

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADEMICO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS
TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

MARIANE CAROLINE DOS SANTOS

**MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE
REVERSA PARA DETERMINAÇÃO DE ZINCO EM ÓLEOS VEGETAIS
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2017

MARIANE CAROLINE DOS SANTOS

**MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE
REVERSA PARA DETERMINAÇÃO DE ZINCO EM ÓLEOS VEGETAIS
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Tecnóloga em Alimentos, do Departamento Acadêmico de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo S. Chaves
Coorientadora: Priscila Karachinski dos Reis

PONTA GROSSA

2017



TERMO DE APROVAÇÃO

MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE REVERSA PARA DETERMINAÇÃO DE ZINCO EM ÓLEOS VEGETAIS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

Por

MARIANE CAROLINE DOS SANTOS

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 23 de novembro de 2017 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnóloga em Alimentos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho nota 10.

Prof^o. Dr^o. Eduardo S. Chaves
Orientador

Priscila Karachinski dos Reis
Coorientadora

Prof^a. Ms. Simone Bowles
Membro titular

Kathlyn Schafranski
Membro titular

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso -

Dedico este trabalho à minha mãe, irmão
e a minha amiga Thalita de Paula que
indicou o curso.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde, força e alegria para superar as dificuldades.

A esta universidade, seu corpo docente e direção.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo S. Chaves, pela sabedoria com que me guiou nesta trajetória e a minha coorientadora Priscila Karachinski dos Reis pela amizade, ajuda e apoio.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo espaço e recursos disponibilizados.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos meus professores por me proporcionar o conhecimento e a educação no processo de formação profissional e principalmente a minha família e amigos pelo incentivo e apoio incondicional.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a finalização deste trabalho.

RESUMO

SANTOS. C, Mariane. **Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa para determinação de zinco em óleos vegetais por espectrometria de absorção atômica**. 2017. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2017.

O preparo de amostras é uma etapa importante na eficiência da determinação de metais, principalmente tratando-se de amostras complexas como óleos vegetais. A técnica microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME) é fundamentada na separação de analitos por partição entre duas fases imiscíveis, ideal para amostras complexas. Este procedimento baseia-se na extração e pré-concentração dos metais utilizando um solvente extrator aquoso e um solvente dispersor orgânico. O objetivo do trabalho foi utilizar a RP-DLLME na extração e pré-concentração de Zn em amostras de azeites de oliva para posterior determinação por FAAS. Avaliou-se também a influência do tempo de armazenamento na migração de Zn para o produto. Para extração e pré-concentração dos analitos foram pesados 5 g das amostras e aquecidos por 10 min, em seguida adicionados de 1 mL da mistura de solução extratora (propanol e HNO₃ 1% na proporção 1:1 v/v), agitados em vórtex por 20 segundos e mantidos em ultrassom por 10 min. Em seguida, foram determinados por FAAS. Os valores de LOQ e LOD foram de 25 ng g⁻¹ e 8 ng g⁻¹ e o R² foi > 0,9919, mostrando ser uma técnica eficiente para extração e pré-concentração do Zn em óleos vegetais. As determinações foram realizadas em diferentes marcas de azeites de oliva, sendo que em duas marcas não apresentaram um aumento significativo na concentração de zinco em relação ao tempo de armazenamento. Entretanto, em uma das amostras a concentração variou de 0,19 ug g⁻¹ a 0,82 ug g⁻¹ após 30 dias de armazenamento. Logo, condições inadequadas de armazenamento e o tipo de material da embalagem podem comprometer a qualidade do azeite.

Palavras-chave: Armazenamento. Metais. Óleos vegetais. RP-DLLME. Zinco.

ABSTRACT

SANTOS. C, Mariane. **Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction for determination of Zn in vegetable oils by atomic absorption spectrometry** 2017. 50 f. Graduation Final Report in (Food Technology) - Federal Technology University - Paraná. Ponta Grossa, 2017.

The preparation of samples is an important step in the efficiency of the determination of metals, especially in complex samples such as vegetable oils. The reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction (RP-DLLME) is based on the separation of analytes by partition between two immiscible phases, ideal for complex samples. This procedure is based on the extraction and pre-concentration of the metals using an aqueous extractor solvent and an organic dispersor solvent. The aim of this paper was to use the RP-DLLME on the extraction and pre-concentration of Zn in olive oil samples to posterior determination by FAAS. Was evaluated the influence of storage time on the migration of Zn to the product. To extraction and pre-concentration of the analytes were weighed 5g of the samples and heated by 10 minutes, then added of 1mL of the extraction solution mixture (propanol and extraction solution HNO₃ 1% on the proportion of 1:1), vortex for 20 seconds and kept in ultrasound for 10 min, then the Zn concentration determined by FAAS. The LOQ and LOD values were 8 ng g⁻¹ and 25 ng g⁻¹ and the R² were > 0,9919, showing being an efficient technique to extraction and pre-concentration of Zn in vegetable oils. The determinations were performed in different brands of olive oil, being that the two brands won't show a significant increase of zinc concentration in relation to the storage time. However, in one of the samples the concentration varied from 0,19 ug g⁻¹ to 0,82 ug g⁻¹ after 30 days of storage. Therefore, improper storage conditions and the type of packaging material can compromise the quality of the oil.

Keywords: Storage. Metals. Vegetable oils. RP-DLLME. Zinc.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Etapas da oxidação lipídica.....	19
Figura 2. Etapas do processo analítico	25
Figura 3. Etapas da DLLME.....	26
Figura 4. Sistema básico de um espectrofotômetro de absorção atômica.....	27
Gráfico 1. Efeito do tipo de solvente dispersor sobre a extração e pré-concentração de Zn. Condições experimentais: 5 g de amostra, 10 min de aquecimento ($90 \pm 5^{\circ}\text{C}$), 20 s de vórtex e 10 min de ultrassom, 1 mL de mistura extratora contendo 500 μL de ácido nítrico 3 % como extrator e 500 μL de solvente dispersor.....	31
Gráfico 2. Efeito do volume de Isopropanol sobre extração e pré-concentração de Zn. Condições experimentais: 5 g de amostra, 10 min de aquecimento ($90 \pm 5^{\circ}\text{C}$), 20 s de vórtex e 10 min de ultrassom, 1 mL de mistura extratora contendo 500 μL de ácido nítrico 3 % como <u>extrator</u> e volumes entre 100-700 μL de solvente dispersor	32
Gráfico 3. Efeito da concentração de HNO_3 sobre extração e pré-concentração de Zn. Condições experimentais: 5 g de amostra, 10 min de aquecimento ($90 \pm 5^{\circ}\text{C}$), 20 s de vórtex e 10 min de ultrassom, 1 mL de mistura extratora contendo 500 μL de isopropanol como solvente dispersor e 500 μL de HNO_3 com concentrações variando entre 0 e 5 %.....	33
Gráfico 4. Otimização do tempo de banho ultrassônico.....	35
Gráfico 5. Otimização do tipo de agitação: com vórtex e sem vórtex.....	36
Gráfico 6. Resultados das concentrações de Zn obtidas por RP-DLLME e FAAS em amostra I de azeite de oliva com embalagem de vidro tipo âmbar.....	39
Gráfico 7. Resultados das concentrações de Zn obtidas por RP-DLLME e FAAS em amostra II de azeite de oliva com embalagem de lata sem tampa retráctil.....	40
Gráfico 8. Resultados das concentrações de Zn obtidas por RP-DLLME e FAAS em amostra III de azeite de oliva com embalagem de lata com tampa retráctil.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de mérito para determinação de Zn em azeite de oliva.....	37
Tabela 2 – Comparação dos parâmetros de mérito entre a RP-DLLME e a Digestão Ácida para determinação de Zn em azeite de oliva.....	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	
ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E FUNÇÕES DOS ÓLEOS VEGETAIS.....	14
3.2 CARACTERÍSTICAS DA OLIVEIRA.....	14
3.3 PROCESSAMENTO DO AZEITE DE OLIVA.....	15
3.3.1 Qualidade Do Azeite De Oliva.....	15
3.3.2 Benefícios Nutricionais Do Azeite De Oliva.....	16
3.4 IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DOS METAIS EM ÓLEOS VEGETAIS.....	16
3.4.1 Zinco.....	17
3.5 INFLUÊNCIA DA EMBALAGEM NO AZEITE DE OLIVA.....	18
3.5.1 Oxidação Lipídica.....	18
3.5.2 Estabilidade Do Azeite De Oliva E Formas De Estocagem.....	21
3.6 TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS.....	22
3.6.1 Microextração Em Fase Líquida (LPME).....	23
3.6.2 Microextração Líquido-líquido Dispersiva (DLLME).....	24
3.6.3 Microextração Líquido-líquido Dispersiva Em Fase Reversa (RP-DLLME).....	26
3.7 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA (FAAS).....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	43
4.2 MATERIAIS, REAGENTES E AMOSTRAS.....	29
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	29
4.3.1 Microextração Líquido-líquido Dispersiva Em Fase Reversa (RP-DLLME)....	29
4.3.2 Digestão Ácida.....	30
5 RESULTADOS	31
5.1 SOLVENTE DISPERSOR.....	31
5.2 OTIMIZAÇÃO DO VOLUME DO SOLVENTE DISPERSOR.....	32
5.3 SELEÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR.....	32
5.4 OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE ULTRASSOM.....	34
5.5 OTIMIZAÇÃO DA AGITAÇÃO COM VÓRTEX.....	35
5.6 PARÂMETROS DE MÉRITO.....	36
5.7 COMPARAÇÃO DO MÉTODO RP-DLLME COM A DIGESTÃO ÁCIDA.....	37
5.8 RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES DE Zn EM AMOSTRAS DE AZEITE DE OLIVA.....	39
6. CONCLUSÃO	41
7. REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais são importantes na nutrição humana e na indústria. Atualmente, mais de 80% da produção de óleos vegetais no mundo é destinada à alimentação humana (NUNES, 2007), o restante é utilizado na nutrição animal e para fins industriais, tais como na produção de cosméticos, alimentos, fármacos e outros (DUGO et al., 2004). Dentre os vários tipos de óleos vegetais o azeite de oliva é um dos mais comercializados e utilizados na culinária além de possuir propriedades nutritivas e terapêuticas.

A presença de metais em óleos vegetais podem ser introduzidos durante as etapas do processamento, tais como extração, armazenamento e transporte (MENDIL et al., 2009). Além disso, depende de vários fatores como a característica da espécie oleaginosa, utilização de fertilizantes, e outros (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2011). Em quantidades apropriadas estes metais são benéficos para o organismo. No entanto, altas concentrações de metais podem apresentar um efeito contrário sobre a qualidade do óleo, pois podem catalisar reações de oxidação de ácidos graxos, provocando a degradação do óleo e comprometendo a qualidade do produto final em relação a manutenção das propriedades, frescor e tempo de armazenamento (GONZALVEZ et al., 2010).

A embalagem pode influenciar diretamente a qualidade do óleo vegetal. Os materiais utilizados para o acondicionamento de azeite são vidros, plásticos e metais, os quais podem influenciar no aumento das concentrações de metais do produto devido a migração do metal da embalagem para o produto (BOSKOU, 2006).

Por isso é importante determinar a concentração de metais em alimentos, principalmente em óleos e gorduras. Essa determinação de metais ocorre normalmente por meio de técnicas espectrométricas, especialmente por espectrometria de absorção atômica (AAS) (NUNES, et al., 2011; ALMEIDA, et al., 2015; TRINDADE, et al., 2015; PEREIRA et al., 2016). Entretanto, a complexidade das amostras orgânicas, tais como os óleos vegetais, fazem com que o preparo das amostras para a posterior determinação de metais por AAS, seja uma etapa laboriosa e nem sempre simples. Assim, procedimentos alternativos para o preparo de amostras vêm sendo estudados. No preparo de amostras para determinações de

metais a RP-DLLME é um procedimento ainda pouco explorado que utiliza solvente extrator aquoso que irá determinar o fator de pré-concentração e solvente dispersor orgânico que irá auxiliar o processo de dispersão dos componentes do sistema, inversamente ao que ocorre na técnica DLLME convencional. Assim, a RP-DLLME é um procedimento alternativo para o preparo de amostras orgânicas que tem potencial para ser aplicado para determinação de Zn e também outros metais em óleos vegetais.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a extração e pré-concentração de Zn em óleos vegetais utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa para posterior determinação por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização em Chama e avaliar a influência do armazenamento no produto. O método foi aplicado para determinação de Zn em amostras de azeites de diferentes marcas e sistemas de embalagens, obtidas no comércio local da cidade de Ponta Grossa-PR. Os resultados obtidos foram comparados com a legislação vigente quanto a concentração de Zn.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a extração e pré-concentração de Zn em óleos vegetais utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa para posterior determinação de Zn por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização em Chama.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Otimizar as condições analíticas para extração e pré-concentração: tipo e concentração de solvente dispersor, concentração de solvente extrator e tempo de ultrassom da RP-DLLME para determinação de Zn em óleos vegetais.

Determinar os parâmetros de mérito para o método proposto: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), coeficiente de correlação linear (R^2), desvio padrão relativo (RSD) e fator de enriquecimento (FE).

Avaliar a exatidão do método proposto por meio da comparação dos resultados com os obtidos por digestão ácida e testes de recuperação.

Comparar resultados obtidos com a legislação vigente quanto a concentração de Zn.

Avaliar a migração de Zn das embalagens metálicas para amostras de óleo e a influência do tempo de armazenamento na qualidade final do produto.

Determinar a concentração de Zn em amostras de azeites de oliva de marcas e sistemas de embalagens diferentes.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E FUNÇÕES DOS ÓLEOS VEGETAIS

Os óleos e gorduras são utilizados em todo o mundo principalmente na alimentação ou em aplicações tecnológicas como a produção de sabões, velas e biodiesel (THOMAIDIS; FEORGIOU, 1999). São constituídos de moléculas de triacilglicerídeos ou triacilglicerois, os quais são compostos por três ácidos graxos de cadeia longa ligados na forma de éster a uma molécula de glicerol (MARTÍN-PELAÉZ et al., 2014). Podem ser provenientes de várias fontes, tais como soja, milho, canola, linhaça, polpa do dendê, algodão, coco, crambe, oliva, entre outras.

A diferença entre os azeites e os óleos é que o azeite é obtido por pressão, não é extraído por solventes químicos e não sofre o processo de refinação, enquanto que, os óleos são obtidos por pressão solventes e posterior purificação e refinação (BOSKOU, 2006).

Os lipídeos possuem função energética, funções estruturais e hormonais no organismo, auxiliam no transporte das vitaminas lipossolúveis (A,D,E,K), em alimentos são utilizadas como emulsificantes, aromatizantes, fritura, entre outras funções tecnológicas (BOSKOU, 2006). Além disso, óleos e gorduras residuais podem ser utilizados como matéria-prima para produção do biodiesel.

3.2 CARACTERÍSTICAS DA OLIVEIRA

Dentre os vários tipos de óleos vegetais o azeite de oliva é um dos mais comercializados e utilizados na culinária além de possuir propriedades nutritivas e terapêuticas. Geralmente, quando mencionado a árvore oliveira, está se referindo à *Olea europaea*, a espécie mais conhecida pelo cultivo de frutos comestíveis (BOSKOU, 2006). Os mesmos cultivares de oliveira podem ser usados para azeitona de mesa e produção de azeite (FOURATI; COSENTINI; KARRA, 2002).

O fruto contém água (até 70%), que é chamado de “água vegetal”. A composição química da azeitona é: 50% água, 1,6% proteína, 22% lipídeos, 19%

carboidratos, 5,8% celulose, 1,5% minerais (cinzas). Outros componentes importantes são as pectinas, ácidos orgânicos, pigmentos e compostos fenólicos (PERCUSI, 2007). Alguns dos componentes e produtos de hidrólise são encontrados na água vegetal, que é espremida com o óleo durante o processamento e é separada por centrifugação (PERCUSI, 2007).

3.3 PROCESSAMENTO DO AZEITE DE OLIVA

De acordo com as normas do *Codex Alimentarius*, *International Oil Olive Council* e Comunidade Europeia, o azeite de oliva virgem é o óleo do fruto da oliveira obtido unicamente a partir de processos mecânicos ou outros meios físicos, em condições que não alterem o azeite, e que não tenham sofrido qualquer tratamento além da lavagem, decantação, centrifugação e filtração excluindo os azeites obtidos com solventes, com adjuvantes de ação química ou bioquímica (BOSKOU, 2006).

A ANVISA (Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de 2000) classifica os azeites de oliva quanto ao processo de obtenção nas tais categorias: azeite de oliva virgem, azeite de oliva refinado, azeite de oliva e óleo de bagaço de oliva refinado. Em relação à acidez, o azeite de oliva virgem é classificado como extra virgem e virgem, essa acidez é expressa em ácido oleico o qual deve ser menos que 0,8% (BRASIL, 2005). Para ter essa característica, somente pode ser extraído a frio, sem passar por qualquer processo térmico ou químico que altere sua composição natural (PERCUSI, 2007). Os azeites são classificados de acordo com sua qualidade que são baseadas em alguns parâmetros, tais como peróxidos, determinação de ácidos graxos livres, absorvâncias espectrofotométrica na região UV, características organolépticas e solventes halogenados. Algumas organizações internacionais como o *Codex Alimentarius*, incluem além desses parâmetros, as impurezas insolúveis, determinação de matéria insaponificável e alguns metais (TSIMIDOU, 2006).

3.3.1 Qualidade Do Azeite De Oliva

Quando devidamente extraído da azeitona *in natura*, madura e de boa qualidade, o azeite tem um perfil de características sensoriais. Sua composição em ácidos graxos é caracterizada por um bom equilíbrio entre ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Pode ser consumido na forma bruta, conservando assim o conteúdo de vitaminas e compostos fenólicos de importância nutricional (PETRAKIS, 2006).

A qualidade do azeite de oliva é afetada por vários fatores, tais como técnicas agrônomicas, estação do ano, estado sanitário das azeitonas, estágio de maturação, sistema de colheita e transporte, método e duração da estocagem e tecnologias de processamento. A preservação da qualidade depende das condições adotadas para estocar o produto e do tempo de estocagem (RANALLI et al., 2000). Já os fatores que afetam as características dos óleos vegetais são: tipo de processamento, forma de armazenagem, exposição à luz e ao oxigênio do ar, adição de adulterantes (mistura com óleos mais baratos), calor e umidade (MORETTO; FETT, 1986).

3.3.2 Benefícios Nutricionais Do Azeite De Oliva

Várias pesquisas têm demonstrado que o azeite de oliva é benéfico para a saúde humana, pois possuem compostos que protegem o organismo contra agentes externos e do desenvolvimento de doenças. O azeite de oliva possui mais de 230 compostos, entre os quais os esteróis, esqualeno, álcoois alifáticos, tocoferóis, pigmentos e compostos fenólicos. (LUH et al., 2005). De acordo com Owen e colaboradores (2000), as propriedades promotoras de saúde do azeite de oliva são resultado do perfil da fração fenólica, juntamente com as altas concentrações de esqualeno e de ácido graxo monoinsaturado – ácido oleico.

Um consumo habitual de azeite de oliva fornece uma fonte contínua de antioxidantes que podem reduzir o estresse oxidativo através da inibição da peroxidação lipídica, um fator diretamente ligado às doenças como câncer, doenças cardíacas e o envelhecimento. Os compostos fenólicos também auxiliam na prevenção de doenças inflamatórias, endócrinas e microbianas, auxiliando o sistema

imunológico do organismo e evitando a sua desregulação (FRANKEL, 2011). Estes compostos além de serem importantes para a manutenção e proteção da saúde humana, também são responsáveis pelo sabor e estabilidade do azeite de oliva.

3.4 IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DOS METAIS EM ÓLEOS VEGETAIS

A presença de metais em determinados níveis nos alimentos tem uma função importante na nutrição humana, seja pela essencialidade ou pela toxicidade destes. Além disso, a concentração de metais pode ser um significativo parâmetro sobre a qualidade e conservação de determinados produtos alimentícios (IBANEZ; CARREON-ALVAREZ; BARCENA-SOTO; CASILLAS, 2008).

Metais em óleos e gorduras comestíveis ocorre em quantidades muito pequenas e são provenientes do metabolismo da planta ou animal de origem ou de contaminações nos processos industriais de refino (ALLEN et al., 1998). A determinação dos metais é de grande importância em óleos vegetais, pois metais como Co, Cu e Zn agem como catalisadores da oxidação lipídica. Essa determinação de metais ocorre normalmente por meio de técnicas espectrométricas. As alterações que ocorrem nos compostos lipídicos normalmente resultam no desenvolvimento de odores e sabores indesejáveis que levam a rejeição do alimento, reduzindo seu tempo de comercialização. Depois da deterioração microbiana, a oxidação que leva a instalação do ranço é a segunda causa mais importante da deterioração de alimentos (LINDLEY, 1998).

Estes metais podem ser provenientes tanto do alimento quanto da própria embalagem, principalmente embalagens revestidas com cobre galvanizado, devido isso os alimentos, principalmente os azeites, podem apresentar aumento no teor dos metais tais como cobre, ferro e zinco por migração da embalagem para o produto. Estes metais podem acelerar a reação de oxidação a qual pode formar compostos tóxicos, além de tornar o produto impróprio para o consumo. Um dos metais presentes tanto na composição da embalagem de lata e no azeite é o zinco, o qual mesmo sendo um elemento essencial em altas concentrações pode apresentar toxicidade (ALLEN et al., 1998).

3.4.1 Zinco

O Zn é o microelemento intracelular mais abundante encontrado em todos os tecidos corpóreos, porém 85% do seu total está concentrado nos músculos e ossos (KING; SHAMES; WOODHOUSE, 2000). Também é acumulado no pâncreas, o qual induzirá a produção de metalotioneína, que por sua vez reduzirá a toxicidade de outros metais, tais como Cd, Cu e Hg (ONOSAKA; TETSUCHIKAHARA; MIN, 2002). Desempenha um papel importante no desenvolvimento e na manutenção do sistema imune, tais como resposta de linfócitos a mitógenos e como cofator do hormônio do timo, a timulina (DELAFUENTE, 1991), porém se altas doses são ingeridas podem ocorrer dores estomacais, náuseas e vômitos. Por vários meses pode causar anemia, danos pancreáticos e diminuição do HDL no sangue (ATSDR, 1994).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2011) recomenda a ingestão diária de 7 mg de Zn para um adulto, de 5,6 mg para criança entre 7-10 anos e para as gestantes é recomendado 11 mg por dia.

3.5 INFLUÊNCIA DA EMBALAGEM NO AZEITE DE OLIVA

3.5.1 Oxidação Lipídica

A oxidação lipídica consiste de uma série complexa de reações, em que há participação de oxigênio e radiações luminosas, entre outros fatores. Estas reações afetam a qualidade dos óleos, levando ao surgimento de uma alteração sensorial conhecida como rancidez oxidativa, que frequentemente resulta em rejeição do produto (AZEREDO, 2001). A oxidação lipídica é constituída de três fases principais: a iniciação, a propagação e a terminação (SEVANI; HOCHSTEIN, 1985). Como pode ser visto na Figura 1.

Figura 1. Etapas da oxidação lipídica



Fonte: Azeredo (2011)

A oxidação lipídica é iniciada pela formação de radicais livres, mesmo no caso da oxidação lipídica catalisada por enzimas. A energia de ativação, necessária para a formação dos primeiros radicais livres, pode ser fornecida por uma fonte de energia térmica, radiação, oxigênio singlete ou outras fontes. Os ácidos graxos insaturados, principalmente os di e tri-insaturados, são mais facilmente convertidos em radicais livres que ácidos graxos saturados uma que um átomo de hidrogênio é mais facilmente removido da molécula se uma ligação dupla está localizado no átomo de carbono adjacente (POKORNY; SCHMIDT; PARKÁNYIOVÁ, 2005). Uma carga de energia substancialmente menor é necessária para produzir radicais livres a partir de produtos de oxidação lipídica, especialmente na presença de metais de valência transitória, tais como cobre, ferro ou manganês (KAMAL-ELDIN; POKORNY, 2005).

O oxigênio reage com um carbono livre da molécula lipídica formando um radical peróxido. Os radicais peróxidos possuem alta energia e retiram um átomo de hidrogênio da molécula do lipídio. Assim, o radical peroxil se converte em uma molécula de hidroperóxido, e então, outro radical lipídico é produzido. Este processo pode ser repetido muitas vezes. Quando presentes em abundância, os radicais livres são muito reativos e reagem facilmente com outros radicais livres formando dímeros

e polímeros. Os hidroperóxidos, especialmente os de ácidos graxos poli-insaturados, são muito instáveis. Os produtos secundários da oxidação lipídica também são instáveis; os aldeídos são muito reativos (KAMAL-ELDIN; POKORNY, 2005). Eles são facilmente oxidados em peroxiácidos, que são instáveis e se decompõem em outros produtos. Os aldeídos, álcoois e cetonas são oxidado em hidroperóxidos, e moléculas com cadeias menores são formadas pela dissociação destes compostos (KAMAL-ELDIN; POKORNY, 2005).

Os produtos secundários de oxidação de lipídios são principalmente produtos de baixo peso molecular, como aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos de cadeia curta (CHOE; LEE; MIN, 2005). O tempo para formação destes produtos derivados dos hidroperóxido é diferente para cada tipo de óleo. No azeite de oliva estes produtos formam imediatamente após a formação dos hidroperóxidos (VELASCO; ANDERSEN; SKIBSTED, 2003).

A oxidação lipídica ocorre quando o óleo, o oxigênio e catalisadores estão em contato. Tanto a concentração, quanto ao estado do oxigênio, são importantes na oxidação. A concentração de oxigênio dissolvido no óleo depende da pressão parcial de oxigênio no *headspace*. Quanto maior a concentração de oxigênio no *headspace*, maior será sua concentração dissolvida no óleo, e assim, maior será a oxidação do produto (DI GIOVACCHINO et al., 2002).

A taxa de oxidação lipídica depende de vários fatores. A oxidação aumenta com o aumento da temperatura, pressão de oxigênio e radiação. A oxidação é catalisada por metais pesados e inibida por antioxidantes. A água e os vários componentes não-lipídicos também podem afetar significativamente o processo. A oxidação lenta pode ocorrer no caso do armazenamento refrigerado e sob pressão de oxigênio reduzida ou em atmosfera com gás inerte (VELASCO; ANDERSEN; SKIBSTED, 2003). Os antioxidantes podem apenas reduzir a taxa de oxidação e não pará-la completamente (KAMAL-ELDIN; POKORNY, 2005). A auto-oxidação e a foto-oxidação são os principais mecanismos de oxidação de óleos comestíveis durante o processamento e armazenamento.

O azeite de oliva virgem é um óleo estável e sua vida útil é maior se comparada a de outros óleos comestíveis. A sua composição em ácidos graxos e a presença de antioxidantes (principalmente compostos fenólicos polares e α -tocoferol) são considerados os fatores-chave da resistência do azeite de oliva à auto-oxidação. Uma série de outros componentes, como ácidos graxos livres,

pigmentos, hidrocarbonetos insaturados, enzimas e traços de metais podem afetar positiva ou negativamente a estabilidade oxidativa do azeite, embora em menor medida (BOSKOU, 2006).

3.5.2 Estabilidade Do Azeite De Oliva E Formas De Estocagem

A vida útil do azeite de oliva depende do tipo de embalagem ou recipiente em que está contido. Tanques de aço inoxidável, latas de folha-de-flandres e recipientes de vidro podem proteger o azeite do oxigênio e da luz. Polímeros com características especiais, tais como polietileno tereftalato revestido com resina de alta barreira e com absorvedor de oxigênio está sendo sugerido como uma alternativa promissora para o vidro tradicional (GAMBACORTA *et al.*, 2004).

A embalagem deve ser projetada com o objetivo de obter melhor estabilidade à oxidação e assegurar uma vida útil adequada. Três fatores são importantes para a escolha de materiais de embalagem: impermeabilidade ao óleo, impermeabilidade aos gases e proteção contra luz (PIERGIOVANNI; LIMPO, 2010). Os materiais utilizados nas embalagens de azeite são plástico, vidro e latas de aço. As latas, como as de folha-de-flandres, não são transparentes e são impermeáveis, estes recipientes são também resistentes aos danos mecânicos e são adequadas para a litografia. O vidro é um material inerte e impermeável aos gases, mas o seu efeito protetor contra a luz pode variar.

Os consumidores geralmente preferem vidro transparente, pois permite a visualização do azeite, o que, no entanto, não é recomendado uma vez que a foto-oxidação ocorre facilmente em vidro transparente (BOSKOU, 2006). A embalagem de vidro apresenta várias vantagens em relação a outros tipos de embalagens, porém o produto torna-se mais caro. As latas de folha-de-flandres oferecem proteção ao produto e são resistentes, porém se o material for de baixa qualidade, ou o processo de galvanização não foi eficiente, com o tempo poderá influenciar a vida de prateleira, no caso dos azeites poderá ocorrer a migração de metais, tais como Fe e Zn da embalagem para o produto (OLIVEIRA, 2006).

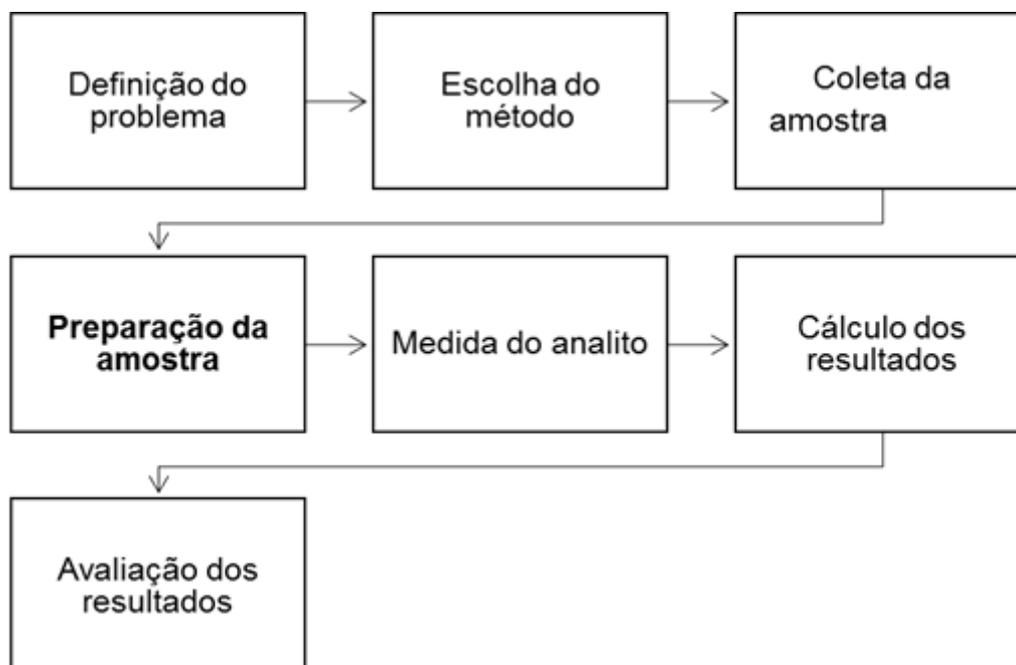
A embalagem para óleo vegetal comestível deverá, fundamentalmente, atuar no controle dos parâmetros que afetam a oxidação, ou seja, deverá apresentar boa barreira ao oxigênio, à umidade e à radiação, especialmente na faixa do ultravioleta. Também é essencial que a tampa da embalagem impeça o vazamento do produto e

garanta ao sistema de embalagem pelo menos a mesma barreira ao oxigênio oferecida pelo corpo da embalagem. Outras propriedades desejadas são a resistência à carga vertical e a resistência ao colapso, que pode ocorrer devido ao consumo do oxigênio residual no interior da embalagem (OLIVEIRA, 2006).

3.6 TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS

Os métodos analíticos espectrofotométricos são utilizados para determinar metais em vários tipos de amostras, desde as inorgânicas simples até as amostras orgânicas complexas, tais como óleos vegetais e biodiesel. Uma das etapas mais importantes, principalmente em análise de alimentos, é o preparo da amostra. Geralmente nesta etapa consome mais tempo da análise, cometem mais erros e pode possuir um maior custo se comparado com as outras etapas do protocolo analítico, como mostra a Figura 2.

Figura 2. Etapas do processo analítico



Fonte: Autoria própria (2017)

A etapa de preparo de amostras constitui o conjunto dos procedimentos necessários para converter física e quimicamente uma amostra em uma forma que permita contornar as limitações impostas pela natureza e a morfologia da mesma, a

determinação do(s) analito(s) e realizar sua quantificação o quanto mais precisa e exata (CAVICCHIOLI; GUTZ, 2003). Os procedimentos empregados para tal propósito dependem da natureza da amostra, dos analitos a serem determinados, bem como de suas concentrações, da técnica empregada para a determinação e, por fim, da precisão e exatidão desejadas (ARRUDA; SANTELLI, 1997; DUTRA; SANTOS; COELHO, 2004).

Atualmente, existem vários procedimentos de preparo de amostras, a escolha da técnica depende de alguns fatores, tais como o tipo de matriz (orgânica, inorgânica, amostras complexas, etc.), propriedades físico-químicas do analito e o método de detecção a ser utilizado. Algumas dessas técnicas são muito utilizadas e denominadas de técnicas tradicionais, tais como a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*); extração sólido-líquido (SLE, do inglês *solid-liquid extraction*); extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) e extração por fluido supercrítico (SFE, do inglês *supercritical fluid extraction*) (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Por isso, existe a necessidade de desenvolver procedimentos mais simples, que utilizem um menor volume de solventes e possuam um baixo custo. Entre os procedimentos modernos de preparo de amostra, estão a microextração em fase líquida (LPME, do inglês *liquid phase microextraction*); microextração em gota única (SDME, do inglês *single-drop microextraction*); microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LMPE, do inglês *hollow fiber liquid phase microextraction*); microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*) e a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME, do inglês *reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction*). Além disso, o emprego de grandes quantidades de solventes tóxicos aliado aos riscos e preocupações ambientais contribuiu para o desenvolvimento de procedimentos miniaturizados (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

3.6.1 Microextração Em Fase Líquida (LPME)

Esta técnica surgiu em 1996 onde foram apresentados os trabalhos de Liu e Dasgupta (1996) e Jeannot e Cantwell (1996) com o intuito de substituir a técnica de preparo de amostra extração líquido-líquido (LLE). Mais tarde, a partir da microextração em fase líquida foram desenvolvidas técnicas mais específicas como

a DLLME e a RP-DLLME. Os diferentes modos de aplicação da LPME (microextração em gota única, microextração líquido-líquido dispersiva e de fibra oca) têm sido cada vez mais empregados para a extração de analitos inorgânicos e orgânicos em diferentes matrizes. Suas vantagens sobre os procedimentos de extração convencionais são: a simplicidade, eficácia, rapidez e baixo consumo de solventes orgânicos, e, desta forma, tem atraído atenção de analistas de alimentos, pois a aplicação dessas técnicas tem apresentado bons resultados (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008; ASENSIO-RAMOS et al., 2011; CARASEK; MERIB, 2015). A LPME tem demonstrado sua versatilidade, além de outras vantagens como: a elevação dos fatores de enriquecimento dos analitos e a facilidade de introdução em sistemas cromatográficos ou eletroforéticos (DE OLIVEIRA et al., 2008; PROSEN, 2014).

3.6.2 Microextração Líquido-líquido Dispersiva (DLLME)

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) foi descrita por Rezaee e colaboradores em 2006. Esta técnica se baseia na partição dos analitos entre duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma delas a fase aquosa (a amostra) e a outra uma fase orgânica (solvente orgânico). A diferença entre a maior polaridade da fase aquosa e a menor polaridade da fase orgânica determina a distribuição do analito entre as fases. A dispersão forma um estado turvo consistindo de inúmeras gotículas extratoras que favorece a transferência do analito da amostra para o solvente extrator (BAN et al., 2000). É uma técnica de extração e pré-concentração da amostra e que atende os requisitos de análises modernas: utiliza pouca quantidade de solvente (μL), é de baixo custo e permite análises rápidas e eficientes (MARTINS; PRIMEL; CALDAS, 2012).

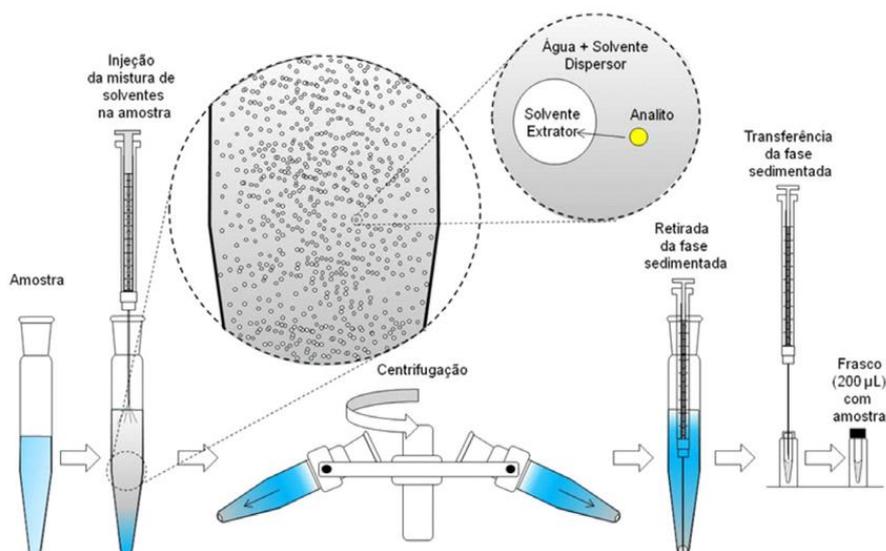
O solvente extrator deve ser imiscível na amostra, ter maior densidade e possui uma boa capacidade de extração do analito de interesse. Entre os solventes mais utilizados como extratores estão os hidrocarbonetos halogenados como clorofórmio, diclorometano, clorobenzeno, tetracloreto de carbono e tetracloroetileno (LIN et al.; 2011). Estes solventes podem ser substituídos por líquidos iônicos, que além de menos tóxicos, podem ser injetados diluídos no sistema analítico (RAO; RAJU; VALI, 2013; VAZQUEZ et al.; 2013). Em relação ao volume de solvente extrator, o aumento do volume deste solvente promove aumento do volume da fase

sedimentada (REZAEI et al.; 2006) e, embora a recuperação permaneça quase constante, o fator de enriquecimento poderá diminuir, levando a perdas na detectabilidade dos analitos de interesse. Geralmente são utilizados 5-100 μL (ZANG et al., 2009).

O solvente dispersor deve ser solúvel na fase aquosa e na fase orgânica, sua função é promover o aumento na eficiência de extração, pois favorece a dispersão do solvente extrator na forma de pequenas gotículas na amostra, de modo que a área superficial do solvente extrator em contato com a amostra contendo o analito. Os solventes dispersores mais utilizados são: metanol, etanol, acetonitrila, acetona e tetraidrofurano (ZANG et al., 2009; HUO et al.; 2011; REZAEI et al.; 2008; YAN et al.; 2011). O volume deste solvente pode afetar diretamente a formação da solução turva e da eficiência da extração.

A Figura 3 mostra como ocorre o procedimento para realizar a DLLME. O solvente extrator e o solvente dispersor são injetados rapidamente na amostra aquosa com o auxílio de uma micro seringa. A injeção da mistura forma uma solução turva. Após a centrifugação, as gotículas do solvente extrator se depositam no fundo do tubo e são retiradas com uma micro seringa para posterior análise (ZANG et al.; 2009; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; FARAJZADEH; DJOZAN; BAKHTIYARI, 2010; KOCUROVA et al.; 2012). Logo, o tempo de extração é definido como o intervalo entre a injeção da mistura dos solventes e a centrifugação.

Figura 2. Etapas da DLLME



Fonte: Caldas et al., (2011)

A DLLME supera as técnicas convencionais de LPME, pois não necessita de um tempo longo para alcançar o estado de equilíbrio, além de possuir um aumento da área de contato entre a amostra e o solvente extrator, com isso ela possui um aumento na eficiência nos fatores de enriquecimento se comparada a LPME. Outras vantagens da DLLME são a simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, fácil manipulação, baixo consumo de solventes orgânicos e alta recuperação (CARNEIRO, 2016). No entanto, como toda técnica apresenta algumas desvantagens tais como o fato de a centrifugação limitar o volume da amostra, o uso de solventes tóxicos e elevados tempo de processo e habilidade do analista.

3.6.3 Microextração Líquido-líquido Dispersiva Em Fase Reversa (RP-DLLME)

Uma das limitações da determinação de metais é a complexidade da matriz, que geralmente requer um tratamento de amostras diferenciado que limita a detecção, principalmente em amostras com alto teor orgânico como o óleo vegetal. Assim, é importante uma etapa de pré-concentração dos analitos para atingir os mais baixos limites de detecção possíveis. A técnica DLLME convencional ocorre com a utilização de um solvente extrator orgânico imiscível na amostra aquosa e miscível em um solvente dispersor polar formando um sistema ternário de solventes. É muito utilizada e supera as técnicas convencionais, porém para amostras orgânicas é recomendada seu modo reverso a RP-DLLME que foi proposta por Hashemi e seus colaboradores em 2010, e ocorre pela utilização de solvente extrator aquoso e solvente dispersor orgânico inversamente ao que ocorre na técnica de DLLME convencional. De acordo com os princípios da RP-DLLME, a amostra deve ser solúvel em solventes orgânicos para que o analito consiga migrar para a fase aquosa e ser concentrado.

No modo reverso (RP-DLLME) a amostra apresenta características orgânicas e por isso os solventes extratores clorados, normalmente utilizados na DLLME convencional, são substituídos por soluções aquosas. Nesta técnica um pequeno volume de água ou solução tampão aquosa, é dispersa em um solvente orgânico de polaridade média que atua como solvente dispersor e que permite a eliminação total da fração orgânica da amostra. Assim, a fase aquosa contendo os analitos é separada, sedimentada e posteriormente injetada no equipamento para análise (HASHEMI et al., 2010).

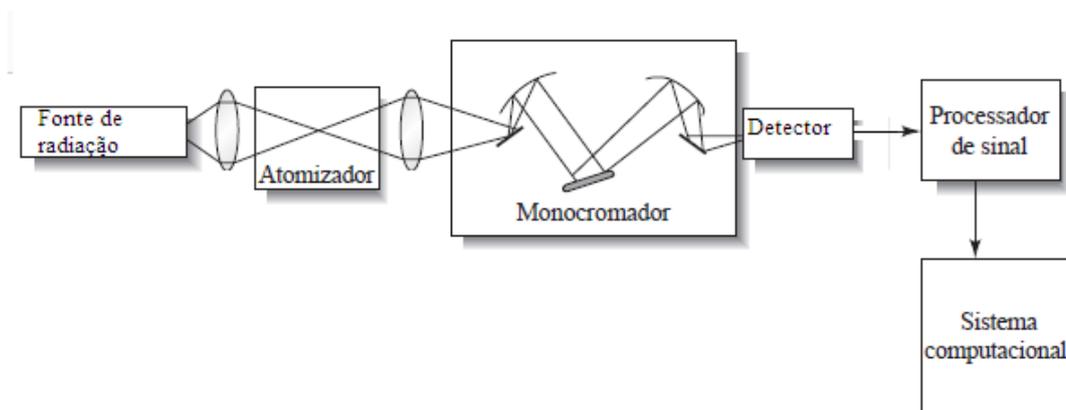
O procedimento ainda é pouco explorado, mas apresenta-se como uma boa alternativa para a determinação de metais em amostras orgânicas, já que elimina os problemas relacionados a matriz complexa. Além de possuir vantagens, tais como elevadas recuperações e fatores de enriquecimento, fácil manipulação, baixo custo e baixo consumo de solventes.

3.7 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO EM CHAMA (FAAS)

A Espectrometria de Absorção Atômica pode ser utilizada em determinações qualitativas e quantitativas de metais, semi-metals e alguns não metais em amostras biológicas, ambientais, geológicas e principalmente em alimentos. Para determinar metais em óleos vegetais pode ser utilizado espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado ou espectrometria de massa, no entanto, a de absorção atômica em chama é a mais utilizada.

O princípio se baseia no fenômeno de absorção de energia radiante por átomos livres no estado gasoso (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). O sistema básico de um espectrofotômetro de absorção atômica é constituído de fonte de radiação, atomizador, monocromador, um detector, um processador de sinais e um sistema computacional conforme demonstrado na Figura 4 (HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009).

Figura 4. Sistema básico de um espectrofotômetro de absorção atômica



Fonte: KOOG et al., (2006)

A FAAS está entre os métodos espectrométricos mais usados na determinação individual de metais devido a sua relativa simplicidade, robustez,

efetividade e baixo custo. Porém, a FAAS é limitada a determinações monoelementares, pois apenas um analito pode ser determinado por vez devido à necessidade de uma lâmpada para cada elemento (SKOOG, et al. 2006).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

Todas as medidas foram realizadas em um Espectrômetro de Absorção Atômica AAnalyst 700, (Perkin Elmer-Sciex, Thornhill, Canadá) em comprimento de onda 213,9 nm utilizando chama ar-acetileno. As alíquotas das amostras em triplicata foram medidas em balança analítica (Mark, Bel Engineering) e após a extração, centrifugadas em centrífuga (LAB1000 ADAMO, Brasil).

4.2 MATERIAIS, REAGENTES E AMOSTRAS

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A água ultrapura com resistividade de 18 MΩ cm, purificada em purificador (Master All 2000, Gehaka). Soluções de HNO₃ ultra puro (Merck) e solvente isopropanol foram utilizados para a extração e pré-concentração dos analitos. Para a digestão ácida foram utilizados os ácidos HNO₃ e H₂SO₄ concentrados e também H₂O₂. Solução estoque de padrão organometálico de Zn (Specsol) contendo 100 mg L⁻¹ foi utilizada para o preparo da curva de calibração. As amostras de azeite de oliva foram de diferentes sistemas de embalagens (lata e vidro) e de três marcas. Para o teste de recuperação foram utilizadas amostras de óleos de soja e milho e para a digestão ácida foram utilizadas as amostras de óleos e gorduras vegetais, tais como canola, crambe + soja, coco, gergelim, girassol, linhaça, manteiga, milho, 4 marcas de azeite de oliva, óleo de peixe e de soja. Todas amostras foram adquiridas no comércio local do município de Ponta Grossa – PR.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Microextração Líquido-líquido Dispersiva Em Fase Reversa (RP-DLLME)

Para este procedimento aproximadamente 5 g de cada amostra de azeite de oliva foram pesados e transferidos para tubos de centrífuga cônicos tipo Falcon de

15 mL, que então foram aquecidos em banho-maria entre 90 ± 5 °C. Ao conteúdo de cada tubo foi adicionada uma mistura contendo solvente dispersor (isopropanol) e solvente extrator (solução HNO₃ 1%), na proporção 1:1 v/v, utilizando uma micropipeta de volume fixo de 1 mL. Em seguida, a mistura foi agitada por 20 segundos em agitador do tipo – Vórtex e o tubo foi colocado em banho ultrassônico a temperatura controlada 50 ± 5 °C por um tempo de 10 minutos. Na sequência as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos para a separação das fases. O conteúdo sobrenadante foi descartado e a fase aquosa, contendo os analitos foi analisada por FAAS. Para as determinações por RP-DLLME, o procedimento de calibração seguiu o mesmo procedimento das amostras, ou seja, foi realizada a calibração com padrão de Zn em meio orgânico usando a RP-DLLME, as medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão e a concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$.

4.3.2 Digestão Ácida

Para verificação da exatidão do método proposto, foram utilizadas as amostras de óleos e gorduras vegetais, tais como canola, crambe + soja, coco, gergelim, girassol, linhaça, manteiga, milho, 4 marcas de azeite de oliva, óleo de peixe e de soja, as quais foram digeridas baseando-se no procedimento descrito por Korn e seus colaboradores em 2010. Aproximadamente 0,5 g de cada amostra foi pesado em tubos de digestão, adicionado de 5 mL de HNO₃ + 2 mL de H₂SO₄ + 1 mL de H₂O₂ 30%. Os tubos foram aquecidos a 90 ± 5 °C por 2 h, posteriormente adicionados de 3 mL de HNO₃ + 1 mL de H₂O₂ 30% v/v e aquecidos novamente a 220 ± 5 °C por 40 min. Após período de resfriamento, foram adicionados 2 mL de HNO₃ + 4 mL de H₂O₂. O sistema foi aquecido a 180 ± 5 °C até completa dissolução dos componentes. As soluções resultantes foram então filtradas em papel filtro quantitativo e avolumadas para 25 mL com água ultrapura.

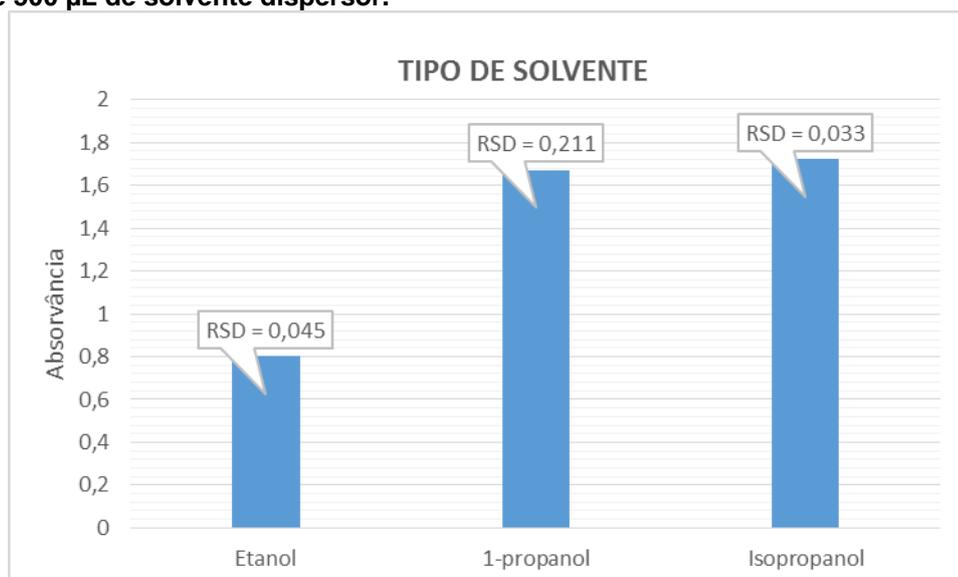
5. RESULTADOS

Alguns fatores podem influenciar na eficiência da extração por RP-DLLME, por isso deve ser feito alguns testes antes do início do processo. São vários fatores que podem influenciar no resultado final, tais como concentração e volume do solvente extrator e do solvente dispersor, volume da amostra, solubilidade do solvente, tempo, temperatura, entre outros. O procedimento descrito foi realizado em todas as etapas de otimização.

5.1 SOLVENTE DISPERSOR

Um dos parâmetros importantes para a escolha do tipo de solvente dispersor é a sua solubilidade e o volume que afeta diretamente a formação das micro-gotas de água, o grau de dispersão do solvente na fase aquosa e na eficiência da extração (ANTHEMIDIS; IOANNOU, 2009). Foram testados três tipos de solventes: o etanol, isopropanol, e 1-propanol. Após a escolha do solvente foi testado a concentração do mesmo. Os resultados obtidos estão apresentados no Gráfico 1.

Gráfico 1. Efeito do tipo de solvente dispersor sobre a extração e pré-concentração de Zn. Condições experimentais: 5 g de amostra, 10 min de aquecimento ($90 \pm 5^\circ\text{C}$), 20 s de vórtex e 10 min de ultrassom, 1 mL de mistura extratora contendo 500 μL de ácido nítrico 3 % v/v como extrator e 500 μL de solvente dispersor.



Fonte: Autoria própria (2017)

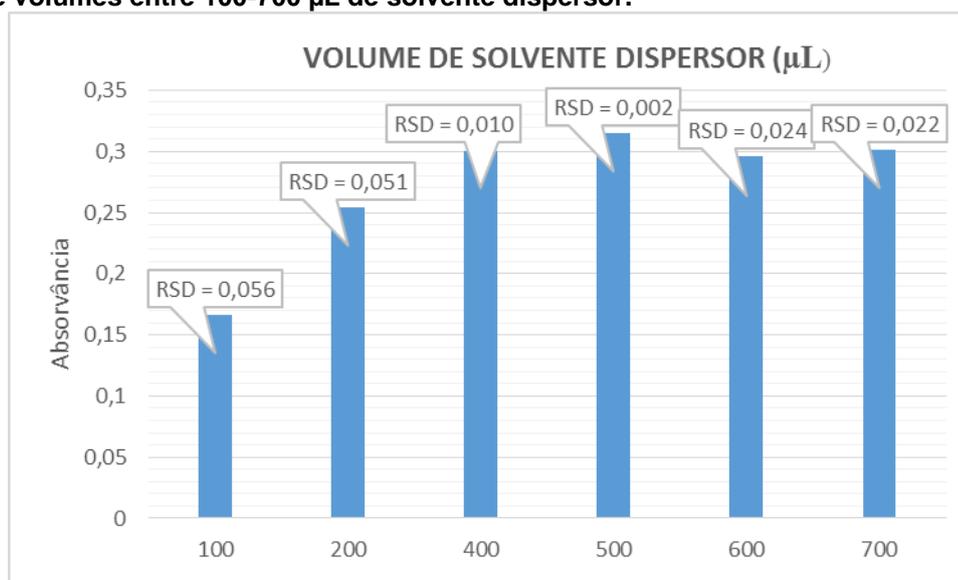
Conforme observado os agentes dispersores mais eficientes foram o 1-propanol e o isopropanol. No entanto, o isopropanol apresentou menor desvio

padrão e um melhor valor médio de absorvância, tornando-se ideal para este trabalho. Esses solventes foram melhores devido as suas propriedades físico-químicas. O isopropanol possui 82,5 °C de ponto de ebulição e o ponto de fusão de -86 a -89 °C, flutua e mistura com água, miscível com a maioria dos solventes orgânicos, densidade relativa do líquido 0,785 a 20 °C, porém produz vapores irritantes. Já o propanol possui ponto de ebulição de 97,2 °C e ponto de fusão de -127 °C, densidade relativa do líquido 0,803 a 25 °C e miscível em água (LIDE; DAVID R, 2002).

5.2 OTIMIZAÇÃO DO VOLUME DO SOLVENTE DISPERSOR

O volume do solvente dispersor influencia no volume da fase sedimentada. Para realizar os testes o volume do solvente dispersor foi otimizado avaliando as amostras contendo a solução extratora de HNO₃ com diferentes volumes do solvente dispersor isopropanol os quais variaram de 100 a 700 µL como mostra o Gráfico 2.

Gráfico 2. Efeito do volume de Isopropanol sobre extração e pré-concentração de Zn.
Condições experimentais: 5 g de amostra, 10 min de aquecimento (90 ± 5°C), 20 s de vórtex e 10 min de ultrassom, 1 mL de mistura extratora contendo 500 µL de ácido nítrico 3 % v/v como extrator e volumes entre 100-700 µL de solvente dispersor.



Fonte: Autoria própria (2017)

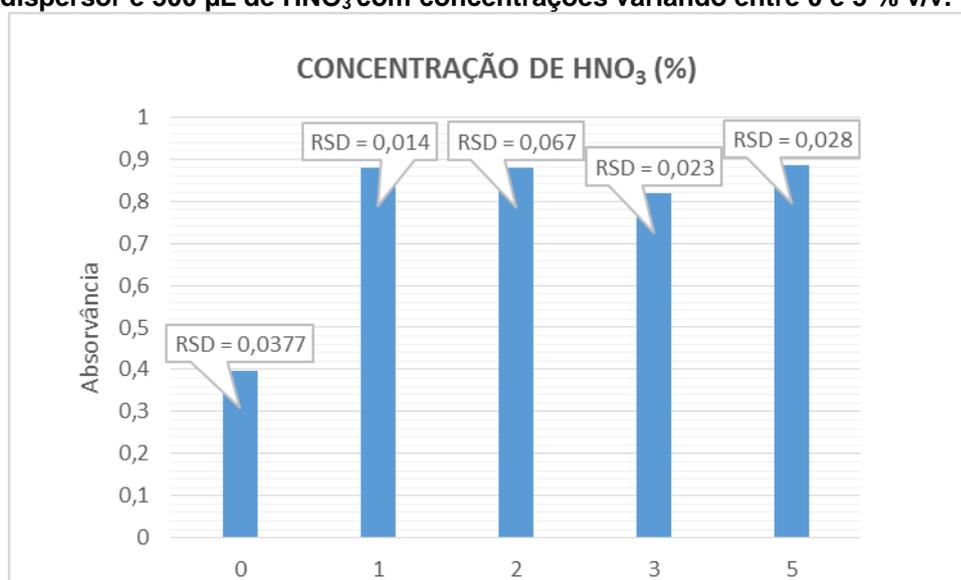
A ausência do solvente dispersor isopropanol não obteve um resultado significativo para as amostras analisadas. O aumento na concentração de

isopropanol proporcionou um aumento na extração do metal nas amostras. No entanto, ao analisarmos os volumes de 600 e 700 μL podemos notar que não há diferença significativa nos sinais obtidos, porém a melhor condição observada e que apresentou um baixo desvio padrão ocorreu com o volume de 500 μL de isopropanol. Além disso, a utilização de 500 μL proporciona uma boa precisão, também reduz o consumo de solvente.

5.3 SELEÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR

Para a eficiência da extração foi avaliada a influência da concentração do ácido extrator (solução de HNO_3) a qual o procedimento realizado foi o mesmo somente variou a concentração do solvente extrator entre 0 % e 5 %. Os resultados obtidos estão apresentados no Gráfico 3.

Gráfico 3: Efeito da concentração de HNO_3 sobre extração e pré-concentração de Zn. Condições experimentais: 5 g de amostra, 10 min de aquecimento ($90 \pm 5^\circ\text{C}$), 20 s de vórtex e 10 min de ultrassom, 1 mL de mistura extratora contendo 500 μL de isopropanol como solvente dispersor e 500 μL de HNO_3 com concentrações variando entre 0 e 5 % v/v.



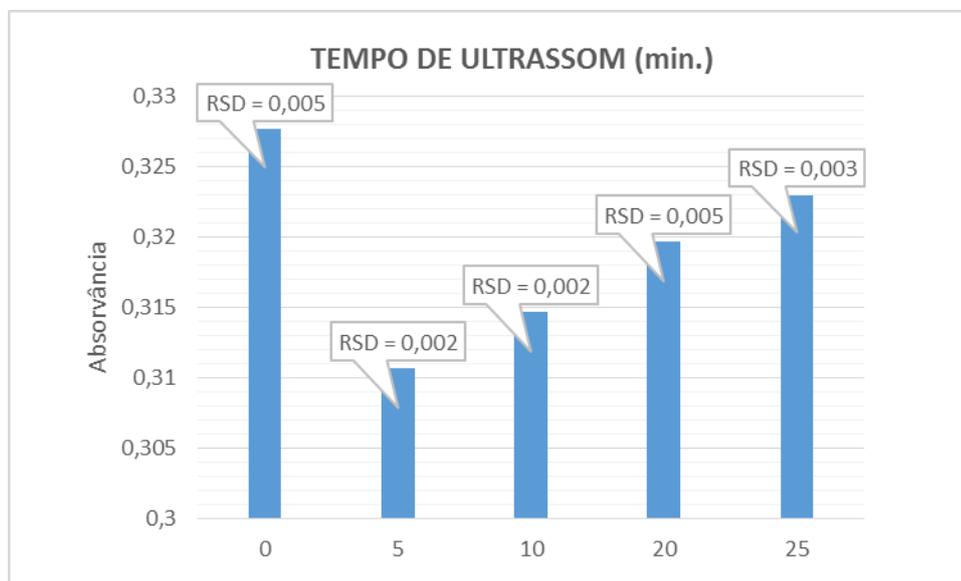
Fonte: Autoria própria (2017)

Com isso podemos concluir que exceto para a concentração de 0 % de HNO_3 na solução extratora que apresentou um grande desvio padrão, não há diferença significativa entre as concentrações com relação a eficiência de extração, desta forma a concentração adotada foi a de 1 %. No trabalho realizado por Lima e

seus colaboradores em 2011, os autores desenvolveram um método alternativo para determinação de metais em amostras de fertilizantes usando extração assistida por ultrassom, para isso avaliaram a influência do HCl e HNO₃ como extrator e concluíram que com o HNO₃ obteve uma melhora na extração dos metais nas amostras de fertilizantes, além disso, os autores observaram que a utilização de ácido nítrico em concentrações maiores não apresentam uma diferença significativa no resultado final se comparado com concentrações abaixo de 50% v v⁻¹. Outro trabalho que utilizou HNO₃ como solução extratora foi proposto em 1991 por Saleh e seus colaboradores, os autores desenvolveram um método para a extração de Cu e Fe do óleo de palma a uma solução aquosa, as amostras foram analisadas por espectrometria de absorção atômica com chama e obtiveram fator de recuperação de aproximadamente 98% para os metais.

5.4 OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE ULTRASSOM

O ultrassom baseia-se na ação de ondas mecânicas de baixa frequência, as quais são responsáveis pela formação e colapso de microbolhas ocasionando áreas pontuais de alta pressão e temperatura na solução (LUZ, 1998). A sua operação é simples e rápida tornando-se um processo eficiente na extração de metais em amostras de alimentos. O resultado obtido, conforme apresentado no Gráfico 4 indica que não existe diferença significativa de extração com diferentes tempos de extração exceto para o tempo 0 com alto desvio padrão o que significa falta de homogeneidade na amostra. Assim, o tempo de 10 min foi definido como o melhor para a extração efetiva. No trabalho realizado por Cypriano J. (2008), o autor propôs um método para a determinação de Cu e Pb em azeite de dendê usando redissolução potenciométrica e posteriormente as amostras foram analisadas por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS). O autor avaliou a eficiência do banho ultrassônico na extração na recuperação de Cu e Pb na amostra de azeite de dendê e observou que a energia ultrassônica acelera a taxa de recuperação dos metais para o meio aquoso. Portanto, o uso da energia de ultrassom para auxiliar na etapa de preparo das amostras se mostrou eficaz.

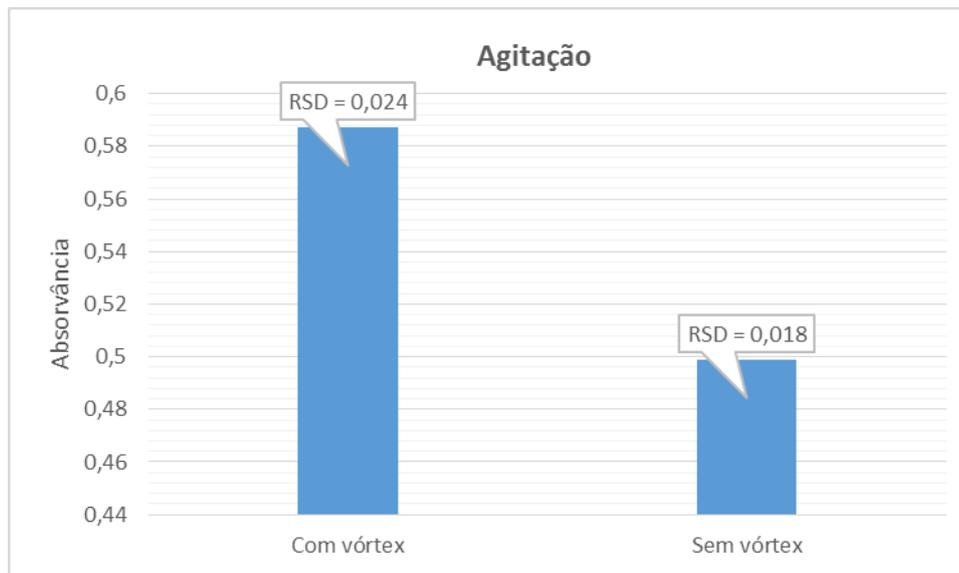
Gráfico 4: Otimização do tempo de banho ultrassônico

Fonte: Autoria própria (2017)

5.5 OTIMIZAÇÃO DA AGITAÇÃO COM VÓRTEX

A otimização da agitação em vórtex foi realizada com as condições previamente otimizadas. A distribuição não-homogênea do analito pode interferir no resultado final, assim como danificar o equipamento. Nesse caso foi realizada a análise em três tubos com agitação em vórtex e três tubos sem agitação. O resultado obtido está apresentado no Gráfico 5.

Gráfico 5. Otimização do tipo de agitação: com vórtex e sem vórtex



Fonte: Autoria própria (2017)

Os resultados demonstram que para o procedimento com agitação apresentou um valor de absorvância mais elevado porém demonstrou um alto valor de desvio padrão, desta maneira a agitação com vórtex foi utilizada neste trabalho. Já no trabalho realizado por Scheila e seus colaboradores (2017), os autores apresentaram a otimização de um método eficiente para o preparo de amostras e para a extração de compostos fenólicos totais em variedades de sementes de *M. pruriens*. Com isso, analisando o tipo de extração, na amostra que sofreu agitação por sonicação, a concentração de compostos fenólicos totais foi de 0,70 mg/mL, enquanto que na amostra agitada por vórtex foi de 0,76 mg/mL. Tornando-se eficiente na análise, além de ser prático e econômico.

5.6 PARÂMETROS DE MÉRITO

Foram determinados os parâmetros de mérito para o método proposto e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 1. O coeficiente de correlação linear (R^2) foi de 0,9919. O desvio padrão relativo ficou entre 6% e 10% apresentando boa precisão do método proposto. O fator de enriquecimento (FE) foi calculado a partir da razão entre a inclinação da reta da curva de calibração obtida por RP-DLLME (In 2) e a inclinação da reta de uma curva de calibração do mesmo metal preparada em solução externa com padrões aquosos (In1) como mostrado na Equação 1.

$$(1) \quad FE = \frac{In2}{In1}$$

O FE é um dos parâmetros mais importantes quando se trata de métodos de pré-concentração, e neste trabalho apresentou um valor de 37,42. Outros parâmetros avaliados que apresentaram resultados satisfatórios foram o limite de detecção que é a menor concentração que pode ser analisada com um bom nível de confiança (SKOOG et al., 2006), apresentou um resultado de 8 ng g⁻¹ e foi calculado como mostra a Equação 2.

$$(2) \quad LOD = \frac{3.s}{s}$$

O limite de quantificação que apresentou um resultado de 25 ng g⁻¹ e foi calculado como mostra a Equação 3 (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

$$(3) \quad LOQ = \frac{10.s}{s}$$

Tabela 1. Parâmetros de mérito para determinação de Zn em azeite de oliva

PARÂMETRO	VALOR
Faixa de calibração	
Coefficiente de Correlação Linear (R ²)	> 0,9919
Desvio Padrão Relativo (RSD %)	6 – 10
Fator de Enriquecimento (FE)	37,42
Limite de Detecção (LOD)	8 ng g ⁻¹
Limite de Quantificação (LOQ)	25 ng g ⁻¹

Fonte: Autoria própria (2017)

Foi analisado o fator de recuperação utilizando óleo de soja e de milho. O fator de recuperação demonstra a boa exatidão do método proposto e avalia os possíveis efeitos da matriz da amostra. Foi calculado de acordo com a Equação 4.

$$(4) \quad FR = \frac{(C_2 - C_0) * 100\%}{C_1}$$

Onde C₀ é a concentração do metal no óleo puro em µg g⁻¹, C₁ é a concentração adicionada em µg g⁻¹ e C₂ é a concentração obtida nas amostras que sofreram adição em µg g⁻¹.

O procedimento foi o mesmo das análises, porém a concentração do padrão de Zn foi variando a cada triplicata. Os resultados ficaram entre 80 % e 93 % para amostras de óleo de soja e entre 87 % e 108 % para amostras de óleo de milho.

5.7 COMPARAÇÃO DO MÉTODO RP-DLLME COM A DIGESTÃO ÁCIDA

Para avaliar a exatidão o método proposto foi comparado com a digestão ácida e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação dos parâmetros de mérito entre a RP-DLLME e a Digestão ácida para determinação de Zn em azeite de oliva

Origem da amostra	Concentração de Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	RP-DLLME	DA
Canola	<0,025	<1,18
Crambe+soja	0,21 \pm 0,01	<1,18
Coco	0,09 \pm 0,01	<1,18
Gergelim	0,17 \pm 0,01	<1,18
Girassol	<0,025	<1,18
Linhaça	0,29 \pm 0,01	<1,18
Manteiga	<0,025	<1,18
Milho	<0,025	<1,18
Oliva M	0,25 \pm 0,01	<1,18
Oliva G	0,21 \pm 0,01	<1,18
Oliva Q	0,82 \pm 0,05	<1,18
Oliva V	0,33 \pm 0,01	<1,18
Peixe	0,17 \pm 0,01	<1,18
Soja	<0,025	<1,18

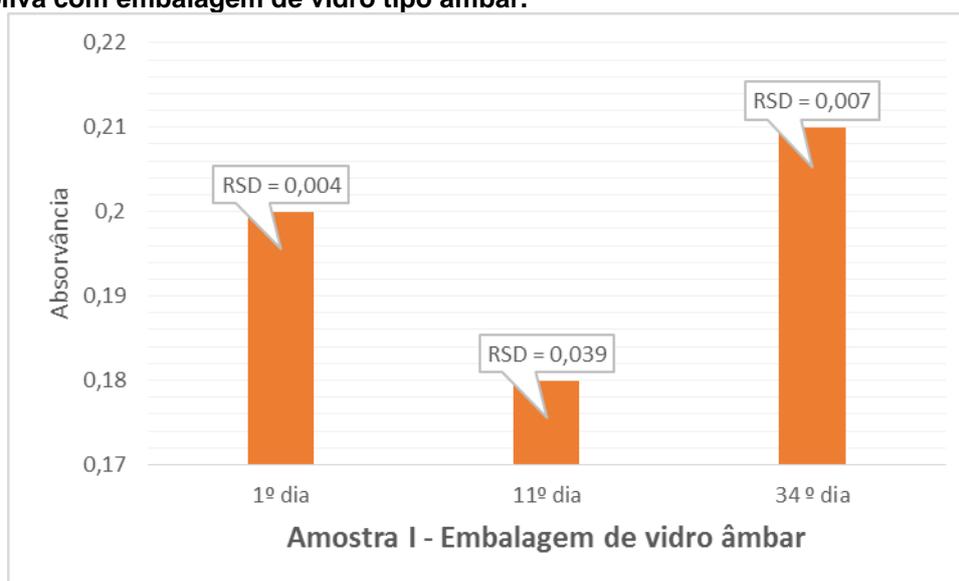
Fonte: Autoria própria (2017)

Podemos concluir que o valor do LOQ (limite de quantificação) para digestão ácida foi de $1,18 \text{ ug g}^{-1}$ e todos os valores obtidos por digestão ácida ficaram abaixo do LOQ. Isto pode ser justificado pelos altos valores de diluição na digestão ácida.

A digestão ácida em amostras orgânicas é utilizada para eliminar parcialmente ou totalmente a matriz da amostra e solubilizar o analito antes de sua determinação. No entanto, essa técnica possui várias desvantagens pois exige um longo período de tempo, coloca em risco a saúde do analista, apresenta risco de perdas por volatilização, contaminação da amostra, uso de ácidos fortes concentrados, outros (KORN et al., 2007).

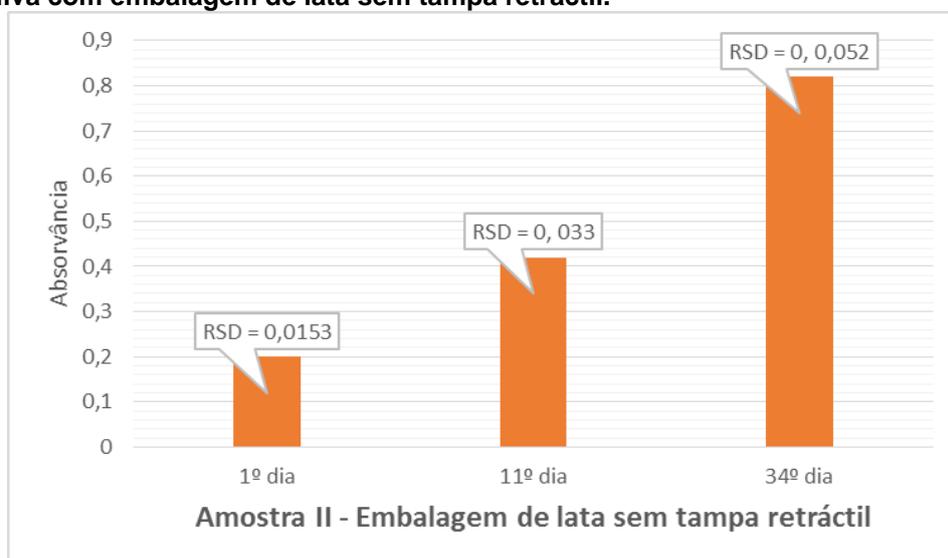
5.8 RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES DE Zn EM AMOSTRAS DE AZEITE DE OLIVA

Gráfico 6. Resultados das concentrações de Zn obtidas por RP-DLLME e FAAS em amostra I de azeite de oliva com embalagem de vidro tipo âmbar.



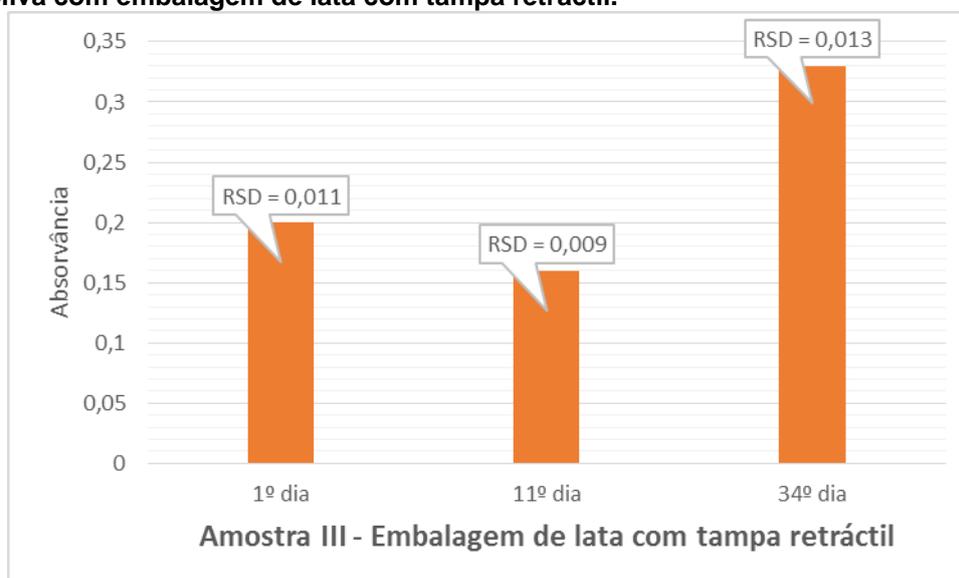
Fonte: Autoria própria (2017)

Gráfico 7. Resultados das concentrações de Zn obtidas por RP-DLLME e FAAS em amostra II de azeite de oliva com embalagem de lata sem tampa retráctil.



Fonte: Autoria própria (2017)

Gráfico 8. Resultados das concentrações de Zn obtidas por RP-DLLME e FAAS em amostra III de azeite de oliva com embalagem de lata com tampa retráctil.



Fonte: Autoria própria (2017)

Pode ser observado que a concentração de zinco nas amostras I e III de azeite de oliva não apresentaram um aumento significativo em relação ao tempo de armazenamento, no entanto, a amostra II em cerca de 30 dias sua concentração variou de $0,19 \text{ ug g}^{-1}$ a $0,82 \text{ ug g}^{-1}$. Esse resultado pode ser devido a embalagem do produto a qual é uma lata sem tampa retráctil. A lata além de ser resistente oferece proteção a luz e ao oxigênio, sendo uma ótima opção para armazenamento de óleos. Porém, a tampa por não possuir um fechamento adequado, o alimento esteve

exposto ao oxigênio, por isso o aumento significativo da concentração pode ser devido a autooxidação e fotooxidação que ocorreu durante o processamento e armazenamento do produto, ou pela migração do Zn da embalagem mas para verificar é necessário realizar análises do próprio material.

A oxidação do óleo é influenciada pela composição de ácidos graxos, processamento do óleo, luz, temperatura, concentração e o tipo de oxigênio, ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, metais de transição, peróxidos, compostos termicamente oxidados, pigmentos e antioxidantes. Esses fatores de forma interativa afetam a oxidação do óleo não sendo fácil diferenciar o efeito individual destes fatores (VELASCO *et al.*, 2002). No trabalho do Steil e seus colaboradores (2009), foi avaliada a influência do armazenamento no produto que estudaram a qualidade e estabilidade do óleo virgem de girassol embalado em vidro âmbar. Foi observado um aumento significativo do índice de peróxido que atingiu o valor de 7,2 mEq/kg após 180 dias de armazenamento a temperatura ambiente.

No entanto, as concentrações obtidas estão de acordo com a legislação vigente. De acordo com a Resolução RDC nº 20, de 22 de março de 2007 que aprova o Regulamento Técnico sobre Disposições para Embalagens, Revestimentos, Utensílios, Tampas e Equipamentos Metálicos em Contato com Alimentos, o limite de migração total ou global é de 50 mg/kg de simulante, no caso de embalagens e equipamentos com capacidade superior ou igual a 250 mL. Além disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2011) recomenda a ingestão diária de 7 mg de Zn para um adulto, de 5,6 mg para criança entre 7-10 anos e para as gestantes é recomendado 11 mg por dia.

6 CONCLUSÃO

O método proposto para determinação de zinco em óleos vegetais por FAAS apresentou resultados satisfatórios tornando-se uma técnica promissora para análise de metais em amostras complexas e orgânicas. A RP-DDLME é uma técnica mais rápida e simples que os métodos convencionais como a digestão ácida. Além disso, é de baixo custo, sensível, utiliza volumes muito pequenos de solventes orgânicos e é eficaz para a remoção de interferentes da matriz.

Entre as amostras de azeites de oliva analisadas, apenas uma amostra apresentou aumento significativo na concentração de Zn após 30 dias de armazenamento. Possivelmente isso deve-se ao tipo de embalagem do produto a qual não possui um fechamento adequado deixando o produto exposto à luz ambiente e também pode estar relacionado ao próprio material da embalagem. Condições inadequadas de armazenamento comprometem a qualidade do azeite causando degradação e alterações indesejáveis que podem ser perceptíveis ao consumidor. Por isso é de extrema importância o controle de qualidade na indústria e o processo de armazenamento para manter a qualidade do produto e conservar seus componentes funcionais.

7 REFERÊNCIAS

ALLEN, L. B. SIITONEN, P. H., HAROLD, C.; THOMPSON, J. **Determination of copper, lead and nickel in edible oils by plasma and furnace atomic spectroscopies.** Journal of the American Oil Chemists' Society. v. 75, p. 477-481, 1998.

ALMEIDA, J. S.; ANUNCIAÇÃO, T. A.; BRANDÃO, G. C.; DANTAS, A. L.; LEMOS, A. L.; TEIXEIRA, L. S. G. **Ultrasound-assisted single-drop microextraction for the determination of cadmium in vegetable oils using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry.** Spectrochimica Acta Part B, v. 107, p. 159-163, 2015.

ANTHEMIDIS, A. N.; KALLIRROY-IONNA, I. G. **Recent developments in homogeneous and dispersive liquid-liquid extraction for inorganic elements determination. A review.** Talanta, vol. 80, pg. 413 – 421, 2009.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **Regulamento técnico sobre ingestão diária recomendada (IDR) para proteína, vitaminas e minerais**, 2004. Disponível em: <http://portal.anivsa.gov.br/wps/portal/anivsa/home>. Acesso em: 23 de agosto de 2017.

ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. **Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte.** Quim. Nova, v. 20, n. 6, p. 638-643, 1997.

ASENSIO-RAMOS, M.; RAVELO-PÉREZ, L. M.; GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; HERNÁNDEZ-BORGES, J. **Liquid phase microextraction applications in food analysis.** Journal of Chromatography A, v. 1218, n. 42, p. 7415-7437, 2011. ISSN 00219673.

ATSDR. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** Toxicological Profile for zinc. Atlanta, 243 p., 1994.

AZEREDO, H. M. C. **Maximização da estabilidade oxidativa de óleo de soja acondicionado em garrafas plásticas.** 2001. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

BAN, T.; KAWAIZUMI, F.; NII, S.; TAKAHASHI, K. **Study of drop coalescence behavior for liquid-liquid extraction operation.** Chemical Engineering Science, v. 55, n. 22, p. 5385-5391, Nov 2000. ISSN 0009-2509.

BOSKOU, D. **Characteristics of the Olive Tree and Olive Fruit.** In: Boskou, D. (Ed). Olive Oil: Chemistry and Technology. AOCS Press: Champaign. 2 ed., chap. 2, p14-19. 2006.

BOSKOU, D. **Storage and Packaging.** In: Boskou, D. (Ed). Olive Oil: Chemistry and Technology. AOCS Press: Champaign. 2 ed., cap. 11, p 233-241. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais.** Diário Oficial da União, Brasília, publicada em 20 de junho de 2000, p. 3029.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Resolução n. 270, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal.** Diário Oficial da União, Brasília, 23 de setembro de 2005, p. 2134.

CARASEK, E.; MERIB, J. **Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review.** *Analytica Chimica Acta*, v. 880, n. 0, p. 8-25, 2015. ISSN 0003-2670.

CARNEIRO, C. F. A.; **Determinação de “Bisfenol A” em água por microextração líquido-líquido dispersiva e cromatografia líquida com detecção por fluorescência.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Maro Grosso do Sul, Campo Grande, pg. 17 – 43, 2016

CAVICCHIOLI, A.; GUTZ, I. G. R. O. **Uso de radiação ultravioleta para o pré-tratamento de amostras em análise inorgânica.** *Quim. Nova*, v. 26, n. 6, p. 913-921, 2003.

CHOE, E.; LEE, J.; MIN, D. B. **Chemistry for Oxidative Stability of Edible Oils.** In: Akoh, C.C., Lai, O.M. *Healthful Liids.* AOCS Press, Champaign, IL, USA, p. 99-126, 2005.

CODEX *Alimentarius Commission.* **CODEX Standards for olive oils, and olive pomace oils,** CODEX STAN 33, 1981. CODEX *Alimentarius*, Rome: FAO/WHO, rev.2, 2003

CYPRIANO, C. J. **Determinação simultânea de cobre e chumbo em amostras de azeite de dendê (*Elaeis guineenses*) por técnicas de redissolução utilizando o método de extração assistida por ultra-som.** 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.

DELAFUENTE, J. **Nutrients and immune responses.** *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, v. 17, n.2, pg 203-12, 1991

DE OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. D. S.; DE SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. **Liquid-phase microextraction (LPME): Fundamentals and applications to the analysis of drugs in biological samples.** *Quimica Nova*, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

DI GIOVACCHINO, L.; MUCCIARELLA, N.; CONSTANTINI, N.; FERRANTE, M. L.; SURRICCHIO, G. **Use of nitrogen to improve stability of virgin olive oil during storage.** *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 79, 339–344. 2002.

DUGO, G.; LAPERA, L.; LATORRE, G.; GIUFFRIDA, D. **Determination of Cd(II), Cu(II), Pb(II), and Zn(II) content in commercial vegetable oils using derivative potentiometric stripping analysis.** Food Chemistry, v. 87, p. 639-645, 2004.

DUTRA, M. J. A.; SANTOS, D. M.; COELHO, N. M. M. **Comparação de procedimentos analíticos para preparo de amostras para determinação de cálcio e magnésio em leite.** Rev. Analytica, n. 12, p. 36-40, 2004.

FARAJZADEH, M.; DJOZAN, D.; BAKHTIYARI, R.; **Use of a capillary tube for collecting an extraction solvent lighter than water after dispersive liquid-liquid microextraction and its application in the determination of parabens in different samples by gas chromatography- Flame ionization detection.** Talanta. 2010; 81(4-5):1360-7.

FERNANDES, K. G. et al. **Padronização interna em espectrometria de absorção atômica.** Química Nova, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 249-252, 2003.

FOURATI, H.; COSENTINI, M.; KARRA, B. **Classification of Olive Trees According to Fruit and Oil Characterisation.** Acta Horticulturae. (ISHS) 586:141-145, 2002.

FRANKEL, E. N. **Nutritional and Biological Properties of Extra Virgin Olive Oil.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, p. 785-792, 2011.

GAMBACORTA, G.; DEL NOBILE, M. A.; TAMAGNONE, P.; LEONARDI, M.; FACCIA, M.; LA NOTTE, E. **Shelf-life of extra virgin olive oil stored in packages with different oxygen barrier properties.** Italian Journal of Food Science.16: 417-428. 2004.

GONZALVEZ, A.; GHANJAOU, M. E.; EL RHAZI, M.; DE LA GUARDIA, M. **Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy Determination of Trace Element Composition of Argan Oil.** Food Science and Technology International, v. 16, p. 65-71, 2010.

GOODACRE, R.; KEL, D. B.; BIANCHI, G. **Rapid assessment of the adulteration of virgin olive oils by other seed oils using pyrolysis mass spectrometry and artificial neural networks.** Journal of the Science of Food and Agriculture, London, v. 63, p.297 – 307, 1993.

HASHEMI, P.; RAESI, F.; GHIASVAND, A. R.; RAHIMI, A. **Reverse-phase dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein.** Talanta, v. 80, p. 1926-1931, 2010.

HUO. X.; LI. Q.; LIN. X.; CHEN. X.; BI. K. **Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of six fungicides in fruit samples by GC-ECD.** Chromatographia. 2011; 73 (3-4): 313-9.

IBANEZ, J. G.; CARREON-ALVAREZ, A.; BARCENA-SOTO, M.; CASILLAS, N.

Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation, and analysis. J. Food Composition and Analysis, v. 21, p. 672–683, 2008.

JORGE, N. **Química e tecnologia de óleos vegetais.** Cultura Acadêmica: Universidade Estadual Paulista, Pró-Reitoria de Graduação, São Paulo, pg. 165, 2009.

KAMAL-ELDIN, A; POKORNY, J. **Lipid oxidation products and methods used for their analysis.** In: Kamal-Eldin A., Pokomy J. Analysis of Lipid Oxidation. AOCS Press: Champaign. USA. Cap. 1. P. 17-39. 2005.

KING, N. F.; SHAMES, D.M.; WOODHOUSE, L. R. **Zinc homeostasis in humans.** J. Nutr., v. 130, p. 130, p. 1360S-1366S, 2000.

KOCUROVA; L.; BALOGH; I.; SANDREJOVA, J.; ANDRUCH, V.; **Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water.** A review. Microchemical Journal. 2012; 102:11-7.

KORN, M, G, A.; SANTOS, D. S. S.; WELZ, B.; VALE, M. G. R.; TEIXEIRA, A. P.; LIMA, D.C.; FERREIRA, S. L. C. **Atomic spectrometric methods for the determination of metals and metalloids in automotive fuels: a review.** Talanta, v. 73, p. 1-11, 2007.

LIDE, DAVID R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**, 83rd ed.; CRC Press: Boca Raton, fl, 2002; p 3-282.

LIMA, Alexandre F. et al. **Alternative Analytical Method for Metal Determination in Inorganic Fertilizers Based on Ultrasound-Assisted Extraction.** J. Braz. Chem. Soc., v. 22, N. 8, p.1519-1524, 2011.

LIN, X.; CHEN, X.; HUO, X.; YU, Z.; BI, K.; LI, Q. **Dispersive liquid–liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-diode array detection for the determination of N-methyl carbamate pesticides in vegetables.** Journal of Separation Science, v. 34, n. 2, p. 202-209, 2011. ISSN 1615-9314.

LINDLEY, M.G. **The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables.** Trends in Food Science and Technology, v.9, p.336-40, 1998.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; ORTEGA-BARRALES, P.; FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA, M. L.; DOMÍNGUEZ-VIDAL, A.; RUIZ-MEDINA, A. **Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain.** Food Chemistry, v. 127, p. 1257-62, 2011.

LUH, B. S.; GARCIA, E. L.; MARTIN, M. H. **Olives.** In: Barret, D. M.; Somogyi, L. P.; Ramaswamy, H. S. **Processing Fruits: Science and Technology.** ed.2. CRC Press, 2005.

LUZ, Luiza P. **Estudo do ultra-som como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos**. 1998. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

MARTÍNE NIETO, L.; HODAIFAB, G.; PENÃ, J. L. L. **Changes in phenolic compounds and Rancimat stability of olive oils from varieties of olives at different stages of ripeness**. Journal of Science and Food Agriculture, n. 90, p. 2393-2398, 2010.

MARTINS, M.; PRIMEL, E.; CALDAS, S. **Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) fundamentos e aplicações**. Scientia Chromatographica, v.4, n. 1, p. 35-51, 2012.

MENDIL, D.; ULUÖZLÜ, O. D.; TÜZEN, M.; SOYLAK, M. **Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry**. Journal of Hazardous Materials, v. 165, p.724-728, 2009.

MORETTO, E.; FETT, R. **Óleos e gorduras vegetais: processamento e análises**. Florianópolis: UFSC, 1986.

NUNES, S. P. Produção e consumo de óleos vegetais no Brasil. **Departamento de Estudos Sócio-Econômico Rurais**, Nº 159, 2007.

NUNES, L. S.; BARBOSA, J. T. P.; FERNANDES, A. P.; LEMOS, V. A.; SANTOS, W. N. L.; KORN, M. G. A.; TEIXEIRA, L. S. G. **Multi-element determination of Cu, Fe, Ni and Zn content in vegetable oils samples by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry and microemulsion sample preparation**. Food Chemistry, v. 127, p. 780-783, 2011.

OLIVEIRA, L. M. **Requisitos de proteção de produtos em embalagens plásticas rígidas**. Centro de Tecnologia de Alimentos – ITAL. Campinas, 2006. 328p.

ONOSAKA, S.; TETSUCHIKAHARA, N.; MIN. K. S. **Paradigm shift in zinc: metal pathology**. Tohoku J. Exp. Med., v. 196, n. 1, p. 1-7, 2002.

OWEN, R. W; GIACOSA, A; HULL, W. E; HAUBNER, R; WURTELE, G; SPIEGELHALDER, B; BARTCH, H. **Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants**. Lancet Oncology. v.1, p.107-112, 2000.

P. Hashemi, F, Raeisi, A. R. Ghiasvand, A. Rahimi, **Reversed-phase dispersive liquidliquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein**, Talanta, 2010, 80, 1926-1931.

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, 1999/07/01 1999. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac990055n> >.

PERCUSSI, L. **Azeite: história, produtores, receitas**. 2ª ed., São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2007, 281p.

PEREIRA, E.; ALMEIDA, T. S.; BORGES, D. L. G.; CARASEK, E.; WELZ, B.; FELDMANN, J.; MENOYO, J. C. **Investigation of chemical modifiers for the direct determination of arsenic in fish oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry**. *Talanta*, v. 150, p. 142-147, 2016.

PETRAKIS, C. **Olive Oil Extraction**. In: Boskou, D. (Ed). *Olive Oil: Chemistry and Technology*. AOCS Press: Champaign, cap. 9, ed. 2. 2006, p 192.

PIERGIOVANNI, L.; LIMBO, S. **Packaging and the shelf life of vegetable oils**. In: Robertson, G. L. *Food Packaging and Shelf Life: A practical Guide*, CRC Press, Boca Raton, p. 318, 2010.

POKORNY, J.; SCHMIDT, S.; PARKÁNYIOVÁ, J. **Ultraviolet-visible spectrophotometry in the analysis of lipid**. In: Kamal-Eldin, A.; Pokorny J. *Analysis of Lipid Oxidation*. AOCS Press: Champaign. USA. cap. 3. p. 17-39. 2005.

PROSEN, H. **Applications of Liquid-Phase Microextraction in the Sample Preparation of Environmental Solid Samples**. *Molecules*, v. 19, n. 5, p. 6776, 2014. ISSN 1420-3049.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica**. *QUIMICA NOVA*, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RANALLI, A.; MODESTI, G.; PATUMI, M.; FONTANAZZA, G. **The compositional quality and sensory properties of virgin olive oil from a new olive cultivar – I77**. *Food Chemistry*. Oxford, v. 69, p. 37 – 46, 2000.

RAO, R.; RAJU, S.; VALI, R. **Ionic-liquid based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatographic determination of anti-hypertensives in rat serum**. *Journal of Chromatography B- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2013; 931: 174-80

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINIA, M. R. M.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. **Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction**. *Journal of Chromatography A*, v. 1116, n. 1-2, p. 1-9, May 26 2006. ISSN 0021-9673.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. **Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method**. *Journal of Chromatography a*. 2010; 1217 (16): 2342-57.

REZAEI, F.; BIDARI, A.; BIRJANDI, A.; HOSSEINI, M.; ASSADI, Y. **Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water**. *Journal of Hazardous Materials*. 2008; 20(1): 599-607.

RIBEIRO, A. S.; ARRUDA, M. A. Z.; CADORE, S. **Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em filamento de tungstênio: uma revisão crítica.** Química Nova, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 396-405, 2002.

SALEH, M. I., JAB, M. S., RHAMAN, I. A., NORASIAH, S. **Aqueous extraction of copper and iron from palm oil by ultrasonic cavitation.** ANALYST, 116, 743-745, 1991.

SEVANIAN, A., HOCHSTEIN, P. **Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems.** Annual Reviews of Nutrition, Palo Alto, v.5, p.365-390, 1985.

SILVA, M.O.; FAVERO, C.F.; LAZARI, J.P; VIEIRA, M.F.; BONAFE, E.; VISENTAINER, J.V.; PEREIRA, N.C.; BERGAMASCO, R.; VIEIRA A.M.S; **Some chemical characterization oil of seed moringa oleifera obtained by solvent and mechanical extraction,** 11th Euro Fed Lipid Congress, 2013, Antalya.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental,** 5ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

STEIL, F.L.; TELLES, M. M.; BLOCK, J.M. **Evaluación de la calidad y estabilidad del aceite virgen de girasol (Helianthus annuus L.) durante el almacenamiento.** Aceites Y Grasas, Florianópolis, v. 4, n. 77, p.654-658, dez. 2009.

THOMAIDIS, N. S.; GEORGIU, C. A. **Edible oil analysis by flow injection.** Laboratory Automation and Information Management, v. 34, p. 101-104, 1999.

TSIMIDOU, M. Z.; GEORGIU, A.; KOIDIS, A.; BOSKOU, D. **Loss of stability of “veiled” (cloudy) virgin olive oils in storage.** Food Chemistry, n. 93, p. 377-383, 2005.

TRINDADE, A. S. N.; DANTAS, A. F.; LIMA, D. C.; FERREIRA, S. L. C.; TEIXEIRA, S. G. **Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction for determination of Cu, Fe, Ni and Zn in vegetable oils by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry.** Food Chemistry, v. 185, p. 145-150, 2015.

VAZQUEZ, M.; VAZQUEZ, P.; GALERA, M.; GARCIA, M.; UCLES, A. **Ultrasound-assisted ionic dispersive liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry for simultaneous analysis of pharmaceuticals in wastewaters.** Journal of Chromatography a. 2013; 1291: 19-26.

VELASCO, J.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. **Evaluation of Oxidative Stability of Vegetable Oils by Monitoring the Tendency to Radical Formation. A Comparison of Electron Spin Resonance Spectroscopy with the Rancimat Method and Differential Scanning Calorimetry,** Food Chemistry. 77: 623–632. 2003.

VELASCO, J; DOBARGANES, C. **Oxidative stability of virgin olive oil**. Eur. J. Lipid Sci. Technol, Sevilla, n. 104, p.661-676, 2002.

YAN, H.; WANG, H.; QIN, X.; LIU, B.; DU, J. **Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for determination of fluoroquinolones in pharmaceutical wastewater**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2011; 54 (1): 53-7.

ZANG X; WU Q; ZHANG M; XI G; WANG Z. **Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique**. Chinese Journal of Analytical Chemistry. 2009; 37(2): 161-8.

Zare-Shahabadi V, Asaadi P, Abbasitabar F, Shirmardi A. **Determination of Traces of Ni, Cu, and Zn in Wastewater and Alloy Samples by Flame-AAS after Ionic Liquid-Based Dispersive Liquid Phase Microextraction**. J. Braz. Chem. Soc. 2017;28(5):887-894