

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

LEANDRA MULLER DO PRADO

**EMPREGO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE
REVERSA PARA O PREPARO DE AMOSTRAS DE ÓLEO DE COCO PARA
DETERMINAÇÃO DE METAIS POR ICP-OES**

MEDIANEIRA

2022

LEANDRA MULLER DO PRADO

EMPREGO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE REVERSA PARA O PREPARO DE AMOSTRAS DE ÓLEO DE COCO PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS POR ICP-OES

The use of reverse-phase dispersive liquid-liquid microextraction to prepare coconut oil samples for metal determination by ICP-OES

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos/Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Cristiane Canan.

Coorientador(a): Éder Lisandro Flores.

MEDIANEIRA

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Medianeira**



LEANDRA MULLER DO PRADO

EMPREGO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE REVERSA PARA O PREPARO DE AMOSTRAS DE ÓLEO DE COCO PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS POR ICP-OES

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia De Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Alimentos.

Data de aprovação: 31 de Agosto de 2022

Dra. Cristiane Canan, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Jussiane Souza Da Silva, Doutorado - Universidade Federal de Santa Maria (Ufsm)

Dr. Oldair Donizeti Leite, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 06/10/2022.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) – Campus Medianeira pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora professora Dra. Cristiane Canan pela dedicação em me orientar durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu coorientador professor Dr. Éder Lisandro Flores, pela paciência, orientação e contribuições.

À CEANMED – Central Analítica Multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Medianeira, Brasil, pelos ensaios realizados.

Ao professor Dr. Érico Marlon de Moraes Flores, à doutoranda Vitoria Hagemann Cauduro e ao acadêmico Gustavo Gohlke pela realização das análises por ICP OES no Laboratório de Análises Industriais e Ambientais (LAQIA) do Departamento de Química da UFSM.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos pelos conhecimentos científicos transmitidos.

Às alunas do Mestrado em Tecnologia de Alimentos pelos momentos de companheirismo que tivemos durante esse período.

À minha família pelo apoio, compreensão e por acreditarem em mim sempre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) (Código de Financiamento 001) pelo apoio financeiro.

RESUMO

O óleo de coco comestível é um alimento versátil, muito utilizado na culinária e também como produto nutracêutico. No entanto, a contaminação com metais pesados no óleo de coco pode ocorrer a partir do uso de fertilizantes, exposição do solo à contaminação ambiental e dos processos de extração e refino do óleo. Nesse sentido, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), seguindo tendências internacionais estabelece limites máximos para diversos metais em alimentos oleosos ou gordurosos. O óleo de coco pode estar no estado líquido ou sólido dependendo de sua composição e temperatura ambiente, o que dificulta seu manuseio nos procedimentos de preparo de amostras. Neste estudo, o método de microextração líquido-líquido dispersivo de fase reversa (RP-DLLME) foi aplicado na preparação de amostras para microextração e pré-concentração de metais em amostras de óleo de coco. Os analitos foram determinados por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). De forma inovadora no preparo das amostras, primeiro foi adicionado à matriz da amostra o solvente verde D-limoneno, com o objetivo de manter a fase líquida, evitando sua solidificação em etapas posteriores. Em seguida, uma mistura de dois solventes, um dispersor (n-propanol) e um extrator (HNO_3 diluído), foi adicionada ao tubo contendo 5 g de amostra de óleo de coco diluído com D-limoneno, já aquecido. Em seguida, as amostras foram agitadas e centrifugadas para extrair a fase aquosa. Os analitos extraídos/pré-concentrados (Al, Ba, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Ti, V e Zn) foram determinados por ICP OES. Os parâmetros avaliados para a otimização do método foram o tipo de solvente dispersante (etanol, n-propanol, isopropanol); a proporção de solventes dispersor:extrator (50:50, 60:40, 70:30, 80:20 (v v⁻¹)), volume e concentração do extrator e tempo de agitação. O método proposto apresentou recuperação de analitos variando de 81 a 106% (RSD < 6%). A avaliação de quão verde o método RP-DLLME proposto foi realizada usando o software AGREE[®] para estabelecer métricas de Química Verde. O método desenvolvido foi considerado adequado para a determinação de metais traço em amostras de óleo de coco comestível, seguindo os Princípios da Química Analítica Verde. O método RP-DLLME proposto é caracterizado pela operação rápida, simples e baixo custo com a utilização de massa elevada de amostra, baixo consumo de reagentes, menor geração de resíduos e alta frequência analítica. Por fim, o método analítico proposto mostrou-se viável, sendo está a primeira aplicação de RP-DLLME para óleo de coco combinado com a utilização de D-limoneno e posterior determinação por ICP OES.

Palavras-chave: óleo vegetal; química analítica verde; limoneno; RP-DLLME; ICP OES.

ABSTRACT

Coconut oil is a healthy food and is also widely used in cooking and as a nutraceutical product. However, contamination with heavy metals in coconut oil may occur from fertilizers, soil exposure to environmental contamination, and oil extraction and refining processes. Thus, the National Health Surveillance Agency (ANVISA), according to international trends, establishes maximum limits for various metals in oily or fatty foods. Coconut oil may be in a liquid or solid state depending on its composition and ambient temperature, which makes it difficult to handle in sample preparation procedures. Therefore, the reverse-phase dispersive liquid-liquid microextraction method (RP-DLLME) was applied in the preparation of the coconut oil sample for microextraction and pre-concentration of metals. The analytes were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). Innovatively, in the preparation of the samples, a green solvent D-limonene was first added to maintain the liquid phase. In extract, a mixture of two solvents, a dispersant (n-propanol) and a sampler (diluted HNO₃), is added to a tube containing 5 g of coconut oil diluted with D-limonene, already heated. Then, the samples were shaken and centrifuged to extract the phase. Extracted and preconcentrated analytes (Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Ti, V, Zn) were determined by ICP OES. The parameters evaluated for the method optimization were the type of dispersing solvent (ethanol, propanol, isopropanol); the dispersing solvent ratio (50:50:40, 70:30, and 80:20 (v v⁻¹)), extractor volume and concentration, and agitation time. The proposed method presented analysis recovery ranging from 81 to 106% (RSD < 6%). The evaluation of how green the proposed RP-DLLME method was performed using AGREE® software to measure Green Chemistry measurements. The method developed was considered suitable for the determination of trace metals and edible coconut oil, following the Principles of Green Analytical Chemistry. The proposed RP-DLLME method is characterized by fast and simple operation, high sample mass, low reagent consumption, lesser particle generation, and high frequency analysis. Finally, the method is proved to be feasible, being the first application of RP-DLLME for coconut oil combined with the use of D-limonene and subsequent determination by ICP OES.

Keywords: vegetable oil; green analytical chemistry; limonene; RP-DLLME; ICP OES.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura triacilglicerídeos.....	14
Figura 2 - Corte longitudinal do coco.....	17
Figura 3 - Extração induzida por quebra de emulsão. (A) fase orgânica; (B) fase aquosa; (C) fase rica em surfactante.....	27
Figura 4 – Representação de sistema de decomposição por radiação micro-ondas com frascos em rotor, sob ação da radiação micro-ondas	30
Figura 5 - Procedimento geral de DLLME	30
Figura 6 – Etapas do método da RP-DLLME.....	31
Figura 7 - Estrutura do D-limoneno.	34
Figura 8 - Fluxograma dos procedimentos experimentais desenvolvidos neste estudo	48
Figura 9 – RP-DLLME. (1) Amostra; (2) adição D-limoneno; (3) adição do dispersor/extrator; (4) formação da solução após agitação; (5) após fase da centrifugação ocorre acumulação da porção líquida no fundo do tubo; (6) remoção da porção oleosa; (7) retirada da porção aquosa; (8) colocação da fase aquosa em novo tubo; (9) aferição com solução de HNO ₃ a 0,5%.....	40
Figura 10 – Avaliação do tipo de solvente utilizando o método de RP-DLLME. Determinação dos analitos por ICP-OES	42
Figura 11 – Ensaio de recuperação para avaliação da proporção de solvente dispersor utilizando isopropanol.....	44
Figura 12 – Ensaio de recuperação para avaliação da proporção de solvente dispersor utilizando n-propanol.....	45
Figura 13 – Avaliação da concentração do solvente extrator utilizado no método de RP-DLLME.....	47
Figura 14 – Avaliação do volume da solução dispersor/extrator utilizado no método de RP-DLLME.....	59
Figura 15 - Avaliação do tempo de agitação utilizado no método de RP-DLLME	51
Figura 16 - Características dos métodos de digestão ácida (A) e RP-DLLME (B) de acordo com o software AGREE	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de ácidos graxos (%) em óleos vegetais.....	15
Tabela 2 - Composição de vitaminas, minerais e lipídios em 100 g de óleo de coco.....	19
Tabela 3 – Características físicas, químicas e físico-químicas do óleo de coco	20
Tabela 4 - Resultados obtidos no teste de recuperação aplicado às amostras de óleo para Mg, Mn, Fe, Zn Ag, Ba, Pb e Cr.....	26
Tabela 5 - Propriedades químicas e físicas do D-limoneno comparado ao tolueno	34
Tabela 6 - Condições operacionais do ICP-OES usadas para determinação dos analitos nos extratos aquosos após o procedimento RP-DLLME proposto.....	35
Tabela 6 - Condições operacionais do ICP-OES usadas para determinação dos analitos nos extratos aquosos após o procedimento RP-DLLME proposto.....	36
Tabela 7 – Teste de Tukey-Kramer 95% de confiança para os valores de recuperação do Mn, Mo, V nos ensaios de recuperação referentes as proporções dos solventes dispersor (n-propanol) e extrator HNO ₃	44
Tabela 8 – Teste de Tukey-Kramer 95% de confiança para os valores de recuperação do Al, Ba, Cd, Mo, Ni, V, Zn nos ensaios de recuperação referentes as proporções dos solventes dispersor (n-propanol) e extrator HNO ₃	46
Tabela 9 - Teste de Tukey-Kramer 95% de confiança para os valores de recuperação do Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mo, Ni, Pb, V, Zn nos ensaios de recuperação referentes as concentrações da solução de dispersor (n-propanol) e extrator (HNO ₃)	48
Tabela 10 - Teste de Tukey-Kramer 95% de confiança para os valores de recuperação do Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, V, Zn nos ensaios de recuperação referentes ao volume da solução de dispersor (n-propanol) e extrator (HNO ₃)	50
Tabela 11 - Teste de Tukey-Kramer 95% de confiança para os valores de recuperação do Al, Ba, Cd, Cu, Mn, Ni, V nos ensaios de recuperação referentes ao tempo de agitação após adição da solução de dispersor (n-propanol) e extrator (HNO ₃).	52
Tabela 12 - Condições selecionadas para aplicação da metodologia de RP-DLLME para determinação de diferentes metais em amostras de óleo de coco utilizando ICP OES	52
Tabela 13 – Ensaios de recuperação em 3 níveis de concentração (250, 500 e 750 µg g ⁻¹) de solução multielementar em amostras de óleo de coco submetidas ao RP-DLLME e quantificadas por ICP OES.....	54
Tabela 14 – Parâmetros LQ e LD para determinação de Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, V, Zn em amostras de óleo de coco por ICP OES com o emprego de RP-DLLME.....	55
Tabela 15 – Concentração de Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, V, Zn em amostras de óleo de coco, aplicando o método RP-DLLME e determinação por ICP OES.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

AAS	Espectrometria de absorção atômica, do inglês, <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>
CPE	Extração de ponto de nuvem, do inglês, <i>cloud-point extraction</i>
DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês, <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético, do inglês, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EAAS	Espectrometria eletrotérmica de absorção atômica, do inglês, <i>electrothermal atomic absorption spectrometry</i>
EIEB	Extração induzida por quebra de emulsão, do inglês, <i>extraction induced by emulsion breaking</i>)
FAAS	Espectrometria de absorção atômica em chama, do inglês, <i>flame atomic absorption spectrometry</i>
HLLLE	Extração líquido-líquido homogênea, do inglês, <i>homogeneous liquid-liquid extraction</i>
IDR	Ingestão Diária Recomendada
GFAAS	Espectrômetro de absorção atômica de forno de grafite, do inglês, <i>graphite furnace atomic absorption spectrometer</i>
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, do inglês, <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
RP-DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa, do inglês, <i>reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction</i>
SQT-FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama de tubo de quartzo com fenda, do inglês, <i>slotted quartz tube flame atomic absorption spectrometry</i>
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio, do inglês, <i>tetramethylammonium hydroxide</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Óleos vegetais	14
3.2 Óleo de coco	16
3.2.1 Composição óleo de coco	18
3.2.2 Características físicas, químicas e físico-químicas	20
3.2.3 Contaminantes inorgânicos em óleo de coco	20
3.3 Método de preparo de amostras para análise inorgânica	22
3.3.1 Extração induzida por quebra de emulsão (EIEB)	27
3.3.2 Digestão assistida por micro-ondas (MAWD)	28
3.3.3 Microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME)	29
3.3.4 Microextração dispersiva líquido-líquido em fase reversa (RP-DLLME)	30
3.4 Química analítica verde	31
3.4.1 Limoneno	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Instrumentação	35
4.2 Reagentes, materiais e solução de referência	36
4.3 Amostras	37
4.3.1 Avaliação do solvente dispersor	39
4.3.2 Avaliação da proporção da mistura dos solventes dispersor e extrator	39
4.4 Métodos de preparo de amostras	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Tipo de solvente dispersor	41
5.2 Proporção dispersor/extrator	43
5.2.1 Proporção dispersor/extrator utilizando isopropanol	43
5.2.2 Proporção dispersor/extrator utilizando n-propanol	45
5.3 Concentração do solvente extrator	46
5.4 Volume da solução dispersor/extrator	49
5.5 Tempo de agitação	51
5.6 Condições experimentais otimizadas dos parâmetros da RP-DLLME para extração de diferentes metais em óleo de coco	52
5.7 Validação do método	53
5.8 Aplicação do método proposto otimizado para determinação de metais em amostras comerciais	56

5.9 Comparação entre digestão ácida e RP-DLLME.....	57
6 CONCLUSÕES GERAIS	61
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o óleo de coco vem ganhando atenção principalmente devido aos benefícios à saúde proporcionados a quem o consome, dentre eles é possível destacar a diminuição do colesterol, redução de doenças cardiovasculares, perda de peso, melhora das funções cognitivas, no tratamento da doença de Alzheimer, aumento da imunidade e o auxílio na cicatrização de feridas (JAYAWARDENA *et al.*, 2021; SANDUPAMA; MUNASINGHE; JAYASINGHE, 2022). O óleo de coco pode ser extraído de forma artesanal, mecânica e por solvente. Enquanto na extração mecânica o processo ocorre pela prensagem, na extração por solvente é adicionado solvente orgânico a planta e realizada separação da porção sólida da líquida. Já na extração artesanal a polpa do coco é cozida e o sobrenadante retirado, sendo submetido a aquecimento e filtração (DE PINHO; SOUZA, 2018).

A presença de metais pode causar efeitos tóxicos à saúde humana e estima-se que 80% da dose diária de metais pesados entram no corpo humano através do consumo de alimentos (SZYCZEWSKI *et al.*, 2016). A contaminação do óleo por metais pode ocorrer através do solo em que a matéria-prima é cultivada, assim como pela poluição ambiental. Os elementos metálicos mesmo em nível traço de concentração, podem acelerar a degradação oxidativa do óleo e também podem ser bioacumulados no organismo humano, resultando em efeitos de toxicidade (MANJUSHA; SHEKHAR; KUMAR, 2019). Entretanto, a quantificação desses metais em óleos tem se mostrado um desafio principalmente quanto à etapa de preparo de amostras (KALSCHNE *et al.*, 2019a).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um método analítico inédito empregando a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME), como etapa de preparo de amostras para extração e pré-concentração de metais em óleo de coco, com o uso D-limoneno como solvente verde e posterior determinação dos metais por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). O método proposto tem como principais características, a simplicidade, baixo consumo de reagentes, elevada frequência analítica, limites de quantificação e detecção adequados e concordância com os princípios da Química Analítica Verde.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um método para determinação de metais em óleo de coco, empregando o método RP-DLLME para o preparo das amostras e posterior determinação por ICP OES.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um método de preparo de amostras empregando RP-DLLME em consonância com os princípios da Química Analítica Verde.
- Utilizar o solvente verde D-limoneno como diluente do óleo de coco, em substituição ao xileno.
- Ajustar os parâmetros de influência no procedimento de RP-DLLME para extração dos analitos das amostras de óleo de coco.
- Realizar testes para validação parcial do método proposto.
- Determinar a concentração de metais em amostras de óleo de coco comerciais empregando ICP OES após preparo de amostras por RP-DLLME.
- Avaliar o enquadramento do método proposto de acordo com os princípios da Química Analítica Verde.

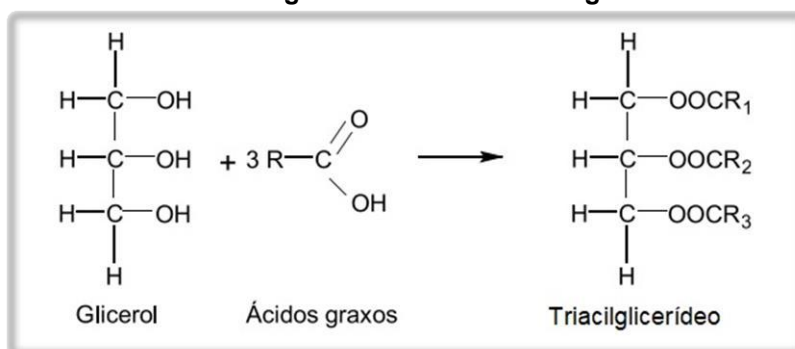
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Óleos vegetais

Lipídios são um grupo de componentes químicos diversos que possuem como características a insolubilidade em água e a solubilidade em solventes orgânicos. Dentro do termo lipídios são incluídos os triacilglicerídeos, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, fosfolipídios, cerebrosídeos, esteróis, terpenos, ácidos graxos e outras substâncias (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007; JORGE, 2009; NELSON; COX, 2014).

Quando líquidos à temperatura ambiente (20 °C) os lipídios são denominados óleos, quando sólidos à temperatura ambiente são gorduras. Essa diferença de estado físico em temperatura ambiente está relacionada com a proporção de grupos acila saturados e insaturados presentes nos triacilgliceróis. Ainda podem ser chamados de azeites se tiverem como origem polpa de frutos (dendê, de oliva), e também determinadas gorduras vegetais podem ser chamados de manteiga (JORGE, 2009). Os óleos e gorduras podem ter origem animal, vegetal ou microbiana. Os chamados triacilglicerídeos são compostos por três ácidos graxos, cada um em uma ligação éster com uma molécula de glicerol como demonstrado na Figura 1, sendo que os óleos vegetais são obtidos de sementes oleaginosas, frutas tropicais e algas (MORETTO; ALVES, 1986).

Figura 1 - Estrutura triacilglicerídeos



Fonte: Jorge (2009)

Os triacilglicerídeos podem conter diferentes ácidos graxos ligados ao glicerol e suas propriedades físicas e químicas dependem dos tipos e proporções desses ácidos graxos que o formam, assim como da sua distribuição na molécula de glicerol. Os principais ácidos graxos saturados encontrados em óleos e gorduras são ácido butírico (C4:0), capríco (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) (JORGE, 2009). As composições de ácidos graxos dos principais óleos vegetais podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição de ácidos graxos (%) em óleos vegetais

Ácidos graxos	Óleo ou gordura de palma	Amendoim	Óleo de semente de algodão	Milho	Soja	Coco
C6:0	ND	ND	ND	ND	ND	ND – 0,7
C8:0	ND	ND	ND	ND	ND	4,6 – 10,0
C10:0	ND	ND	ND	ND	ND	5,0 – 8,0
C12:0	ND – 0,5	ND – 0,1	ND – 0,2	ND – 0,3	ND – 0,1	45,1 – 53,2
C14:0	0,5 – 2,0	ND – 0,1	0,6 – 1,0	ND – 0,3	ND – 0,2	16,8 – 21,0
C16:0	39,3 – 47,5	5,0 – 14,0	21,4 – 26,4	8,6 – 16,5	8,0 – 13,5	7,5 – 10,2
C16:1	ND – 0,6	ND – 0,2	ND – 1,2	ND – 0,5	ND – 0,2	ND
C17:0	ND – 0,2	ND – 0,1	ND – 0,1	ND – 0,1	ND – 0,1	ND
C17:1	ND	ND – 0,1	ND – 0,1	ND – 0,1	2,0 – 5,4	ND
C18:0	3,5 – 6,0	1,0 – 4,5	2,1 – 3,3	ND – 3,3	17 – 30	2,0 – 4,0
C18:1	36,0 – 44,0	35,0 – 80	14,7 – 21,7	20,0 – 42,2	48,0 – 59,0	5,0 – 10,0
C18:2	9,0 – 12,0	4,0 – 43,0	46,7 – 58,2	34,0 – 65,6	4,5 – 11,0	1,0 – 2,5
C18:3	ND – 0,5	ND – 0,5	ND – 0,4	ND – 2,0	0,1 – 0,6	ND – 0,2
C20:0	ND – 1,0	0,7 – 2,0	0,2 – 0,5	0,3 – 1,0	ND – 0,6	ND – 0,2
C20:1	ND – 0,4	0,7 – 3,2	ND – 0,1	0,2 – 0,6	ND – 0,5	ND – 0,2
C20:2	ND	ND	ND – 0,1	ND – 0,1	ND – 0,1	ND
C22:0	ND – 0,2	1,5 – 4,5	ND – 0,6	ND – 0,5	ND – 0,7	ND
C22:1	ND	ND – 0,6	ND – 0,3	ND – 0,3	ND – 0,3	ND
C22:2	ND	ND	ND – 0,1	ND	ND	ND
C24:0	ND	0,5 – 2,5	ND – 0,1	ND – 0,5	ND – 0,5	ND
C24:1	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*ND: valores não detectáveis

Fonte: FAO (2019); Brasil (2021)

Como é possível verificar na Tabela 1 os ácidos graxos encontrados em maior concentração no óleo de coco são láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0). Gorduras ricas em cadeias saturadas de ácidos graxos que têm a tendência de se solidificar em temperaturas baixas, como é possível observar com o óleo de coco em temperatura ambiente e forma similar é possível observar no óleo ou gordura de

palma, diferente de óleos como de soja, de girassol que possuem diferente composição e se apresentam líquidos em temperatura ambiente (JORGE, 2009).

3.2 Óleo de coco

O coqueiro pertence à família *Arecaceae* e devido aos inúmeros produtos que podem ser obtidos a partir desse, essa árvore é conhecida como árvore da vida. Seu cultivo ocorre com maior intensidade na Ásia e região do pacífico, embora em mais de 90 países pode ser observado seu crescimento, favorecendo a economia e cultura local. O principal produto obtido dessa árvore é o óleo de coco (PHAM, 2016; JAYAWARDENA *et al.*, 2021). Segundo definições adotadas pelo *Codex Alimentarius* (FAO, 2019) e pela Instrução Normativa nº 87, de 15 de março de 2021 da ANVISA/Ministério da Saúde o óleo de coco é aquele derivado da polpa do coco (*Cocos nucifera* L.).

Na década de 1950 o óleo de coco era o óleo vegetal mais comercializado no mundo. Em 1961 a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) começou a coletar dados referentes a colheitas e produção de óleos e o de coco ocupava a 4ª posição entre os 12 óleos vegetais mais comercializados em todo o mundo. Atualmente, o óleo de coco compõe apenas 2% da produção de óleos vegetais ocupando a nona posição, enquanto os óleos de palma, soja e canola ocupam 30%, 26% e 14%, respectivamente (NAYAR, 2017).

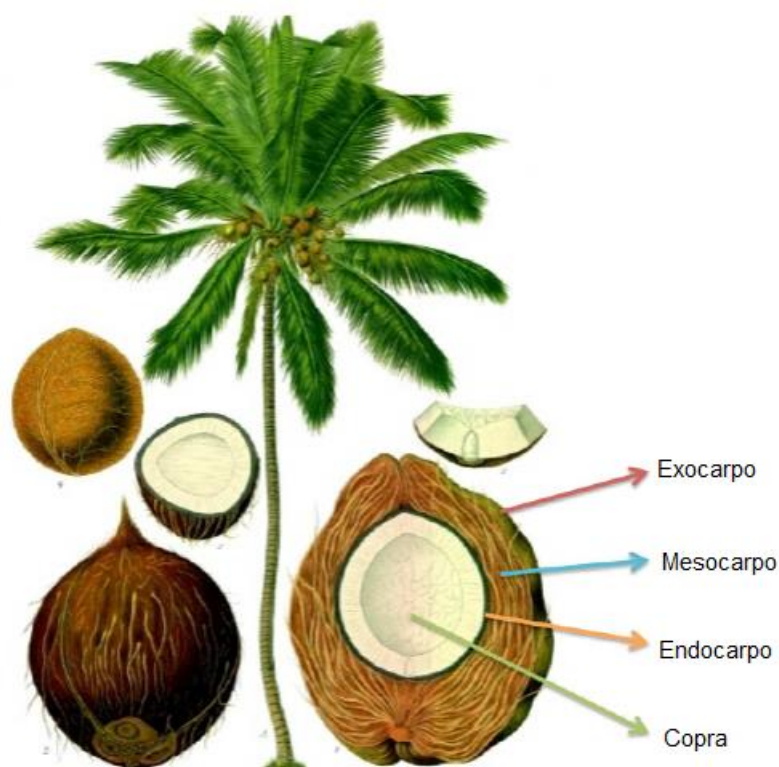
Os principais produtores mundiais de óleo de coco são a Indonésia, Filipinas e Índia com mais de 70% da produção mundial. Apesar de apresentar elevada produtividade, a contribuição nacional chega a cerca de 3,8% da produção mundial, ocupando a 5ª posição, totalizando 2,3 milhões de toneladas em 2017. A região nordeste tem destaque na produção de coco, com cerca de 74% de toda produção nacional, sendo os principais estados Bahia, Sergipe e Ceará (BRAINER, 2018).

A qualidade e acidez do óleo de coco depende principalmente da secagem, armazenamento e transporte. O óleo de coco assim como o óleo de palmiste, óleo de semente de babaçu, óleo de *cuphea* apresentam alto teor de ácido láurico (40 – 50%), devido ao alto teor de ácidos graxos de cadeia média e baixo teor de ácidos graxos insaturados. O menor ponto de fusão do óleo de coco decorre da composição de ácidos graxos e as demais propriedades dependem da distribuição desses ácidos

graxos no glicerol. O óleo de coco é um óleo saturado com aproximadamente 90% de teor de ácidos graxos saturados, baixo teor de ácidos graxos poliinsaturados, sendo muito estável e resistente ao ranço oxidativo (PHAM, 2016).

Enquanto o coco verde é utilizado para obtenção de água de coco, no coco seco as fibras do mesocarpo são utilizadas em tapetes, vasos, barreira sonora, entre outras aplicações. O endocarpo, além da sua utilização em trabalhos artesanais, pode ser utilizado como carvão, lenha. A copra, a porção mais nobre da planta, é utilizado na produção de coco ralado, óleo, ração animal, dentre outros empregos (Figura 2) (BRAINER, 2018; DE PINHO; SOUZA, 2018).

Figura 2 - Corte longitudinal do coco



Fonte: Adaptado de Bolaños (2013)

Apesar da existência de diversas formas de extração de óleo de coco, as principais são a extração artesanal, mecânica e por solvente. No método de extração artesanal a polpa do coco é cozida juntamente com água e após a fervura o óleo sobrenadante é retirado. Esse óleo é submetido ao aquecimento para que ocorra sua secagem e em seguida é filtrado. Através da prensagem é realizada a extração

mecânica e na extração por solvente é adicionado um solvente orgânico a planta. Após determinado tempo da adição é realizada a separação da porção sólida da porção líquida. (DE PINHO; SOUZA, 2018).

De acordo com Jayawardena *et al.* (2021) o consumo do óleo de coco apresenta múltiplos benefícios como diminuição do colesterol, melhora das funções cognitivas, redução do risco de doenças cardiovasculares, diabetes, assim como na cicatrização de feridas. Os corpos cetônicos, que se acredita, serem convertidos a partir dos quase 50% de ácidos graxos de cadeia média presente no óleo de coco possuem a capacidade de passar pela barreira hematoencefálica, fornecendo energia para o cérebro com diminuição dos níveis de glicose, tendo um possível papel terapêutico em doenças neurodegenerativas.

3.2.1 Composição óleo de coco

Segundo o Departamento de Agricultura do Estados Unidos (em inglês United States Department of Agriculture – USDA) o óleo de coco é composto por carboidratos, proteínas, gorduras, fibras e minerais, cuja composição está descrita na Tabela 2.

As vitaminas lipossolúveis presentes no óleo de coco são micronutrientes essenciais para o metabolismo, crescimento e fisiologia do organismo humano (LIU *et al.*, 2021). A vitamina E possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Assim como possui importante papel no sistema imune. Tem como funções desenvolvimento ósseo, prevenção de osteoporose, regulação de cálcio e fósforo e auxílio na resposta imune. A vitamina K possui importante função na coagulação sanguínea, fatores de coagulação do sangue, mineralização óssea. Sendo que a deficiência de vitamina K é observada através de coagulopatias como tempo de coagulação prolongado e sangramento subcutâneo, além de poder contribuir para uma menor densidade óssea (STEVENS, 2021).

Tabela 2 - Composição de vitaminas, minerais e lipídios em 100 g de óleo de coco

	Composição	Quantidade	IDR (%)
Macronutrientes	Energia	892 kcal	44,6
	Gordura	99,06 g	180,1
Minerais	Cálcio	1,00 mg	0,1
	Ferro	0,05 mg	0,4
	Zinco	0,02 mg	0,3
Vitaminas	Vitamina E	0,11 mg	1,1
	Vitamina K	0,60 µg	0,9
	Colina	0,30 mg	0,1
Lipídios	Gorduras Saturadas	82,48 g	374,9
	Ác. caprílico (8:0)	6,80 g	-
	Ác. Cáprico (10:0)	5,39 g	-
	Ác. Láurico (12:0)	41,84 g	-
	Ác. Mirístico (14:0)	16,65 g	-
	Ác. Palmítico (16:0)	8,64 g	-
	Ác. Esteárico (18:0)	2,52 g	-
	Gorduras monoinsaturadas	6,33 g	-
	Ác. Oléico (18:1 ω-9)	6,27g	-
	Gorduras poli-insaturadas	1,70 g	-
	Ác. Linoléico (18:2 ω-6)	1,68 g	-
	ALA (18:3 ω-3)	0,02 g	-
	Gorduras Trans	0,03 g	-
	Fitoesteróis	86,00 mg	-
Outros	Água	0,94 g	-

Fonte: USDA (2018)

Dentre os ácidos graxos saturados presentes nos triacilglicerídeos, ácidos láurico, mirístico e palmítico são os encontrados em maior concentração no óleo de coco. Gorduras ricas em cadeias saturadas de ácidos graxos têm a tendência de se solidificar em temperaturas baixas (JORGE, 2009), uma das características apresentada pelo óleo de coco.

Em relação aos ácidos graxos monoinsaturados dos triacilglicerídeos, o ácido oléico é o que apresenta maior concentração (18:1 ω-9) tendo demonstrado inúmeros efeitos farmacológicos, atuando como fator neurotrópico, inibindo a proliferação do câncer, reduzindo inflamação, revertendo riscos de obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (ZHAO *et al.*, 2021). As gorduras poliinsaturadas também se apresentam como de

suma importância ao organismo, pois na sua ausência pode ocorrer déficit funcional do sistema nervoso e no desenvolvimento do organismo como um todo (CLEMENTE *et al.*, 2007).

3.2.2 Características físicas, químicas e físico-químicas

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprovou o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade referente a óleos e gorduras vegetais através da Resolução nº 482 de 23 de setembro de 1999, fixando a identidade e características mínimas de qualidade a que devam obedecer os óleos e gorduras vegetais, Tabela 3, em concordância com o que está estabelecido no *Codex Alimentarius* (BRASIL, 1999; FAO, 2019).

Tabela 3 – Características físicas, químicas e físico-químicas do óleo de coco	
	Óleo de coco
Densidade relativa 40°C/25 °C	0,908 – 0,921
Índice de refração (n D 40)	1,448 – 1,450
Índice de saponificação	248 – 265
Índice de iodo (Wijs)	6 – 11
Matéria insaponificável, g 100 g ⁻¹	Máximo 1,5%
Acidez, g de ácido oléico 100 g ⁻¹	
Óleo refinado	Máximo 0,3%
Óleo bruto	Máximo 5,0%
Índice de peróxido, meq kg ⁻¹	Máximo 10

Fonte: Brasil (1999); FAO (2019)

3.2.3 Contaminantes inorgânicos em óleo de coco

A presença no óleo de coco ou outros óleos comestíveis de contaminantes inorgânicos pode ocorrer através da utilização de fertilizantes durante sua produção ainda nas propriedades rurais, bem como a contaminação por metais pode ocorrer devido a exposição a grandes quantidades de metais presentes no ambiente, assim como nos processos de extração e refinamento, emissões industriais (KARA; FISHER; HILL, 2015; MANJUSHA; SHEKHAR; KUMAR, 2019).

Enquanto a presença de determinados contaminantes inorgânicos, em óleos comestíveis, como As, Hg, Cr, Cd e Pb apresentam potencial toxicidade ao serem consumidos por seres humanos; os metais Fe, Cu, Ca, Mg, Co, Ni e Mn mesmo em nível traço aumentam a oxidação desses óleos (MANJUSHA; SHEKHAR; KUMAR, 2019; VALASQUES *et al.*, 2020). Segundo Kara; Fisher; Hill (2015) a presença de analitos mesmo em nível traço permite uma avaliação do frescor e do período de armazenamento desse óleo comestível, permitindo uma conclusão em relação a qualidade do mesmo.

A Instrução Normativa nº 88 de 26 de março de 2021 publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. O óleo de coco se encaixa dentro da categoria óleos e gorduras comestíveis de origem vegetal e ou animal, incluindo a margarina. Os valores estabelecidos para os LMT dessa categoria são 0,10 mg kg⁻¹ para As, 0,10 mg kg⁻¹ para Cd, 0,30 mg kg⁻¹ para Pb, enquanto óleos e gorduras virgens, exceto azeite de oliva apresentam valores máximos de 0,4 mg kg⁻¹ para Cd.

Já o Regulamento da Comissão Europeia (em inglês, *Commission Regulation* - EC) nº 1881/2006 de 19 de dezembro de 2006 através do Jornal Oficial da União Europeia que estabelece procedimento comunitários para os contaminantes presentes nos gêneros alimentícios firmou que óleos e gorduras, incluindo a matéria gorda do leite deve apresentar teor máximo de Pb de 0,10 mg kg⁻¹.

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (do inglês, United States Department of Agriculture – USDA, 2017) a China através da Comissão Nacional de Saúde e Planejamento Familiar e Administração de Alimentos e Medicamentos da China (do inglês, National Health and Family Planning Commission e China Food and Drug Administration) foram estabelecidos os níveis máximos de contaminantes em alimentos. O óleo de coco se enquadra dentro da categoria de gordura e seus produtos, possuindo limites máximos para Pb de 0,1 mg kg⁻¹; As 0,1 mg kg⁻¹; Ni 1,0 mg kg⁻¹.

De acordo com publicação da FAO (2019) sobre os padrões para óleos vegetais referenciados (do inglês, *Codex Standard for Named Vegetable Oils* – CODEX-STAN 210 1999) que se aplica ao óleo de coco. Pode apresentar como contaminação máxima por metais pesados 0,1 mg kg⁻¹ de Pb, 0,1 mg kg⁻¹ de As.

Independentemente do método utilizado para a concentração de metais em óleos comestíveis essa é uma difícil tarefa e quanto menor sua concentração mais

difícil se torna (LÓPEZ-GARCÍA; VICENTE-MARTÍNEZ; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, 2014).

3.3 Método de preparo de amostras para análise inorgânica

O preparo de amostras é a etapa em que se gasta mais tempo, tem maior custo e ocorrem mais erros, sendo a etapa mais crítica entre as operações analíticas. Considerada a principal causa de resultados equivocados, seguida por erros humanos e problemas com equipamentos. De forma geral, para a realização das análises são necessárias etapas de preparo das amostras, e esse método deve ser escolhida da melhor maneira possível, considerando a técnica analítica de detecção, os analitos e a composição da amostra (KRUG; ROCHA, 2019).

O preparo de amostras, basicamente, consiste no isolamento e enriquecimento dos componentes de interesse de determinada amostra (REZAEI; ASSADI; HOSSEINI, 2006). O preparo de amostras de óleos vegetais e a determinação de possíveis contaminantes já foram relatadas através de diferentes métodos como RP-DLLME, digestão ácida assistida por micro-ondas e extração induzida por quebra de emulsão. No Quadro 1 são apresentados alguns métodos utilizados nessa etapa.

Quadro 1 – Métodos de preparo de amostras de matriz oleosa para determinação de contaminantes inorgânicos

(continua)

Amostras	Elementos	Método de preparo de amostra	Técnica de determinação	Referência
Cápsulas de óleo de peixe	Cd, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn	RP-DLLME	ICP OES	Kalschne <i>et al.</i> (2020)
Óleos comestíveis (óleo de mostarda, óleo de girassol, óleo de gergelim, óleo de amendoim, óleo de coco, óleo de arroz branco, óleo de milho)	Pb, Cd, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn	Extração assistida por Ultrassom	GF AAS	Manjusha; Shekhar; Kumar (2019)

Quadro 2 – Métodos de preparo de amostras de amostras oleosas para determinação de contaminantes inorgânicos

(conclusão)

Óleo de coco virgem	Cu, Fe e Pb	Digestão ácida	AAS	GHANI <i>et al.</i> (2018)
Óleo de peixe e azeite de oliva	Cd	RP-DLLME	SQT-FAAS	Özzeybek <i>et al.</i> (2020)
Suplementos dietéticos oleosos	Cd e Pb	Extração induzida por quebra de emulsão	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite	Leal <i>et al.</i> (2022)
Cápsulas de óleo de peixe, margarina e manteiga	Cd e Zn	RP-DLLME	F AAS	Sorouraddin; Farajzadeh; Okhravi (2020)
Óleo de milho, óleo de girassol e azeite de oliva	Cu	Extração induzida por quebra de emulsão	FAAS	Drosaki; Anthemidis (2022)
Manteiga de cacau	Mg, Ca, Zn e Na	Extração induzida por quebra de emulsão	FAAS	Guimarães <i>et al.</i> (2022)
Óleos comestíveis	Mg, Mn, Fe, Zn, Ag, Ba, Pb e Cr	Extração induzida por quebra de emulsão	ICP-MS	(HE <i>et al.</i> , 2014)

Fonte: Autoria própria (2022)

Kalschne *et al.* (2019a) aplicaram pela primeira vez o método RP-DLLME combinando com a determinação por ICP OES, sendo também a primeira vez aplicado a gordura animal. O método foi aplicado no preparo de amostra de óleo de peixe utilizando uma massa de 10,0 g e realizando a determinação dos analitos por ICP OES. Alcançando recuperações para Cd, Mn, Ni e Zn utilizando adição de analitos de 100 e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de 86,4 a 93,4% e 90,4 a 97,3%, respectivamente. Para Fe e Pb, as recuperações variaram de 85,7 a 90,0% e 85,3 a 94,4% para os mesmos valores de adição de analitos. Os valores dos limites de quantificação (LQ) obtidos RP-DLLME foram 0,41, 1,98, 0,33, 0,35, 1,52 e 1,39 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para Cd, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn,

respectivamente. Apresentou limite de detecção (LD) 0,12, 0,59, 0,10, 0,11, 0,58, 0,42 para Cd, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn, respectivamente.

Manjusha; Shekhar; Kumar (2019) aplicaram o método de extração assistida por ultrassom usando hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) sendo utilizados diferentes óleos comestíveis (óleo de mostarda, óleo de girassol, óleo de gergelim, óleo de amendoim, óleo de coco, óleo de arroz branco, óleo de milho) com uma massa de 1 g e a determinação dos analitos (Pb, Cu, Fe, Mn, Cd, Cr, Zn) realizada por espectrômetro de absorção atômica de forno de grafite. Já Ghani *et al.* (2018) utilizaram digestão ácida como método de preparo de amostra de óleo de coco virgem com massa de 0,5 g e realizada a determinação de Pb, Cu e Fe por espectrometria de absorção atômica, mas estes não informam qual sua porcentagem de recuperação.

Özzeybek *et al.* (2020) utilizaram o método RP-DLLME como método de preparo de amostra e determinação de Cd através de espectrometria de absorção atômica com chama de tubo de quartzo com fenda em amostras com massa de 3,0 g de azeite de oliva e óleo de peixe. Obtiveram recuperações de 95,6 a 105,7% para óleo de peixe, com LD $0,74 \mu\text{g kg}^{-1}$ e LQ $2,48 \mu\text{g kg}^{-1}$. Já Bruzzoniti *et al.* (2012) optaram pelo método de digestão assistida por micro-ondas no preparo de amostras de 0,15 g óleo mineral isolante e determinação por ICP OES. As recuperações obtidas foram de 0,4 a 31,9 mg kg^{-1} a depender da amostra, com LD de $8,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ LQ $29,3 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Extração induzida por quebra de emulsão foi o método de escolha de Pereira *et al.* (2013) para o preparo de amostras de 5 mL biodiesel e determinação de Cu, Mn e Ni por espectrometria de absorção atômica eletrotérmica. Foram obtidas recuperações de 95 a 102%, 91 a 109% 89 a 106% para Cu, Mn, Ni, respectivamente. Tendo um LD de 0,053, 0,18, 0,30 para Cu, Mn, Ni, respectivamente; e um LQ de 0,18, 0,60, 0,99 para Cu, Mn, Ni, respectivamente.

Leal *et al.* (2022) utilizaram o método de extração induzida por quebra de emulsão no preparo de 500 mg de amostras de suplementos dietéticos oleosos. As amostras foram acondicionadas em tubos de 15 mL de polipropileno e 1,5 mL de tolueno foi adicionado a mesma e durante 20 s foi realizada agitação manual. Em seguida 2 mL de solução ácida de Triton X-100 foi adicionada e a amostra foi mexida durante 30 s objetivando obter uma emulsão, que foi quebrada na centrifugação durante 5 min a 4000 rpm. Foram obtidas 2 fases, a fase orgânica contendo a amostra

oleosa e a fase aquosa contendo os metais extraídos. Foram retirados 2 mL da fase aquosa para posterior determinação por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (do inglês high-resolution continuum-source graphite furnace atomic absorption spectrometry - HR-CS GFAAS). A concentração de Cd nas amostras variou de 8,81 a 9,35 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e a maior concentração de Pb foi de 19,91 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Foram obtidas recuperações de 100,80 a 106,07% para o Cd e 94,65 a 108,41% para o Pb. Apresentando um LD para o Cd de 1,51 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e para o Pb 3,32 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto LQ para o Cd 5,04 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e para o Pb de 11,20 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Sorouraddin; Farajzadeh; Okhravi (2020) também escolheram o método RP-DLLME para o preparo de amostras de cápsulas de óleo de peixe, manteiga e margarina e posterior determinação de Cd e Zn por espectrômetro de absorção atômica de chama. Foram utilizados 2 g de amostra adicionados de solvente dispersor e extrator (solvente eutético profundo e ácido nítrico, respectivamente) e aquecidas a 45 °C para formar uma solução turva e posterior centrifugação durante 5 min a 6000 rpm. Apresentando um LD de 0,12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o Cd, e 0,18 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o Zn. LQ de 0,30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o Cd e 0,50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o Zn. Pelo método proposto foi possível obter recuperações de mais de 80% para ambos os analitos.

Drosaki; Anthemidis (2022) obtiveram recuperações de 94,2 a 102,4% para o Cobre através de extração ácida induzida por quebra de emulsão com aquecimento, utilizando espectrometria de absorção atômica com chama. O método proposto pelos pesquisadores apresenta 32 etapas, em que inicialmente são utilizadas 10 mL de solução de amostras de óleo (amostras de óleos diluído com xileno) e solução extratora em câmara de extração termostatizada. Após aquecimento os metais passam da fase oleosa para fase aquosa e posterior retirada dessa fase para realização da quantificação por espectrometria de absorção atômica com chama.

Guimarães *et al.* (2022) utilizaram o método de extração induzida por quebra de emulsão para amostras de manteiga de cacau, sendo realizada posterior determinação por espectrômetro de absorção atômica de chama. Foi utilizada 1 g de manteiga de cacau aquecida a 35 °C em banho-maria, adicionado de xileno com objetivo de manter as amostras liquefeitas e surfactante em ácido nítrico agitado de forma vigorosa por 10 s até formação de uma emulsão. A quebra de emulsão ocorre pelo aquecimento em banho-maria a 96 °C por 7 min, seguido pela centrifugação por 5 min até a separação das fases. Após esse processo a fase aquosa foi retirada, e dividida em 4 alíquotas para determinação dos analitos. As concentrações

encontradas pelo método proposto foram de 15,8 e 37,1 mg kg⁻¹ (Mg), 1,20 e 5,18 mg kg⁻¹ (Ca), 0,20 e 1,05 mg kg⁻¹ (Zn), e 0,60 e 1,93 mg kg⁻¹ (Na).

He *et al.* (2014) por meio da extração induzida por quebra de emulsão realizaram a determinação multielementar (Mg, Mn, Fe, Zn, Ag, Ba, Pb e Cr) em óleos comestíveis (de colza, mistura de óleos comestíveis, de soja, de girassol, de milho, azeite de oliva, de amendoim, de farelo de arroz, de camélia e de canola) e posterior determinação por ICP-MS. Inicialmente são misturados 4 mL de óleo com 2 mL de ácido Triton X-114 e agitados por 20 min objetivando a melhora na extração dos analitos, em seguida é realizada centrifugação para promover a quebra da emulsão. Causando a separação das fases, e posterior retirada de parte da fase aquosa contendo os analitos para posterior determinação por ICP-MS. O método apresenta como LD para Mg 0,093; Mn 0,052; Fe 0,271; Zn 0,177; Ag 0,007; Ba 0,009; Pb 0,004; Cr 0,033 µg L⁻¹ e LQ Mg 0,311; Mn 0,173; Fe 0,903; Zn 0,591; Ag 0,024; Ba 0,031; Pb 0,013; Cr 0,111 µg L⁻¹. As recuperações obtidas foram de 99 a 107% para óleo de colza com o analito Mg; 89 a 102% Mn; Fe 97 a 105%; Zn 89 a 108%; Ag 98 a 106%; Ba 88 a 99%; Pb 89 a 102%; Cr 97 a 103%. Já para a mistura de óleos comestíveis a recuperação foi de 57 a 102% para Mg; 89 a 100% para Mn; 87 a 107% para Fe; 92 a 101% para Zn; 89 a 100 para Ag; 100 a 102% para Ba; 89 a 97% para Pb; 87 a 100% para Cr. As demais recuperações podem ser observadas na Tabela 4, sendo todas acima de 80%.

Tabela 4 - Resultados obtidos no teste de recuperação aplicado às amostras de óleo para Mg, Mn, Fe, Zn Ag, Ba, Pb e Cr

Elemento	Recuperação (%)							
	Soja	Girassol	Milho	Azeite de oliva	Amendoim	Farelo de arroz	Camélia	Canola
Mg	96 – 108	93 – 101	88 - 96	90 – 104	100 – 106	97 – 103	99 – 107	99 – 100
Mn	96 – 108	87 – 103	99 – 106	88 – 100	89 – 108	88 - 89	87 – 103	90
Fe	100	89 – 107	88 – 107	100	99 – 107	88 – 105	96 – 101	95 – 98
Zn	88 – 103	99 – 104	89 – 99	104 – 108	92 – 100	87 – 93	99 – 106	96 – 106
Ag	99 – 108	99 – 104	95 – 102	95 – 105	94 – 107	89 – 102	98 – 100	100 – 108
Ba	91 – 100	91 – 103	87 – 100	104 – 105	95 – 101	97 – 101	92 – 100	88 -98
Pb	97 – 104	95 – 101	96 – 106	96 – 99	100 - 105	90 - 98	102 – 107	98 – 108
Cr	99 – 105	97 – 108	101 – 103	101 - 103	96 - 107	88 - 105	101 – 105	95 - 100

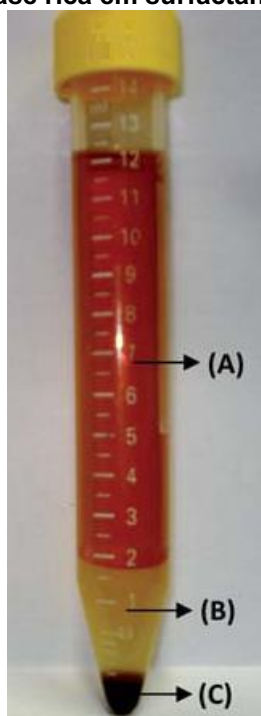
Fonte: Modificado de He *et al.* (2014)

3.3.1 Extração induzida por quebra de emulsão (EIEB)

O método de preparo de amostras por extração induzida por quebra de emulsão (do inglês *extraction induced by emulsion breaking*) foi proposto por Cassella *et al.* (2010) para determinação de metais em amostras de óleo. Por esse processo é possível pré-concentrar os analitos da amostra, aumentando os limites de detecção e permitindo sua detecção mesmo em nível traço (PEREIRA *et al.*, 2013). Durante a extração da amostra as variáveis que mais podem influenciar nesse processo são as concentrações do surfactante e da solução ácida (VALASQUES *et al.*, 2020).

O método é baseado na formação de emulsão de água em óleo. Em determinado volume de amostra adiciona-se ácido nítrico e surfactante, essa solução é agitada para que forme uma emulsão. Após essa etapa o tubo é aquecido, e ocorre a quebra da emulsão com a formação de três fases distintas. A porção orgânica, contendo apenas o óleo, compõe a fase superior, abaixo dessa está a fase aquosa contendo os metais extraídos e fase inferior é rica em surfactantes, como demonstra a Figura 3. Com auxílio de uma micropipeta a fase aquosa é coletada, podendo ser diluída se necessário (PEREIRA *et al.*, 2013; VALASQUES *et al.*, 2020)

Figura 3 - Extração induzida por quebra de emulsão. (A) fase orgânica; (B) fase aquosa; (C) fase rica em surfactante



Fonte: Cassella *et al.* (2010)

3.3.2 Digestão assistida por micro-ondas (MAWD)

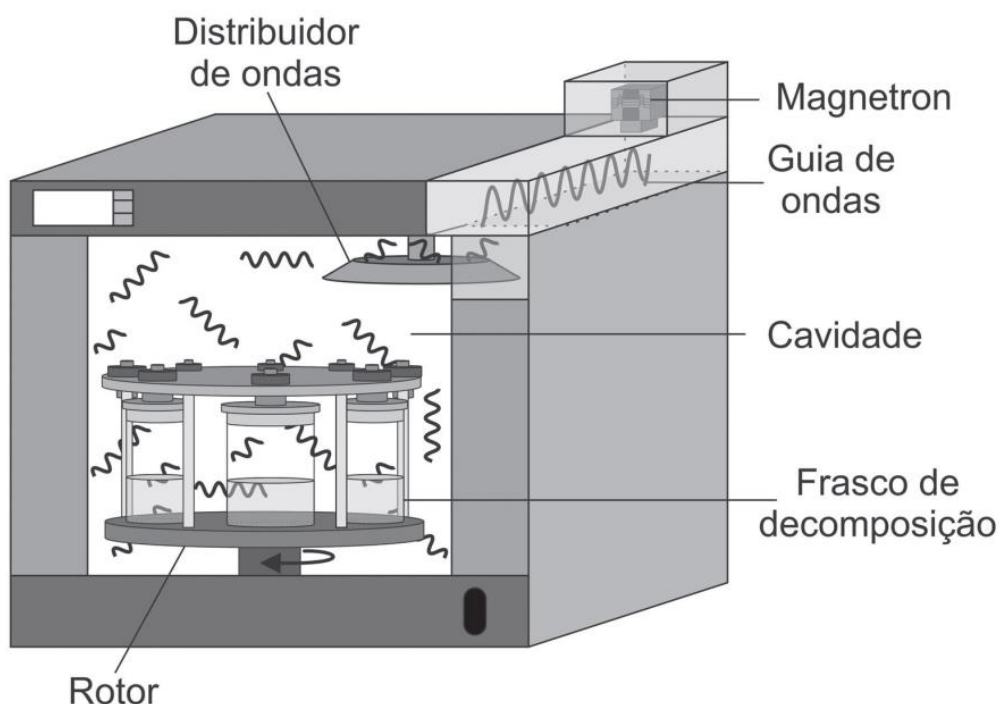
O início da Digestão Assistida por Micro-ondas (do inglês, Microwave-assisted wet digestion) ocorreu em 1975 com o primeiro relato da utilização da radiação micro-ondas na etapa de preparo de amostras, por meio de um forno micro-ondas doméstico. Esse foi usado para decomposição de material biológico por aquecimento com mistura ácida em sistema aberto. Com o desenvolvimento de equipamentos específicos para laboratório, na década de 80, sua utilização aumentou, com destaque ainda maior na década de 90 com o desenvolvimento de frascos que suportavam altas temperaturas e pressões. Atualmente a radiação micro-ondas é utilizada para decomposições por vias úmida ou seca, processos de extração e sistemas de combustão, entre outras utilizações, sendo aplicada em todas as áreas da química analítica (KRUG; ROCHA, 2019).

As técnicas de digestão podem ser em frasco aberto ou frasco fechado, normalmente os últimos são utilizados evitando potenciais contaminações e perda de espécies voláteis de determinados elementos alvos, também potencializa o aumento da pressão e temperatura permitindo a posterior quantificação de diversos elementos em baixas concentrações. (YANG; CASEY; GAO, 2017).

A realização da decomposição depende das reações químicas em condições ideais de temperatura e pressão. A absorção da energia liberada pela radiação do micro-ondas leva a rápido aumento da temperatura. Esse aquecimento ocorre devido a migração iônica e rotação de dipolos.

Ao aplicar um campo elétrico os íons alteram sua trajetória sofrendo resistência das espécies com fluxo oposto ao seu deslocamento, ocorrendo dissipação de energia e aumento da temperatura no meio. O mesmo ocorre na rotação de dipolos, em que devido a presença de campo elétrico o movimento de orientação apresenta resistência. O processo de aquecimento realizado através desse método ocorre de forma mais rápida, eficiente e seguro do que se comparado ao processo de aquecimento condutivo, sendo também diminuída a quantidade de reagentes necessários para converter a amostra em solução (KRUG; ROCHA, 2019). Na Figura 4 é possível observar a representação de sistema de digestão assistida por micro-ondas.

Figura 4 – Representação de sistema de decomposição por radiação micro-ondas com frascos em rotor, sob ação da radiação micro-ondas



Fonte: krug; Rocha (2019)

3.3.3 Microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME)

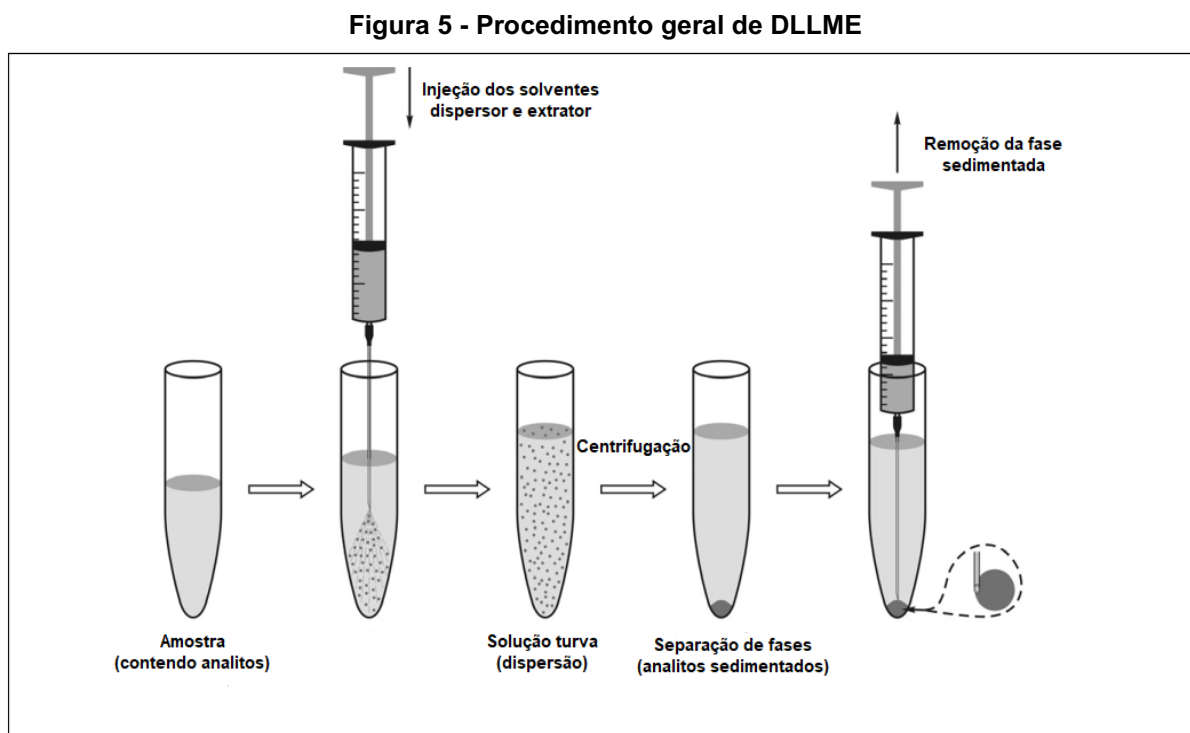
O procedimento DLLME foi proposto pelos autores Rezaee; Assadi; Hosseini (2006) como uma novidade em relação às técnicas de microextração, sendo um poderoso método de pré-concentração. Simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, alta recuperação e fator de enriquecimento são as vantagens da DLLME.

O método é baseado no sistema de solvente de componente ternário que consiste em uma fase aquosa, um solvente de extração não polar e um solvente polar miscível em água (solvente dispersor), assim como na extração líquido-líquido homogênea (HLL, do inglês *Homogeneous Liquid-Liquid Extraction*) e a extração de ponto de nuvem (CPE, do inglês *cloud point extraction*) (RYKOWSKA; ZIEMBLIŃSKA; NOWAK, 2018).

Para realização do método determinado volume de água bidestilada, solvente dispersor, solvente extrator e a amostra são colocados em tubos de ensaio. A mistura é gentilmente agitada, formando uma solução turva, o próximo passo é a

centrifugação da amostra para separação das fases. A fase sedimentada contendo analitos é removida através de um micro-seringa e pode então ser submetida a determinação (REZAEI; ASSADI; HOSSEINI, 2006).

Tipos e volumes de solventes extrator e dispersor, tempo de extração, quantidade de amostras, pH e adição de sal são os principais fatores que tem influência na eficiência de extração do método DLLME. O solvente dispersor deve ser solúvel no solvente extrator e miscível em água, aumentando a interação entre as fases com conseqüente aumento na eficiência da extração. Já o solvente extrator deve ter maior densidade que a água assim como baixa solubilidade em água (HERRERA-HERRERA *et al.*, 2010). Na Figura 5 pode ser observado o esquema do procedimento de amostra por RP-DLLME.



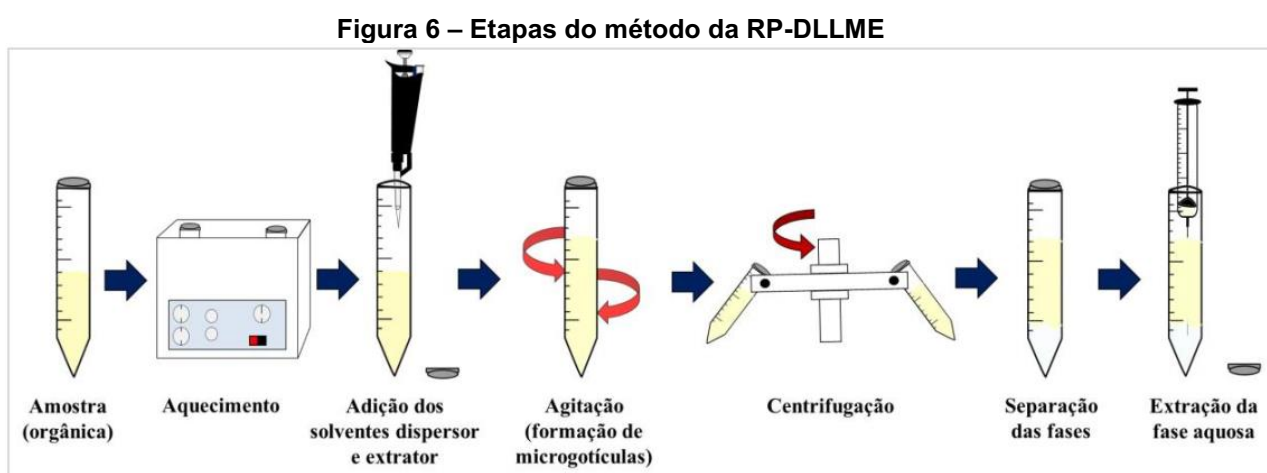
Fonte: Zgoła-Grzesowiak; Grzeskowiak (2011)

3.3.4 Microextração dispersiva líquido-líquido em fase reversa (RP-DLLME)

Rezaee; Assadi; Hosseini (2006) propuseram o método DLLME clássico, mas este apresentava desvantagens já que é inadequado para extrair analitos altamente polares ou hidrofílicos e dependem dos solventes de extração altamente tóxicos (XIE

et al., 2020). A microextração líquido-líquido em fase reversa como método alternativo à DLLME começou a ser utilizada há pouco mais de 10 anos e tem atraído cada vez mais atenção já que a técnica se mostra simples e rápida, além de diminuir os processos de pré-tratamento da amostra e menor uso de solventes orgânicos (HASHEMI *et al.*, 2010). Na RP-DLLME é possível utilizar pequeno volume de fase aquosa para extração de grandes volumes de amostra oleosa (KALSCHNE *et al.*, 2019a).

Uma mistura de solventes (dispersor e extrator) é utilizada promovendo a extração dos analitos para a fase aquosa. Os solventes dispersores são utilizados objetivando a miscibilidade da amostra. Etanol, isopropanol, n-propanol são alguns dos exemplos e destaques utilizados como solvente dispersor. Enquanto o solvente extrator é preparado a partir de solução ácida (LOURENÇO *et al.*, 2019). As etapas gerais realizadas na RP-DLLME estão ilustradas na Figura 6.



Fonte: Andriolli (2021)

3.4 Química analítica verde

Química verde, química ambientalmente benigna, química limpa, economia de átomos, química benigna por Design são alguns dos nomes empregados em novos produtos e processos químicos criados e desenvolvidos de formas mais eficientes, eficazes, economicamente vantajosos, menos danosos para saúde humana e para o ambiente que vieram à tona na década de 1990 (ANASTAS, 1999; DE LA GUARDIA; ARMENTA, 2011; LÓPEZ-LORENTE *et al.*, 2022).

A Química Analítica Verde teve sua origem a partir da química verde, objetivando manter, até mesmo melhorar análises químicas, associado a redução dos impactos negativos (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013). Apesar de ser utilizada para avaliar impactos ambientais das atividades químicas, contribuindo com a proteção do meio ambiente, também acarreta problemas ambientais devido às substâncias perigosas utilizadas e gerados durante os procedimentos analíticos (LÓPEZ-LORENTE *et al.*, 2022). Gałuszka; Migaszewski; Namieśnik (2013) propuseram os 12 princípios da Química Analítica Verde, que tiveram como base, para sua elaboração, os princípios da química verde (Quadro 2).

Quadro 3 – Princípios da Química Analítica Verde

Número	Princípio
1	Técnicas analíticas diretas devem ser utilizadas para evitar tratamento de amostras
2	Tamanho e quantidade de amostra devem ser os menores possíveis
3	Análises <i>in situ</i> devem ser realizadas
4	Integração entre operações e processos analíticos, reduzindo consumo de energia e uso de reagentes
5	Utilização de métodos automatizados e miniaturizados
6	Derivatizações devem ser evitadas
7	Evitar a geração de grandes quantidades de resíduos analíticos e gestão correta desses resíduos deve ser providenciada
8	São preferíveis métodos multi-analitos
9	Uso de energia deve ser reduzido
10	Reagente provenientes de fontes renováveis devem ser preferidos
11	Reagentes perigosos devem ser eliminados ou substituídos
12	A segurança do operador deve ser aumentada

Fonte: Gałuszka; Migaszewski; Namieśnik (2013)

Através da química analítica verde novas abordagens estão sendo criadas e colocados em prática em elementos como análise de campo, triagem, extração, métodos de diluição, métodos de digestão (ANASTAS, 1999).

Tendo como objetivo procedimentos analíticos mais sustentáveis, o ideal seria medições diretas em amostras não tratadas, já que essa etapa é a que pode trazer mais impactos ambientais como resultado, mas diversas metodologias analíticas

requerem esse preparo. Homogeneização, filtração, limpeza, centrifugação, dissolução, extração e pré-concentração do analito são algumas das formas de preparo das amostras. No caso da extração é necessário o uso de reagentes e energia, o procedimento escolhido deve ser o mais simples, assim como a escolha do reagente deve ser menos nocivo entre as opções disponíveis (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2015).

Gałuszka *et al.* (2012) apresentaram a Eco-Escala Analítica uma forma de avaliação semiquantitativa de metodologias analíticas que permite comparação e seleção do método mais “verde”. Nessa escala o valor ideal proposto é 100, quando os parâmetros estão diferentes do ideal são diminuídos pontos de penalidade desse valor. O valor obtido ao final desse cálculo é colocado em escala, em que >75 representa análise verde excelente; > 50 análise verde aceitável e < 50 análise verde inadequada.

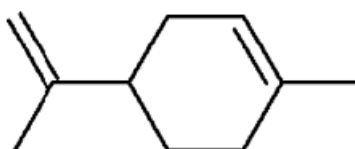
Recentemente nova ferramenta métrica baseada nos doze princípios da química verde foi desenvolvida por Pena-Pereira; Wojnowski; Tobiszewski (2020) visando avaliar se o método encontra-se dentro dos princípios da química analítica verde, permitindo avaliar a coleta das amostra, a determinação dos analitos, o preparo de amostras e o descarte de resíduos. Chamada Analytical GREEnes (software AGREE) está ferramenta transforma cada dado em uma escala de 0 a 1 de acordo com a escala de cores que varia de vermelho, amarelo e verde. Um gráfico circular é formado a partir da pontuação dos dados obtidos formando uma pontuação geral do método.

3.4.1 Limoneno

São dois os tipos de solventes que podem ser utilizados nos métodos químicos, aqueles obtidos a partir da indústria do petróleo e aqueles obtidos a partir de fontes renováveis (VIROT *et al.*, 2008). A utilização de solventes tóxicos, que trazem perigos à saúde e ao meio ambiente, utilizados em processos químicos, vem sendo substituída nos últimos anos pela utilização de solventes verdes, obtidos de fontes renováveis, indo ao encontro dos princípios da química analítica verde. Um exemplo é o D-limoneno, obtido a partir de cascas de frutas cítricas, terpeno

biodegradável com baixo custo e baixa toxicidade (Figura 7). Alimentos, cosméticos, perfumes, medicamentos, bebidas, detergentes, sabões, inseticidas, desinfetantes, desengordurantes são algumas de suas aplicações. O D-limoneno também pode ser utilizado como solvente alternativo a solventes com maior toxicidade como metiletilcetona, acetona, tolueno, éteres glicólicos e vários solventes fluorados e clorados. A Tabela 5 apresenta comparação das propriedades químicas e físicas entre D-limoneno e tolueno (VIROT *et al.*, 2008; POURREZA; NAGHDI, 2017).

Figura 7 - Estrutura do D-limoneno.



Fonte: Viroto *et al.* (2008)

Tabela 5 - Propriedades químicas e físicas do D-limoneno comparado ao tolueno

Propriedades	D-Limoneno	Tolueno
Fórmula	C ₁₀ H ₁₆	C ₆ H ₅ CH ₃
Peso molecular	136,23	92,14
Ponto de Ebulição (°C)	175,5	110,6
Calor de vaporização (kJ kg ⁻¹)	353	351
Densidade (g mL ⁻¹)	0,8411	0,8669
Toxicidade	Não	Sim
Impacto ambiental	Baixo	Alto

Fonte: Chemat; Tomao; Chemat (2012)

Segundo Tobiszewski (2019) a Sociedade Americana de Químicos de Óleos (do inglês, American Oil Chemists' Society – AOCS) tem recomendado a substituição de tolueno por D-limoneno em determinados métodos analíticos. Rendimento e qualidade do óleo bruto obtido a partir da extração com D-limoneno foram semelhantes aqueles obtidos com n-hexano (TANZI *et al.*, 2012). A partir da Tabela 4 é possível observar que D-limoneno e tolueno possuem peso molecular semelhante. D-limoneno possui ponto de ebulição mais alto em comparação ao tolueno trazendo mais estabilidade ao aquecimento. Outro ponto importante é em relação ao impacto ambiental que é alto com tolueno e baixo com o D-limoneno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instrumentação

A pesagem das amostras foi realizada em balança de precisão (Matte, modelo AW 220) com resolução de 0,0001 g e capacidade máxima de 220 g.

O aquecimento das amostras foi realizado em banho ultrassom (Elmasonic P 60 H) com capacidade máxima para 5,75 L e temperatura ajustável até 80 °C.

A separação das fases foi realizada em centrífuga (Cientec, CT-5000R, Brasil) com capacidade para 12 tubos de 15 mL e velocidade máxima de 5600 g.

A determinação de Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Ti, V, Zn foi realizada por ICP OES, utilizando o espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (modelo Optima 4300 DV, Perkin Elmer, EUA) equipado com nebulizador concêntrico e câmara de nebulização ciclônica. As condições operacionais foram as descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Condições operacionais do ICP OES usadas para determinação dos analitos nos extratos aquosos após o procedimento RP-DLLME proposto

(continua)

Parâmetro	Condição
Potência do gerador de radiofrequência (W)	1400
Vazão do gás principal (L min ⁻¹)	15,0
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,20
Vazão de gás nebulizador (L min ⁻¹)	0,70
Elementos	Comprimento de onda (nm)
Al	308,215
Ba	455,403
Cd	214,440
Cr	205,560
Cu	327,393
Fe	238,204
Mg	279,077
Mn	257,610

Tabela 7 - Condições operacionais do ICP OES usadas para determinação dos analitos nos extratos aquosos após o procedimento RP-DLLME proposto

	(conclusão)
Mo	202,031
Ni	231,604
Pb	220,353
Ti	334,940
V	290,880
Zn	206200

Fonte: Autoria própria (2022)

4.2 Reagentes, materiais e solução de referência

Água ultrapura foi utilizada na lavagem de vidrarias e preparo de soluções (Gehaka, Brasil) com resistividade inferior a $18,2 \Omega \text{ cm}^{-1}$, acoplado com um equipamento de sistema de osmose reversa (modelo OS 10 LX, Gehaka, Brasil). Foram utilizadas micropipetas automáticas (modelo Basic K1-1000B, K1-100B, Kasvi) no preparo de soluções com volumes variáveis entre 10-100 e 100-1000 μL .

Durante o preparo de amostra (pesagem, adição da solução solvente, aquecimento, adição da solução dispersora/extratora e centrifugação), foram utilizados tubos de polipropilenos de 15 mL sem base e de 50 mL com base (Corning) com tampa de rosca para uso em centrífugas.

Antes de sua utilização todos os materiais foram lavados e descontaminados com solução de HNO_3 a 10% (v v⁻¹) preparado a partir de HNO_3 P.A (65%, Neon, Brasil) e em seguida foram secos em temperatura ambiente.

Foi utilizado (R)-(+)-Limoneno (Sigma-Aldrich, Alemanha) como solvente verde como diluente do óleo de coco, em substituição ao xileno utilizado por Kalschne *et al.* (2019b).

Na realização do método de RP-DLLME, o HNO_3 foi usado como solvente extrator P.A (65%, $d = 1,39 \text{ g mL}^{-1}$, Merck, Alemanha) e como solvente dispersor foram utilizados o 1-propanol P.A (99%, Sigma, Alemanha), 2-propanol/isopropanol (Honeywell, Estados Unidos) e o Álcool etílico 95%/etanol (Sigma-Aldrich, Alemanha).

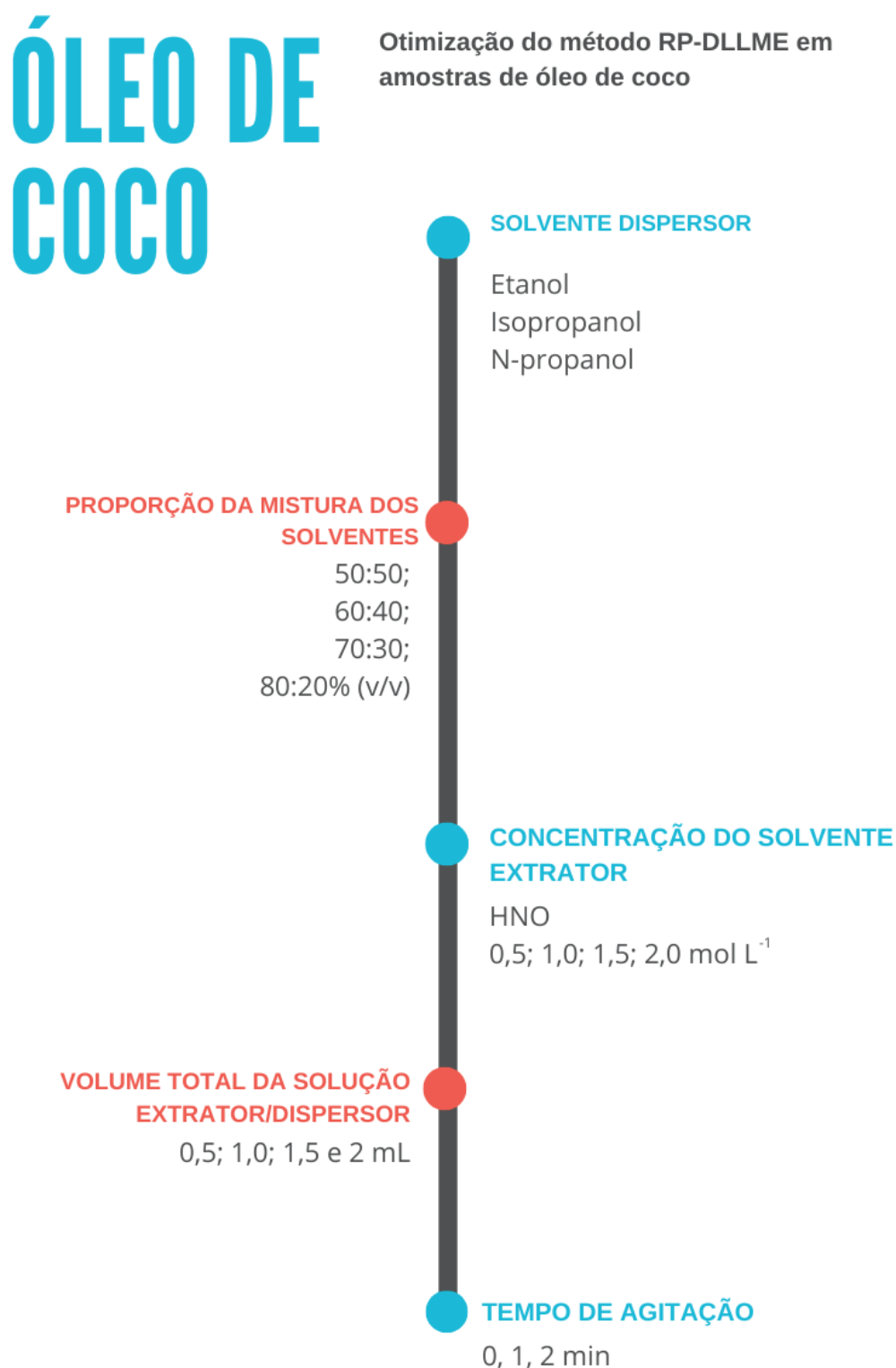
Os ensaios de recuperação foram realizados a partir da adição dos analitos, utilizando uma solução de referência multielementar em matriz oleosa (VHG-V21+K, LGC, Estados Unidos) na concentração de 50 mg kg^{-1} , contendo os seguintes

elementos: Ag, Al, B, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Si, Sn, Ti, V e Zn.

4.3 Amostras

Foi utilizado óleo de coco obtida no comércio local da cidade de Medianeira-PR. Foram adicionadas as amostras $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de solução multielementar para os ensaios de recuperação, dessa forma sendo possível avaliar a exatidão e precisão do método mediante essa adição e recuperação dos analitos em amostras de óleo de coco comercial. A homogeneização da amostra e padrão foi realizada por meio de agitação manual intensa (30 s) e 1 min no vórtex. Todos os tubos foram devidamente identificados com nome, data e concentração dos analitos. A adição de analitos foi realizada diariamente, assim como o preparo de soluções com o objetivo de minimizar possíveis erros. Foram realizados ensaios com amostras de 5,0 g, utilizando 1 mL de solução com 50% (v v⁻¹) HNO₃ como solvente extrator e 50% (v v⁻¹) de n-propanol como dispersor. Os estudos foram realizados em quintuplicata. Na Figura 8 é mostrado um esquema geral dos parâmetros avaliados no desenvolvimento desse estudo.

Figura 8 - Fluxograma dos procedimentos experimentais desenvolvidos neste estudo



4.3.1 Avaliação do solvente dispersor

Em relação ao solvente dispersor foram testados etanol, isopropanol e n-propanol para melhor recuperação do analito.

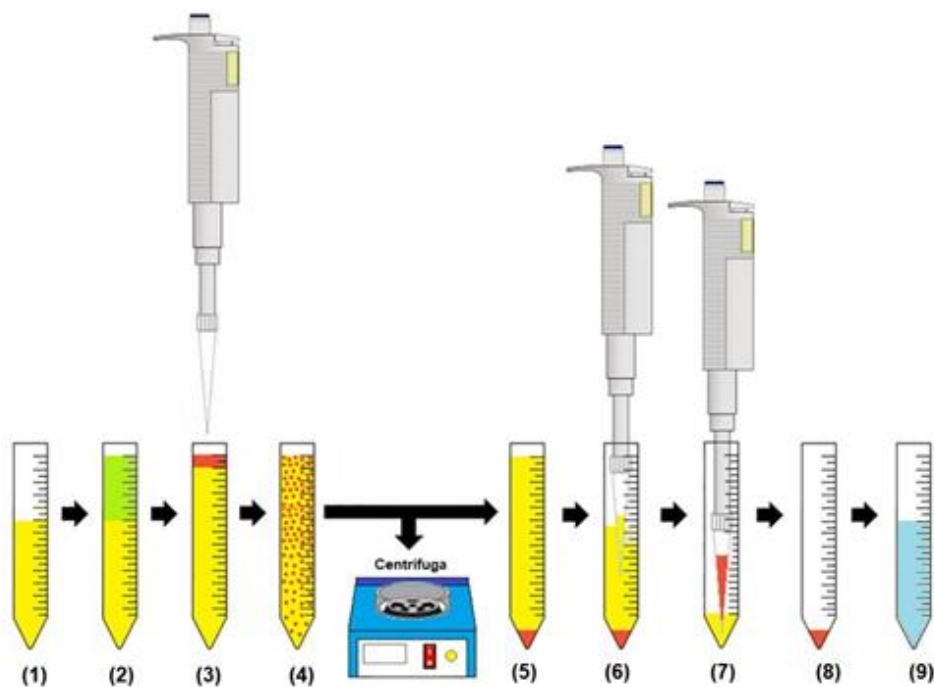
4.3.2 Avaliação da proporção da mistura dos solventes dispersor e extrator

A etapa contendo a solução de solvente dispersor e extrator também foi verificada a melhor eficiência nas proporções de 20, 30, 40 e 50% de agente dispersor em relação ao volume total da mistura, tanto para o solvente dispersor propanol quanto para o isopropanol.

4.4 Métodos de preparo de amostras

Neste estudo foi utilizado o método RP-DLLME para concentração de metais em amostras de óleo de coco. Em tubos de 15 mL de polipropileno foram pesadas 5 g de amostra, em seguida foram adicionados 5 mL de D-limoneno. As amostras foram então submetidas a aquecimento no banho-maria por aproximadamente 20 min a 70 °C. Posteriormente adicionou-se 1,0 mL da solução solvente dispersor e extrator e realizou-se a agitação das amostras manualmente por 30 s seguida por 1 min no vórtex, para homogeneização da amostra com a mistura do dispersor e extrator. As amostras foram submetidas à centrifugação por 15 min a 6000 rpm (5600 x *g*) em temperatura ambiente. Após a centrifugação, com auxílio de uma pipeta a porção oleosa foi removida objetivando facilitar a retirada da fase aquosa. Essa porção aquosa foi transferida para novo tubo de 15 mL e aferida com solução de HNO₃ a 0,5% (v v⁻¹) a 5 mL e encaminhada para determinação de metais por ICP OES (Figura 9).

Figura 9 – RP-DLLME. (1) Amostra; (2) adição D-limoneno; (3) adição do dispersor/extrator; (4) formação da solução após agitação; (5) após fase da centrifugação ocorre acumulação da porção líquida no fundo do tubo; (6) remoção da porção oleosa; (7) retirada da porção aquosa; (8) colocação da fase aquosa em novo tubo; (9) aferição com solução de HNO_3 a 0,5%



Fonte: Adaptado de Kalschne *et al.* (2020)

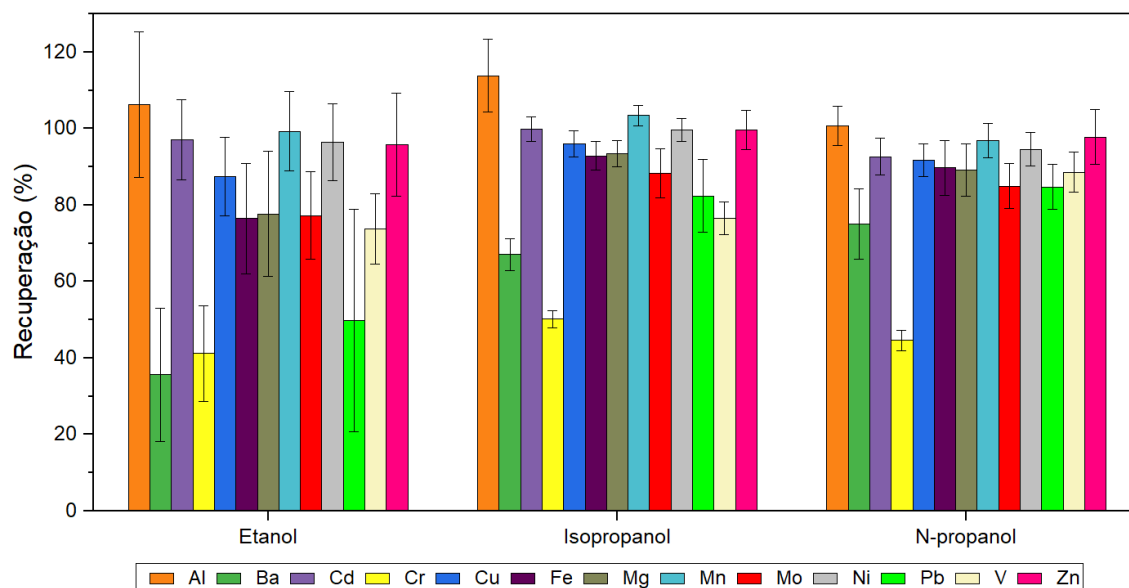
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de condições iniciais já estabelecidas em trabalhos anteriores envolvendo RP-DLLME, foram realizados ajustes nas mesmas objetivando a otimização do método, uma vez que não há relatos da utilização de óleo de coco através desse processo.

5.1 Tipo de solvente dispersor

De acordo com Rezaee; Assadi e Hosseini (2006) o ponto principal na escolha de um solvente dispersor é a miscibilidade do mesmo. Para a escolha do solvente dispersor mais efetivo foram utilizados diferentes álcoois, com objetivo de escolher aquele que promovesse uma rápida e eficiente interação entre a amostra e o extrator. Através da avaliação de estudos anteriores com a utilização de outras amostras oleosas, foi realizado o teste de recuperação utilizando etanol, isopropanol e n-propanol. Mediante a adição de $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de solução multi-elementar em amostras de 5 g de óleo de coco, sendo que o resultado mais próximo de 100% para a maioria dos metais foi escolhido como dispersor a ser utilizado nas etapas seguintes. Nessa etapa foi utilizada HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ na proporção de 70:30% v v⁻¹, após o aquecimento das amostras a 70 °C durante 20 min, seguido de 30 s de agitação manual, 1 min no vórtex e 15 min de centrifugação. As recuperações obtidas para Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Ti, V, Zn usando os solventes dispersores avaliados estão mostrados na Figura 10.

Figura 10 – Avaliação do tipo de solvente utilizando o método de RP-DLLME. Determinação dos analitos por ICP OES



Condições: massa de amostra: 5 g; mistura de solventes: 70% (v v⁻¹) de dispersor e 30% (v v⁻¹) de extrator HNO₃ a 1 mol L⁻¹; volume da solução extrator/dispersor 1,0 mL; temperatura 70 °C por 20 min e centrifugação (15 min a 5600 g).

Fonte: Autoria própria (2022)

Após a adição do isopropanol e n-propanol em amostras de óleo de coco, foi possível observar a formação de solução turva e da formação de microgotas, indicando o efeito dispersor na amostra, possibilitando o uso de ambos os dispersores nos ensaios posteriores por apresentarem eficiência de dispersão na amostra, em seguida foi possível visualizar sedimentação ao longo da amostra, observada de forma acentuada após a centrifugação.

De acordo com a Figura 10, é possível observar menores recuperações nas amostras em que foi utilizado o etanol como solvente dispersor, além do desvio padrão relativo também se apresentar maior. Recuperações menores que 85% foram observadas para Cr, Ba, Pb em ambos os solventes dispersores (isopropanol e propanol). Isso ocorre para V apenas utilizando isopropanol como solvente dispersor (76,53%) e Mo utilizando n-propanol (84,95%). Os demais analitos apresentam recuperações superiores a 85% tanto com isopropanol quanto com n-propanol (Al, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Ti, Zn). É possível observar resultados satisfatórios, mesmo este sendo o primeiro teste realizado. A recuperação da maioria dos metais (Al, Ba, Cu, Fe, Mg, Mo, Ni, Pb, Zn) não apresentou diferença estatística (teste *t-sudent*, nível de confiança de 95%) com o uso de isopropanol e n-propanol como solvente dispersor.

Com base nesses resultados de recuperação, os ensaios subsequentes foram realizados com o uso de n-propanol e isopropanol como solvente dispersor.

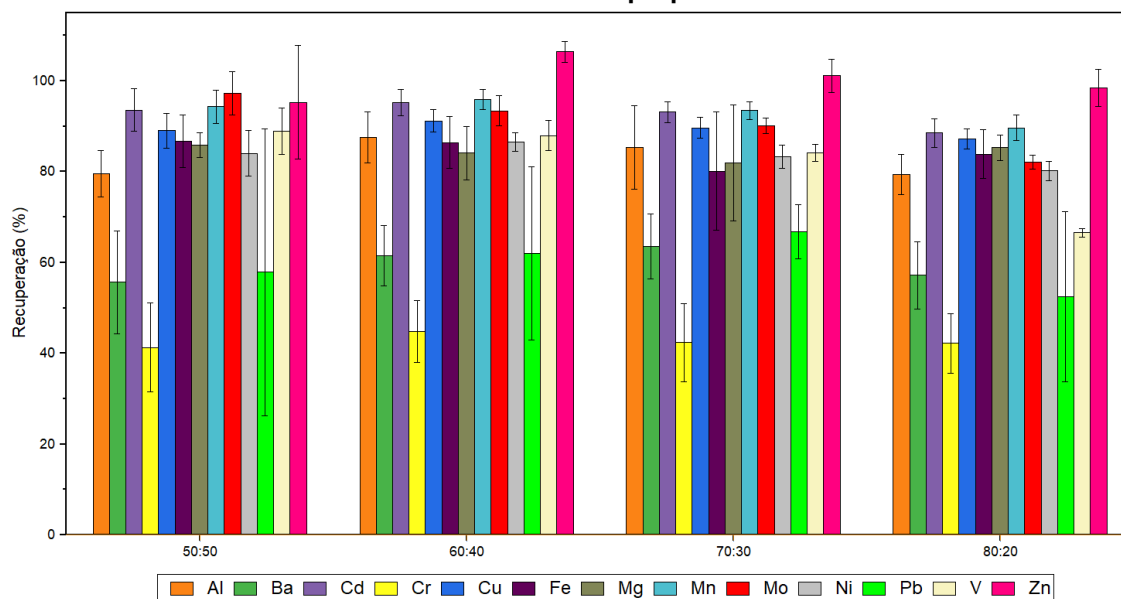
5.2 Proporção dispersor/extrator

Nos métodos de microextração o volume do solvente dispersor é extremamente importante, pois sua falta ou adição em excesso pode levar a uma alteração da solubilidade do solvente extrator na amostra, tendo como consequência uma extração deficiente dos analitos (LOURENÇO *et al.*, 2019). Proporções adequadas de solvente dispersor/extrator tem grande importância para a formação de microgotículas que ficam temporariamente dispersas ao longo da amostra que também afetam posterior recuperação (KALSCHNE *et al.*, 2019b). Por estes motivos foi avaliada a proporção ideal de solventes dispersor e extrator objetivando recuperações eficientes.

5.2.1 Proporção dispersor/extrator utilizando isopropanol

Foram avaliadas as proporções de 50:50, 60:40, 70:30 e 80:20%, v v⁻¹ de isopropanol: HNO₃ 1,0 mol L⁻¹, em amostras de óleo de coco (5 g) com a adição de 500 µg kg⁻¹ de solução multi-elementar, as amostras foram aquecidas a 70 °C durante 20 min, seguido de 30 s de agitação manual, 1 min no vórtex e 15 min de centrifugação. A Figura 11 demonstra as recuperações obtidas para Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Ti, V, Zn para as diferentes proporções de isopropanol como agente dispersor nos ensaios de RP-DLLME.

Figura 11 – Ensaio de recuperação para avaliação da proporção de solvente dispersor utilizando isopropanol



Condições: 5 g de amostra; diferentes proporções de dispersor isopropanol e extrator HNO₃; 1,0 mL da solução dispersor/extrator; aquecimento a 70 °C; agitação manual por 30 s e por 1 min no vortex; centrifugação a 5600g em 15 min. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5).

Fonte: Autoria própria (2022)

A partir dos resultados (Figura 11) é possível observar que as recuperações obtidas na proporção de 50:50 (v v⁻¹) foram maiores para Fe, Mg, Mo, V e maiores recuperações na proporção de 60:40 (v v⁻¹) foram para Al, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn. Na proporção de 70:30 melhores recuperações foram obtidas para os metais Ba e Pb. A proporção de 80:20 (v v⁻¹) não demonstrou ser a melhor condição para nenhum dos analitos analisados. Embora ao realizar a análise estatística (teste *t-student*) dos resultados apenas 3 dos 14 analitos analisados apresentaram diferença significativa (Mn, Mo, V) entre as proporções de solvente dispersor, sendo utilizado teste de Tukey-Kramer para identificar entre quais dos grupos encontra-se esta diferença (Tabela 7).

Tabela 8 – Teste de Tukey-Kramer 95% de confiança para os valores de recuperação do Mn, Mo, V nos ensaios de recuperação referentes as proporções dos solventes dispersor (n-propanol) e extrator HNO₃

Proporções (v v ⁻¹)	Mn	Mo	V
50:50	94,32 ^a ± 3,71	97,25 ^a ± 4,78	88,90 ^a ± 5,12
60:40	95,84 ^{ab} ± 2,21	93,43 ^{ab} ± 3,26	87,99 ^{ac} ± 3,34
70:30	93,47 ^{ab} ± 1,95	90,11 ^b ± 1,77	84,11 ^{ac} ± 1,88
80:20	89,70 ^a ± 2,76	82,10 ^c ± 1,51	66,53 ^b ± 1,01

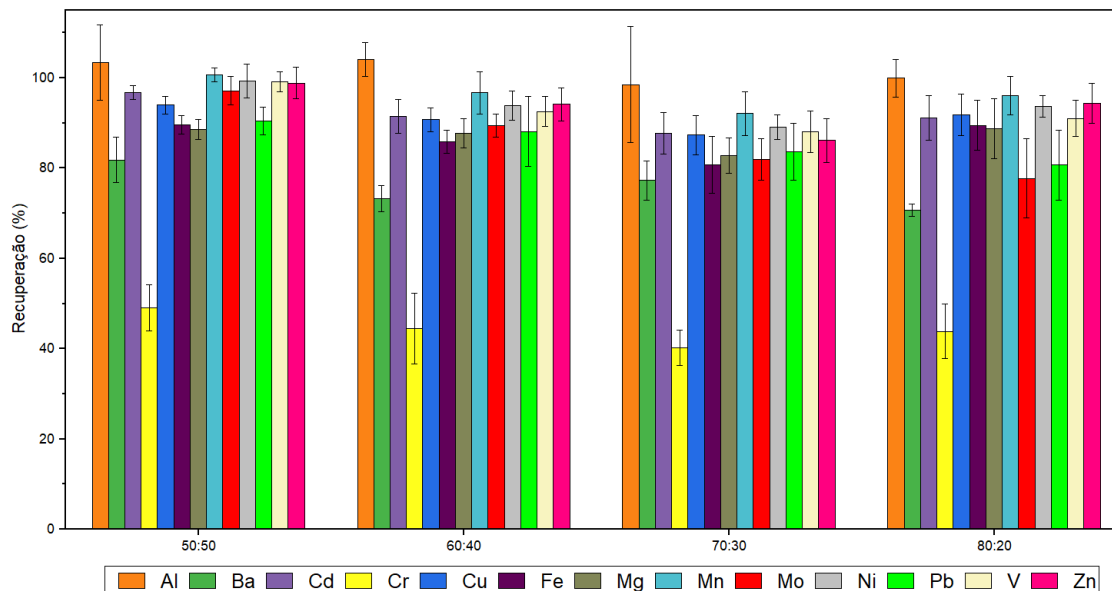
Fonte: Autoria própria (2022)

A partir da Tabela 3 é possível observar que para esses analitos a recuperação foi melhor em 50:50 ($v v^{-1}$), mas estas não se apresentam significativas para Mn em relação a 60:40 e 70:30 ($v v^{-1}$); para Mo em relação a 60:40 ($v v^{-1}$); e para V em relação a 60:40 e 70:30 ($v v^{-1}$).

5.2.2 Proporção dispersor/extrator utilizando n-propanol

As proporções de 50:50, 60:40, 70:30 e 80:20% $v v^{-1}$ de n-propanol foram avaliadas com HNO_3 1,0 mol L^{-1} , em amostras de óleo de coco (5 g) com a adição de 500 $\mu g kg^{-1}$ de solução multi-elementar, as amostras foram aquecidas a 70 °C durante 20 min, seguido de 30 s de agitação manual, 1 min no vórtex e 15 min de centrifugação. Na figura 12 estão mostradas as recuperações obtidas para Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Ti, V, Zn para as diferentes proporções de n-propanol como agente dispersor nos ensaios de RP-DLLME.

Figura 12 – Ensaios de recuperação para avaliação da proporção de solvente dispersor utilizando n-propanol



Condições: 5 g de amostra; diferentes proporções de dispersor n-propanol e extrator HNO_3 ; 1,0 mL da solução dispersor/extrator; aquecimento a 70 °C; agitação manual por 30 s e por 1 min no vortex; centrifugação a 5600 g em 15 min. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5).

Fonte: Autoria própria (2022)

A análise estatística (teste *t-student*) apresentou diferença significativa para apenas 7 dos 14 analitos analisados (Al, Ba, Cd, Mo, Ni, V, Zn) entre as proporções de solvente dispersor, sendo utilizado teste de Tukey-Kramer para identificar entre

quais dos grupos encontra-se esta diferença que pode ser observado na Tabela 8. A proporção analisada que apresentou maiores recuperações foi de 50:50 (v v⁻¹) para os seguintes analitos Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Ti, V, Zn. Apenas Mg apresenta maior recuperação na proporção 80:20 (v v⁻¹), mas esta não apresenta diferença significativa através do teste *t-student* em relação a recuperação 50:50.

Tabela 9 – Teste de Tukey-Kramer 95% de confiança para os valores de recuperação do Al, Ba, Cd, Mo, Ni, V, Zn nos ensaios de recuperação referentes as proporções dos solventes dispersor (n-propanol) e extrator HNO₃

Proporções (v v ⁻¹)	Al	Ba	Cd	Mo	Ni	V	Zn
50:50	106,20 ^a ± 8,41	81,85 ^a ± 5,00	96,81 ^a ± 1,54	97,19 ^a ± 3,11	99,34 ^a ± 3,70	99,21 ^a ± 2,19	98,57 ^a ± 3,58
60:40	91,42 ^b ± 2,65	73,28 ^{ab} ± 2,96	91,51 ^{ab} ± 3,70	89,45 ^{ab} ± 2,49	93,87 ^{ab} ± 3,26	92,58 ^{ab} ± 3,36	94,73 ^{ab} ± 3,53
70:30	91,57 ^b ± 6,96	77,28 ^{ab} ± 4,33	87,70 ^b ± 4,63	81,99 ^b ± 4,62	89,16 ^b ± 2,75	88,09 ^b ± 4,59	86,59 ^b ± 4,56
80:20	101,46 ^{ab} ± 6,96	70,74 ^b ± 4,32	91,14 ^{ab} ± 4,62	77,75 ^{cb} ± 4,61	93,73 ^{ab} ± 2,75	91,06 ^{cb} ± 4,59	96,09 ^{ab} ± 4,56

Fonte: Autoria própria (2022)

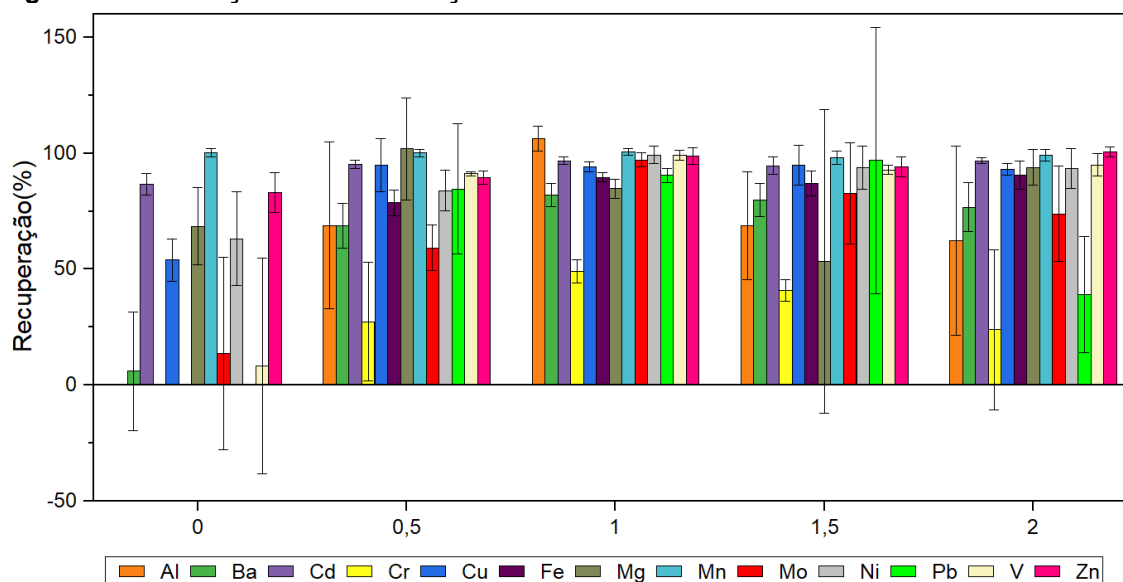
Na Tabela 8 é possível observar maiores recuperações na proporção 50:50 (v v⁻¹) mas estas se apresentam significativas para Al em relação a 60:40 e 70:30 (v v⁻¹); para Ba em relação a 80:20 (v v⁻¹); para Cd em relação a 70:30 (v v⁻¹); para Mo em relação a 70:30 (v v⁻¹); para V em relação a 70:30 e 80:20 (v v⁻¹); para Zn em relação a a 70:30 (v v⁻¹). Sendo escolhida a proporção 50:50 (v v⁻¹) por apresentar maiores recuperações para determinados metais e menor desvio padrão relativo, assim como uma menor utilização de n-propanol.

5.3 Concentração do solvente extrator

Objetivando a redução no consumo de reagentes e métodos de preparo de amostras mais verdes, a influência da concentração do solvente extrator empregado foi avaliada. O solvente extrator geralmente utilizado em procedimentos de extração por RP-DLLME é o HNO₃ (CASSELLA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2013; KALSCHNE *et al.*, 2019b; LOURENÇO *et al.*, 2019), assim foram realizados ensaios de recuperação para identificar a melhor concentração de HNO₃, visando uma eficiente extração dos analitos das amostras.

Foram avaliadas as concentrações 0 (água ultrapura como extrator); 0,5; 1; 1,5; 2 mol L⁻¹. Seguindo o procedimento, 5 g de amostra com e sem adição da solução multielementar e diluição em de D-limoneno, foram pesadas e aquecidas a 70 °C por 20 min, foi realizada a injeção de 1 mL mistura dispersor/extrator (n-propanol 50% e extrator 50%) seguido da agitação manual por 30 s e vórtex por 1 min. As amostras foram imediatamente levadas para centrifugação por 15 min a 6000 RPM. As fases sedimentas foram extraídas e as concentrações dos metais de interesse foram determinadas por ICP OES e os resultados referentes a estes ensaios podem ser observados na Figura 13.

Figura 13 – Avaliação da concentração do solvente extrator utilizado no método de RP-DLLME



Condições: 5 g de amostra; 50% de dispersor n-propanol; 50% de extrator HNO₃ em diferentes concentrações (0 a 2,0 mol L⁻¹); 1,0 mL da solução dispersor/extrator; aquecimento a 70 °C; agitação manual por 30 s e por 1 min no vórtex; centrifugação a 5600 g em 15 min. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5).

Fonte: Autoria própria (2022)

O uso de água ultrapura como solvente extrator resultou em baixas recuperações (Ba, Cu, Mg, Mo, Ni, Ti, V) ou próximas de 0 (Al, Cr, Fe, Pb) para maioria dos metais, também apresentando desvio padrão relativo alto. Sendo os valores superiores de recuperações foram para os metais Ba (6,08%), Cd (86,73%), Cu (53,94%), Mg (68,48%), Mn (100,21%), Mo (13,62%), Ni (63,14%), Ti (4,44%), V (8,38%), Zn (83,07%).

Os ensaios a 1,5 mol L⁻¹ de HNO₃ evidenciam melhores recuperações apenas para Cu (94,92%) e para Pb (97,00%), enquanto 2,0 mol L⁻¹ de HNO₃ apresentou melhores recuperações para Fe (90,64%), Ti (95,29%) e Zn (100,66%).

Os ensaios a 1,0 mol L⁻¹ de HNO₃ demonstraram maior eficiência na recuperação da maioria dos analitos, apresentando recuperações de 106,42% para Al; 81,85% para Ba; 96,81% para Cd; 49,11% para Cr (mesmo este sendo um valor baixo, é a maior recuperação encontrada dentro das concentrações avaliadas); 100,70% para Mn; 97,19% para Mo; 99,34% para Ni; 99,21% pra V.

Apenas Mg e Mn não apresentam diferença significativa através do teste *t-student* em nenhuma das concentrações analisadas. Em análise a Tabela 9, os resultados para Al, Ba, Cd, Mo e V apresentam apenas diferença significativa em relação as concentrações de 0 e 0,5, 0 e 1,0, 0 e 1,5, 0 e 2,0 as demais concentrações não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey-Kramer. Cr apresenta diferença significativa em relação as concentrações 0 e 1,0 e entre 0 e 1,5. Fe apresenta diferença significativa em relação as concentrações 0 e 0,5; 0 e 1,0; 0 e 1,5; 0 e 2,0; 0,5 e 1,0; 0,5 e 2,0. Ni apresenta diferença significativa entre 0 e 1,0; 0 e 1,5; 0 e 2,0. Pb apresenta diferença significativa entre 0 e 0,5; 0 e 1,0; 0 e 1,5. Zn apresenta diferença significativa pelo teste de Tukey-Kramer entre 0 e 1,0; 0 e 1,5; 0 e 2,0; 0,5 e 1,0; 0,5 e 2,0.

Tabela 10 - Teste de Tukey-Kramer 95% de confiança para os valores de recuperação do Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mo, Ni, Pb, V, Zn nos ensaios de recuperação referentes as concentrações da solução de dispersor (n-propanol) e extrator (HNO₃)

	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Al	0,00 ^a ± 0	68,89 ^b ± 30,08	106,42 ^b ± 5,32	68,76 ^b ± 23,30	62,39 ^b ± 40,88
Ba	6,08 ^a ± 25,52	68,81 ^b ± 9,52	81,85 ^b ± 5,00	79,79 ^b ± 7,25	76,82 ^b ± 10,47
Cd	86,73 ^a ± 4,68	95,37 ^b ± 1,84	96,81 ^b ± 1,54	94,68 ^b ± 3,87	96,78 ^b ± 1,29
Cr	0,00 ^a ± 0,00	27,41 ± 25,63	49,11 ^b ± 5,10	40,79 ^b ± 4,62	23,92 ± 34,50
Cu	53,94 ^a ± 9,04	94,89 ^b ± 11,53	94,17 ^b ± 2,16	94,92 ^b ± 8,45	93,10 ^b ± 2,60
Fe	0,00 ^a ± 0,00	78,64 ^b ± 5,53	89,65 ^b ± 2,01	87,00 ^b ± 5,37	90,64 ^b ± 6,14
Mo	13,62 ^a ± 41,46	59,27 ^b ± 9,80	97,19 ^b ± 3,11	82,63 ^b ± 21,75	73,91 ^b ± 20,62
Ni	63,14 ^a ± 20,24	83,91 ± 8,81	99,34 ^b ± 3,70	93,81 ^b ± 9,39	93,43 ^b ± 8,44
Pb	0,00 ^a ± 0,00	84,60 ^b ± 28,16	90,46 ^b ± 3,13	97,00 ^b ± 57,45	39,09 ± 25,15
V	4,44 ^a ± 88,18	85,59 ^b ± 3,34	93,07 ^b ± 1,74	88,42 ^b ± 5,45	95,29 ^b ± 1,90
Zn	83,07 ^a ± 8,62	89,48 ^c ± 2,86	98,89 ^{bc} ± 3,47	94,17 ^b ± 4,36	100,66 ^{bc} ± 2,22

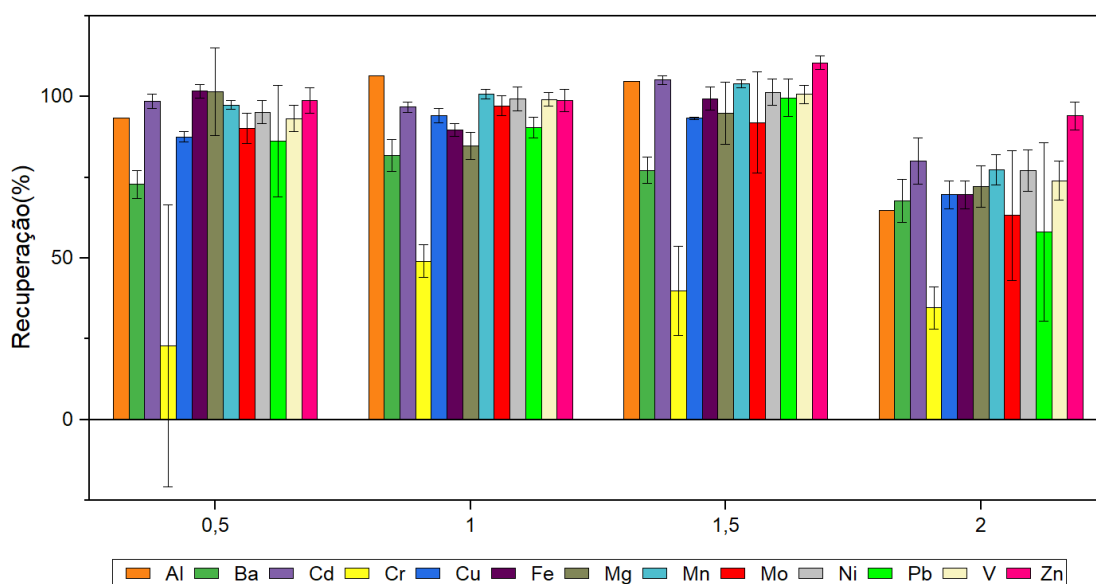
Fonte: Autoria própria (2022)

5.4 Volume da solução dispersor/extrator

Foi realizada avaliação da influência do volume da solução dispersor/extrator objetivando verificar a maior eficiência para extração e maiores recuperações dos analitos, contendo quantidades apropriadas da solução dispersor/extrator.

Os ensaios de recuperação visaram identificar a melhor concentração de HNO₃, objetivando uma eficiente extração dos analitos das amostras. Foram avaliados os volumes de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mL da solução dispersor/extrator composta por n-propanol:HNO₃ (proporção 50:50% v v⁻¹, respectivamente). Foram utilizadas 5 g das amostras com e sem adição da solução multielementar, adicionadas de D-limoneno, foram pesadas e aquecidas a 70 °C por 20 min, foi realizada a injeção de mistura dispersor/extrator seguido da agitação manual por 30 s e vórtex por 1 min. As amostras foram imediatamente levadas para centrifugação por 15 min a 6000 RPM. As fases sedimentas foram extraídas e as concentrações dos metais de interesse foram determinadas por ICP OES e os resultados referentes a estes ensaios podem ser observados na Figura 14.

Figura 14 – Avaliação do volume da solução dispersor/extrator utilizado no método de RP-DLLME



Condições: 5 g de amostra; 50% de dispersor n-propanol; 50% de extrator HNO₃; aquecimento a 70 °C; agitação manual por 30 s e por 1 min no vórtex; centrifugação a 5600g em 15 min. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5).

Fonte: Autoria própria (2022)

Os metais Cd, Fe, Mn, Pb, Zn apresentaram maiores recuperações com volume de 1,5 mL, sendo 105,18%; 99,43%; 103,95% 99,64%; 110,54% respectivamente (Figura 14). Recuperações menores foram obtidas com a utilização de 0,5 mL da solução dispersor/extrator para todos os metais avaliados. Utilizando 1,0 mL, a recuperação dos metais Cr e Mo apresentaram maiores recuperações, mas estas não são significativas em relação a recuperação obtida com 1,5 mL. Ao utilizar 2,0 mL é possível verificar uma diminuição nas recuperações de todos os metais.

Tabela 11 - Teste de Tukey-Kramer 95% de confiança para os valores de recuperação do Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, V, Zn nos ensaios de recuperação referentes ao volume da solução de dispersor (n-propanol) e extrator (HNO₃)

Analito	Volume			
	0,5 mL	1,0 mL	1,5 mL	2,0 mL
Al	93,34 ± 26,41	106,42 ^a ± 5,32	104,80 ^a ± 2,13	64,82 ^b ± 17,08
Ba	72,87 ^a ± 4,28	81,85 ^a ± 5,00	77,20 ^a ± 4,05	67,77 ^b ± 6,69
Cd	98,51 ^a ± 2,23	96,81 ^a ± 1,54	105,18 ^c ± 1,42	80,10 ^b ± 7,23
Cu	87,61 ^a ± 1,64	94,17 ^b ± 2,16	93,38 ^b ± 0,38	69,66 ^c ± 4,28
Fe	101,70 ^a ± 2,16	89,65 ^b ± 2,01	99,43 ^a ± 3,50	69,07 ^c ± 5,46
Mg	101,61 ^a ± 13,63	84,79 ^{ab} ± 4,18	94,96 ^a ± 9,63	72,16 ^b ± 6,45
Mn	97,41 ^a ± 1,32	100,70 ^{ab} ± 1,48	103,95 ^b ± 1,24	77,42 ^c ± 4,69
Mo	90,21 ^{ab} ± 4,67	97,19 ^a ± 3,11	92,04 ^a ± 15,59	63,22 ^b ± 20,07
Ni	95,20 ^a ± 3,57	99,34 ^a ± 3,70	101,43 ^a ± 4,17	77,20 ^b ± 6,63
Pb	86,24 ^a ± 17,20	90,46 ^a ± 3,13	99,64 ^{ab} ± 5,75	58,11 ^a ± 27,62
V	93,26 ^a ± 4,07	99,21 ^a ± 2,19	100,79 ^a ± 2,83	74,02 ^b ± 6,02
Zn	98,84 ^a ± 4,02	98,89 ^a ± 3,47	110,54 ^b ± 2,06	94,04 ^a ± 4,28

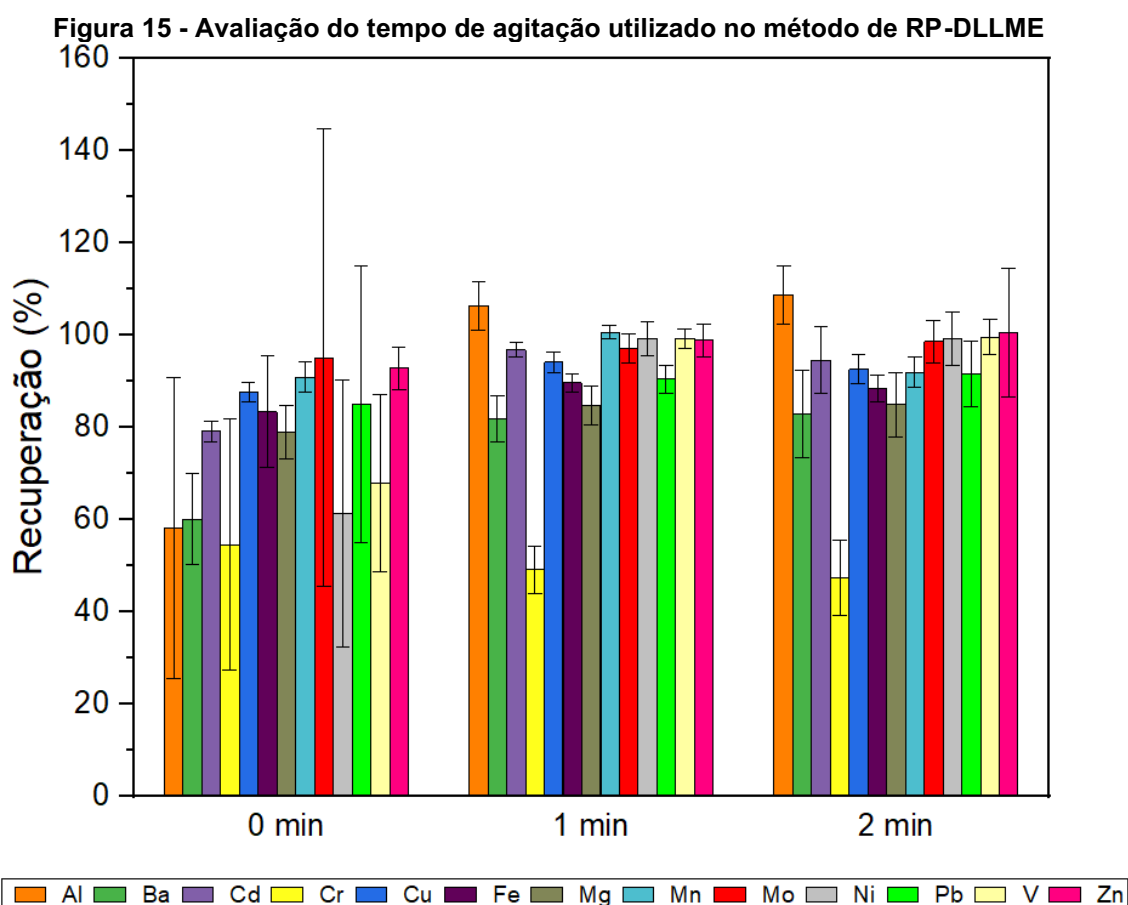
Fonte: Aatoria própria (2022)

Dos metais determinados apresentaram diferença significativa através do teste *t-student* nos volumes analisados, exceto Cr que não apresentou diferença significativa. Analisando a Tabela 10 Al, Ba apresentam diferença significativa apenas entre os volumes de 1,0 e 2,0; 1,5 e 2,0 mL. Cd apresenta diferença significativa entre os seguintes volumes 0,5 e 2,0; 1,0 e 1,5; 1,0 e 2,0; 1,5 e 2,0 mL. Cu não apresentou diferença significativa apenas entre os volumes de 1,0 e 1,5 mL os demais volumes apresentam diferença entre eles. Fe só não apresentou diferença significativa para os volumes 0,5 e 1,5 mL, Mg não apresentou diferença significativa entre os volumes 0,5 e 2,0; 1,0 e 1,5. Falta de significância ocorreu apenas para os volumes 0,5 e 1,0; 1,0 e 1,5 para o Mn. Mo teve diferença significativa apenas entre os volumes 1,0 e 2,0; 1,5 e 2,0. Ni, V apresentou diferença significativa para os volumes 0,5 e 2,0; 1,0 e 2,0; 1,5 e 2,0. Pb teve diferença significativa apenas entre os volumes 1,5 e 2,0. Zn teve diferença significativa entre os volumes 0,5 e 1,5; 1,0 e 1,5; 1,5 e 2,0.

5.5 Tempo de agitação

Um melhor desempenho nos resultados de recuperações pode ser obtido através do processo de agitação realizado após a adição da mistura de solvente dispersor/extrator (ÖZZEYBEK *et al.*, 2020). No presente estudo foram avaliados os tempos de 0, 1 e 2 min de agitação com vórtex. Os experimentos foram realizados usando as condições, até então, otimizadas.

Na Tabela 11 é possível verificar que os valores de desvio padrão relativo encontrados no teste sem agitação foram maiores em comparação as outras duas condições utilizando agitação. As recuperações obtidas nas condições de 1 e 2 min de agitação foram todas acima de 80%, exceto para Cr que obteve 49,11 e 47,41% para 1 e 2 min, respectivamente. Al teve recuperações de mais de 100% nas duas condições. Ba teve recuperações de 81,85 e 82,90% para 1 e 2 min, respectivamente. Os demais analitos analisados tiveram recuperações acima de 90%.



Condições: 5 g de amostra; 50% de dispersor n-propanol; 50% de extrator HNO₃; aquecimento a 70 °C; centrifugação a 5600g em 15 min. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5).

Fonte: Autoria própria (2022)

Ao teste *t-student* 6 dos 12 analitos não apresentaram diferença significativa nos tempos de agitação (Cr, Fe, Mg, Mo, Pb, Zn). Ao teste de Tukey-Kramer (Tabela 10) os demais metais analisados (Al, Ba, Cd, Cu, Mn, Ni, V) apenas apresentam diferença significativa entre as recuperações obtidas no tempo 0 e 1, 0 e 2. A diferença não foi significativa entre os tempos 1 e 2. Dessa forma a escolha da melhor condição foi o tempo de 1 min de agitação.

Tabela 12 - Teste de Tukey-Kramer 95% de confiança para os valores de recuperação do Al, Ba, Cd, Cu, Mn, Ni, V nos ensaios de recuperação referentes ao tempo de agitação após adição da solução de dispersor (n-propanol) e extrator (HNO₃)

	Al	Ba	Cd	Cu	Mn	Ni	V
0 min	58,24 ^a ± 32,64	60,14 ^a ± 9,79	79,14 ^a ± 2,27	87,65 ^a ± 2,17	90,83 ^a ± 3,28	61,27 ^a ± 29,00	67,82 ^a ± 19,23
1 min	106,42 ^b ± 5,32	81,85 ^b ± 5,00	96,81 ^b ± 1,54	94,17 ^b ± 2,16	100,70 ^b ± 1,48	99,34 ^b ± 3,70	99,21 ^b ± 2,19
2 min	108,73 ^b ± 6,22	82,90 ^b ± 9,41	94,53 ^b ± 7,24	92,64 ^b ± 3,08	97,96 ^b ± 3,25	99,26 ^b ± 5,70	96,61 ^b ± 3,75

Fonte: Autoria própria (2022)

5.6 Condições experimentais otimizadas dos parâmetros da RP-DLLME para extração de diferentes metais em óleo de coco

Na Tabela 12 são apresentadas as condições ótimas estabelecidas nos estudos das variáveis que influenciaram no procedimento de extração de diferentes metais em óleo de coco pela técnica RP-DLLME.

Tabela 13 - Condições selecionadas para aplicação da metodologia de RP-DLLME para determinação de diferentes metais em amostras de óleo de coco utilizando ICP OES

Parâmetros	Condição otimizada
Solvente dispersor	n-propanol
Proporção solvente dispersor/solvente extrator	50:50 (v v ⁻¹) 750 µl n-propanol 750 µl HNO ₃
Concentração do solvente extrator (HNO ₃)	1,0 mol L ⁻¹
Volume da mistura (solvente dispersor/solvente extrator)	1,5 mL
Tempo de agitação	1 min

Fonte: Autoria própria (2022)

A partir dessas condições otimizadas foi possível obter resultados com melhores recuperações e valores de precisão na extração empregando RP-DLLME e posterior determinação por ICP OES de amostras comerciais de óleo de coco.

5.7 Validação parcial do método

A partir das melhores condições encontradas no método proposto, foi realizada a validação do método em que foram analisados a recuperação e concentração dos analitos (Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, V, Zn), limite de detecção e limite de quantificação em 4 marcas comerciais em 3 níveis.

Segundo a Resolução nº 899 de 29 de maio da ANVISA (2003), em que foi publicado Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, esta deve ser considerada em 3 níveis distintas (250, 500 e 750 $\mu\text{g g}^{-1}$). Precisão para Al o desvio relativo padrão (RSD) variou de 2 a 50%; para Ba a variação foi de 2 a 8%; para o Cd 1 a 4%; Cr 1 a 4%; Cu 1 a 5%; Fe 1 a 7%; Mg 3 a 19%; Mn 1 a 5%; Mo 3 a 16%; Ni 1 a 7%; Pb 3 a 12%; V 2 a 4%; Zn 2 a 14%.

Através da recuperação é possível verificar a eficiência de extração de determinado método científico, expressa como a porcentagem da comparação entre a quantidade acrescida de um analito e amostra branco submetidas ao processo de extração (BRASIL., 2003). Analisando os 3 níveis de recuperação a recuperação dos analitos variou de 97 a 104% para o Al; 77 a 91% para Ba; 96 a 103% para Cd; 6 a 63% para o Cr; 80 a 93% para o Cu; 86 a 99% para o Fe; 87 a 107% para p Mg; 94 a 104% para o Mn; 64 a 100% para o Mo; 91 a 101% para o Ni; 89 a 100% para o Pb; 85 a 101% para o V; 98 a 111% para o Zn. Essas recuperações obtidas para a maioria dos analitos concordam com os critérios determinados pelo INMETRO (2020) que orienta sobre a validação dos métodos analíticos em que a recuperação média deve ser de 80 a 110% para unidades de 100 ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$) fazendo que o método de escolha seja adequado para determinação de metais em óleo de coco.

Tabela 14 – Ensaio de recuperação em 3 níveis de concentração (250, 500 e 750 $\mu\text{g g}^{-1}$) de solução multielementar em amostras de óleo de coco submetidas ao RP-DLLME e quantificadas por ICP OE (n=5)

Elemento	Adicionado $\mu\text{g g}^{-1}$	Recuperação			
		Amostra A	Amostra B	Amostra C	Amostra D
Al	250	101 \pm 50	102 \pm 5	104 \pm 6	102 \pm 3
	500	105 \pm 2	98,53 \pm 5	102 \pm 7	99,04 \pm 3
	750	104 \pm 20	106,97 \pm 7	97 \pm 6	108 \pm 7
Ba	250	87 \pm 2	91 \pm 3	90 \pm 3	91 \pm 3
	500	77 \pm 4	90 \pm 5	85 \pm 3	85 \pm 6
	750	80 \pm 8	88 \pm 2	89 \pm 3	84 \pm 2
Cd	250	100 \pm 1	100 \pm 2	102 \pm 3	103 \pm 3
	500	105 \pm 1	96 \pm 1	96 \pm 4	102 \pm 3
	750	104 \pm 2	100 \pm 1	99 \pm 3	102 \pm 3
Cr	250	10 \pm 17	6 \pm 9	0 \pm 0	16 \pm 21
	500	40 \pm 14	21 \pm 5	0 \pm 0	32 \pm 6
	750	35 \pm 5	34 \pm 6	5 \pm 9	36 \pm 1
Cu	250	86 \pm 1	84 \pm 3	85 \pm 4	85 \pm 4
	500	93 \pm 1	81 \pm 1	80 \pm 5	84 \pm 2
	750	88 \pm 2	86 \pm 3	83 \pm 3	85 \pm 3
Fe	250	93 \pm 1	86 \pm 7	96 \pm 5	93 \pm 4
	500	99 \pm 3	71 \pm 2	97 \pm 6	93 \pm 4
	750	96 \pm 3	79 \pm 4	95 \pm 6	95 \pm 4
Mg	250	107 \pm 3	99 \pm 19	108 \pm 8	98 \pm 4
	500	95 \pm 10	87 \pm 8	102 \pm 7	98 \pm 3
	750	101 \pm 3	94 \pm 7	95 \pm 7	98 \pm 3
Mn	250	99 \pm 1	99 \pm 1	100 \pm 3	102 \pm 3
	500	104 \pm 1	98 \pm 1	94 \pm 5	101 \pm 2
	750	102 \pm 2	100 \pm 2	96 \pm 3	101 \pm 3
Mo	250	96 \pm 3	92 \pm 8	73 \pm 7	99 \pm 4
	500	92 \pm 16	90 \pm 3	64 \pm 7	97 \pm 2
	750	100 \pm 4	94 \pm 4	72 \pm 4	97 \pm 3
Ni	250	95 \pm 3	92 \pm 4	97 \pm 3	95 \pm 4
	500	101 \pm 4	92 \pm 1	91 \pm 4	97 \pm 4
	750	101 \pm 7	96 \pm 2	95 \pm 4	96 \pm 2
Pb	250	89 \pm 12	94 \pm 5	97 \pm 9	98 \pm 9
	500	100 \pm 6	86 \pm 5	90 \pm 10	91 \pm 6
	750	87 \pm 7	86 \pm 3	93 \pm 4	92 \pm 6
V	250	96 \pm 2	90 \pm 4	91 \pm 4	96 \pm 4
	500	101 \pm 3	90 \pm 2	85 \pm 4	95 \pm 2
	750	97 \pm 3	94 \pm 2	90 \pm 4	95 \pm 3
Zn	250	113 \pm 5	111 \pm 8	108 \pm 13	98 \pm 7
	500	110 \pm 2	109 \pm 11	113 \pm 14	105 \pm 6
	750	109 \pm 3	110 \pm 3	108 \pm 4	106 \pm 6

Fonte: Autoria própria (2022)

O INMETRO (2020) define como limite de detecção (LD) de um procedimento analítico a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas. Em amostras com analitos em nível traço é necessário o estabelecimento do menor valor de

concentração do analito que pode ser detectado pelo método. O LD será calculado conforme a equação abaixo.

$$LD = \bar{X} + (3 \cdot s)$$

Sendo:

\bar{X} : média dos valores dos brancos da amostra

s: desvio padrão amostral dos brancos da amostra

Ainda de acordo com a definição do INMETRO (2020) limite de quantificação de um procedimento analítico é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis.

$$LQ = \bar{X} + (10 \cdot s)$$

Sendo:

\bar{X} : média dos valores dos brancos da amostra

s: desvio padrão amostral dos brancos da amostra

Tabela 15 – Parâmetros LQ e LD para determinação de Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, V, Zn em amostras de óleo de coco por ICP OES com o emprego de RP-DLLME

Analito	LD (ng g ⁻¹)	LQ (ng g ⁻¹)
Al	7,85	23,37
Ba	0,58	1,74
Cd	1,79	4,87
Cr	2,25	6,66
Cu	0,01	0,02
Fe	6,85	16,94
Mg	11,95	31,27
Mn	0,05	0,15
Mo	3,58	9,93
Ni	0,50	1,46
Pb	0,05	0,15
V	2,83	7,79
Zn	5,29	15,97

Fonte: Autoria própria (2022)

LD obtidos com o método RP-DLLME foram 7,85; 0,58; 1,79; 2,25; 0,01; 6,85; 11,95; 0,05; 3,58; 0,50; 0,05; 2,83; 5,29 ng g⁻¹ para Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn,

Mo, Ni, Pb, V, Zn, respectivamente. LD dos analitos analisados foram baixos, sendo dessa forma suficiente para determinação desses analitos em nível traço. Os limites mínimos de quantificação são inferiores aos limites máximos definidos pela legislação, sendo considerado um método adequado e seguro. Ao comparar com o único trabalho realizado também utilizando o método RP-DLLME e posterior determinação por ICP OES é possível verificar valores menores em seu LD e LQ o que pode ter ocorrido devido à utilização do dobro de massa utilizado no presente trabalho (KALSCHNE *et al.*, 2019a).

5.8 Aplicação do método proposto otimizado para determinação de metais em amostras comerciais

O método proposto foi aplicado em diferentes amostras de óleo de coco comercializadas na cidade de Medianeira-PR (sendo 2 das amostras óleo de coco extravirgem, 1 amostra de óleo de coco virgem e 1 amostra de gordura de coco) com o objetivo de verificar a aplicabilidade do método proposto a possíveis variações na matriz da amostra. Foram realizados testes sem adição de solução multielementar para determinação e quantificação de Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, V, Zn e os resultados são apresentados na Tabela 15.

Tabela 16 – Concentração de Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, V, Zn em amostras de óleo de coco, aplicando o método RP-DLLME e determinação por ICP OES
Concentrações (ng g⁻¹)

Elemento	Amostra A	Amostra B	Amostra C	Amostra D
Al	1051,98	1033,04	949,53	877,45
Ba	<LQ	0,81	1,41	<LQ
Cd	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cr	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cu	5,07	12,77	28,61	10,04
Fe	56,77	0,0277	50,29	6,13
Mg	<LQ	569,34	9,2324	<LQ
Mn	0,60	11,16	25,34	<LQ
Mo	70,44	203,04	174,38	58,60
Ni	23,83	18,09	16,94	8,87
Pb	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
V	11,73	19,01	14,68	11,28
Zn	<LQ	37,71	114,88	14,37

Fonte: Autoria própria (2022)

Segundo a IN nº 88 (2021) o limite máximo tolerado é de 0,10 (mg kg⁻¹) para Cd e 0,30 mg kg⁻¹ para Pb. Já o Regulamento da Comissão Europeia (em inglês, *Commission Regulation - EC*) nº 1881/2006, FAO estabelecem o limite máximo de 0,10 mg kg⁻¹ para o chumbo e as amostras sendo esses valores respeitados por todas as amostras. Segundo a USDA a China estabelece como limite máximo para Pb de 0,1 mg kg⁻¹ e Ni 1,0 mg kg⁻¹ que também são respeitados.

5.9 Comparação entre digestão ácida e RP-DLLME

Em único artigo encontrado relatando a utilização de óleo de coco para determinação de metais foi utilizada digestão ácida como método de preparo de amostras. Dessa forma esse método será utilizado como comparativo ao método proposto por este trabalho. Para realizar avaliação do quão verde determinado procedimento analítico é diferentes características são analisadas. Esses critérios estão dentro dos 12 princípios da química analítica verde no método proposto por Pena-Pereira; Wojnowski e Tobiszewski (2020). Em que cada um dos princípios avaliados é colocado em uma escala de 0 – 1 e o valor final oferecido por meio software AGREE é o resultado do produto de cada princípio. O resultado final é fornecido no centro de um gráfico em formato de relógio e o resultado de cada um dos princípios é fornecido através de uma escala intuitiva de cores (vermelho, amarelo, verde) nas laterais do mesmo. Um gráfico circular é formado a partir da pontuação dos dados obtidos formando uma pontuação geral do método, sendo o valor mais próximo de 1 considerado o mais “verde”.

No trabalho apresentado por Ghani *et al.* (2018) foi utilizada digestão ácida como método de preparo de amostra de óleo de coco virgem com massa de 0,5 g, em seguida foi adicionada uma mistura de HNO₃ e HCl. Essa mistura foi colocada em banho-maria a 80-90 °C por 4-5 horas até sua completa dissolução. Após esse procedimento a mistura foi resfriada em temperatura ambiente e filtrado através de papel filtro. Em seguida foi realizada a evaporação do extrato objetivando a remoção do excesso de ácido e foi feita a aferição com água destilada até 50 mL. A determinação dos analitos (Pb, Cu e Fe) foi realizada utilizando espectrômetro de absorção atômica (AAS).

Enquanto no presente trabalho foi utilizado RP-DLLME como método de preparo de amostras de óleo de coco com massa de 5 g adicionados 5 mL de D-limoneno ao tubo. Esse é então aquecido a 70 °C por 20 min para então ser adicionada 1,5 mL da solução de extrator/dispersor na proporção de 50/50% (v v⁻¹) (n-propanol e ácido nítrico). É realizada agitação das amostras por 30 s de forma manual e 1 min no vórtex para então serem centrifugadas por 15 min a 6000 rpm. Após esse processo ocorre a separação das fases e é possível realizar a separação da fase aquosa contendo os analitos.

Princípio 1 – No primeiro princípio são verificadas se foram aplicadas técnicas analíticas diretas, evitando o tratamento das amostras. Evitar tratamento e preparação das amostras pode reduzir problemas ambientais, de saúde e segurança associada a determinados métodos. No método RP-DLLME e digestão ácida é necessário pré-tratamento das amostras, levando a uma diminuição da pontuação.

Princípio 2 – Este princípio julga o tamanho e quantidade de amostra que devem ser os menores possíveis. No método de RP-DLLME são utilizadas 5g de amostra, enquanto no método de digestão ácida proposto por Ghani *et al.* (2018) foram utilizadas 0,5 g obtendo maior score em comparação.

Princípio 3 – O princípio 3 avalia se as análises podem ser realizadas no local da coleta. Tanto no método RP-DLLME quanto no método de digestão ácida é necessário o envio das amostras ao laboratório, possuindo menor qualificação.

Princípio 4 – Qualifica a quantidade de passos do método, verificando a integração entre operações e processos analíticos, reduzindo consumo de energia e uso de reagentes. Sendo preferíveis métodos com a menor quantidade de etapas possíveis. Os dois métodos obtiveram a mesma pontuação por possuir menos de 3 etapas.

Princípio 5 – no quinto princípio é realizada uma avaliação em relação a utilização de métodos automatizados e miniaturizados. No método RP-DLLME possui processos manuais e automáticos e a preparação da amostra é miniaturizada, enquanto na digestão ácida o método é manual e não-miniaturizado.

Princípio 6 – Derivatizações devem ser evitadas. Nenhum dos métodos utilizados para comparação possui.

Princípio 7 – Nele é realizada avaliação da geração de resíduos, evitando assim a geração de grandes quantidades de resíduos analíticos e gestão correta dos mesmos. Como a massa após sua extração é descartada foi considerada a massa de amostra para avaliação. No método de digestão ácida foi considerado a utilização de 50 mL, enquanto no método RP-DLLME 15 mL.

Princípio 8 – São preferíveis métodos multi-analitos ou multi-parâmetros. No oitavo princípio é considerado a quantidade de analitos determinados em 1 hora. No método de digestão ácida é possível fazer a determinação de 1 analito por vez, assim como no RP-DLLME. Sendo na digestão ácida 6 min por amostra para determinação de todos os analitos indicados e no RP-DLLME 3 min por amostra.

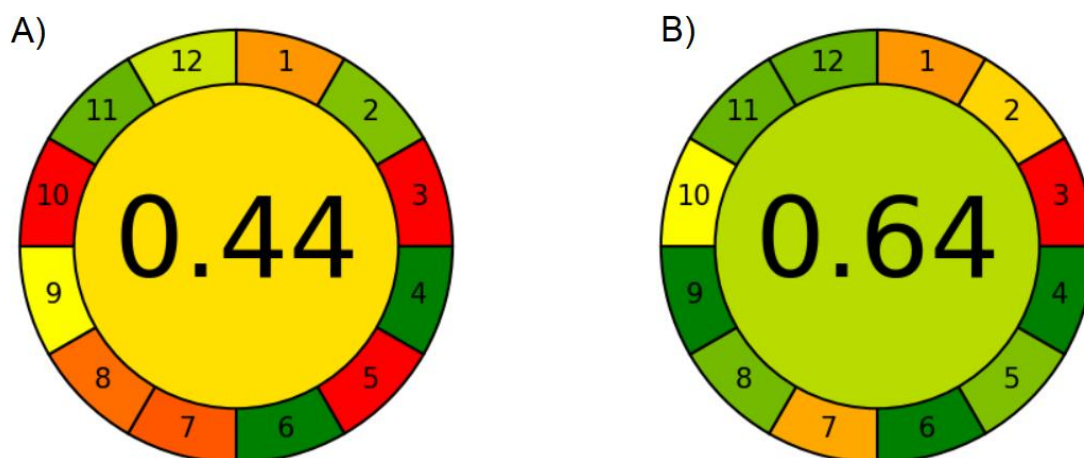
Princípio 9 – Uso de energia deve ser reduzido, sendo que os valores de cada sistema analítico dependem do consumo total de energia por amostra. Nesta etapa o software leva em consideração apenas o equipamento de maior consumo utilizado durante o método. Sendo utilizado no método de digestão ácida espectrômetro de absorção atômica e no RP-DLLME o equipamento de ICP OES.

Princípio 10 – Reagentes provenientes de fontes renováveis devem ser preferidos. Os quais não são utilizados no método de digestão ácida, mas sim no RP-DLLME.

Princípio 11 – Reagentes perigosos devem ser eliminados ou substituídos por alternativas mais “verdes”. Sendo necessários para ambos os métodos, porém, o RP-DLLME possibilita a utilização destes em menor concentração e quantidade.

Princípio 12 – no último princípio é avaliada a segurança do operador que deve ser aumentada e também são avaliados os perigos ambientais. Sendo o método de digestão ácida altamente oxidativo e corrosivo, enquanto o RP-DLLME é tóxico para vida aquática.

Figura 16 - Características dos métodos de digestão ácida (A) e RP-DLLME (B) de acordo com o software AGREE



Fonte: Autoria própria (2022)

Conforme a Figura 16 é possível verificar que através do aplicativo AGREE o método de preparo de amostra utilizando a digestão ácida obteve uma pontuação geral de 0,44, o método RP-DLLME obteve uma pontuação geral de 0,64. Dentre os 12 princípios da química analítica verde, o método RP-DLLME teve resultados bons a excelente em 7 desses princípios, enquanto a digestão ácida apenas em 5. No método RP-DLLME os princípios 1, 3, 7 tiveram desempenho inferior devido a necessidade do preparo dessas amostras, a forma de análise e geração de resíduos. Já no método de digestão ácida os piores scores foram encontrados nos princípios 1, 3, 5, 7, 8, 10 devido aos mesmos motivos encontrados no método RP-DLLME nos princípios 1, 3 e 7, enquanto no princípio 5, este não é um método miniaturizado e não apresenta reagente provenientes de fontes renováveis como o princípio 10 exige. O método RP-DLLME também obteve destaque devido a utilização de reagentes em pequenas concentrações. A pontuação mais próxima de 1 sinaliza que o método proposto nesse trabalho é mais “verde” que o método utilizado para comparação.

6 CONCLUSÕES GERAIS

O método proposto empregando RP-DLLME tem como características sua simplicidade, a necessidade de poucas etapas e sua fácil execução. Os parâmetros de influência foram ajustados e a utilização de D-limoneno para diluição das amostras de óleo de coco foi considerado adequado. A determinação dos analitos por ICP OES foi compatível com o método de preparo de amostras proposto. No presente estudo foi possível o desenvolvimento de novo método para determinação de metais a partir do método RP-DLLME para óleo de coco e posterior determinação por ICP OES. foi adicionado 5 mL de D-limoneno aos 5 g de óleo de coco objetivando manter a amostra liquefeita. Para o preparo de amostra foi realizada uma mistura de solventes n-propanol como dispersor (750 μL) e HNO_3 como extrator (750 μL), 1,5 mL dessa solução foi injetado na amostra aquecida durante 20 min a 70 $^\circ\text{C}$. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 15 min a 6000 rpm, para então ser retirada a fase aquosa da amostra com auxílio de uma pipeta, transferida para novo frasco e posterior aferição com HNO_3 0,5% ($v v^{-1}$) e determinação por ICP OES.

Após a determinação das condições ótimas das variáveis que influenciaram no procedimento de extração de diferentes metais em óleo de coco pela técnica RP-DLLME, foi possível obter recuperações dos analitos acima de 80% em concordância com a faixa de recuperação de 80 a 110% exigida pelo INMETRO.

Com a popularização da utilização do óleo de coco pelos consumidores, são necessários métodos que comprovem a qualidade dos mesmos e esses métodos devem apresentar comprovadamente sua praticidade e exatidão de acordo com os métodos analíticos da Química verde.

REFERÊNCIAS

ANASTAS, P. T. Green Chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 167–175, 1999.

ANDRIOLLI, C. R. **Desenvolvimento de método utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa para determinação de As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V em excipientes farmacêuticos oleosos**. 2021. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/23097>. Acesso em: 10 jan. 2022.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 2–8, 2015.

BRAINER, M. S. C. P. Produção de coco: o nordeste é destaque nacional. **Caderno Setorial ETENE**, v. 3, n. 61, p. 1–25, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003**, n. 18, p. 1–11, 2003. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html. Acesso em: 10 jan. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa 88, de 26 de março de 2021**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-88-de-26-de-marco-de-2021-311655598>. Acesso em: 10 jan. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução Nº 482, de 23 de setembro de 1999**. Aprovar o Regulamento Técnico referente a óleos e gorduras vegetais. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1999/res0482_23_09_1999.html#:~:text=Objetivo%3A,os%20%C3%B3leos%20e%20gorduras%20vegetais.&text=Apl%2Dse%20aos%20%C3%B3leos%20e,nos%20anexos%201%20a%2017. Acesso em: 10 jan. 2022.

BRUZZONITI, M. C. *et al.* Determination of copper in liquid and solid insulation for large electrical equipment by ICP-OES. Application to copper contamination assessment in power transformers. **Talanta**, v. 99, p. 703–711, 2012.

CASSELLA, R. J. *et al.* Extraction induced by emulsion breaking: A novel strategy for the trace metals determination in diesel oil samples by electrothermal atomic

absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 11, p. 1704–1711, 2010.

CHEMAT, S.; TOMAO, V.; CHEMAT, F. Limonene as Green Solvent for Extraction of Natural Products. Em: **Green Solvents I: Properties and Applications in Chemistry**. p. 1–427. 2012.

CLEMENTE, M. *et al.* Acid greasy polyunsaturateds n-3 and its action on system imunitário of participant individuals of physical activity. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. Setembro, p. 18–27, 2007.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's Food Chemistry**. Boca Raton, 2007.

DE LA GUARDIA, M.; ARMENTA, S. Origins of green analytical chemistry. Em: **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 1–23, 2011.

DE PINHO, A. P. S.; SOUZA, A. F. Extração e caracterização do óleo de coco (Cocos nucifera L.). **Perspectivas Online: Biológicas & Saúde**, v. 8, n. 26, p. 9–18, 2018.

DROSAKI, E.; ANTHEMIDIS, A. N. A novel automatic flow-batch extraction induced by emulsion breaking platform for on-line copper determination in edible oil samples by atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 244, n. April, p. 123423, 2022.

COMISSÃO EUROPEIA. **Regulamento (CE) N. 1881/2006 da Comissão**, 2006. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&from=FR>. Acesso em: 10 jan. 2022.

FAO. Standard for named vegetable oils. **Codex Alimentarius**, v. 8, n. 5, p. 55, 2019. Disponível em: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B210-1999%252FCXS_210e.pdf. Acesso em: 10 jan. 2022.

GAŁUSZKA, A. *et al.* Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 61–72, 2012.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.

GHANI, N. A. A. *et al.* Physicochemical properties, antioxidant capacities, and metal contents of virgin coconut oil produced by wet and dry processes. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 5, p. 1298–1306, 2018.

GUIMARÃES, L. B. *et al.* A new method for determination of Mg, Ca, Zn, and Na in cocoa butter by FAAS employing extraction induced by emulsion breaking and multivariate optimization. **Food Analytical Methods**, v. 15, n. 2, p. 458–467, 2022.

HASHEMI, P. *et al.* Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein. **Talanta**, v. 80, n. 5, p. 1926–1931, 2010.

HE, Y. M. *et al.* Extraction induced by emulsion breaking for trace multi-element determination in edible vegetable oils by ICP-MS. **Analytical Methods**, v. 6, n. 14, p. 5105–5111, 2014.

HERRERA-HERRERA, A. V *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, 2010.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia). **Orientação sobre validação de métodos analíticos Inmetro**. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeracao=00774&num_documento=008%0Ahttp://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_08.pdf. Acesso em 10 jan 2022.

JAYAWARDENA, R. *et al.* Health effects of coconut oil: Summary of evidence from systematic reviews and meta-analysis of interventional studies. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 15, n. 2, p. 549–555, 2021.

JORGE, N. **Química e Tecnologia de óleos Vegetais**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2009.

KALSCHNE, D. L. *et al.* Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction (RP-DLLME) as a green sample preparation method for multielement determination in fish oil by ICP-OES. **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 1, p. 230–237, 2019a.

KALSCHNE, D. L. *et al.* A new and feasible analytical method using reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction (RP-DLLME) for further determination of Nickel in hydrogenated vegetable fat. **Talanta**, v. 208, n. July 2019, p. 120409, 2019b.

KARA, D.; FISHER, A.; HILL, S. Extraction of trace elements by ultrasound-assisted emulsification from edible oils producing detergentless microemulsions. **Food Chemistry**, v. 188, p. 143–148, 2015.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2. ed. São Paulo. EditSBQ, 2019.

LEAL, G. C. *et al.* Emulsion breaking-induced extraction of Cd and Pb from oily dietary supplements followed by graphite furnace atomic absorption spectrometry detection. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 112, n. March, p. 104651, 2022.

LIU, H. *et al.* Simultaneous quantification of fat-soluble vitamins A, 25-hydroxylvitamin D and vitamin E in plasma from children using liquid chromatography coupled to Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1177, n. April, p. 122795, 2021.

LÓPEZ-GARCÍA, I.; VICENTE-MARTÍNEZ, Y.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of cadmium and lead in edible oils by electrothermal atomic absorption spectrometry after reverse dispersive liquid-liquid microextraction. **Talanta**, v. 124, p. 106–110, 2014.

LÓPEZ-LORENTE, Á. I. *et al.* The Ten Principles of Green Sample Preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 116530, 2022.

LOURENÇO, E. C. *et al.* A simple, rapid and low cost reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of Na, K, Ca and Mg in biodiesel. **Talanta**, v. 199, n. September 2018, p. 1–7, 2019.

MANJUSHA, R.; SHEKHAR, R.; KUMAR, S. J. Ultrasound-assisted extraction of Pb, Cd, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn from edible oils with tetramethylammonium hydroxide and EDTA followed by determination using graphite furnace atomic absorption spectrometer. **Food Chemistry**, v. 294, n. December 2018, p. 384–389, 2019.

MORETTO, E.; ALVES, R. F. **Óleos e gorduras vegetais - processamento e análise**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1986.

NAYAR, N. M. The Coconut in the World. Em **The Coconut**, p. 1–8, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehinger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ÖZZEYBEK, G. *et al.* Reverse phase dispersive liquid–liquid microextraction coupled to slotted quartz tube flame atomic absorption spectrometry as a new analytical strategy for trace determination of cadmium in fish and olive oil samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 90, n. April, 2020.

PENA-PEREIRA, F.; WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M. AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 14, p. 10076–10082, 2020.

PEREIRA, F. M. *et al.* Novel extraction induced by emulsion breaking as a tool for the determination of trace concentrations of Cu, Mn and Ni in biodiesel by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 117, p. 32–38, 2013.

PHAM, L. J. Coconut (*Cocos nucifera*). Em: **Industrial Oil Crops**. AOCS Press. Published by Elsevier Inc. All rights reserved., 2016.

POURREZA, N.; NAGHDI, T. D-Limonene as a green bio-solvent for dispersive liquid–liquid microextraction of β -cyclodextrin followed by spectrophotometric determination. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 51, p. 71–76, 2017.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. M. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid – liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 1–9, 2006.

RYKOWSKA, I.; ZIEMBLIŃSKA, J.; NOWAK, I. Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review. **Journal of Molecular Liquids**, n. 2017, 2018.

SANDUPAMA, P.; MUNASINGHE, D.; JAYASINGHE, M. Coconut oil as a therapeutic treatment for alzheimer's disease: a review. **Journal of Future Foods**, v. 2, n. 1, p. 41–52, 2022.

SOROURADDIN, S. M.; FARAJZADEH, M. A.; OKHRAVI, T. Application of deep eutectic solvent as a disperser in reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of Cd(II) and Zn(II) ions from oil samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 93, n. li, p. 103590, 2020.

STEVENS, S. L. Fat-soluble vitamins. **Nursing Clinics of North America**, v. 56, n. 1, p. 33–45, 2021.

SZYCZEWSKI, P. *et al.* A comparative study of the content of heavy metals in oils: Linseed oil, rapeseed oil and soybean oil in technological production processes.

Archives of Environmental Protection, v. 42, n. 3, p. 37–40, 2016.

TANZI, C. D. *et al.* Terpenes as green solvents for extraction of oil from microalgae. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8196–8205, 2012.

TOBISZEWSKI, M. Analytical chemistry with biosolvents. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 19, p. 4359–4364, 2019.

USDA. Standard for Maximum Levels of Contaminants. p. 1–17, 2017. Disponível em: https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-02/GB-2762-2017.pdf. Acesso em 10 jan 2022.

VALASQUES, G. S. *et al.* Multivariate optimization for the determination of cadmium and lead in crude palm oil by graphite furnace atomic absorption spectrometry after extraction induced by emulsion breaking. **Microchemical Journal**, v. 153, n. November 2019, p. 104401, 2020.

VIROT, M. *et al.* Green procedure with a green solvent for fats and oils' determination. Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. **Journal of Chromatography A**, v. 1196–1197, n. 1–2, p. 147–152, 2008.

XIE, Q. *et al.* Phase transfer catalyst-assisted reversed-phase dispersive liquid – liquid microextraction for the rapid determination of organic acids in Fischer-Tropsch oil products. **Fuel**, v. 275, n. November 2019, p. 117882, 2020.

YANG, W.; CASEY, J. F.; GAO, Y. A new sample preparation method for crude or fuel oils by mineralization utilizing single reaction chamber microwave for broader multi-element analysis by ICP techniques. **Fuel**, v. 206, p. 64–79, 2017.

ZGOŁA-GRZESOWIAK, A.; GRZESKOWIAK, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 9, 2011.

ZHAO, X. *et al.* Identification and direct determination of fatty acids profile in oleic acid by HPLC-CAD and MS-IT-TOF. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 204, p. 114238, 2021.