DES e 12 μL de DNPH, onde a membrana foi submersa durante 10 minutos, sob agitação. Foi adicionado 1,5 mL de tampão a 10 mL de urina fortificada a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, e esta solução foi centrifugada durante 5 minutos a 3000 rpm. Foram transferidos 1,5 mL do sobrenadante aos poços de extração. A extração foi mantida por 45 minutos e seguida de 15 minutos de dessorção em 300 μL de ACN:MeOH (1:1), ambas sob agitação.

Para a derivatização após o procedimento de extração, a membrana foi impregnada em 300 μL de DES durante 10 minutos. A urina fortificada a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi submetida a centrifugação durante 5 minutos a 3000 rpm. E então foi adicionado 1,5 mL do sobrenadante nos poços de amostragem e mantido sob agitação durante 45

minutos para extração. Por fim, a derivatização foi realizada utilizando 294 μL de tampão e 6 μL de DNPH, a solução foi mantida sob agitação durante 45 minutos. Em seguida, em novos poços de amostragem foi realizada a dessorção em 300 μL ACN:MeOH (1:1) durante 15 minutos.

4.5.3 Otimização do solvente e tempo de dessorção.

A otimização do solvente de dessorção foi realizada utilizando uma abordagem multivariada através de um planejamento Simplex Lattice de 9 experimentos, sendo o ponto central realizado em triplicata conforme descrito pela tabela 6. As condições fixadas para este estudo foram 300 μL de DES (DODECA:HEX) para impregnar a membrana por 10 minutos, tempo de extração de 45 minutos, a derivatização ocorreu após o processo de extração utilizando 300 μL de tampão e 6 μL de DNPH durante 45 minutos e o tempo de dessorção foi fixado em 15 minutos. Os solventes estudados foram acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e acetato de etila (Ac.Et).

Tabela 7. Planejamento simplex Lattice para otimização de solvente de dessorção.

Experimento	ACN (%)	MeOH (%)	Ac.Et (%)
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	33,3	33,3	33,3
8	33,3	33,3	33,3
9	33,3	33,3	33,3

Fonte: Autoria própria (2023).

Utilizando as otimizações realizadas previamente, foi estudado de forma univariada o tempo de dessorção. Foram avaliados os tempos de 5, 15, 30 e 45 minutos, todos foram realizados em triplicata.

4.5.4 Otimização dos parâmetros de extração.

Para avaliação dos parâmetros de extração, como pH, quantidade de derivatizante, tempo de derivatização e tempo de extração foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^4 . Variou-se pH (2, 6 e 10), quantidade de derivatizante (proporção molar de 1:1, 1:5 e 1:9), tempo de derivatização (30, 45 e 60 min) e tempo de extração (15, 45 e 75).

Tabela 8. Planejamento fatorial completo para estudo dos parâmetros de extração.

Experimento	pH	Tempo de derivatização (min)	Quantidade de derivatizante	Tempo de extração (min)
1	2	30	1	15
2	10	30	1	15
3	2	60	1	15
4	10	60	1	15
5	2	30	9	15
6	10	30	9	15
7	2	60	9	15
8	10	60	9	15
9	2	30	1	75
10	10	30	1	75
11	2	60	1	75
12	10	60	1	75
13	2	30	9	75
14	10	30	9	75
15	2	60	9	75
16	10	60	9	75
17	6	45	5	45
18	6	45	5	45
19	6	45	5	45

Fonte: Autoria própria (2023).

A fim de avaliar de forma mais precisa as variáveis determinadas como significativas com este planejamento foi proposto um novo planejamento. Para isso, foram avaliados pH, tempo de extração e quantidade de derivatizante, sendo que os níveis dessas variáveis foram ajustados de acordo com o que foi observado no planejamento fatorial completo. Foi realizado um planejamento Box-Behnken com 15 experimentos, onde o pH foi avaliado variando de 3 a 6, o tempo de extração de 60 a 90 minutos e a quantidade de derivatizante variando de uma proporção molar de 1:10 a 1:30 (aldeído:DNPH). A tabela 9 apresenta os experimentos realizados neste planejamento.

Tabela 9: Planejamento box-behnken para pH, tempo de extração e quantidade de derivatizante.

Experimento	pH	Tempo de extração (min)	Quantidade de derivatizante
1	3	60	1:20
2	6	60	1:20
3	3	90	1:20
4	6	90	1:20
5	3	75	1:10
6	6	75	1:10
7	3	75	1:30
8	6	75	1:30
9	3	60	1:10
10	6	90	1:10
11	5	60	1:30
12	5	90	1:30
13	5	75	1:20
14	5	75	1:20
15	5	75	1:20

Fonte: Autoria própria (2023).

4.6 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

A partir de curvas de calibração construídas para cada um dos dois analitos, obteve-se os parâmetros analíticos de mérito como limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), faixa linear de trabalho e coeficiente de determinação (R^2). As curvas de calibração foram construídas diretamente na matriz de urina de uma voluntária em 6 níveis de concentração em triplicata. O limite de quantificação (LOQ) foi assumido como a primeira concentração da faixa linear de trabalho enquanto o limite de detecção (LOD) foi considerado como sendo o LOQ dividido por 3,33 (WILL *et al.*, 2021).

A precisão do método foi avaliada através de ensaios de precisão intradia e interdía realizados em três níveis de concentração (100, 400 e 800 $\mu\text{g L}^{-1}$) em triplicata em um dia ($n=3$) e em três dias ($n=9$), respectivamente. Os resultados destes experimentos foram avaliados através dos desvios padrões relativos (RSD) para a medida de cada analito em cada concentração. A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação relativa em dois níveis de concentração em triplicata (100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) realizados em duas amostras de urina de voluntários saudáveis.

4.7 APLICAÇÃO EM AMOSTRA

A aplicabilidade do método foi avaliada em 3 amostras de urina de voluntários não fumantes e saudáveis, sendo 2 do sexo feminino e 1 do sexo masculino, de 26, 27 e 28 anos. Para a aplicação do método utilizou-se a primeira urina do dia, coletada em frascos de PTFE e mantidos sob refrigeração a 4°C até sua utilização. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina sob o número de 11300913718.3.0000.0121.

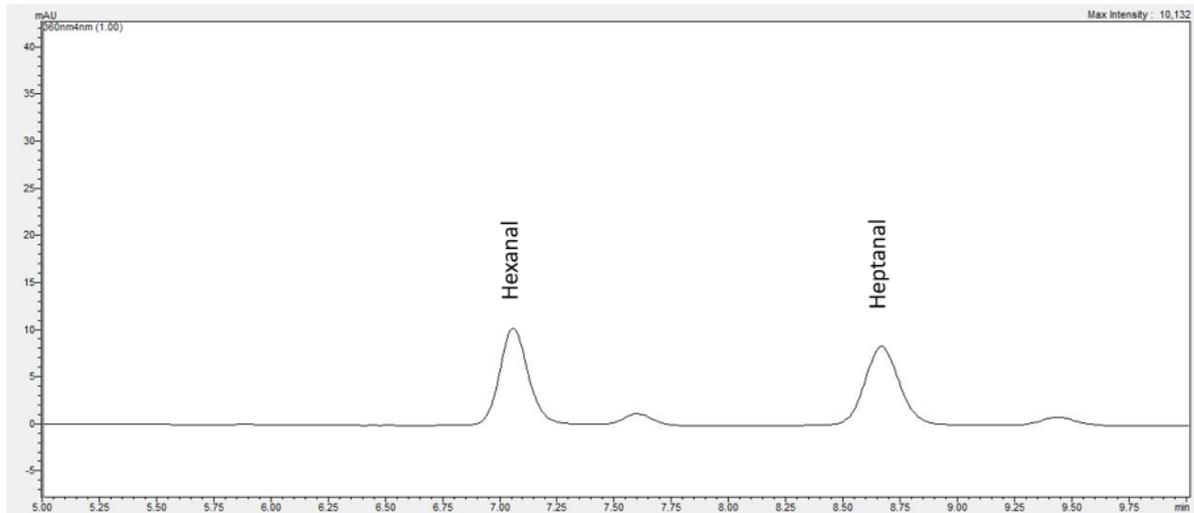
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

A separação cromatográfica foi realizada utilizando modo isocrático, com proporções de água e metanol como fase móvel. Para avaliação dos tempos de retenção dos analitos, soluções individuais de hexanal e heptanal de 1 mg L^{-1} foram derivatizadas utilizando solução de DNPH em proporção molar com os analitos de 1:4 (aldeído:DNPH). Após a identificação dos tempos de retenção de cada analito, uma

mistura de hexanal e heptanal de 1 mg L^{-1} foi submetida ao processo de derivatização descrito anteriormente e então analisada em HPLC-DAD. O cromatograma da separação cromatográfica é mostrado na figura 9. A corrida cromatográfica totalizou 10 minutos.

Figura 9: Separação cromatográfica dos analitos derivatizados (1 mg L^{-1}) em 360 nm.



Fonte: Autoria própria (2023).

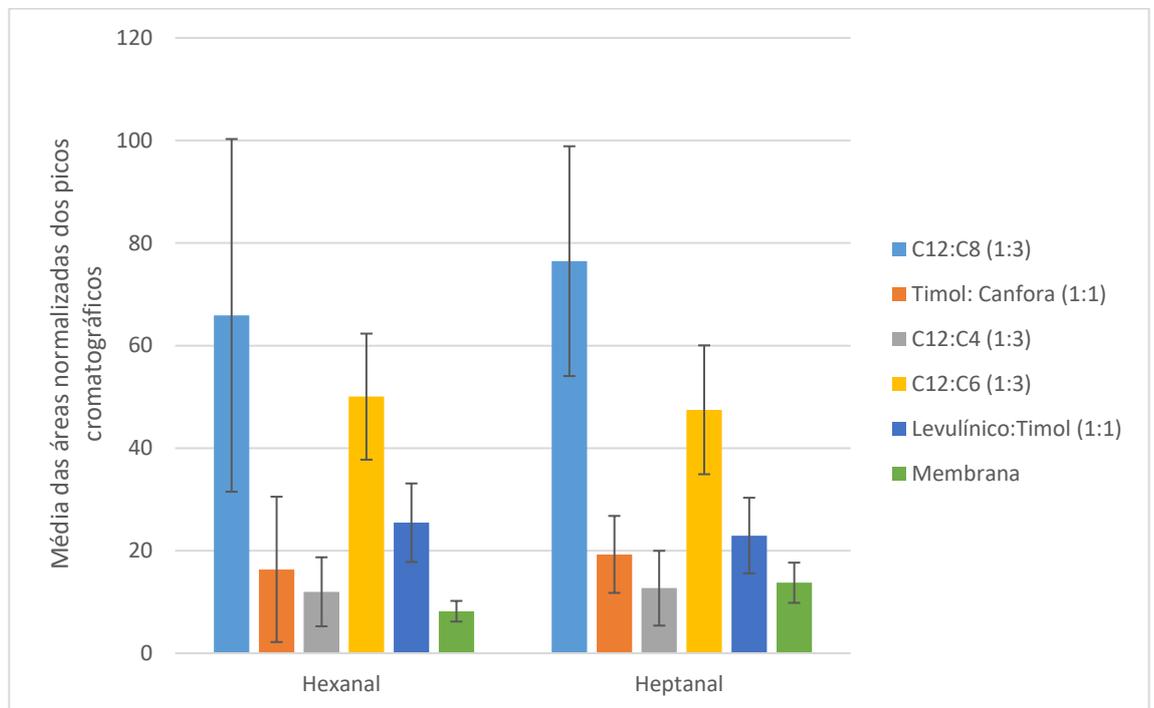
5.2 OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO EXTRATOR

A interação adequada entre os analitos estudados com a fase extratora é de extrema importância para obter um bom desempenho na extração. Portanto, para o desenvolvimento de uma metodologia analítica eficiente o estudo do solvente extrator foi realizado primeiro. Esse estudo leva em conta as propriedades físico-químicas da fase extratora, como baixa volatilidade, insolubilidade na matriz de interesse, seletividade para os analitos, viscosidade adequada e compatibilidade com a técnica de microextração e instrumentação analítica que serão utilizadas (CARASEK; MERIB, 2015).

Devido a hidrofobicidade dos analitos e a característica aquosa da matriz, os DES escolhidos, para avaliar a melhor fase extratora, possuem características hidrofóbicas, não possuem volatilidade relevante e apresentam uma viscosidade adequada para que se mantenham impregnados na membrana porosa, característica crucial para uso na técnica de HF-MMLLE (MORELLI, 2023).

Para a seleção do solvente extrator ideal foram avaliadas misturas de ácido dodecanóico e ácido octanóico, timol e cânfora, ácido dodecanóico e ácido butírico, ácido dodecanóico e ácido hexanóico, ácido levulínico e timol. Além disso, foi avaliado a extração realizada somente pela membrana para observar o ganho de sinal quando o DES é utilizado. Para avaliação dos resultados foram utilizadas as médias aritméticas da área de sinal normalizada para cada um dos analitos. A figura 10 apresenta o gráfico de barras obtido para a otimização do solvente eutético profundo.

Figura 10: Resultados obtidos para a otimização do solvente eutético profundo como fase extratora.



Fonte: Autoria própria (2023).

Através do gráfico de barras, as maiores respostas para extração utilizando encontra-se com o uso do DES ácido dodecanóico e ácido octanóico porém esse DES apresentou formação de partículas sólidas durante a extração. Observa-se também que o erro relacionado a essa medida é grande e poderia resultar em consequências para a precisão do método. Para assegurar a confiabilidade dos resultados, o DES escolhido para seguimento no desenvolvimento do trabalho foi a mistura entre ácido dodecanóico e ácido hexanóico em proporção 1:3. Uma análise de variância com nível de confiança de 95% foi realizada, comprovando a diferença não significativa entre o DES ácido dodecanóico: ácido octanóico e ácido dodecanóico: ácido hexanóico, os

resultados podem ser observados na tabela 10 e 11, onde os valores de F são menores que o F crítico . Devido a características estruturais dos componentes do DES e dos analitos, como ilustrado na figura 11, os resultados obtidos justificam-se pelas características apolares do ácido dodecanóico e ácido hexanóico devido a cadeia carbônica longa e linear, que facilitam a interação com os analitos hexanal e heptanal, também apolares.

Tabela 10: Resultados obtidos pela análise de variância para hexanal (ANOVA).

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	366414090,7	1	3,66E+08	0,565107	0,494023	7,708647
Dentro dos grupos	2593590997	4	6,48E+08			
Total	2960005087	5				

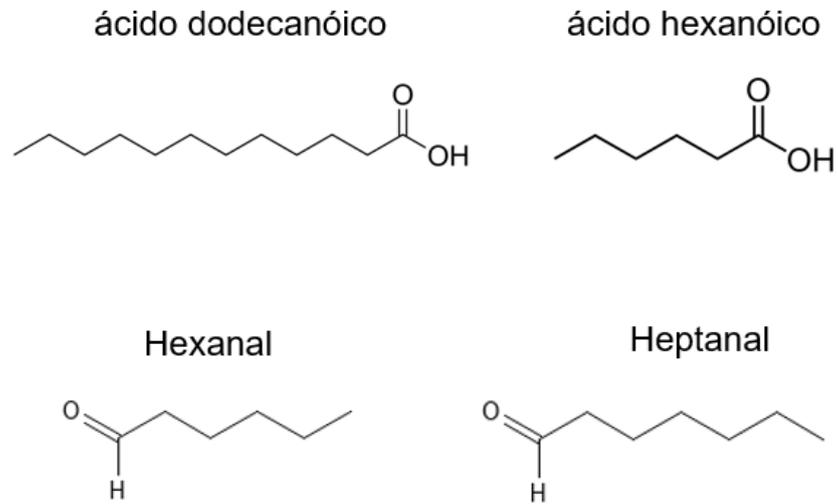
Fonte: Autoria própria (2023).

Tabela 11: Resultados obtidos pela análise de variância para heptanal (ANOVA).

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	977339488,2	1	9,77E+08	3,820692	0,122302	7,708647
Dentro dos grupos	1023206709	4	2,56E+08			
Total	2000546198	5				

Fonte: Autoria própria (2023).

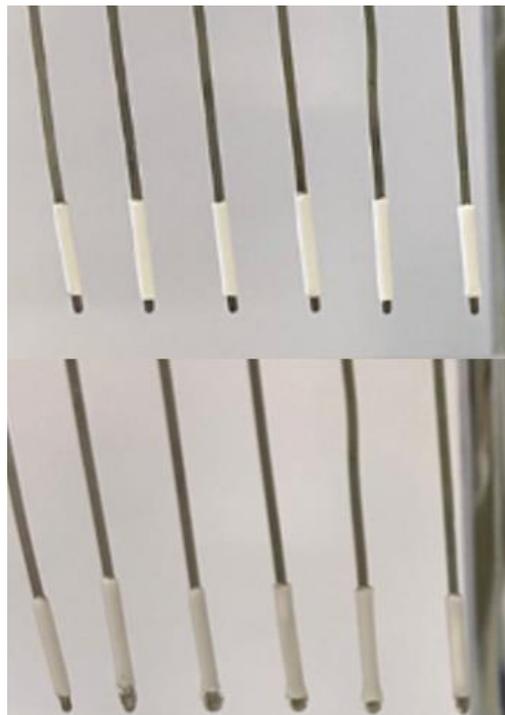
Figura 11: Fórmulas estruturais dos componentes do DES e dos analitos, hexanal e heptanal.



Fonte: A autoria própria.

Como mostrado na figura 12, é possível perceber uma alteração no aspecto visual da membrana antes e após a impregnação como confirmação da imobilização dos DES na membrana microporosa.

Figura 12: Membranas de PP antes da impregnação e após a impregnação do DES.



Fonte: A autoria própria (2023).

O DES (DODECA:HEX) selecionado neste trabalho foi caracterizado por Pierri (2022). Os autores relatam a confirmação da formação da interação presente no DES através de análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e termogravimétricas (TGA).

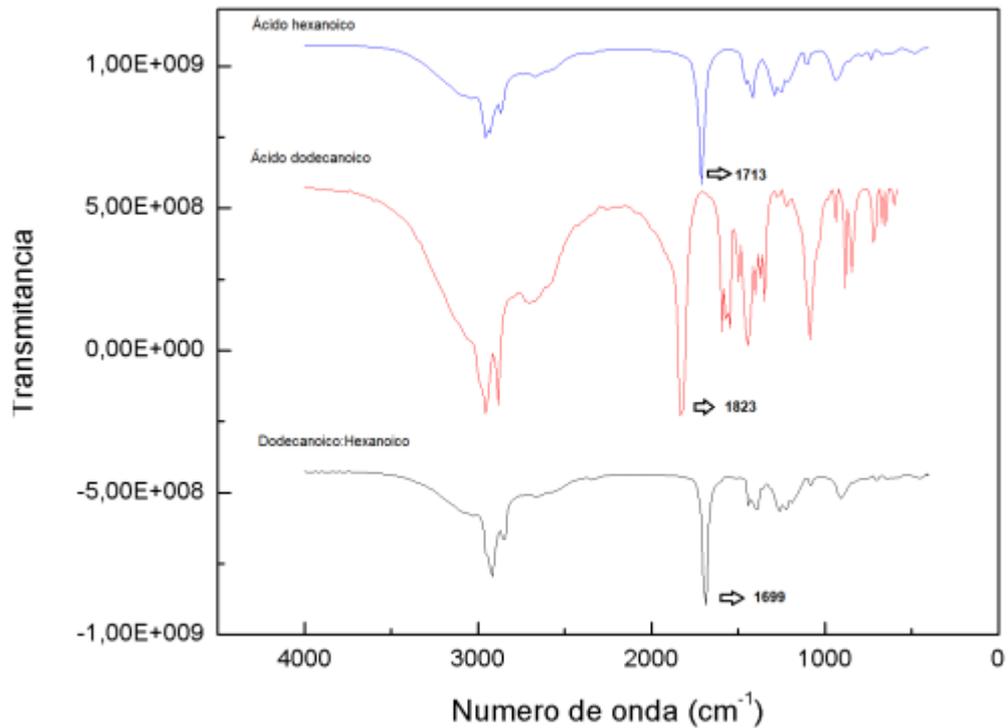
Os resultados obtidos por essas análises são discutidos neste estudo. A análise de calorimetria exploratória diferencial permite confirmar a formação do DES através da redução do ponto de fusão dos compostos da mistura separadamente (LEKSINA *et al.*, 2023). A magnitude da diferença do ponto de fusão dos compostos puros para o ponto de fusão da mistura eutética mostra a força da interação entre HBA e HBD, onde interações mais fortes resultam em uma maior diferença de ponto de fusão (SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014).

Os pontos de fusão dos componentes individuais da mistura, são de $-3,4^{\circ}\text{C}$ para o ácido hexanóico e de $43,8^{\circ}\text{C}$ para o ácido dodecanóico (PUBCHEM, [s.d.]). O resultado de DSC obtido por Pierri (2022) mostra que existe uma redução do ponto de fusão dos componentes quando estes são misturados na proporção molar de (1:3) ácido dodecanóico: ácido hexanóico e seu o ponto de fusão reduz para $-11,53^{\circ}\text{C}$, confirmando então a existência de uma mistura eutética.

Na **Figura 13** pode-se observar o espectro de infravermelho dos componentes do DES de forma separada, ácido hexanóico e ácido dodecanóico, e após a mistura dos componentes e formação da mistura eutética, obtidos por Pierri (2022). A FT-IR é uma outra importante ferramenta para identificação de compostos desconhecidos. A investigação de estruturas complexas como os DES através de FT-IR é considerado um método útil e valioso (GHAEDI *et al.*, 2017). A região de 3300 cm^{-1} a 2500 cm^{-1} observa-se uma banda alargada em todos os espectros, essa banda é característica de deformações axiais da ligação O-H provenientes do ácido carboxílico. As bandas de deformação axial C-H ocorrem na região de 3000 a 2840 cm^{-1} do espectro, porém no caso dos compostos analisados as bandas C-H podem ser sobrepostas pela banda larga de ligações O-H. A ligação de hidrogênio é capaz de alterar as frequências da carbonila. No caso de ligações X-H, onde o X é o grupo doador de prótons, as bandas são deslocadas para frequências menores. Observa-se na figura 13, bandas pronunciadas em 1713 e 1823 cm^{-1} para os espectros de ácido hexanóico e ácido dodecanóico respectivamente, essa banda é atribuída ao estiramento C=O. Já na mistura eutética, essa banda é observada em 1699 cm^{-1} , o que é explicado pela formação da ligação de hidrogênio, interação presente entre as moléculas de ácido

dodecanóico e ácido hexanóico no DES (PIERRI, 2022; SILVERSTEIN, R.M; WEBSTER, F.X, 2000) .

Figura 13: Infravermelho do ácido hexanóico, ácido dodecanóico e a mistura eutética entre eles.



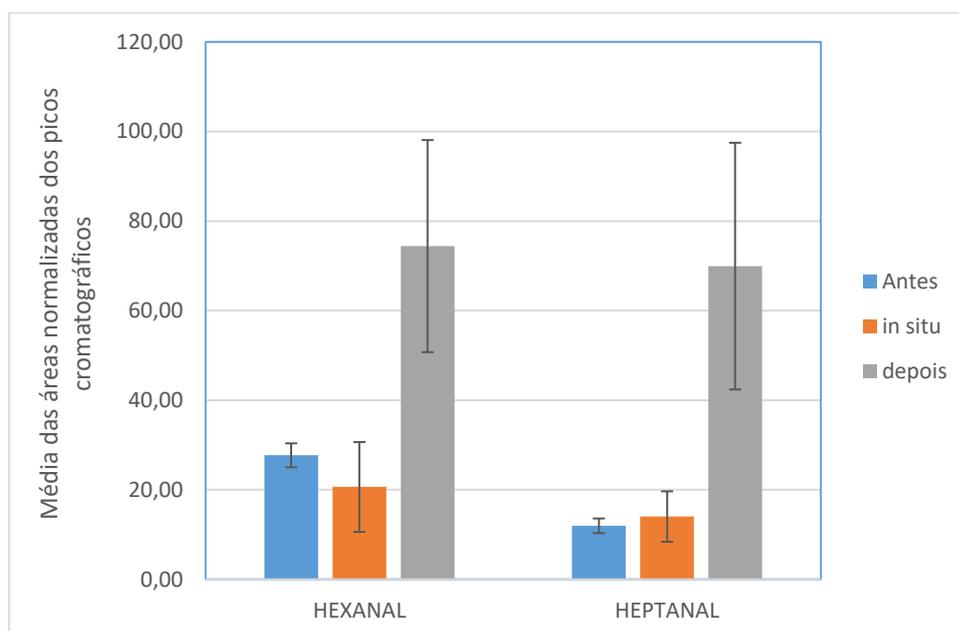
Fonte: Pierri (2022).

A TGA é uma análise térmica onde as alterações de propriedades físicas e químicas do material estudado são observadas através do aumento da temperatura em taxa constante, em função do tempo e assim é possível observar a decomposição do material (GHAEDI *et al.*, 2017). As análises de TGA também foram utilizadas como caracterização dos DES. Através dos resultados da TGA obtidos por Pierri (2022) obteve-se o perfil de degradação do DES quando este é aquecido. No termograma com as curvas de TGA, Pierri (2022) observou uma perda de 95% de massa entre 80°C e 230°C justificado pela degradação do DES em temperaturas maiores de 80°C. Através destes resultados têm-se o conhecimento da temperatura onde o DES mantém seu estado líquido e pode ser utilizado como um solvente extrator.

5.3 OTIMIZAÇÃO DO MODO DE DERIVATIZAÇÃO

Devido a importância do processo de derivatização para as análises de hexanal e heptanal em HPLC-DAD, um estudo do procedimento de derivatização foi realizado. Foi avaliado a eficiência da extração quando a derivatização ocorria antes, durante (*in situ*) ou depois do processo de extração. As respostas das áreas normalizadas dos picos cromatográficos obtidas com esses experimentos são apresentadas na **Figura 14**.

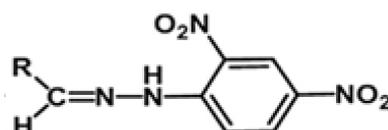
Figura 14: Resultados de otimização do modo de derivatização.



Fonte: Autoria própria (2023).

A figura 14 apresenta melhores resultados quando a derivatização ocorre após o procedimento de extração. Para os resultados observados na derivatização antes da extração, esse fato pode ser ocasionado por um provável impedimento estérico durante a migração de moléculas já derivatizadas da matriz para a membrana, devido ao tamanho da estrutura da molécula após a reação, representada na **Figura 15**.

Figura 15: Moléculas de aldeídos após reação de derivatização com DNPH.



Fonte: Adaptado de Oenning, 2017.

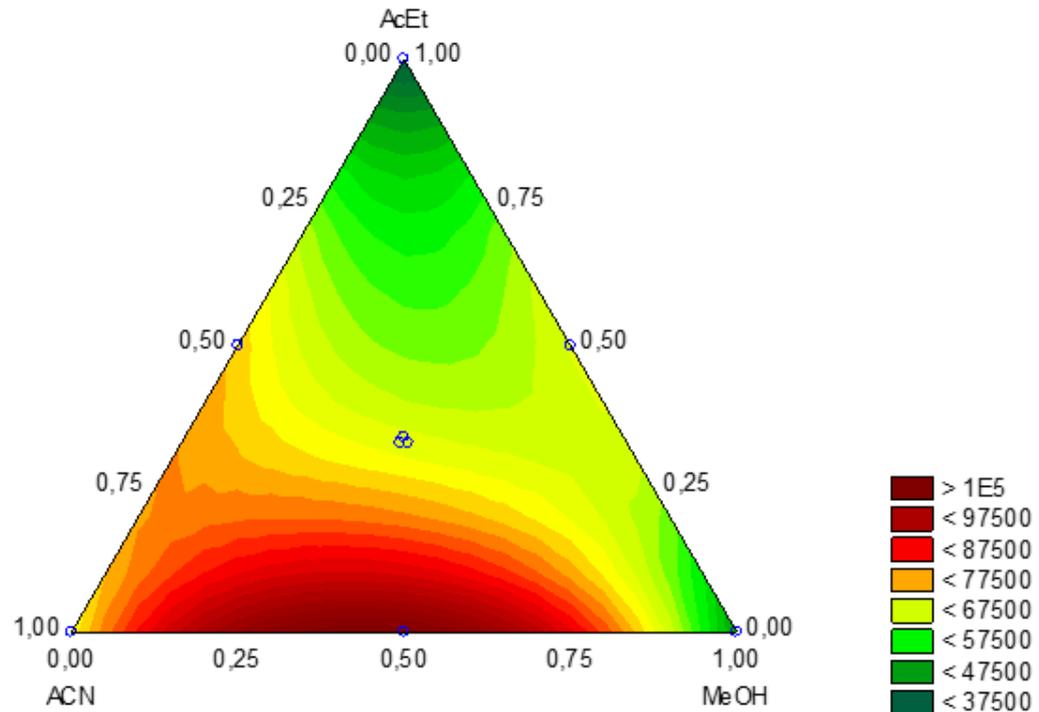
Já para extração *in situ* é possível que ocorra uma saturação dos sítios ativos de extração na membrana por moléculas de DNPH, essa interação membrana e DNPH pode ser tão efetiva que possivelmente prejudique a reação de derivatização. Quando a derivatização de hexanal e heptanal é realizada após a interação dos analitos com o DES, observa-se um melhor desempenho no método, este fato pode ocorrer devido as características alifáticas do DES (DODECA:HEX) oferecerem melhor interação com os analitos, também com cadeias alifáticas, e então com essa interação já consolidada a derivatização ocorre de forma mais efetiva.

5.4 OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE DE DESSORÇÃO

Para bons resultados em uma análise instrumental é necessário que o solvente de dessorção analisado além de compatível com o instrumento, seja capaz de solubilizar os constituintes do DES utilizado. A fim de estudar o melhor solvente, foi realizado um planejamento *simplex lattice* onde a composição dos solventes acetonitrila, metanol e acetato de etila foi avaliada. Os parâmetros como solvente de extração (DODECA:HEX), derivatização com 6 μL de DNPH após o processo de extração durante 45 minutos, a extração em urina fortificada com 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante 45 minutos e o tempo de dessorção por 15 minutos foram fixados.

A superfície de resposta apresentada na **Figura 16** foi obtida utilizando a média geométrica da área dos picos cromatográficos e construída com auxílio do software *Statsoft Statistica*. O coeficiente de determinação de 0,9292 indica o ajuste dos dados ao modelo matemático, onde é possível observar as melhores respostas utilizando uma mistura de 50% metanol e 50% acetonitrila. Considerando a polaridade do ácido dodecanóico (log Kow 4,60) e hexanóico (log Kow 1,92) esperava-se que o acetato de etila (log Kow 0,73) fosse o solvente que melhor solubilizasse o DES, porém observa-se que melhores respostas são encontradas ao fazer uso da mistura entre metanol: acetonitrila (50:50). Este fato pode ser explicado pela polaridade intermediária da acetonitrila (log Kow -0,34) e metanol (log Kow -0,77), facilitando a interação também com a parte polar dos ácidos carboxílicos e assim favorecendo a solubilização do solvente extrator nos solventes de dessorção, sendo possível assim removê-lo, junto com os analitos, da membrana, fato também observado com o retorno da coloração da membrana como apresentada antes da impregnação do DES.

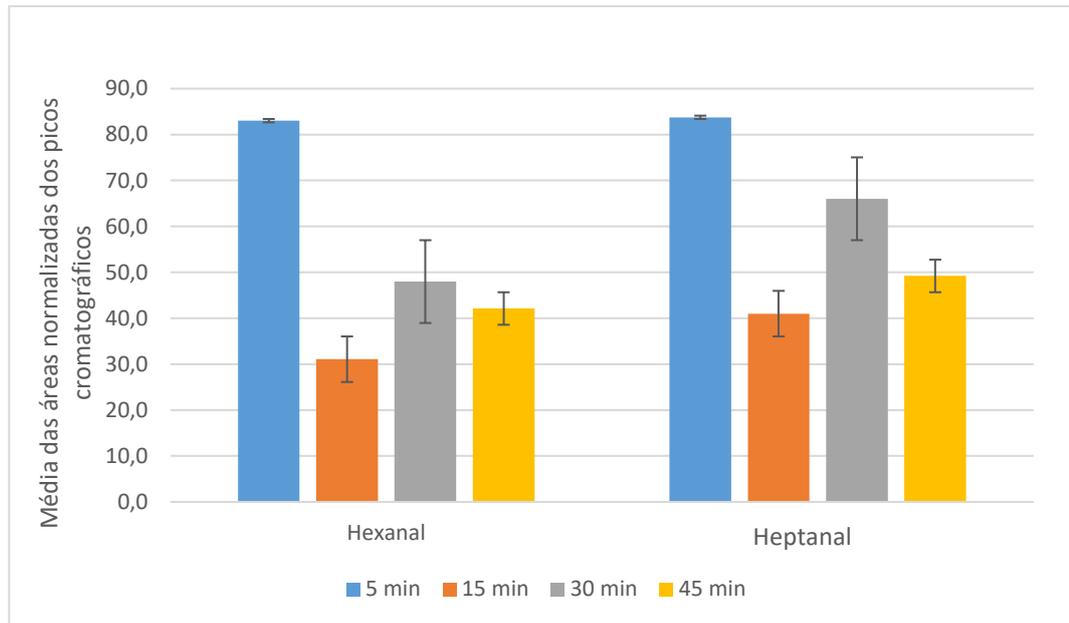
Figura 16: Superfície de resposta obtida para a otimização do solvente de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2023).

5.5 OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE DESSORÇÃO

A fim de garantir uma condição compromisso entre eficiência de dessorção dos analitos sem comprometer a frequência analítica do método, um estudo do tempo de dessorção foi realizado. O tempo de dessorção foi avaliado de forma univariada, onde foi avaliado 5, 15, 30 e 45 minutos de dessorção. Os outros parâmetros foram fixados como solvente de extração (DODECA:HEX), derivatização com 6 μ L de DNPH após a extração em urina fortificada com 500 μ g L⁻¹ durante 45 minutos, tempo de extração de 45 minutos e dessorção em solvente metanol:acetonitrila (50:50) por tempos variados. A **Figura 17** apresenta os resultados através da área do pico cromatográfico normalizada para os tempos estudados.

Figura 17: Resultados da otimização do tempo de dessorção.

Fonte: Autoria própria (2023).

Observa-se que os melhores resultados para ambos os analitos são obtidos quando se faz uso de 5 minutos de dessorção. As **Tabela 12** e **Tabela 13** mostram a análise de variância com nível de confiança de 95%. No caso do hexanal o F calculado foi maior que o F crítico, assegurando diferença significativa para 5 minutos. Para o heptanal, o F calculado foi menor que o F crítico, indicando diferença não significativa. Considerando os estudos estatísticos entre os tempos de 5 e 30 minutos, o tempo ótimo de dessorção foi de 5 minutos. . O tempo de 5 minutos foi suficiente para remover o DES e analitos presentes na membrana. Nos tempos maiores consegue-se observar uma queda nas respostas. Isso pode ser resultado da volatilidade dos analitos, onde menores tempos de dessorção reduz a perda de analitos somado a uma retroextração dos analitos dessorvidos para a membrana (MORELLI *et al.*, 2020b). O mesmo fenômeno é observado por Oenning (2017), onde melhores respostas são encontradas em menores tempos de extração (OENNING *et al.*, 2017).

Tabela 12: Análise de variância para estudos do tempo de dessorção para o analito hexanal.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1,41E+08	1	1,41E+08	12,09831	0,025392	7,708647

Dentro dos grupos	46720465	4	11680116
Total	1,88E+08	5	

Fonte: Autoria própria (2023).

Tabela 13: Análise de variância para estudos de tempo de dessorção para o analito heptanal.

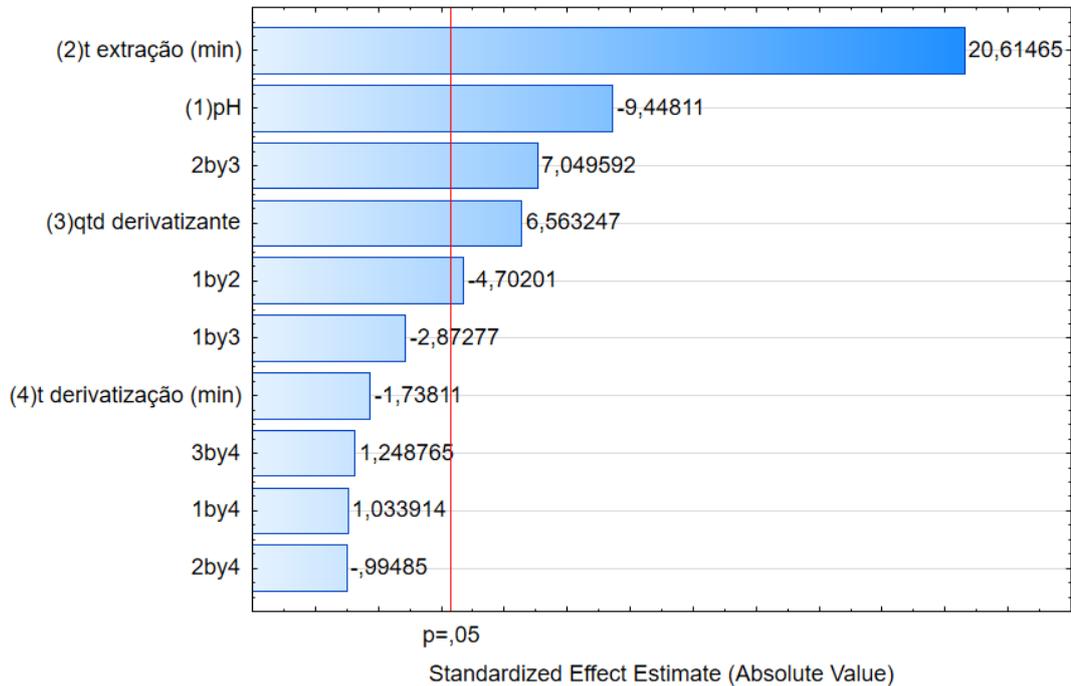
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1,5E+08	1	1,5E+08	1,9776	0,232371	7,708647
Dentro dos grupos	3,03E+08	4	75753470			
Total	4,53E+08	5				

Fonte: Autoria própria (2023).

5.6 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO

Fatores que podem afetar a eficiência de extração foram avaliados. Através de um planejamento fatorial completo (2^4) é possível obter respostas referentes a significância das variáveis individuais e quando relacionadas entre si para o processo de extração. Os parâmetros avaliados pelo planejamento fatorial completo foram pH, tempo de extração, quantidade de derivatizante e tempo de derivatização. A **Figura 18** mostra o gráfico de pareto obtido utilizando as médias geométricas das áreas dos picos cromatográficos dos analitos para cada um dos experimentos.

Figura 18: Respostas obtidas através do planejamento fatorial completo 2⁴.



Fonte: Autoria própria (2023).

O gráfico de Pareto apresenta R^2 de 0,87424, mostrando a correlação adequada do modelo matemático aos dados obtidos. O efeito das variáveis estudadas é observado no gráfico, sendo um efeito significativo quando a variável ultrapassa a linha vermelha e não significativo quando se mantém antes da linha vermelha. Os valores encontrados fornecem informações das melhores respostas, sendo que valores negativos indicam que os melhores resultados são encontrados em valores mínimos, e para valores positivos, melhores resultados encontram-se em valores máximos das variáveis estudadas.

Os resultados obtidos indicam a não significância do tempo de derivatização para o processo de extração e por isso o menor tempo foi mantido, sendo de 30 minutos.

Para o tempo de extração, que apresentou significância e valores positivos, os melhores resultados são observados em maiores tempos sugerindo a necessidade de um tempo maior de extração, por isso essa variável teve sua faixa de estudo ajustada para 60 a 90 minutos, no planejamento seguinte. No estudo de pH, também significativo, os valores obtidos foram negativos indicando que as melhores respostas são obtidas em menores pHs, e assim foram avaliados pHs de 3 a 6 no próximo estudo. E para a significância observada na quantidade de derivatizante, os melhores

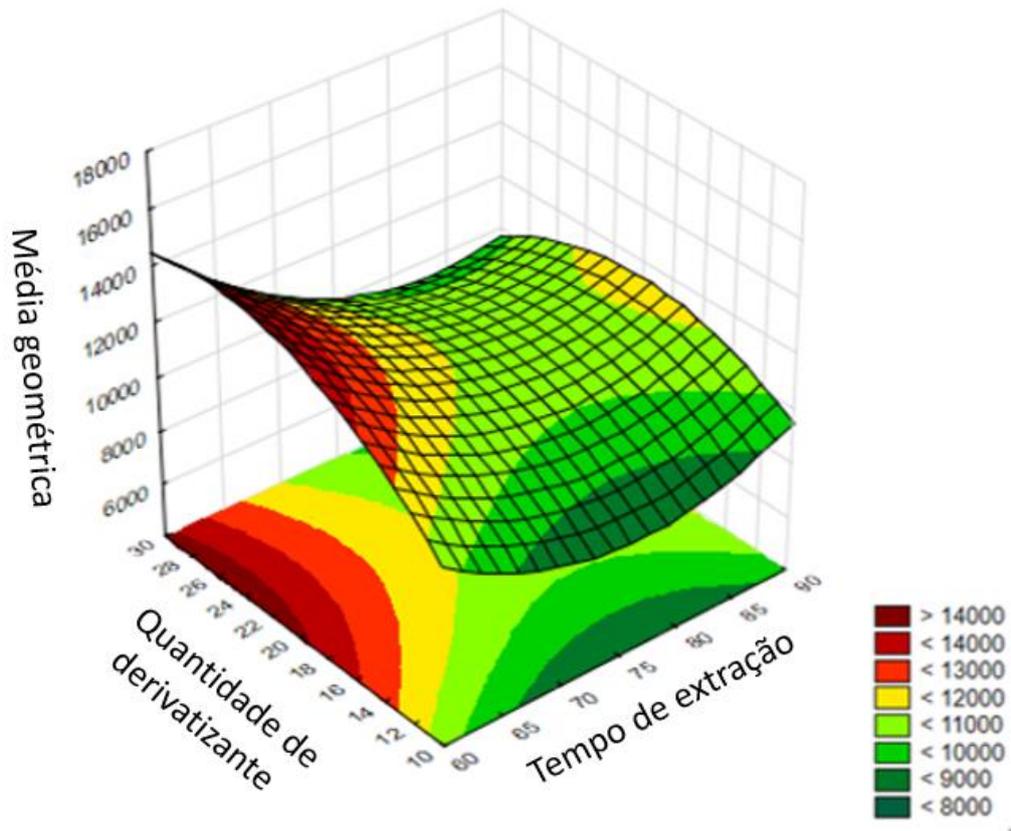
resultados são obtidos em maiores proporções de derivatizante, visto que apresenta um efeito positivo e dessa forma o estudo seguinte avaliou a proporção de 1:10 a 1:30.

Considerando os resultados obtidos com o planejamento fatorial completo e ajustando as faixas de estudo de acordo com o efeito observado para as variáveis, um planejamento Box-Behnken foi realizado.

5.7 PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN

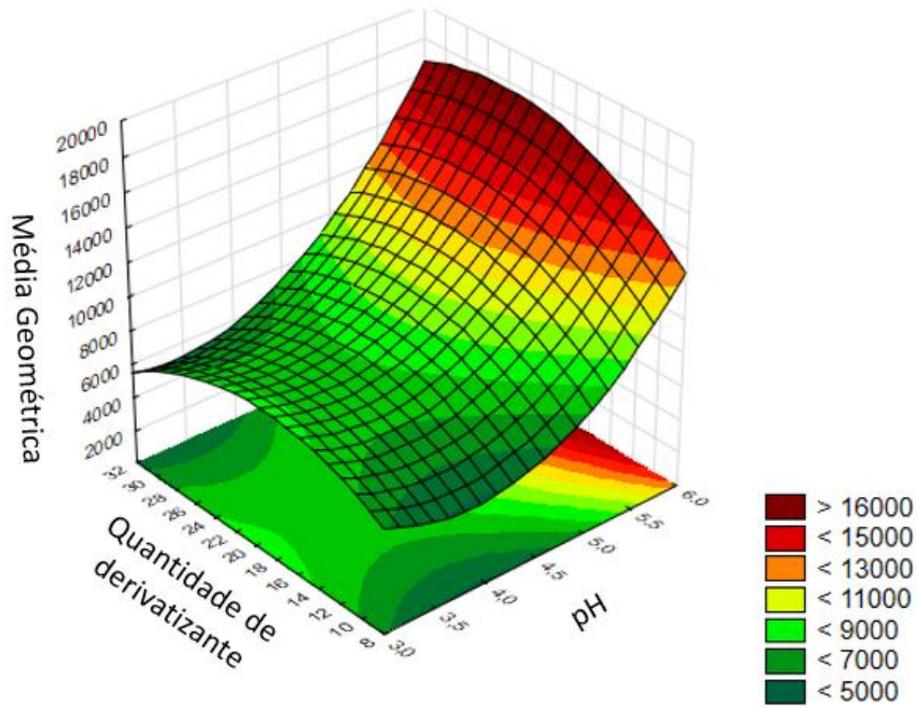
Para estudar os parâmetros que apresentaram significância no processo de extração foi realizado um planejamento Box-Behnken, onde as faixas de estudos foram definidas anteriormente. As **Figura 19**, **Figura 20** e **Figura 21** apresentam as superfícies de respostas obtidas através desse planejamento, com R^2 de 0,90786 indicando a adequada correlação de dados obtidos com o modelo matemático.

Figura 19: Superfície de resposta para otimização de tempo de extração e quantidade de derivatizante.



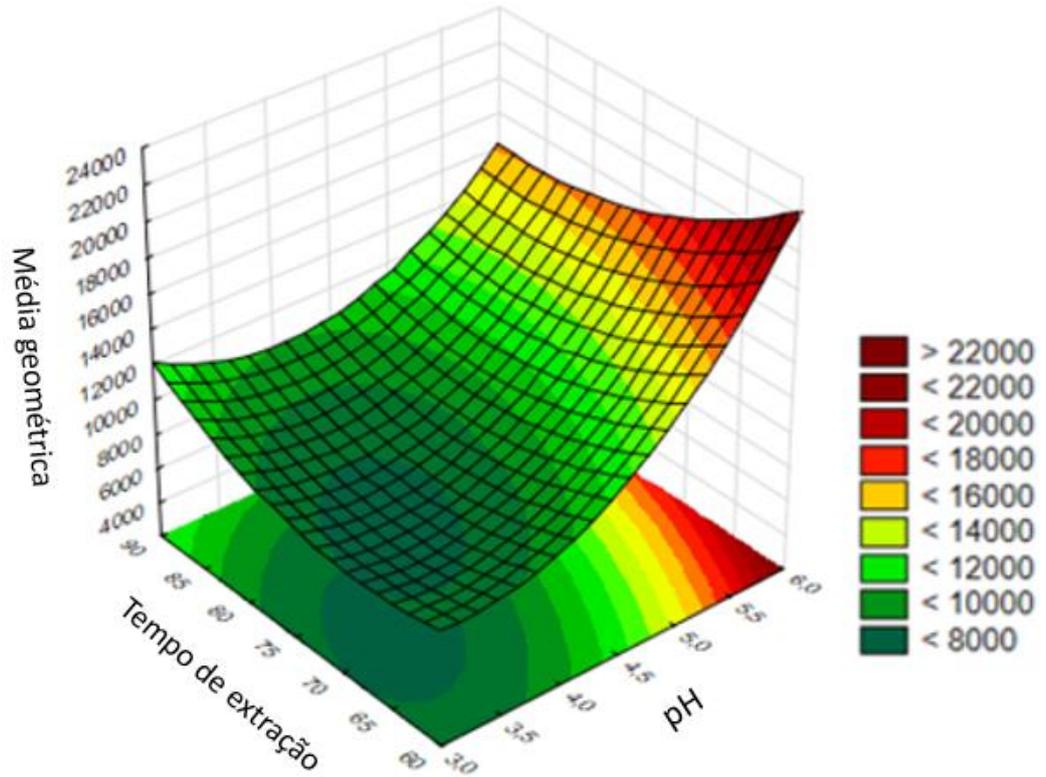
Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 20: Superfície de resposta para otimização de pH e quantidade de derivatizante.



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 21: Superfície de resposta para otimização de pH e tempo de extração.



Fonte: Autoria própria (2023).

Nas figuras 19, 20 e 21 observa-se que as melhores respostas expressas pelas médias geométricas são obtidas quando o pH do meio de extração é 6, esse fato pode ser resultado de um possível fortalecimento das interações entre os componentes dos DES quando estes passam a apresentar carga, visto que o pKa dos ácidos dodecanóico e hexanóico é de 5,3 e 4,88 respectivamente, e por isso podem ser encontrados em sua forma parcialmente desprotonada e totalmente desprotonada. As melhores respostas foram obtidas em menores tempos de extração (60 min), corroborando com o melhor tempo encontrado em outro estudo, sendo que este valor foi tempo suficiente para extrair os analitos da amostra, visto que tempos maiores que o necessário, podem resultar na perda de analitos já extraídos que retornam a amostra (OENNING et al., 2017). O estudo da quantidade de derivatizante forneceu melhores respostas em maiores proporções de derivatizante (1:30), este fato corrobora com estudos relatados na literatura, onde maiores proporções de aldeído:DNPH fornecem reações de derivatização mais efetivas (LIU; YUAN; FENG, 2015).

A partir do estudo das variáveis que interferem na extração, os parâmetros otimizados foram 60 minutos de extração, ajuste de pH da amostra para 6 e a quantidade de derivatizante de 1:30.

5.8 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

A partir do método otimizado segue o processo de validação através de curvas de calibração, realizadas na matriz onde obtêm-se os principais parâmetros analíticos de mérito, apresentados na **Tabela 14**. Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos foram superiores a 0,9973, assegurando a correlação linear entre concentração e área dos picos cromatográficos. A faixa linear obtida é representada em duas formas na **Tabela 14**, sendo a primeira forma com faixa linear de 100 a 800 ng mL⁻¹. A segunda forma é utilizada pela literatura para identificação de pacientes com câncer de pulmão. Os limites de detecção alcançados foram de 0,3 e 0,26 nmol mL⁻¹ (correspondente a 30,30 ng mL⁻¹) para hexanal e heptanal respectivamente, e o limite de quantificação foi de 1,00 para hexanal e 0,87 nmol mL⁻¹ para heptanal.

Tabela 14. Limites de detecção e quantificação, faixa linear de trabalho, coeficiente de determinação e equação da reta dos analitos estudados, hexanal e heptanal.

Analito	LOD (nmol mL ⁻¹)	LOQ (nmol mL ⁻¹)	Faixa Linear (ng mL ⁻¹)	Faixa Linear (nmol mL ⁻¹)	R ²	Equação da reta
Hexanal	0,30	1,00	100-800	1,00 - 8,00	0,9973	y=212,5x- 5194,2
Heptanal	0,26	0,87	100-800	0,87-7,00	0,9935	y=168,92x- 4844,8

Fonte: Autoria própria (2023).

Para avaliação da precisão do método, foram realizados ensaios de precisão intradia e interdia em concentrações de 100, 400 e 800 ng mL⁻¹, os resultados são apresentados na **Tabela 15**. A precisão intradia apresentou desvios padrões relativos variando de 9 a 20%, dessa forma, alguns dos dados encontram-se não concordantes com o limite de 15% estabelecido pela AOAC, fato justificado pela complexidade da matriz de urina. A urina é uma matriz complexa em que sua composição é altamente variável de acordo com parâmetros biológicos, como alimentação e o indivíduo (MORÉS *et al.*, 2023). Os valores não concordantes podem ser ocasionados por efeito de matriz e pelo fato da urina não ser diluída, agravado pela necessidade de uso de derivatizante para obtenção de resultados em HPLC-DAD. Para a precisão interdia os resultados variaram de 17 a 22%, este seguindo recomendação da AOAC (2016), com limite máximo de 22% para esta faixa de concentração. Considerando valores obtidos adequados e avaliando precisão intradia e interdia pode-se considerar o método proposto como um método preciso.

Tabela 15. Resultados de ensaios de precisão intradia e interdia.

Analito	Concentração (ng mL ⁻¹)	Precisão Intradia (%)	Precisão Interdia (%)
		n=3	n=9
Hexanal	100	20	17
	400	16	20
	800	11	22
Heptanal	100	9	22
	400	18	19
	800	14	20

Fonte: Autoria própria (2023).

Os estudos de exatidão do método foram realizados através de ensaios de recuperação relativa nas concentrações de 100 e 500 ng mL⁻¹, mostrados na **Tabela 16**. Os valores alcançados variaram de 53,5 a 97,0 % para o hexanal e 61,2 a 97,3 % para o heptanal. A AOAC define como limite de variação de 80 a 110% para recuperações relativas realizadas nessa faixa de concentração, o estudo apresenta alguns valores com variações consideráveis, possivelmente devido ao efeito de matriz causado pela urina não diluída e a necessidade de reação de derivatização (AOAC, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS., 2016).

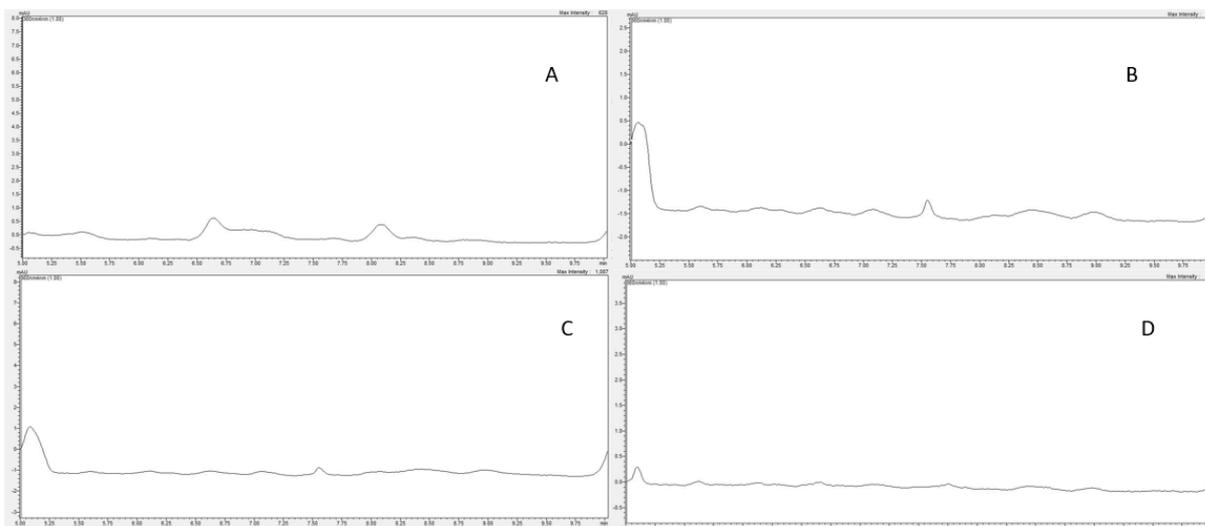
Tabela 16. Resultados de ensaios de recuperação relativa.

Analito	Concentração (ng mL ⁻¹)	Recuperação Relativa 1 (%)	Recuperação Relativa 2 (%)
Hexanal	100	55,2 ± 10	97,0 ± 9
	500	53,5 ± 4	58,4 ± 7
Heptanal	100	61,2 ± 9	97,3 ± 11
	500	77,9 ± 15	70,8 ± 9

Fonte: Autoria própria (2023).

Por fim, a urina de 2 voluntárias femininas e 1 voluntário masculino, com idades de 28 (**Figura 22 - B**), 27 (**Figura 22 - C**) e 26 anos (**Figura 22 - D**), foram utilizadas para aplicação do método, os cromatogramas constam na Figura 22 – A. As análises das urinas dos voluntários não apresentaram concentrações dos analitos dentro do limite de quantificação. A faixa de concentração dos analitos encontrados nas urinas de voluntários pode ser justificável pela não presença de câncer de pulmão.

Figura 22. Cromatogramas dos extratos derivatizados utilizando o método desenvolvido, em 360 nm. Amostra fortificada 100 nmol mL⁻¹ (A); Amostra 1 (B); Amostra 2 (C); Amostra 3 (D).



Fonte: Autoria própria (2023).

5.9 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM METODOLOGIAS REPORTADAS NA LITERATURA PARA ANÁLISE DE HEXANAL E HEPTANAL EM AMOSTRAS DE URINA.

A **Tabela 17** apresenta características do método desenvolvido e de métodos reportados na literatura. Pode-se observar que ao comparar com os métodos, este estudo apresentou uma grande redução no tempo de preparo por amostra para análise de hexanal e heptanal, sendo de aproximadamente 1 minuto por amostra, enquanto trabalhos relatados chegam a 70 minutos de preparo por amostra. Assim, esse trabalho apresenta uma alta frequência analítica, fator importante visto que diagnósticos precoces estão diretamente relacionados com a redução da taxa de mortalidade em pacientes com câncer de pulmão.

A metodologia desenvolvida atende a parâmetros da química analítica verde, onde utiliza um pequeno volume de amostra biológica (1,5 mL), de solvente extrator (300 µL) e de solvente de dessorção (300 µL), além de não utilizar um agente redutor para reação de derivatização e, como consequência, uma menor quantidade de resíduos são gerados. Ademais, o método proposto substitui um solvente extrator tradicional por um solvente eutético profundo natural, tornando a técnica mais verde.

Os limites de detecção encontrados variam de 0,3 a 0,26 nmol mL⁻¹ para hexanal e heptanal, respectivamente, esses valores apresentam-se no intermédio dos reportados em outros trabalhos. Os valores de LODs obtidos neste trabalho são

considerados satisfatórios para identificação de pacientes com câncer de pulmão (MORÉS, 2022). Vale ressaltar que valores de LOD podem ser obtidos de variadas formas além de que instrumentações analíticas maior sensibilidade como LC-MS e GC-MS permitem resultados mais sensíveis, quando comparado ao HPLC-DAD utilizado para desenvolvimento deste trabalho.

Até o presente momento nenhum trabalho foi encontrado na literatura para determinação destes analitos em urina utilizando um solvente eutético profundo natural. O novo método desenvolvido se mostra como um método simples, de alta frequência analítica e ambientalmente amigável, ao acoplar a técnica de HF-MMLE ao sistema de 96 poços de extração utilizando um solvente verde e apresenta potencialidade de aplicação no auxílio da identificação de pacientes com câncer de pulmão, mostrando a atratividade do método.

Tabela 17: Tabela comparativa de métodos de análise de hexanal e heptanal em urina.

Técnica de preparo de amostra	Fase extratora	Equipamento de análise	Tempo de preparo de amostra (min)	LOD (nmol mL ⁻¹)	Referência
BA μ E	Cortiça	HPLC-DAD	70	Hexanal 1 Heptanal 0,73	(OENNING <i>et al.</i> , 2017)
HF-LPME	1-Octanol	CZE-AD	60	Hexanal 0,00097 Heptanal 0,0027	(CHEN <i>et al.</i> , 2014)
DPX	Cortiça	HPLC-DAD	5	Hexanal e heptanal 0,13	(MORÉS, 2022)
MSPE	Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ /P(MAA-co-EGDMA)	HPLC-UV	9	Hexanal 0,0017 Heptanal 0,0025	(LIU; YUAN; FENG, 2015)
SPME	Poli (MAA-co-EDMA)	LC-MS	35	Hexanal 0,015 Heptanal 0,009	(CHEN <i>et al.</i> , 2017)
HF-MMLLEE	Ácido dodecanóico: ácido hexanóico	HPLC-DAD	1,09	Hexanal 0,3 Heptanal 0,26	Este trabalho

Fonte: Autoria própria (2023).

6 CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida para determinação de biomarcadores de câncer de pulmão em amostras de urina humana utilizando a técnica de HF-MMLLE com NADES como fase extratora apresentou resultados satisfatórios. O método proposto atende a parâmetros da química analítica verde ao demonstrar a potencialidade dos NADES para substituição de solventes orgânicos, somando-se a redução da produção de resíduos devido ao uso de pequenos volumes de amostra, de solvente de extração e de dessorção.

A técnica de HF-MMLLE acoplada ao sistema de 96 poços de extração forneceu uma alta frequência analítica ao método, sendo que o tempo de preparo por amostra foi de 1,09 minutos quando comparado aos reportados na literatura que podem chegar a 70 minutos por amostra.

O presente estudo desenvolveu um método rápido, simples e ambientalmente amigável com potencialidade de aplicação no auxílio da triagem e diagnóstico de pacientes com câncer de pulmão. Os LODs obtidos foram de $0,3 \text{ nmol L}^{-1}$ para hexanal e $0,26 \text{ nmol L}^{-1}$ para heptanal e os LOQs de 1 nmol mL^{-1} para hexanal e $0,87 \text{ nmol mL}^{-1}$ para heptanal, valores satisfatórios para identificação de pacientes com câncer de pulmão mostrando a aplicabilidade do método, além disso ganhos com sua aplicação são observados visto que o método faz uso de pequenos volumes de amostra e solvente, aliados ao uso de um solvente verde e com uma alta frequência analítica.

O método desenvolvido apresenta-se como pioneiro na determinação de hexanal e heptanal em urina humana utilizando os NADES como solvente extrator e assim mostrando uma ampliação da aplicabilidade deste solvente. Além disso, traz ganhos como os citados anteriormente como a possibilidade de acoplamento ao sistema de 96 poços de extração que leva a uma alta frequência analítica e reduz a manipulação humana que pode acarretar em erros no procedimento analítico, atendendo a parâmetros da química analítica verde como a redução da produção de resíduos devido ao uso de pequenos volumes de amostra e solvente e a substituição de solventes orgânicos por um solvente verde.

REFERÊNCIAS

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

ABBOTT, A. P. et al. Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. **Chemical Communications**, n. 19, p. 2010–2011, 15 out. 2001.

ABBOTT, A. P. et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical Communications**, n. 1, p. 70–71, 1 jan. 2003.

AOAC, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Guidelines for Standard Method Performance Requirements**. [s.l: s.n.].

AUGUSTO, F. et al. New sorbents for extraction and microextraction techniques. **Journal of Chromatography A**, Extraction Techniques. v. 1217, n. 16, p. 2533–2542, 16 abr. 2010.

AZORÍN, C. et al. Determination of hexanal and heptanal in saliva samples by an adapted magnetic headspace adsorptive microextraction for diagnosis of lung cancer. **Analytica Chimica Acta**, p. 341435, 30 maio 2023.

BASHIR, I. et al. Deep eutectic solvents for extraction of functional components from plant-based products: A promising approach. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 33, p. 101102, 1 jun. 2023.

BEDENDO, G. C.; JARDIM, I. C. S. F.; CARASEK, E. Multiresidue determination of pesticides in industrial and fresh orange juice by hollow fiber microporous membrane liquid–liquid extraction and detection by liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 88, p. 573–580, 15 jan. 2012.

CAKOWSKI, M. M. et al. The absence of lymph nodes removed (pNx status) impacts survival in patients with lung cancer treated surgically. **Surgical Oncology**, v. 48, p. 101941, 1 jun. 2023.

CAO, J.; SU, E. Hydrophobic deep eutectic solvents: the new generation of green solvents for diversified and colorful applications in green chemistry. **Journal of Cleaner Production**, v. 314, p. 127965, 10 set. 2021.

CARASEK, E. et al. A recent overview of the application of liquid-phase microextraction to the determination of organic micro-pollutants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 108, p. 203–209, 1 nov. 2018.

CARASEK, E.; MERIB, J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, p. 8–25, 23 jun. 2015.

CARASEK, E.; MORÉS, L.; HUELSMANN, R. D. Disposable pipette extraction: A critical review of concepts, applications, and directions. **Analytica Chimica Acta**, v. 1192, p. 339383, 1 fev. 2022.

- CHEN, D. et al. A liquid chromatography–mass spectrometry method based on post column derivatization for automated analysis of urinary hexanal and heptanal. **Journal of Chromatography A**, v. 1493, p. 57–63, 14 abr. 2017.
- CHEN, F. et al. Sensitive determination of endogenous hexanal and heptanal in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to capillary electrophoresis with amperometric detection. **Talanta**, v. 119, p. 83–89, 15 fev. 2014.
- CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Extraction techniques with deep eutectic solvents. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 225–239, 1 ago. 2018.
- DAI, Y. et al. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. **Food Chemistry**, v. 187, p. 14–19, 15 nov. 2015.
- DELLA POSTA, S. et al. Strategies for the recovery of bioactive molecules from deep eutectic solvents extracts. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 157, p. 116798, 1 dez. 2022.
- DENG, C.; LI, N.; ZHANG, X. Development of headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for determination of hexanal and heptanal in human blood. **Journal of Chromatography B**, v. 813, n. 1, p. 47–52, 25 dez. 2004.
- DENG, C.; ZHANG, X.; LI, N. Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 808, n. 2, p. 269–277, 5 set. 2004.
- DOĞAN, B.; ELIK, A.; ALTUNAY, N. Determination of paracetamol in synthetic urea and pharmaceutical samples by shaker-assisted deep eutectic solvent microextraction and spectrophotometry. **Microchemical Journal**, v. 154, p. 104645, 1 maio 2020.
- ESPINO, M. et al. Natural designer solvents for greening analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 126–136, 1 fev. 2016.
- GARCÍA-LÓPEZ, M.; RODRÍGUEZ, I.; CELA, R. Evaluation of liquid–liquid microextraction using polypropylene microporous membranes for the determination of organophosphorus flame retardants and plasticizers in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 625, n. 2, p. 145–153, 12 set. 2008.
- GHAEDI, H. et al. Thermal stability and FT-IR analysis of Phosphonium-based deep eutectic solvents with different hydrogen bond donors. **Journal of Molecular Liquids**, v. 242, p. 395–403, 1 set. 2017.
- HERCE-SESA, B.; LÓPEZ-LÓPEZ, J. A.; MORENO, C. Advances in ionic liquids and deep eutectic solvents-based liquid phase microextraction of metals for sample preparation in Environmental Analytical Chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 143, p. 116398, 1 out. 2021.
- HU, H. et al. Extracellular vesicles derived from lung cancer cells promote the progression of lung cancer by delivering miR-151a-5p. **Experimental Cell Research**, p. 113526, 23 fev. 2023.

HUANG, H. et al. Blood protein biomarkers in lung cancer. **Cancer Letters**, v. 551, p. 215886, 28 dez. 2022.

HYDER, M. et al. 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, n. 2, p. 919–926, 15 ago. 2011.

JOARDER, S. et al. Bioinspired green deep eutectic solvents: preparation, catalytic activity, and biocompatibility. **Journal of Molecular Liquids**, v. 376, p. 121355, 15 abr. 2023.

KANU, A. B. Recent developments in sample preparation techniques combined with high-performance liquid chromatography: A critical review. **Journal of Chromatography A**, v. 1654, p. 462444, 27 set. 2021.

KAYA, S. I.; CETINKAYA, A.; OZKAN, S. A. Green analytical chemistry approaches on environmental analysis. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 33, p. e00157, 1 mar. 2022.

KAYA, S. I.; CETINKAYA, A.; OZKAN, S. A. Molecularly imprinted polymers as highly selective sorbents in sample preparation techniques and their applications in environmental water analysis. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 37, p. e00193, 1 mar. 2023.

KOKOSA, J. M. Selecting an extraction solvent for a greener liquid phase microextraction (LPME) mode-based analytical method. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 238–247, 1 set. 2019.

LAMEI, N.; EZODDIN, M.; ABDI, K. Air assisted emulsification liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for preconcentration of methadone in water and biological samples. **Talanta**, v. 165, p. 176–181, 1 abr. 2017.

LEKSINA, U. M. et al. A new deep eutectic solvent based on diphenylguanidine for the effective extraction of pertechnetate anion. **Separation and Purification Technology**, v. 316, p. 123824, 1 jul. 2023.

LI, H. et al. Liquid–Liquid Microextraction Based on Acid–Base-Induced Deep Eutectic Solvents for Determination of β -Carotene and Lycopene in Fruit Juices. **Food Analytical Methods**, v. 12, n. 12, p. 2777–2784, 1 dez. 2019.

LI, K. et al. 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**, v. 1614, p. 460730, 15 mar. 2020.

LI, N. et al. Gas chromatography–mass spectrometric analysis of hexanal and heptanal in human blood by headspace single-drop microextraction with droplet derivatization. **Analytical Biochemistry**, v. 342, n. 2, p. 318–326, 15 jul. 2005.

LILI, L. et al. Analysis of volatile aldehyde biomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of

floating organic droplet method by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Extraction Techniques. v. 1217, n. 16, p. 2365–2370, 16 abr. 2010.

LIU, J.-F.; YUAN, B.-F.; FENG, Y.-Q. Determination of hexanal and heptanal in human urine using magnetic solid phase extraction coupled with in-situ derivatization by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 136, p. 54–59, 1 maio 2015.

LOPES, D. et al. Determination of hormones in urine by hollow fiber microporous membrane liquid–liquid extraction associated with 96-well plate system and HPLC-FLD detection. **Journal of Chromatography B**, v. 1207, p. 123406, 1 set. 2022.

MAKOŚ, P. et al. Sample preparation procedure using extraction and derivatization of carboxylic acids from aqueous samples by means of deep eutectic solvents for gas chromatographic-mass spectrometric analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1555, p. 10–19, 22 jun. 2018.

MARTÍNEZ, G. M.; TOWNLEY, G. G.; MARTÍNEZ-ESPINOSA, R. M. Controversy on the toxic nature of deep eutectic solvents and their potential contribution to environmental pollution. **Heliyon**, v. 8, n. 12, p. e12567, 1 dez. 2022.

MASIH, A. et al. Exposure profiles, seasonal variation and health risk assessment of BTEX in indoor air of homes at different microenvironments of a terai province of northern India. **Chemosphere**, v. 176, p. 8–17, 1 jun. 2017.

MHANDU, P.; MCGONIGLE, N. Lung cancer. **Surgery (Oxford)**, 17 fev. 2023.

MOGHADAM, A. G.; RAJABI, M.; ASGHARI, A. Efficient and relatively safe emulsification microextraction using a deep eutectic solvent for influential enrichment of trace main anti-depressant drugs from complicated samples. **Journal of Chromatography B**, v. 1072, p. 50–59, 1 jan. 2018.

MORELLI, D. C. et al. A green - high throughput –extraction method based on hydrophobic natural deep eutectic solvent for the determination of emerging contaminants in water by high performance liquid chromatography – diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1626, p. 461377, 30 ago. 2020a.

MORELLI, D. C. et al. Designing a green device to BAμE: Recycled cork pellet as extraction phase for the determination of parabens in river water samples. **Talanta**, v. 219, p. 121369, 1 nov. 2020b.

MORELLI, D. C. **Solventes eutéticos profundos e microextração líquido-líquido em membrana microporosa por fibra oca: uma alternativa verde e eficiente para determinação de contaminantes emergentes**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2023.

MORÉS, L. **Ampliando a utilização do bioissorvente cortiça: aplicação em extração em ponteira descartável para análise de compostos biomarcadores em urina humana**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2022.

MORÉS, L. et al. Application of Parallel-DPX for the determination of potential cancer biomarkers in urine samples using cork as natural extraction phase followed by GC–MS. **Green Analytical Chemistry**, v. 5, p. 100061, 1 jun. 2023.

NUGBIENYO, L. et al. Flow method based on liquid-liquid extraction using deep eutectic solvent for the spectrofluorimetric determination of procainamide in human saliva. **Talanta**, v. 168, p. 307–312, 1 jun. 2017.

OENNING, A. L. et al. A new configuration for bar adsorptive microextraction (BA μ E) for the quantification of biomarkers (hexanal and heptanal) in human urine by HPLC providing an alternative for early lung cancer diagnosis. **Analytica Chimica Acta**, v. 965, p. 54–62, 1 maio 2017.

OLASUPO, A.; SUAHI, F. B. M. Trends in hollow fibre liquid phase microextraction for the preconcentration of pharmaceutically active compounds in aqueous solution: A case for polymer inclusion membrane. **Journal of Hazardous Materials**, v. 431, p. 128573, 5 jun. 2022.

OSCH, D. et al. Hydrophobic Deep Eutectic Solvents: Water-Immiscible Extractants. **Green Chem.**, 20 jul. 2015.

PAIVA, A. et al. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 5, p. 1063–1071, 5 maio 2014.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid–Liquid–Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2650–2656, 1 jul. 1999.

PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Liquid-phase microextraction approaches combined with atomic detection: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 669, n. 1, p. 1–16, 11 jun. 2010.

PEREIRA-COELHO, M. et al. Development of hollow fiber-membrane microporous liquid–liquid extraction (HF-MMLLE) procedure based on palladium nanoparticles for determination of PAH in leached extracts. **Microchemical Journal**, v. 169, p. 106562, 1 out. 2021.

PFIZER. **Câncer de pulmão | Pfizer Brasil**. Disponível em: <<https://www.pfizer.com.br/sua-saude/oncologia/cancer-de-pulmao>>. Acesso em: 7 jun. 2023.

PHILLIPS, M. et al. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. **The Lancet**, v. 353, n. 9168, p. 1930–1933, 5 jun. 1999.

PIERRI, M. E. **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. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/240857>>. Acesso em: 15 maio. 2023.

PIERRI, M. E. et al. Multiclass determination of endocrine disruptors in urine by hollow fiber microporous membrane and liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 652, p. 114725, 1 set. 2022.

POCHIVALOV, A. et al. Liquid-liquid microextraction with hydrophobic deep eutectic solvent followed by magnetic phase separation for preconcentration of antibiotics. **Talanta**, v. 252, p. 123868, 15 jan. 2023.

POLI, D. et al. Determination of aldehydes in exhaled breath of patients with lung cancer by means of on-fiber-derivatisation SPME–GC/MS. **Journal of Chromatography B, BIOLOGICAL MONITORING AND ANALYTICAL TOXICOLOGY IN OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL MEDICINE**. v. 878, n. 27, p. 2643–2651, 1 out. 2010.

PRABHUNE, A.; DEY, R. Green and sustainable solvents of the future: Deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 379, p. 121676, 1 jun. 2023.

PUBCHEM. **PubChem**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 24 fev. 2023.

SEIJO, L. M. et al. Biomarkers in Lung Cancer Screening: Achievements, Promises, and Challenges. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 14, n. 3, p. 343–357, 1 mar. 2019.

S. HAMMOND, O.; T. BOWRON, D.; J. EDLER, K. Liquid structure of the choline chloride-urea deep eutectic solvent (reline) from neutron diffraction and atomistic modelling. **Green Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 2736–2744, 2016.

SHISHOV, A. et al. An effervescence-assisted dispersive liquid–liquid microextraction based on deep eutectic solvent decomposition: Determination of ketoprofen and diclofenac in liver. **Microchemical Journal**, v. 156, p. 104837, 1 mar. 2020.

SHISHOV, A. et al. Deep eutectic solvents with low viscosity for automation of liquid-phase microextraction based on lab-in-syringe system: Separation of Sudan dyes. **Talanta**, v. 255, p. 124243, 1 abr. 2023.

SILVA, J. M. et al. Therapeutic Role of Deep Eutectic Solvents Based on Menthol and Saturated Fatty Acids on Wound Healing. **ACS Applied Bio Materials**, v. 2, n. 10, p. 4346–4355, 21 out. 2019.

SILVERSTEIN, R.M ; WEBSTER, F.X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 2000.

SMITH, E. L.; ABBOTT, A. P.; RYDER, K. S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 11060–11082, 12 nov. 2014.

SULTHAN, R.; REGHUNADHAN, A.; SAMBHUDEVAN, S. A new era of chitin synthesis and dissolution using deep eutectic solvents- comparison with ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 380, p. 121794, 15 jun. 2023.

TABIBPOUR, M. et al. Microextraction on a screw for determination of trace amounts of hexanal and heptanal as lung cancer biomarkers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 191, p. 113528, 30 nov. 2020.

TANG, W.; AN, Y.; ROW, K. H. Emerging applications of (micro) extraction phase from hydrophilic to hydrophobic deep eutectic solvents: opportunities and trends. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 136, p. 116187, 1 mar. 2021.

UCHIYAMA, S.; INABA, Y.; KUNUGITA, N. Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B, ENHANCEMENT OF ANALYSIS BY ANALYTICAL DERIVATIZATION**. v. 879, n. 17, p. 1282–1289, 15 maio 2011.

USMANI, Z. et al. Biobased natural deep eutectic system as versatile solvents: Structure, interaction and advanced applications. **Science of The Total Environment**, v. 881, p. 163002, 10 jul. 2023.

WILL, C. et al. High-throughput approach for the in situ generation of magnetic ionic liquids in parallel-dispersive droplet extraction of organic micropollutants in aqueous environmental samples. **Talanta**, v. 223, p. 121759, 1 fev. 2021.

XU, H. et al. High-performance liquid chromatographic determination of hexanal and heptanal in human blood by ultrasound-assisted headspace liquid-phase microextraction with in-drop derivatization. **Journal of Chromatography A, Extraction Techniques**. v. 1217, n. 16, p. 2371–2375, 16 abr. 2010.

XU, H. et al. A novel solid-phase microextraction method based on polymer monolith frit combining with high-performance liquid chromatography for determination of aldehydes in biological samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 690, n. 1, p. 86–93, 25 mar. 2011.

YANG, D. et al. A green deep eutectic solvents microextraction coupled with acid-base induction for extraction of trace phenolic compounds in large volume water samples. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 178, p. 130–136, 30 ago. 2019.

YAZDANPANA, M. et al. Cytotoxic Aldehydes as Possible Markers for Childhood Cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 6, p. 870–878, 1 jan. 1997.

YU, K. et al. Determination of fluoroquinolones in milk, honey and water samples by salting out-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent combined with MECC. **Food Chemistry**, v. 332, p. 127371, 1 dez. 2020.

YU, L.-Q. et al. A gate-opening controlled metal-organic framework for selective solid-phase microextraction of aldehydes from exhaled breath of lung cancer patients. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 6, p. 307, 22 maio 2018.

ZHANG, H.-J. et al. Polymer monolith microextraction with in situ derivatization and its application to high-performance liquid chromatography determination of hexanal and heptanal in plasma. **Journal of Chromatography A, 23rd Montreux Symposium on Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Supercritical Fluid Chromatography-**

Mass Spectrometry, Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry. v. 1160, n. 1, p. 114–119, 10 ago. 2007.

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, n. 1, p. 30–37, 20 jul. 2007.

ZORITA, S.; HALLGREN, P.; MATHIASSEN, L. Steroid hormone determination in water using an environmentally friendly membrane based extraction technique. **Journal of Chromatography A**, v. 1192, n. 1, p. 1–8, 23 maio 2008.