

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

PRISCILA KARACHINSKI DOS REIS

**MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE
REVERSA ASSISTIDA POR VÓRTEX PARA DETERMINAÇÃO DE Fe,
Mg e Zn EM ÓLEOS VEGETAIS POR ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CURITIBA

2018

PRISCILA KARACHINSKI DOS REIS

**MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE
REVERSA ASSISTIDA POR VÓRTEX PARA DETERMINAÇÃO DE Fe,
Mg e Zn EM ÓLEOS VEGETAIS POR ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento de Química e Biologia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química - Área de Concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo S. Chaves

CURITIBA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R375m Reis, Priscila Karachinski dos
2018 Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa
assistida por vórtex para determinação de fe, mg e
zn em óleos vegetais por espectrometria de absorção
atômica / Priscila Karachinski dos Reis.-- 2018.
73 f.: il.; 30 cm.

Disponível também via World Wide Web.
Texto em português com resumo em inglês.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica
Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Química,
Curitiba, 2018.
Bibliografia: p. 57-70.

1. Óleos vegetais - Amostragem. 2. Metais. 3. Química
Analítica. 4. Espectroscopia de absorção atômica.
5. Química - Dissertações. I. Chaves, Eduardo Sidinei, orient.
II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de
Pós-Graduação em Química, inst. III. Título.

CDD: Ed. 22 -- 540



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 012

A Dissertação de Mestrado intitulada MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE REVERSA ASSISTIDA POR VÓRTEX PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Mg E Zn EM ÓLEOS VEGETAIS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Priscila Karachinski dos Reis**, no dia 23 de fevereiro de 2018, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração QUÍMICA ANALÍTICA, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Eduardo Sidinei Chaves - Presidente -UTFPR

Prof. Dr. Eder José Dos Santos – TECPAR

Prof. Dr. Edson Luiz Seibert - UTFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 23 de fevereiro de 2018.

Carimbo e Assinatura do(a) Coordenador(a) do Programa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela força e luz em todos os momentos

Ao Professor Dr. Eduardo Chaves, excelente orientador e amigo, o qual sempre irá expressar a mim um exemplo de profissional a ser seguido.

Aos técnicos de laboratório da UTFPR Junior Van Beik, Flávia Henrik e Rubia que foram fundamentais no desenvolvimento do projeto.

As colegas de laboratório Klaiani, Caroline, Kathlyn, Mariane, Letícia e Bianca pelo suporte e amizade.

As minhas amigas Camila Gama, Agatha Transfeld e Lys Mari Bileski Candido pelo incentivo e apoio ao meu ingresso no programa de mestrado.

Aos meus pais Sueli e João pelo carinho, amor e paciência nos momentos mais difíceis.

Ao meu noivo Everaldo, por todo o amor e incentivo durante o mestrado.

Aos membros da banca Dr. Edson Luiz Seibert e Dr. Éder José dos Santos, por aceitarem avaliar este trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Departamento Acadêmico de Química e Biologia da UTFPR Campus Curitiba e ao Departamento de Engenharia Química da UTFPR Ponta Grossa pelo suporte e auxílio.

À Deus, a minha mãe Sueli e a meu saudoso avô
João Freitas

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz”.

(Bill Gates)

RESUMO

REIS, Priscila Karachinski. **Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa assistida por vórtex para determinação de Fe, Mg e Zn em óleos vegetais por espectrometria de absorção atômica.** 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

Neste trabalho, a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME) assistida por vórtex é proposta no preparo de amostras de óleos para posterior determinação de espécies metálicas por espectrometria de absorção atômica com atomização por chama (F AAS). A RP-DLLME foi proposta usando 2-propanol e solução de ácido nítrico (HNO_3) como solventes dispersor e extrator, respectivamente. Foram otimizados os seguintes parâmetros: tipo e volume de solvente dispersor, concentração ácida no solvente extrator e tempo de ultrassom. Sob condições otimizadas, 5 g das amostras foram aquecidas (a uma temperatura de $95 \pm 5^\circ\text{C}$) durante 10 min, em seguida, adicionadas de 1 mL da mistura de solventes, 2-propanol e solução de HNO_3 1% (v/v), submetidas a agitação em vórtex por 20 s e sonicadas em banho ultrassônico por 10 min. Após a RP-DLLME, o sobrenadante foi separado por centrifugação e as concentrações de Fe, Mg e Zn na fase extratora foram determinadas por F AAS. A calibração foi realizada por RP-DLLME utilizando adição de padrões organometálicos em amostra de óleo vegetal previamente purificada. Os intervalos de calibração foram $0,05\text{-}0,50 \mu\text{g g}^{-1}$, $0,01\text{-}0,10 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,02\text{-}0,20 \mu\text{g g}^{-1}$ para Fe, Mg e Zn respectivamente. Os valores de Limite de detecção (LOD) foram de 9 ng g^{-1} , 2 ng g^{-1} e 8 ng g^{-1} para Fe, Mg e Zn. Os valores de desvio padrão relativo (RSD) obtidos ficaram entre 1 e 11%. A comparação dos resultados obtidos pela metodologia proposta com os obtidos por diluição direta não apresentou diferença significativa de acordo com o teste T emparelhado e teste F. Os testes de recuperação apresentaram valores entre 81-110%, demonstrando a boa exatidão do método. O método proposto foi aplicado para a determinação de Fe, Mg e Zn em amostras de óleos vegetais de diferentes origens, e as concentrações obtidas foram da ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$.

Palavras-chave: Preparo de amostras. Determinação de espécies metálicas. Amostras orgânicas.

ABSTRACT

REIS, Priscila Karachinski. **Vortex-assisted reverse-phase microextraction liquid-liquid dispersion for the determination of Fe, Mg and Zn in vegetable oils by atomic absorption spectrometry**. 2018. 74 p. Dissertation (Master's degree in Chemistry) Federal University of Technology – Paraná. Curitiba, 2018.

In this work, Vortex-assisted reverse-dispersive liquid-liquid dispersion (RP-DLLME) is proposed for the preparation of oil samples and for further determination of metal species by flame atomization (F AAS) atomic absorption spectrometry. RP-DLLME was proposed using 2-propanol and nitric acid solution (HNO_3) as dispersant and extractor solvents, respectively. The following parameters were optimized: type and volume of dispersing solvent, acid concentration in the extracting solvent and ultrasonic time. Under optimized conditions, 5 g of the samples were heated (at a temperature of 95 ± 5 ° C) for 10 min, then added with 1 ml of the solvent mixture, 2-propanol and 1% HNO_3 solution (v/v), vortexed for 20 sec if sonicated in an ultrasonic bath for 10 min. After RP-DLLME, the supernatant was separated by centrifugation and the concentrations of Fe, Mg and Zn in the extractive phase were determined by F AAS. Calibration was performed by RP-DLLME using addition of organometallic standards in previously purified vegetable oil sample. The calibration intervals were $0.05\text{-}0.50 \mu\text{g g}^{-1}$, $0.01\text{-}0.10 \mu\text{g g}^{-1}$ and $0.02\text{-}0.20 \mu\text{g g}^{-1}$ for Fe, Mg and Zn respectively. The limit of detection (LOD) values were 9 ng g^{-1} , 2 ng g^{-1} and 8 ng g^{-1} for Fe, Mg and Zn. The relative standard deviation (RSD) values obtained were between 1 and 11%. The comparison of the results obtained by the proposed methodology with those obtained by direct dilution did not show a significant difference by paired test T and test F. The recovery tests showed values between 81-110%, demonstrating the good accuracy of the method. The proposed method was applied for the determination of Fe, Mg and Zn in samples of vegetable oils of different origins, and the concentrations obtained were of the order of $\mu\text{g g}^{-1}$.

Keywords: Sampling. Determination of metallic species. Organic samples

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Produção mundial de 13 tipos de óleos vegetais e 4 tipos de gorduras....	15
Figura 2. Esquema geral de oxidação lipídica.	17
Figura 3. Diagrama de blocos de um espectrofotômetro de absorção atômica de feixe único.	21
Figura 4. Espectrofotômetro de absorção atômica com atomização por chama.	26
Figura 5. Esquema DLLME.....	26
Figura 6. Esquema RP-DLLME, onde SE: solução extratora e AN: analito.....	28
Figura 7. Efeito do tipo de solvente dispersor sobre a extração e pré-concentração de Fe, Mg e Zn..	39
Figura 8. Efeito do volume de 2-propanol sobre extração e pré-concentração de Fe, Mg e Zn em óleos vegetais.....	40
Figura 9. Efeito da concentração de HNO ₃ sobre a extração e pré-concentração de Fe Mg e Zn.	41
Figura 10. Influência do tempo de ultrassom na extração e pré-concentração de Fe, Mg e Zn.	42
Figura 11. Efeito da agitação em vórtex sobre a extração e pré-concentração de Fe, Mg e Zn..	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características de diferentes métodos aplicando a DLLME e RP-DLLME.	30
Tabela 2. Figuras de mérito para RP-DLLME na determinação de Fe, Mg e Zn em amostras de óleos vegetais por F AAS.	44
Tabela 3. Valores de LOD obtidos por diferentes técnicas analíticas para determinação de Fe, Mg e Zn em amostras de óleos vegetais.	46
Tabela 4. Valores de desvio padrão relativo (RSD) aceitáveis de acordo com a concentração do analito	48
Tabela 5. Teste de recuperação para Fe, Mg e Zn em diferentes amostras de óleos vegetais por RP-DLLME	49
Tabela 6. Intervalos de recuperação aceitos de acordo com a concentração do analito.....	49
Tabela 7. Concentrações de Fe, Mg e Zn em óleos vegetais obtidos com diferentes procedimentos de preparo de amostras	53
Tabela 8. Concentrações de Fe, Mg e Zn em amostras de óleos vegetais aplicando RP-DLLME e Diluição Direta e valores de teste T e teste F para comparação entre as médias	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	<i>Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção Atômica);
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Associação oficial de Químicos Analíticos);
DLLME	<i>Dipersive Líquid-Líquid Microextraction</i> (Microextração Líquido-líquido Dispersiva);
DLLME-SFO	<i>Dispersive Líquid-liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop</i> (Microextração Líquido-Líquido Dispersivo Baseado na Solidificação da Gota Orgânica Flutuante);
ETA-AAS	<i>Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica)
F AAS	<i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização por Chama);
FE	Fator de Enriquecimento;
FR	Fator de Recuperação;
GF AAS	<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite);
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência);
HR-CS F AAS	<i>High-resolution Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção Atômica com atomização por chama de Alta Resolução com Fonte Contínua);
IAL	Instituto Adolfo Lutz;
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado);
ICP OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> (Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado);
IL-DLLME	<i>Ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction</i> (Microextração Líquido-líquido dispersiva com líquido iônico)

ISEO	<i>Institute of Shortening and Edible Oils</i> (Instituto de Gorduras e Óleos Comestíveis);
ISTA	<i>International Statistical Agricultural Information</i> (Informação Estatística Agrícola Internacional);
LC-DAD–MS	<i>Liquid Chromatography Coupled with Diode-array Detection and tandem Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida Acoplada a Detector por Arranjo de Diodos e a Espectrômetro de Massas);
LDS-SD-DLLME	Low-density Solvent-based Solvent Demulsification Dispersive Liquid-liquid Microextraction (Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com desemulsificação com solvente de baixa densidade)
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Limite de detecção);
LOQ	<i>Limit of Quantitation</i> (Limite de quantificação);
RP-DLLME	Reverse-phase Microextraction Liquid-liquid Dispersion (Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa);
RSD	Desvio padrão relativo;
RSD _R	Desvio padrão relativo aceitável;
R ²	Coefficiente de determinação;
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i> (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos);
USVADLLME	<i>Ultrasound-Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Micro-Extraction</i> (Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Ultrassom-Vórtex-Assistida);

LISTA DE SÍMBOLOS

C_0	Concentração inicial do analito no óleo
C_1	Concentração de padrão adicionada
C_2	Concentração obtida em amostras que sofreram adição do padrão
C_{sed}	Concentração do analito na fase sedimentada
n	Número de replicatas
s	Desvio padrão
S	Inclinação da curva analítica
x	Diferença entre cada valor obtido e a média
\bar{x}	Média aritmética entre todos os valores obtidos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1 ÓLEOS VEGETAIS	15
3.2 ESPÉCIES METÁLICAS EM ÓLEOS VEGETAIS	18
3.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS EM ÓLEOS	20
3.3.1 Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização por Chama ...	21
3.4 PREPARO DE AMOSTRAS	23
3.4.1 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)	25
3.4.2 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva em Fase Reversa (RP- DLLME).....	28
4 EXPERIMENTAL	31
4.1 INSTRUMENTAÇÃO E ACESSÓRIOS.....	31
4.2 REAGENTES, PADRÕES E AMOSTRAS	31
4.3 MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE REVERSA (RP-DLLME).....	32
4.4 DIGESTÃO ÁCIDA	32
4.5 DILUIÇÃO DIRETA	33
4.6 CURVAS ANALÍTICAS	33
4.6.1 Curvas Analíticas para determinações por RP-DLLME	33
4.6.2 Curvas Analíticas para determinações por Digestão Ácida.....	34
4.6.3 Curvas Analíticas para determinações por Diluição Direta.....	34

4.7 PARÂMETROS DE MÉRITO	34
4.7.1 Precisão	34
4.7.2 Exatidão	35
4.7.3 Limite de Detecção (LOD).....	36
4.7.4 Limite de Quantificação (LOQ)	36
4.7.5 Fator de enriquecimento (FE).....	36
4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	37
5 RESULTADOS.....	38
5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS DA RP-DLLME.....	38
5.1.1 Tipo de Solvente Dispensor.....	38
5.1.2 Volume de Solvente Dispensor	39
5.1.3 Concentração do Solvente Extrator	40
5.1.4 Tempo de Ultrassom	42
5.1.5 Agitação em Vórtex.....	43
5.2 PARAMETROS DE MÉRITO	44
5.2.1 Estudo da Precisão.....	47
5.2.2 Estudo da Exatidão.....	48
5.4 COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS	50
5.5 APLICAÇÃO ANALÍTICA.....	52
5.5.1 Determinações de Fe, Mg e Zn em Amostras de Óleos Vegetais.....	52
6 CONCLUSÃO	56
7 REFERENCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais são utilizados em todo o mundo principalmente na alimentação ou em aplicações tecnológicas como a produção de sabões, velas e biodiesel¹. A constituição dos óleos vegetais é baseada principalmente em triglicerídeos com concentrações menores de mono e diglicerídeos, ácidos graxos, fosfatídeos, esteróis, tocofenóis, pigmentos e outros componentes².

A concentração de espécies metálicas em óleos vegetais normalmente é baixa, porém a determinação destas espécies é de grande importância, pois espécies metálicas de Ca, Co, Fe, Mg, Ni e Zn podem atuar como catalisadores em processos de oxidação de lipídios acarretando alterações químicas e características indesejáveis no sabor e no odor destes produtos^{3,4}. Também existem espécies metálicas potencialmente tóxicas que podem causar danos à saúde^{4,5}.

A determinação de metais em óleos vegetais comestíveis normalmente ocorre por meio de diferentes técnicas analíticas como Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) com Atomização por Chama (F AAS) ou por Forno de Grafite (GF AAS), Espectrometria e Emissão Óptica com Fonte de Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES) e Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)⁵⁻⁷. Apesar de sua elevada eficiência, os métodos instrumentais de análise normalmente necessitam de etapas de preparo de amostras, os quais são determinantes para a obtenção de resultados fidedignos.

Os procedimentos convencionais de preparo de amostras de óleos vegetais com posterior determinação de metais aplicam a digestão ácida em frasco aberto ou assistida por micro-ondas⁵. Apesar de muito eficientes estes procedimentos apresentam algumas limitações e desvantagens como uso de ácidos fortes concentrados, perda de analitos por volatilização ou projeção, manipulação excessiva da amostra e elevados fatores de diluição⁵. Neste sentido, novas metodologias para o preparo de amostras, que envolvem procedimentos de extração e pré-concentração de analitos estão sendo propostas, focando principalmente na simplicidade e na economia sem que haja perda de eficiência⁸.

Atualmente, há uma tendência ao desenvolvimento de procedimentos analíticos miniaturizados, diminuindo o gasto de amostras e de reagentes⁵⁻⁷. Entre os procedimentos miniaturizados, pode-se destacar a microextração líquido-líquido

dispersiva (DLLME), proposta por Rezaee et al. (2006)⁹, nela ocorre a utilização de um solvente extrator (orgânico) imiscível na amostra (aquosa) e um solvente dispersor que deve ser miscível na amostra e no solvente extrator e ainda proporcionar a formação de um sistema ternário de solventes, facilitando a extração dos analitos⁹. Atualmente variações na DLLME tem ampliado sua gama de aplicações¹⁰. Para amostras insolúveis em água, Hashemi e colaboradores (2010)¹⁰, propuseram a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME), onde a amostra é de origem orgânica e o solvente extrator aquoso, assim como na DLLME um solvente dispersor é responsável por facilitar a dispersão do extrator na amostra, proporcionando uma maior eficiência de extração¹⁰.

Óleos vegetais são amostras complexas e exigem procedimentos de preparo para determinação de espécies metálicas que são bastante laboriosos, assim o desenvolvimento de procedimentos alternativos de preparo de amostras é de extrema importância⁶. A RP-DLLME apresenta-se como um procedimento promissor e ainda pouco explorado que detém inúmeros benefícios na extração e pré-concentração de analitos inorgânicos como: simplicidade, rapidez, economia e utilização de reagentes de baixa toxicidade. A utilização da RP-DLLME já foi descrita em alguns trabalhos sobre a determinação de compostos orgânicos em óleos vegetais¹⁰⁻¹³, mas na determinação de espécies metálicas em óleos atualmente existe apenas um trabalho na literatura com a aplicação de RP-DLLME¹⁴. Diante disso o presente trabalho propõe a RP-DLLME para extração e pré-concentração de espécies metálicas de Fe, Mg e Zn presentes em óleos vegetais para posterior determinação por F AAS.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa para extração e pré-concentração de espécies metálicas de Fe, Mg e Zn em amostras de óleos vegetais com posterior determinação por espectrometria de absorção atômica com atomização por chama.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar os parâmetros de extração e pré-concentração da RP-DLLME: tipo e volume do solvente dispersor, concentração do ácido na solução extratora e tempo de ultrassom;
- Determinar os parâmetros de mérito para a metodologia proposta;
- Avaliar a metodologia proposta por meio da comparação dos resultados com os obtidos por outros métodos de análise e por testes de recuperação;
- Aplicar a metodologia proposta para determinação de Fe, Mg e Zn em amostras de óleos vegetais provenientes de diferentes fontes.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ÓLEOS VEGETAIS

Os óleos vegetais são utilizados pela humanidade desde a antiguidade seja na alimentação ou em aplicações tecnológicas diversas como na indústria química e farmacêutica¹⁴⁻¹⁷. Usualmente os óleos vegetais presentes na alimentação humana provem de sementes de vegetais como soja, girassol, milho e canola ou ainda de frutos como azeitona e palmeiras.¹⁸ A obtenção dos óleos vegetais pode ocorrer por extração com solvente orgânico ou prensagem mecânica das sementes ou frutos.¹⁹

O consumo de óleos vegetais eleva-se a cada ano, segundo estimativa do *International Statistical Agricultural Information (ISTA)*²⁰ a produção mundial de óleos e gorduras, entre 2016 e 2017, deve ultrapassar 200 milhões de toneladas, considerando os 13 tipos de óleos vegetais e os 4 tipos de gorduras mais consumidos conforme demonstrado na Figura 1.

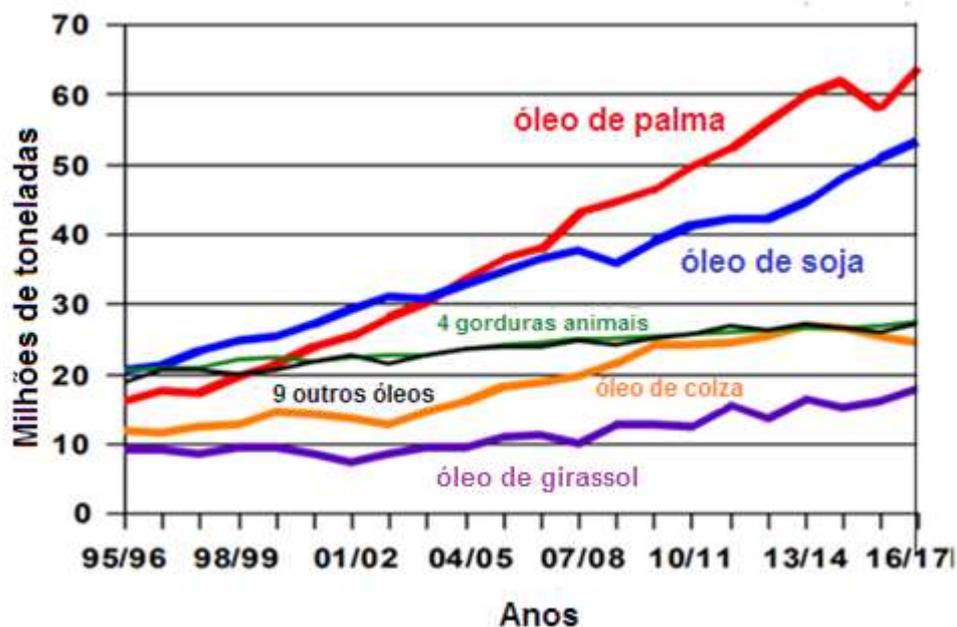


Figura 1. Produção mundial de 13 tipos de óleos e 4 tipos de gorduras.

Fonte: Adaptada ISTA (2017)²⁰.

A expansão na produção de óleos vegetais decorre principalmente do aumento da renda e do consumo da população em países em desenvolvimento e da crescente demanda por biocombustíveis²⁰.

Como alimentos, óleos vegetais são extremamente importantes para a nutrição humana, pois são fontes potenciais de energia, atuam como reguladores biológicos fornecendo compostos necessários à síntese de estruturas celulares e prostaglandinas e atuam no transporte de vitaminas lipossolúveis (A, E, D e K)^{18,19}. Também em alguns óleos como os provenientes de nozes, buriti, colza e linhaça existem grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, ácido linoleico, ácido linolênico e α -tocoferol, compostos capazes de diminuir o risco de doenças cardiovasculares^{20,21}.

Pertencentes ao grupo de substâncias hidrofóbicas, os óleos vegetais apresentam cadeias carbônicas longas que podem estar ligadas a grupos orgânicos como álcoois, ácidos carboxílicos, fenóis e outros^{22,23}. Diante do elevado consumo de óleos vegetais, o conhecimento acerca da composição química dos mesmos é cada vez mais importante.

Os óleos vegetais são constituídos predominantemente de triglicerídeos, com quantidades menores de mono e diglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfatídeos, esteróis, vitaminas solúveis e tocofenóis^{2,24}. Além de compostos derivados de ácidos graxos e de substâncias lipídicas, os óleos vegetais podem apresentar em sua composição glicosídeos, isoflavonas e espécies metálicas sob diferentes formas que interferem drasticamente em suas propriedades organolépticas^{22,23}.

A qualidade dos óleos vegetais está diretamente relacionada à sua composição e a reações químicas que alteram suas características, uma das reações mais frequentes é a oxidação²⁵. Considerada a principal forma de deterioração dos óleos, a oxidação lipídica ocorre quando o oxigênio se dissolve no óleo e reage com seus constituintes (ácidos graxos insaturados), a maior reatividade está intrinsecamente relacionada ao grau de instauração²⁶.

A oxidação pode ser definida como uma reação em que ocorre a perda de hidrogênio ou de elétrons por ação de um agente oxidante, em alimentos o agente oxidante é o oxigênio⁴. O mecanismo da reação de oxidação lipídica consiste numa sequência de reações interligadas²⁷. Ocorrendo na seguinte maneira:

1. Iniciação: são formados os radicais livres do ácido graxo em decorrência da retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo. Tal hidrogênio torna-se mais facilmente removível, uma vez que o radical acaba sendo estabilizado por ressonância pelas duas ligações duplas²⁷;
2. Propagação: o oxigênio ataca os radicais livres que são convertidos em outros radicais, aparecendo os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos). Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico²⁷;
3. Término: dois radicais se combinam com a formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis)²⁷.

As etapas da oxidação lipídica estão demonstradas na Figura 2.

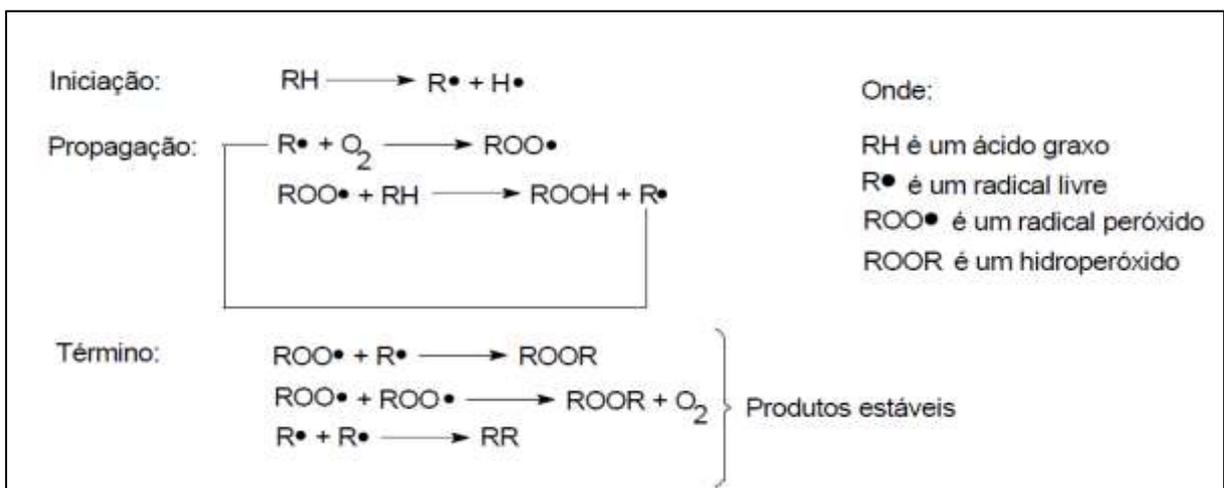


Figura 2. Esquema geral de oxidação lipídica.

Fonte: Ramalho e Jorge (2006)²⁷

A oxidação de lipídios altera drasticamente as características organolépticas dos produtos, pode destruir ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis e ainda gerar substâncias como peróxidos, aldeídos, cetonas, hidroxiácidos, hidrocarbonetos e polímeros que podem ser nocivas à saúde^{28,31}.

O fenômeno de oxidação lipídica ocorre de maneira espontânea e inevitável, mas pode acontecer por meio de vários mecanismos que dependem do meio e da presença de catalisadores²⁹. Entre os fatores que podem acelerar o processo de oxidação lipídica estão^{24,29}:

- Temperatura – quanto maior a temperatura mais rápida a oxidação;

- Luz – a absorção de luz na região do visível ou próximo do ultravioleta fornece energia que favorece a oxidação;
- Lipoxigenase – a enzima lipoxigenase proveniente de vegetais proporciona a maior formação de radicais livres e assim a oxidação lipídica;
- Metais – íons metálicos de metais de transição como Fe e Zn, favorecem a formação de radicais livres devido a transferência de elétrons ocorrida durante as alterações de estado de oxidação. A atuação de íons metálicos nos processos de oxidação lipídica diminui a energia de ativação da reação inicial de oxidação e favorece a formação de peróxidos.

3.2 ESPÉCIES METÁLICAS EM ÓLEOS VEGETAIS

A presença de metais em óleos vegetais, geralmente ocorre em quantidade muito pequena e provem de fatores como o metabolismo da planta de origem, uso de fertilizantes e agentes para correção do solo durante o cultivo, presença de rodovias próximas às áreas de plantações, contaminações ambientais ou durante os processos de refino, transporte ou armazenamento do produto^{11,13,31}.

A concentração de metais em óleos vegetais é bastante variável, pois depende da origem do produto, mas normalmente apresenta-se na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$ e ng g^{-1} . Trindade e colaboradores (2015)¹⁷ relataram concentrações entre 0,27-1,75 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Fe e entre 0,11-0,45 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Zn em três tipos de óleos comestíveis e Bennincasa e colaboradores (2007)³² expuseram largas faixas de concentração de Fe e Mg em amostras de óleo de oliva entre 89,3-550,9 ng g^{-1} e 56-1032 ng g^{-1} respectivamente, isto devido as diferentes origens e condições de cultivo das amostras analisadas.

Muitas espécies metálicas de Ca, Fe, K, Mg e Zn são nutrientes essenciais da alimentação humana, exercendo funções importantes no equilíbrio e na manutenção das funções do organismo humano como a geração de energia, síntese de estruturas celulares e atividade enzimática³⁴. Diante da importância nutricional de espécies metálicas, existem recomendações sobre as concentrações a serem ingeridas diariamente, sendo entre 10 e 40 mg dia^{-1} , de Fe, entre 320-420 mg dia^{-1} de Mg e entre 12-15 mg dia^{-1} de Zn³⁵.

Metais como Fe, Mg e Zn estão presentes em diversos alimentos e a absorção de tais metais no organismo humano depende diretamente da forma química em que se apresentam³⁴. Apesar de representarem nutrientes muito importantes da nutrição humana a exposição excessiva a determinadas espécies metálicas destes metais podem trazer danos a saúde humana^{34,35}.

O Fe é um elemento fundamental a diversas atividades metabólicas considerado o metal mais abundante no organismo humano, atua na formação da hemoglobina e de enzimas vinculadas a funções respiratórias, assim sua presença na dieta humana é indispensável. No entanto, estudos demonstram que o excesso de Fe pode gerar danos a células e tecidos devido a sua capacidade de catalisar a geração de radicais que atacam e danificam macromoléculas celulares³³.

O Mg configura o quarto cátion mais abundante no corpo humano, este elemento é um importante nutriente que auxilia na ativação das enzimas e juntamente com o K age nas células como instigador interno do metabolismo do fósforo em processo de geração de energia³⁴. O excesso de Mg no organismo pode gerar quadro de hipermagnesemia marcado por sonolência, fraqueza, e em casos mais graves parada respiratória³⁷.

O Zn é o segundo elemento em maior concentração no corpo humano e atua em diversos eventos fisiológicos como na divisão celular mitótica e síntese de DNA, o Zn também é fundamental no equilíbrio da atividade enzimática, estabilização de proteínas e transmissão de impulsos nervosos³⁸. Apesar de ser um nutriente essencial ao organismo humano, as concentrações elevadas de Zn podem causar inúmeras doenças incluindo lesão neuronal e epilepsia^{39,40}.

Apesar da concentração de metais em óleos vegetais ser relativamente baixa, a presença destes pode interferir diretamente na qualidade dos óleos comerciais, uma vez que metais como Fe, Mg e Zn atuam como catalizadores de reação de oxidação lipídica gerando peróxidos, aldeídos e cetonas que alteram de modo relevante características de sabor e odor do produto^{13,41,42}. Além disso, elementos como Cd, Hg e Pb são potencialmente tóxicos ao organismo humano mesmo em baixas concentrações^{3,4,5}. Neste sentido, o controle da concentração de elementos químicos em amostras de óleos vegetais é importante.

3.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS EM ÓLEOS

A determinação de metais em óleos constitui um grande desafio analítico, pois as amostras são de grande complexidade e a concentração das espécies metálicas normalmente apresenta-se em nível traço, estes fatores dificultam muito a identificação e quantificação^{13,43-45}.

Diversas técnicas analíticas vêm sendo utilizadas na determinação de metais em óleos, entre as quais estão a Espectrometria de Emissão Óptica com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES)^{46,47}, Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)^{48,49}, Espectroscopia de Raios X⁵⁰, e Espectrometria de Absorção Atômica (AAS), sendo esta amplamente utilizada^{7,14,25,35,51,52}. Além destas a Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua (HR-CS AAS) também é considerada uma alternativa na determinação de elementos traço em óleos^{17,53,54,59}.

O fundamento de técnicas de AAS consiste na medida de absorção da intensidade da radiação eletromagnética, proveniente de uma fonte de radiação específica, por átomos gasosos no estado fundamental⁶⁰. Esta técnica pode ser utilizada em determinações qualitativas e quantitativas de metais, semi-metais e alguns não metais^{51,52}.

O sistema básico de um espectrômetro de absorção atômica é constituído de fonte de radiação, atomizador, monocromador, um detector, um processador de sinais e um sistema computacional conforme demonstrado na Figura 3. Os recentes avanços tecnológicos dos componentes ópticos e eletrônicos permitiram a AAS determinações com maior sensibilidade, precisão e menores limites de detecção⁵⁶.

A eficiência da utilização da AAS na determinação de metais em amostras de óleos foi demonstrada em trabalhos como o de Bakircioglu, Toprakasever e Kutulus (2014)⁶⁶, com a utilização de extração induzida por quebra de emulsão para a determinação de Zn em óleos comestíveis por F AAS, o valor de LOD foi de 1,00 µg L⁻¹, também Cabrera-Vique, Bouzas e Oliveras-López (2012)⁶ obtiveram bons resultados na determinação de 5 metais em amostras de óleo de oliva por GF AAS, utilizando diluição com solventes, os valores de Limite de Detecção ficaram entre 1,50 e 80 pg g⁻¹.

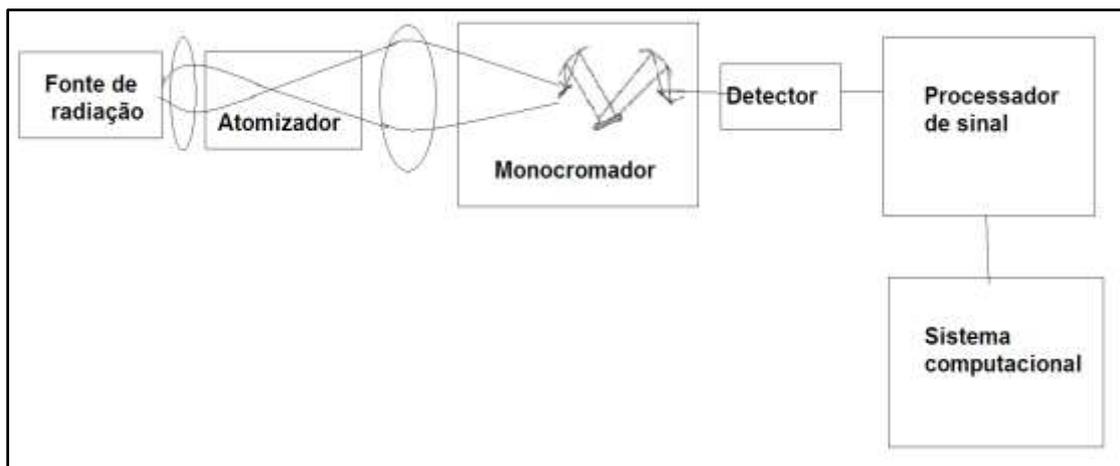


Figura 3. Diagrama de blocos de um espectrômetro de absorção atômica de feixe único.

Fonte: Adaptado de Holler, Skoog e Crouch (2009)⁶¹.

As técnicas instrumentais são eficientes na determinação de elementos traço, mas tratando-se de amostras complexas como óleos vegetais a confiabilidade dos resultados obtidos está diretamente relacionada com os procedimentos de preparo de amostras, os quais visam minimizar interferentes e garantir a qualidade nas determinações.

3.3.1 Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização por Chama

A espectrometria de absorção atômica com atomização por chama foi proposta em 1955 por Alan Walsh na Austrália e por Alkemade e Milatz na Holanda⁵⁸. O espectrofotômetro de absorção atômica com atomização por chama possui como componentes principais fonte de radiação com lâmpada de cátodo ôco específica para cada elemento, atomizador por chama, monocromador, detector e um sistema para leitura conforme a Figura 4.

A análise por F AAS inicia-se com a nebulização da amostra, a qual é transformada em um fino aerossol e misturada a gases combustíveis e oxidantes que produzem a chama, elevando-se o calor existe a evaporação do solvente e a vaporização dos analitos, posteriormente as moléculas dissociam-se dão origem a átomos livres, a quantidade de átomos livres no estado fundamental pode ser relacionada com a radiação absorvida⁶³.

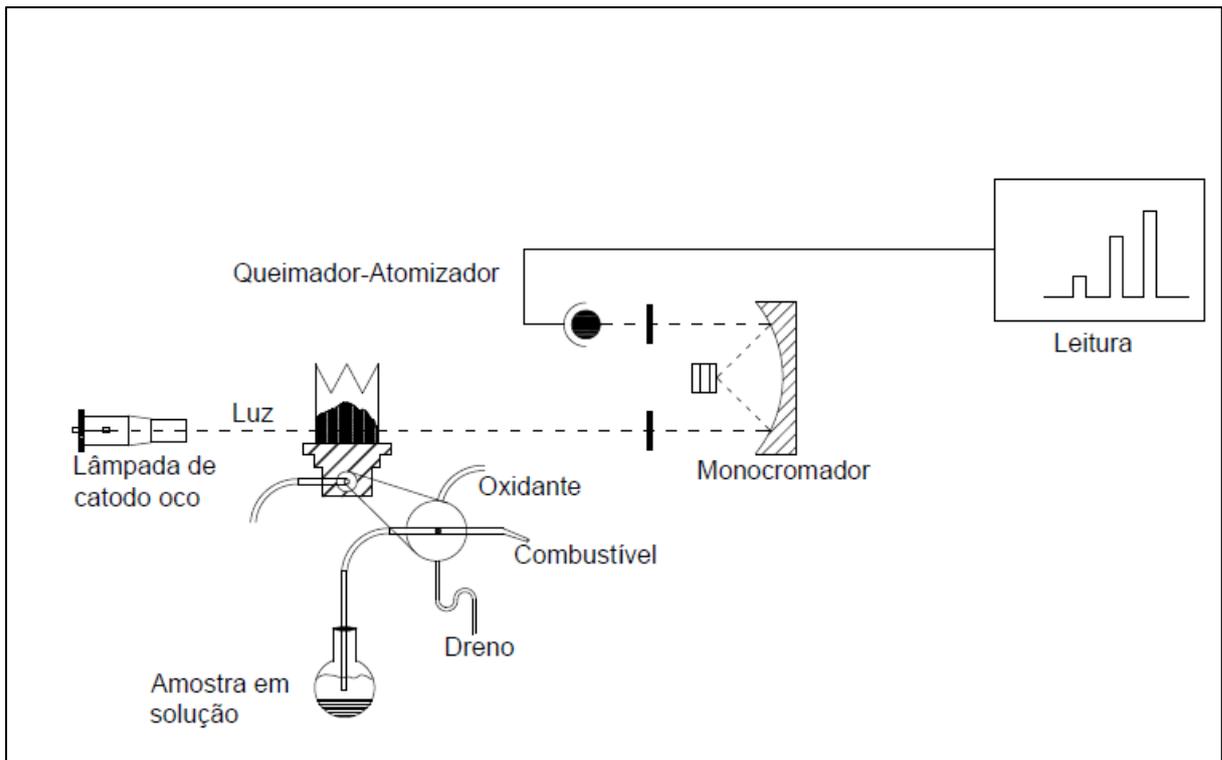


Figura 4. Espectrofotômetro de absorção atômica com atomização por chama

Fonte: CIENFUEGOS e VAITSMAN (2000)⁶³

A F AAS esta entre as técnicas espectrométricas mais usadas na determinação de metais devido a sua relativa simplicidade, robustez, efetividade e baixo custo. Apesar de determinar entre 60 e 70 elementos com elevada sensibilidade, a F ASS convencional e que utiliza fontes de linhas, é limitada a determinações monoelementares⁶⁰.

As determinações por F AAS podem sofrer alterações devido a interferências do tipo espectral e/ou não-espectral. As interferências espectrais provem da presença de produtos particulados que espalham a radiação ou de superposição das linhas, já as interferências não-espectrais são causadas na maioria das vezes pelos contaminantes presentes na matriz da amostra^{59,61}.

Entretanto a presença de compostos orgânicos em amostras analisadas por espectrometria atômica pode interferir drasticamente no resultado, exigindo procedimentos de preparo de amostras capazes de eliminar todos os interferentes, o que pode gerar perda de analitos e contaminação por reagentes⁶¹.

3.4 PREPARO DE AMOSTRAS

A correta escolha e execução de procedimentos de preparo de amostra são fundamentais para o sucesso em análises químicas. Considerada a etapa mais crítica de determinações espectrométricas, o preparo de amostras exige em média 61% do tempo total da análise e pode representar a maior fonte de erros analíticos^{56,57}.

Tratando-se de amostras com alto teor de matéria orgânica como óleos, o preparo de amostra deve reduzir ao máximo a quantidade de carbono orgânico e para isto muitas vezes requer ácidos concentrados e consideráveis tempo e temperatura aquecimento¹⁵. Entre os procedimentos de preparo de amostras mais amplamente aplicados para determinação de metais em óleos estão: a digestão ácida em frasco aberto ou assistida por micro-ondas, diluição direta, combustão assistida por micro-ondas, emulsificação e extração líquido-líquido^{17,58,62}.

A digestão ácida busca oxidar todos os compostos orgânicos constituintes da amostra utilizando misturas de reagentes como: ácido nítrico, ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio, sob altas temperaturas em frasco aberto ou em sistema micro-ondas sob alta pressão, até a completa decomposição da matriz da amostra^{63,64}. A digestão ácida apresenta vantagens como a eliminação de prováveis interferências da matriz, elevada aplicabilidade, eficiência e robustez⁶⁴. No entanto, a digestão ácida, principalmente em frasco aberto, exhibe desvantagens, como o prolongado tempo de análise, consumo elevado de reagentes, exposição do analista a reagentes potencialmente tóxicos e alto fator de diluição^{5,13}.

O preparo de amostras por diluição com solventes orgânicos é um procedimento simples e rápido, aplicado para solubilização de amostras orgânicas, mas limitado devido ao uso elevado de reagentes potencialmente tóxicos e a alta probabilidade de contaminação proveniente de reagentes de baixa pureza⁶. Além disso, a introdução direta das amostras com alto conteúdo orgânico em equipamentos espectrométricos pode gerar resultados imprecisos uma vez que determinados componentes da amostra podem formar compostos termicamente estáveis que não se decompõem com a ação da chama, também na diluição direta o limite de quantificação é elevado em consequência do fator de diluição^{6,63,64}.

A combustão assistida por micro-ondas é utilizada no preparo de amostras complexas, principalmente devido a elevada eficiência na decomposição de matéria

orgânica, eliminando a matéria orgânica que pode atrapalhar as determinações espectrométricas⁶⁵. No entanto a utilização de temperaturas muito elevadas durante o procedimento podem levar a formação de espécies voláteis e assim perda de analitos^{65,66}.

A emulsificação representa um procedimento alternativo para o preparo de amostras em que não há destruição total da matriz⁴⁷. Neste procedimento ocorre a formação de um sistema entre água e óleo com aplicação de surfactantes e algumas vezes um álcool como co-solvente, com a finalidade reduzir a viscosidade da amostra e facilitar as determinações^{47,53}. Apesar de ser um procedimento simples, as emulsões formadas muitas vezes não apresentam boa estabilidade podendo comprometer os resultados¹³.

A extração líquido-líquido (LLE) é um dos procedimentos mais antigos na extração de analitos, utiliza solventes imiscíveis para que ocorra a separação entre analitos orgânicos e inorgânicos⁶⁶. Este procedimento fundamenta-se na solubilidade do analito em uma das fases imiscíveis, proporcionando a extração e a pré concentração dos analitos em volumes menores⁶⁷. No entanto a LLE apresenta algumas limitações como o elevado consumo de reagentes, baixas taxas de recuperação do analito, muitas etapas de manipulação da amostra, elevado tempo de extração e geração de grande volume de resíduos^{17,67}.

Diante das limitações demonstradas por procedimentos de preparo de amostras convencionais, surge a necessidade do desenvolvimento de novos métodos que eliminem ou reduzam o consumo de reagentes, diminuam o gasto energético, apresentem menor geração de resíduos e não exponham riscos ao operador^{5,67}.

No desenvolvimento de novas metodologias analíticas existe atualmente uma tendência a miniaturização dos sistemas, tornando os processos mais rápidos, simples e menos dispendiosos sem perder a eficiência⁶⁸. Em função disso, procedimentos de preparo de amostras aplicando quantidades reduzidas de reagentes estão sendo desenvolvidos, entre estes destacam-se a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) e a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva em Fase Reversa (RP-DLLME).

3.4.1 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)

Com a finalidade de melhorar o processo de extração líquido-líquido convencional, Rezaee e colaboradores (2006)⁹ desenvolveram a DLLME. Neste procedimento, ocorre a formação de um sistema ternário a partir da mistura entre uma solução contendo o solvente extrator (solvente orgânico de baixa densidade, imiscível em água) e agente dispersor (solvente miscível em água e no solvente extrator) e a amostra^{8,67,69}. Na DLLME, a separação dos analitos ocorre por partição entre duas fases imiscíveis de solução aquosa e solvente orgânico, a polaridade do analito determina sua solubilidade em uma das fases¹⁰.

O procedimento da DLLME inicia-se na injeção rápida da mistura de solventes sobre a amostra aquosa contendo os analitos⁷⁰. Com a turbulência gerada pela introdução da mistura de solventes, existe a dispersão de finas gotículas do solvente extrator na amostra, aumentando o contato entre as fases e conseqüentemente a extração dos analitos⁷⁰. A elevada área de contato entre solvente extrator e amostra aquosa, faz com que o equilíbrio seja alcançado rapidamente e assim o tempo de extração seja curto^{67,70}. Após a injeção da mistura de solventes ocorre a centrifugação separando as duas fases, na fase sedimentada encontram-se os analitos que podem então ser determinados^{69,71}. As etapas da DLLME estão ilustradas na Figura 5.

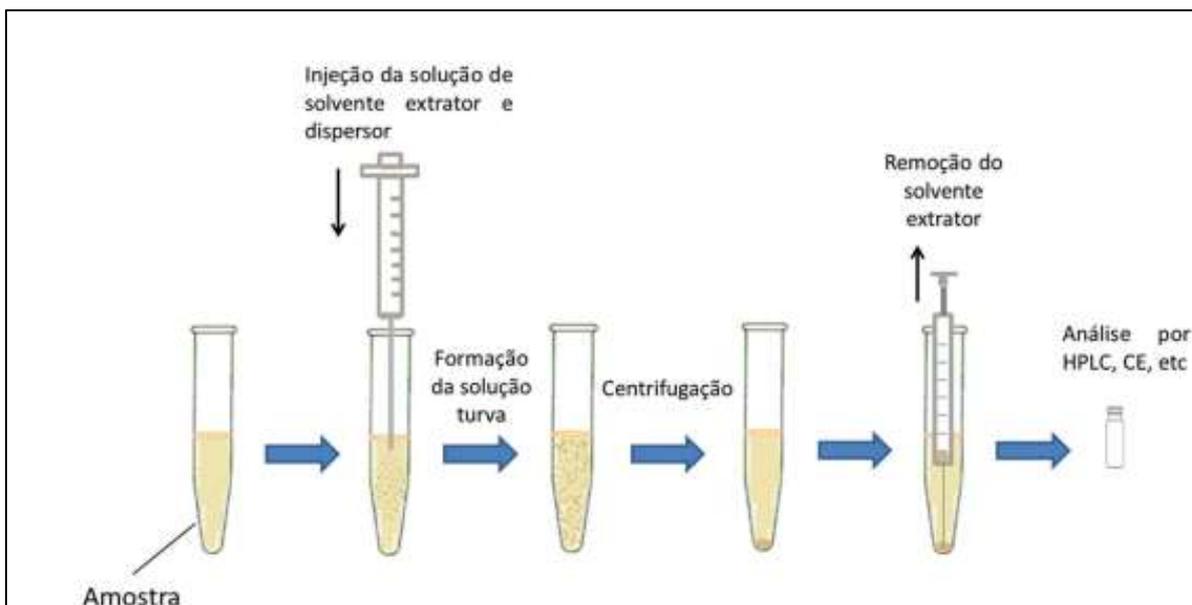


Figura 5. Esquema DLLME.

Fonte: Moreira Yokoya e Gaitani (2014)⁷¹.

Existem fatores muito importantes a se considerar na aplicação da DLLME entre eles a solubilidade do solvente extrator em água, o volume da solução de amostra, o tipo e o volume de solvente dispersor e o volume solvente extrator⁶⁹. Para obter os melhores resultados o ideal é realizar experimentos com o intuito de otimizar as condições de extração e pré-concentração.

Os procedimentos de preparo de amostras por DLLME apresentam diversas vantagens, dentre elas: baixo custo, recuperação adequada, elevados fatores de enriquecimento (FE) ou pré-concentração, pequeno consumo de reagente e ótima eficiência de extração⁶⁷.

A DLLME já foi aplicada em muitos trabalhos conforme demonstrado na Tabela 1. Os resultados expõem a elevada sensibilidade e eficiência dos métodos aplicando DLLME em diferentes amostras. Na determinação de metais em amostras biológicas e de alimentos a DLLME é bastante favorável, pois com ela, além de extração ocorre a pré-concentração destes analitos que normalmente apresentam-se em quantidades muito pequenas em tais amostras.

Apesar dos inúmeros benefícios da DLLME, existem fatores que dificultam a sua aplicação, como a escolha do solvente extrator que deve ter a capacidade de extrair os analitos, gerar uma solução turva em contato com o solvente dispersor, ter pouca solubilidade em água e ainda ser compatível com a instrumentação analítica,

desta maneira o número de solventes extratores que podem ser utilizados é bastante limitado^{69,72,73}.

Algumas modificações quanto a natureza do solvente extrator utilizado na DLLME vêm sendo propostas com a finalidade de melhorar a eficiência e a ampliar aplicabilidade do procedimento, dentre as novas metodologias pode-se mencionar a *ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction* (IL-DLLME) que utiliza líquidos iônicos como solventes extratores, amplamente aplicável na determinação de espécies metálicas⁷⁴, pesticidas^{69,75} e outros poluentes orgânico⁷⁶ em amostras de origem biológica, água ou cosméticos e a *dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop* (DLLME-SFO) que apresenta como inovação a utilização de um solvente de baixa densidade e com ponto de fusão próximo a temperatura ambiente para solidificar-se e tornar mais fácil a separação do analito, este procedimento é muito eficiente na extração de compostos orgânicos halogenados⁷⁷.

Outra metodologia promissora é *low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction* (LDS-SD-DLLME) onde após a injeção da mistura de solventes, ocorre a adição de um novo volume de solvente dispersor para que ocorra a quebra da emulsão e o solvente extrator fica na fase superior, facilitando a coleta e excluindo a etapa de centrifugação o que torna o procedimento mais rápido, a LDS-SD-DLLME possui inúmeras aplicações incluindo a determinação de hidrocarbonetos policíclicos e sulfonamidas em água⁷⁸⁻⁸⁰.

Usualmente o solvente extrator aplicado a DLLME é apolar, portanto tem pouca afinidade por analitos polares ou aplicação para extração de analitos em amostras hidrofóbicas como óleos vegetais⁶⁹. Na determinação de espécies metálicas por DLLME, muitas vezes ocorre à conversão dos analitos a complexos com a adição de agentes quelantes que possibilitam a interação do analito com o solvente extrator apolar, este procedimento vem sendo aplicado para amostras aquosas⁸. No entanto para a determinação de espécies metálicas amostras complexas como óleos, que são apolares, a aplicação deste procedimento não é possível⁸⁰.

Para contornar esta limitação, existem estudos recentes com a utilização da *reverse phase dispersive liquid-liquid microextraction* (RP-DLLME), procedimento que utiliza solventes com polaridade inversa a DLLME convencional.

3.4.2 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva em Fase Reversa (RP-DLLME)

A RP-DLLME foi proposta por Hashemi e colaboradores (2010)¹⁰ para a extração pré-concentração de oleuropeína em águas residuais provenientes do processamento da azeitona. Atualmente a RP-DLLME expandiu-se a diversos métodos analíticos.

A RP DLLME segue procedimentos similares a DLLME tradicional, uma mistura de solventes é aplicada diretamente na amostra, onde o solvente dispersor é miscível na amostra e no solvente extrator e o solvente extrator é miscível em água de modo inverso a DLLME, o analito deve ter maior afinidade pelo solvente extrator, de modo a ser atraído para a fase aquosa, conforme demonstrado na Figura 6^{71,81}.

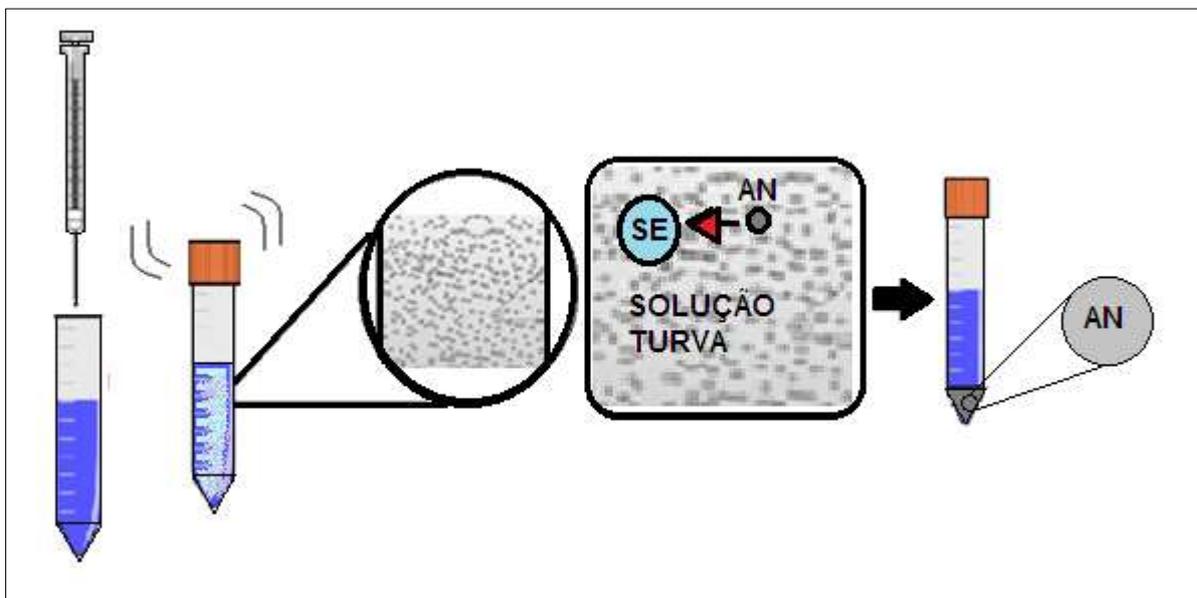


Figura 6. Esquema RP-DLLME, onde SE: solução extratora e AN: analito

A RP-DLLME trata-se de um procedimento de equilíbrio, pois durante a formação da dispersão entre os solventes e a amostra, existe uma grande área de superfície entre o solvente extrator e o analito, fazendo com que o equilíbrio seja atingido rapidamente⁸²⁻⁸⁵.

Entre as vantagens associadas à RP-DLLME pode-se mencionar a rapidez, a simplicidade em relação a outros procedimentos como digestão ácida, economia e facilidade de automatização.¹⁰ A RP-DLLME tornou-se atualmente foco de diversos estudos conforme demonstrado na Tabela 1.

Assim como na DLLME convencional variações nos procedimentos de dispersão da mistura podem melhorar a eficiência de extração da RP-DLLME. A utilização de banho ultrassônico e agitação por vórtex em trabalhos que aplicam a RP-DLLME trazem benefícios como: a melhoria da formação da dispersão, rápida transferência de massa entre duas fases imiscíveis, redução do tempo de equilíbrio e diminuição o tempo de extração^{86,87}.

Em trabalhos como o de Cinelli et al. (2013)⁸⁸ ocorreu a utilização de *ultrasound-vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction* (USVADLLME) na determinação de seis ésteres em bebidas alcoólicas por GC-FID, obtendo ótimos resultados com valores de LOD abaixo de $0,022 \mu\text{g L}^{-1}$, Ziyaadini, Mahadi e Khosravinia (2016)⁸⁹ utilizaram a RP-DLLME assistida por ultrassom para a determinação de compostos fenólicos em sedimentos marinhos, o uso de ultrassom trouxe como um dos benefícios o uso de um menor volume de solvente e o valor de LOD de $15 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ⁸⁹. Também Hosseini, Heydari e Alimoradi (2015),¹³ verificaram que a utilização de vórtex na RP-LLME melhora a extração de amygdalin em óleo vegetal obtendo um LOD de $20 \mu\text{g L}^{-1}$.

A RP-DLLLME permite a extração e pré-concentração de analitos com valores de fator de pré-concentração elevados e valores de limite de detecção na ordem de ng g^{-1} . Constata-se que a maioria das aplicações da RP-DLLME destina-se a determinação de compostos orgânicos como fenólicos e N-nitro dietanolamina em amostras apolares^{11,12,90} Já determinação de espécies metálicas por RP-DLLME ainda é pouco abordada, apresentada apenas no estudo de López-García, Vicente-Martinez e Hernández-Córdoba (2013)¹⁴ onde os resultados foram satisfatórios com valores de LOD abaixo de 10ng Kg^{-1} e fatores de enriquecimento acima de 140, indicando que a aplicação da RP-DLLME para esta finalidade é um ótimo tópico a ser explorado.

Algumas características de diversos trabalhos aplicando DLLME e RP-DLLME estão expostas na Tabela 1.

Tabela 1. Características de diferentes métodos aplicando a DLLME e RP-DLLME.

Procedimento de preparo das amostras/ Técnica	Amostras	Analitos	Comentários	Referencias
DLLME/HPLC	Água mineral	β -estradiol e dietilstilbestrol	Acetona como solvente dispersor e CCl_4 como solvente extrator. LOD de $0,010 \mu\text{g L}^{-1}$ para β -estradiol e $0,008 \mu\text{g L}^{-1}$ para diethylstilbestrol	(96)
DLLME/F AAS	Cereais e alimentos vegetais	Cu	Etanol como solvente dispersor e CCl_4 contendo 1,3-fenileno-bis(1,2-etanodil)-bis-isotioureia como solvente extrator. FE de 55 e LOD de $0,05 \text{ ng g}^{-1}$	(97)
DLLME/GF AAS	Materiais biológicos	Ag	Acetona como solvente dispersor e CCl_4 como solvente extrator. FE de 70 e LOD de 2 ng g^{-1}	(98)
DLLME/F AAS	Mel	Cd e Pb	Acetonitrila e Acetona como solventes dispersores para Cd e Pb respectivamente e CCl_4 como solvente extrator para Cd e Pb. LOD de 20 e 140 ng g^{-1} para Cd e Pb nesta ordem	(99)
RP-DLLME/LC-DAD-MS	Óleo de oliva extra virgem	Compostos fenólicos	1-4 dioxano como solvente dispersor e solução etanol/água 6:4 (v/v) como solvente extrator. Valores de LOD entre 10 e 400 ng g^{-1}	(11)
RP-DLLME/HPLC	Óleos comestíveis	Bisfenol	Metanol como solvente dispersor e solução de NaOH como solvente extrator. LOD de $2,5 \text{ ng g}^{-1}$	(12)
RP-DLLME/ETA-AAS	Óleos comestíveis	Cd e Pb	Isopropanol como solvente dispersor e solução de ácido nítrico como solvente extrator. FE de 140 para Cd e de 146 para Pb. LOD de 0,6 e 10 ng Kg^{-1} para Cd e Pb respectivamente.	(14)
RP-VADLLME/HPLC-UV/Vis	Óleos e sementes	Amygdalin	Mistura de acetonitrila e tetrahydrofurano como solvente dispersor e água como solvente extrator. FE LOD de $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$	(13)
RP-DLLME/e LC-UV/Vis	Cosméticos	N-nitro dietanolamina	Acetona como solvente dispersor e água como solvente extrator. FE de 31,5. LOD de $1,2 \text{ ng g}^{-1}$	(100)

4 EXPERIMENTAL

4.1 INSTRUMENTAÇÃO E ACESSÓRIOS

Balança analítica Mark 2054 (Bel, Itália) com resolução de 0,0001g, chapa de aquecimento modelo EAM 301 (Equilam, Brasil), agitador tipo vórtex K45-2820 (Kasvi, Brasil), banho de ultrassom USC-1400A (Unique, Brasil) frequência 40 kHz e centrífuga LM-DM0412S (Lab1000, Brasil) foram utilizados para a RP-DLLME. O procedimento de digestão foi realizado em bloco digestor SL2540 (Solab, Brasil) com tubos de vidro borossilicato de 100 mL. Na construção da curva analítica, a extração de metais da amostra de óleo de soja ocorreu em incubadora *shaker* SP 223 (SPLABOR, São Paulo). Todas as determinações de Fe e Mg e Zn, envolvendo RP-DLLME, digestão ácida, e diluição direta, foram realizadas em espectrômetro de absorção atômica com atomização por chama Analyst 700 (PerkinElmer-Sciex, Canadá) com lâmpadas de cátodo oco operando em corrente de 19 mA para Fe e Mg e em 15 mA para Zn, para ambos os metais utilizou-se fenda espectral de 0,7 nm, chama de ar/acetileno (17:2 L min⁻¹). As absorvâncias monitoradas foram 248,3 nm, 285,2 nm e 213,9 nm para Fe, Mg e Zn nesta ordem. Todos os materiais utilizados durante as análises foram previamente lavados e mergulhados por 12 horas em solução de ácido nítrico 10% (v/v) com posterior enxague com água destilada por três vezes.

4.2 REAGENTES, PADRÕES E AMOSTRAS

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Em todos os procedimentos em que ocorreu a utilização de água, empregou-se água ultra-pura com resistividade de 18 MΩ cm⁻¹, purificada em purificador Master All 2000 (Gehaka, Brasil). Soluções de HNO₃ supra puro 65% (Merck, Alemanha) foram utilizadas para a extração dos analitos. Etanol (Dinâmica, Brasil), Isopropanol (Proquimios, Brasil) e 2-propanol (Panreac AppliChem, Alemanha)

foram utilizados na otimização do solvente dispersor para RP-DLLME. Soluções estoque de Fe ($100 \mu\text{g g}^{-1}$), Mg ($500 \mu\text{g g}^{-1}$) e Zn ($100 \mu\text{g g}^{-1}$) em óleo mineral (Specsol, Brasil) foram utilizadas no preparo das curvas analíticas e testes de recuperação. Para a digestão foram usados H_2SO_4 95% (Neon, Brasil), HNO_3 65% (Nuclear, Brasil), H_2O_2 30% (Vetec, Brasil) e papel filtro quantitativo (Unifil, Brasil). As amostras dos óleos de: canola, coco, gergelim, girassol, linhaça, milho, soja e oliva adquiridas no comércio local da cidade de Ponta Grossa (Paraná, Brasil). O óleo crambe foi gentilmente doado por uma empresa localizada na região de Ponta Grossa (Paraná, Brasil).

4.3 MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE REVERSA (RP-DLLME)

Para RP-DLLME aproximadamente 5 g de cada amostra foram diretamente pesados em tubos de polipropileno de 15 mL com fundos cônicos e posteriormente aquecidos em banho-maria ($90 \pm 5^\circ\text{C}$) por 10 min. Após, com auxílio de uma micropipeta, foi adicionado 1 mL da mistura contendo um solvente dispersor (2-propanol) e solvente extrator (solução acidificada com HNO_3). Então, para facilitar a dispersão dos solventes, a mistura foi agitada por 20 s em vortéx e sonicada em banho ultrassônico por 10 min. Na sequência as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 min para a separação das fases. O sobrenadante foi descartado e a fase aquosa sedimentada, aproximadamente 600 μL contendo os analitos, foi analisada por F AAS, ajustando o tempo de integração. As condições analíticas do equipamento foram tempo de *delay* de 1 s e o tempo de integração de 2 s. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos com a estimativa da média \pm desvio padrão.

4.4 DIGESTÃO ÁCIDA

O procedimento adotado para a digestão ácida baseou-se no trabalho descrito por Korn e colaboradores (2010)¹⁰¹. Aproximadamente 0,5 g de cada óleo foi pesado em tubos de digestão, adicionado de 5 mL de HNO_3 , 2 mL de

H₂SO₄ e 1 mL de H₂O₂ 30%. Os tubos foram aquecidos a $90 \pm 5^\circ\text{C}$ por 2 h, posteriormente adicionados de 3 mL de HNO₃ e 1 mL de H₂O₂ (30% v/v) e aquecidos novamente a $220 \pm 5^\circ\text{C}$ por 40 min. Após período de resfriamento, foram adicionados 2 mL de HNO₃ + 4 mL de H₂O₂. O sistema foi aquecido a $180 \pm 5^\circ\text{C}$ até completa dissolução dos componentes. As soluções resultantes foram então filtradas em papel filtro quantitativo e avolumadas para 50 mL com água ultrapura.

4.5 DILUIÇÃO DIRETA

A diluição direta baseou-se no método descrito por Chaves e colaboradores (2011)⁴⁶, aproximadamente 0,5 g de cada amostra foi pesado em balões volumétricos de 10 mL e adicionado de 2-propanol até completar o volume. A mistura foi agitada manualmente por 30 s ou até completa diluição da amostra.

4.6 CURVAS ANALÍTICAS

4.6.1 Curvas Analíticas para determinações por RP-DLLME

Para o preparo das curvas analíticas, 100 g de uma amostra de óleo de soja foram purificados por extração líquido-líquido exaustiva por meio da adição de 20 mL de uma solução de HNO₃ 10% (v/v), agitação em incubadora *shaker* a 100 rpm, por 12 h a 25°C e posterior separação da fase aquosa com funil de separação. As curvas analíticas foram preparadas por RP-DLLME, nas mesmas condições utilizadas para as amostras. Padrões organometálicos de Fe, Mg e Zn foram utilizados para obtenção das curvas de calibração, sendo as faixas de calibração entre 0,05-0,50 µg g⁻¹ para Fe, 0,01-0,10 µg g⁻¹ para Mg e 0,02-0,20 µg g⁻¹ para Zn.

4.6.2 Curvas Analíticas para determinações por Digestão Ácida

Para a digestão ácida foram construídas curvas analíticas aplicando padrões aquosos, acidificados com HNO₃ 1% (v/v), nas faixas de 0,5-5,0 mg L⁻¹, 0,05-0,50 mg L⁻¹ e 0,2-2,0 mg L⁻¹ para Fe, Mg e Zn respectivamente.

4.6.3 Curvas Analíticas para determinações por Diluição Direta

Na diluição direta, as curvas analíticas foram preparadas com a utilização de padrões aquosos diluídos em 2-propanol e acidificados com HNO₃ 1% (v/v). As faixas de concentração adotadas foram de 0,5-5,0 mg L⁻¹, 0,05-0,50 mg L⁻¹ e 0,2-2,0 mg L⁻¹ para Fe, Mg e Zn nesta ordem.

4.7 PARÂMETROS DE MÉRITO

Os parâmetros de mérito analisados para o método foram: precisão, exatidão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e fator de enriquecimento (FE).

4.7.1 Precisão

A precisão de um método analítico pode ser avaliada por meio do valor de desvio padrão (*s*) e desvio padrão relativo (RSD). O cálculo de desvio padrão foi baseado na raiz quadrada da somatória ao quadrado da diferença entre cada valor obtido (*x*) e a média aritmética entre todos os valores (\bar{x}) dividida pelo número de replicatas (*n*) menos 1, conforme demonstrado pela Equação 1¹⁰².

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (1)$$

O desvio padrão relativo foi calculado de acordo com a Equação 2:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \quad (2)$$

onde s é o desvio padrão e \bar{x} é a média aritmética dos valores observados.

4.7.2 Exatidão

A exatidão do método foi determinada mediante comparação com os resultados obtidos por diluição direta, procedimento indicado pela NBR 15556⁹¹ com adaptações, também com os resultados obtidos por digestão ácida proposto nos Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos (IAL,2008)⁶³. Outro procedimento para verificar a exatidão do método baseou-se em ensaios de recuperação. Na determinação do fator de recuperação para extração e pré-concentração de Fe aplicando RP-DLLME, aproximadamente 5 g do óleo de soja foram pesados em 6 tubos tipo Falcon de 15 mL, em três tubos não houve adição de padrão, nos outros foram adicionadas alíquotas de 0,20 $\mu\text{g g}^{-1}$ do padrão organometálico de Fe. Procedeu-se então a RP-DLLME com todos os tubos preparados e após realizou-se a leitura em F AAS.

Os mesmos procedimentos foram realizados para o Mg usando alíquotas de 0,04 $\mu\text{g g}^{-1}$ de padrão organometálico e para o Zn com alíquotas de 0,10 $\mu\text{g g}^{-1}$ de padrão organometálico.

O fator de recuperação foi calculado de acordo com a Equação 3^{102,103}.

$$FR = \frac{(C_2 - C_0) * 100\%}{C_1} \quad (3)$$

Onde C_0 é a concentração do metal no óleo puro em $\mu\text{g.g}^{-1}$, C_1 é a concentração adicionada em $\mu\text{g.g}^{-1}$ e C_2 é a concentração obtida nas amostras que sofreram adição em $\mu\text{g.g}^{-1}$.

4.7.3 Limite de Detecção (LOD)

A determinação do limite de detecção (LOD) de um método analítico atribui a menor concentração que pode ser percebida com um bom nível de confiança^{103,104}. Para a definição dos valores de LOD e Limite de Quantificação (LOQ), adotou-se como branco a solução extratora contendo isopropanol e solução de ácido nítrico 1% na proporção 1:1 (v/v). A Equação 4 identifica como foi calculado o limite de detecção do método proposto.

$$LOD = \frac{3.s}{S} \quad (4)$$

Onde s é o desvio-padrão de dez medidas do branco (solução extratora) e S é a sensibilidade da calibração, ou seja a inclinação da curva analítica.

4.7.4 Limite de Quantificação (LOQ)

A menor quantidade de analito que pode ser identificada na amostra caracteriza o LOQ. No presente estudo o limite de quantificação foi dado pela Equação 5⁵¹.

$$LOQ = \frac{10.s}{S} \quad (5)$$

onde s é o desvio-padrão de dez medidas do branco e S é a sensibilidade da calibração.

4.7.5 Fator de enriquecimento (FE)

O fator de enriquecimento foi determinado de acordo com Huo e colaboradores. (2011)¹⁰⁵ com a Equação 6, onde (C_{sed}) é a concentração do

analito na fase sedimentada em $\mu\text{g g}^{-1}$ e (C_0) é a concentração inicial do analito na amostra em $\mu\text{g g}^{-1}$.

$$F = \frac{C_{sed}}{C_0} \quad (6)$$

4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os resultados obtidos para a concentração das espécies metálicas de Fe, Mg e Zn em óleos vegetais, aplicando RP-DLLME e Diluição Direta foram comparados por meio de teste T emparelhado, utilizando-se o programa *Statistica* versão 7 (*StatSoft*) (Tulsa, Estados Unidos). Os valores médios foram comparados em um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS DA RP-DLLME

Com a finalidade de elevar a eficiência da extração e pré-concentração de Fe, Mg e Zn em óleos vegetais por RP-DLLME, os parâmetros otimizados foram: tipo e volume de solvente dispersor, concentração ácida no solvente extrator, agitação em vórtex e tempo de sonicação. A análise das otimizações ocorreu de maneira univariada, utilizando uma amostra composta pela mistura A (óleo de crambe e óleo de soja na proporção aproximada de 1:4 (v/v), contendo naturalmente os analitos.

5.1.1 Tipo de Solvente Dispersor

As características do solvente dispersor afetam diretamente a RP-DLLME, pois estas determinam a dispersão do solvente extrator, sob a forma de gotículas, na amostra, aumentando a superfície de contato e facilitando a extração do analitos, assim é fundamental que o solvente dispersor seja solúvel tanto na amostra quanto na solução extratora^{68,106}. Três solventes foram testados como possíveis agentes dispersores: etanol, 1-propropanol e 2-propanol ou Isopropanol, os resultados estão expostos na Figura 7.

Os álcoois foram selecionados como possíveis solventes dispersores devido à miscibilidade no solvente de extração aquoso e na amostra, fase orgânica. Conforme demonstrado no estudo de López-García, Vicente-Martínez e Hernández-Córdoba (2014)¹⁴, álcoois como 2-propanol, etanol e metanol demonstraram bons resultados como solventes dispersores para RP-DLLME aplicada a determinação de espécies metálicas em óleos vegetais¹⁴.

Na Figura 7 pode-se observar que os valores de absorvância obtidos usando o 1-propanol e 2-propanol ou Isopropanol como dispersores, para os três analitos, foram ligeiramente superiores aos valores obtidos com etanol

para os 3 analitos. Isto pode ser explicado pela relação de afinidade entre álcoois e óleos vegetais¹⁰⁷.

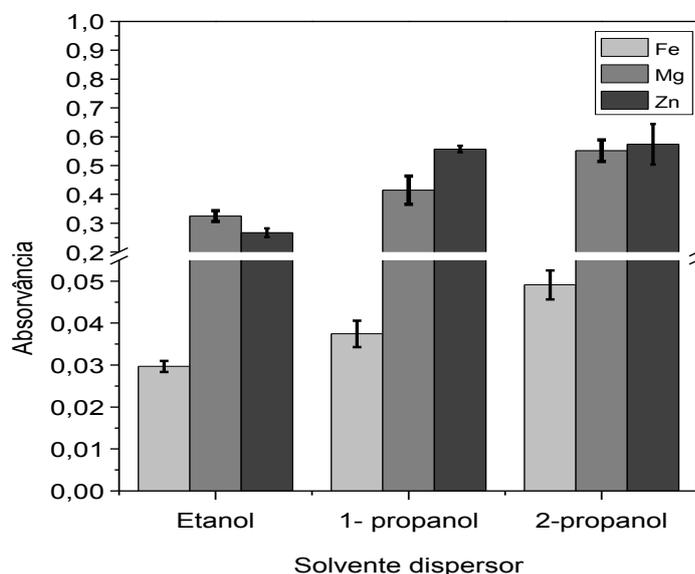


Figura 7. Efeito do tipo de solvente dispersor sobre a extração e pré-concentração de Fe, Mg e Zn. Condições experimentais: 5 g da mistura A, 10 min de aquecimento ($90 \pm 5^\circ\text{C}$), 20 s de vórtex e 10 min de ultrassom, 1 mL de mistura extratora contendo 500 μL de ácido nítrico 3% como extrator e 500 μL de solvente dispersor. (n=3)

Os óleos vegetais são em sua maioria formados por moléculas grandes e apolares com valores de constante dielétrica entre 2 e 4 $\text{C}^2\text{N}^{-1}\text{m}^{-2}$ ²⁹, assim têm grande afinidade por substâncias apolares. Os álcoois tem sua polaridade definida de acordo com o tamanho da cadeia carbônica, quanto maior a cadeia mais apolar¹⁰⁷, desta maneira demonstram maior afinidade por óleos vegetais.

A utilização do 2-propanol como solvente dispersor proporcionou valores de absorvância médios levemente superiores aos obtidos com 1-propanol, assim o 2-propanol foi selecionado como dispersor para a extração e pré-concentração de Fe, Mg e Zn por RP-DLLME.

5.1.2 Volume de Solvente Dispersor

O volume de solvente interfere na formação da dispersão e desta maneira na eficácia da extração⁸. Na definição da quantidade ideal de solvente dispersor para a extração e pré-concentração de Fe, Mg e Zn em óleos

vegetais, utilizou-se misturas contendo 500 μL de ácido nítrico 3% (v/v) e volumes de 2-propanol variando entre 100 e 700 μL . Os resultados obtidos para cada metal estão demonstrados na Figura 8.

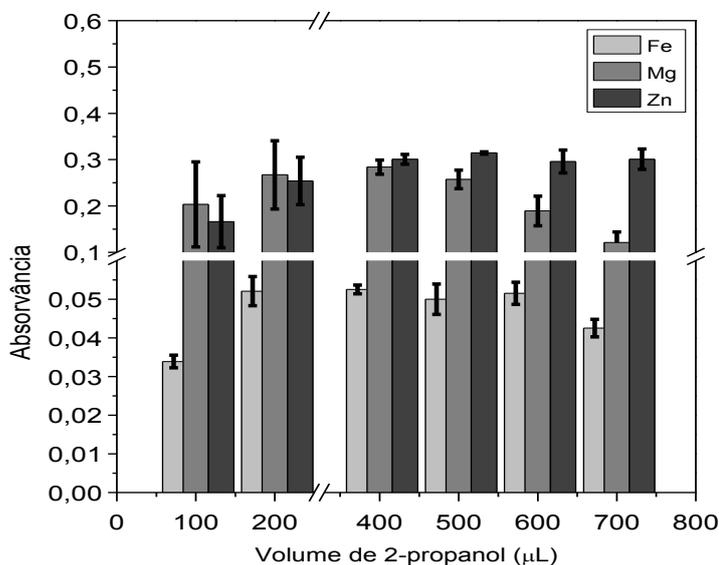


Figura 8. Efeito do volume de 2-propanol sobre extração e pré-concentração de Fe, Mg e Zn em óleos vegetais. Condições experimentais: 5 g da mistura A, 10 min de aquecimento ($90 \pm 5^\circ\text{C}$), 20 s de vórtex e 10 min de ultrassom, 1 mL de mistura extratora contendo 500 μL de ácido nítrico 3% (v/v) como extrator e volumes entre 100-700 μL de solvente dispersor. (n=3)

Os melhores valores, com maiores sinais de absorvância, foram obtidos entre os volumes de 200 e 600 μL para Fe, 200 e 500 μL para Mg e 400 e 600 μL para Zn. Apesar de encontrar-se entre as maiores faixas de absorvância para os três metais, o volume de 400 μL gerou volumes finais de extração inferiores a 600 μL , o que dificultaria a determinação por F AAS. Desta maneira, buscando o menor consumo de solvente, adotou-se como volume ótimo 500 μL para todos os metais. A diminuição dos valores de absorvância com o aumento do volume de solvente extrator pode estar associada a um maior fator de diluição do analito.

5.1.3 Concentração do Solvente Extrator

O solvente extrator é determinante para bons resultados por RP-DLLME, este solvente deve ser imiscível na amostra, ter maior densidade que a fase

doadora (amostra) e elevada interação com o analito de interesse^{108,109}. O solvente extrator adotado foi o ácido nítrico, que possui elevada capacidade oxidante, o que leva a melhor extração e solubilização das espécies metálicas de Fe, Mg e Zn presentes na matriz⁹².

A definição da concentração ideal de solução extratora, consistiu na utilização de soluções de ácido nítrico variando entre 0 e 7% (v/v). Os resultados demonstrados na Figura 9.

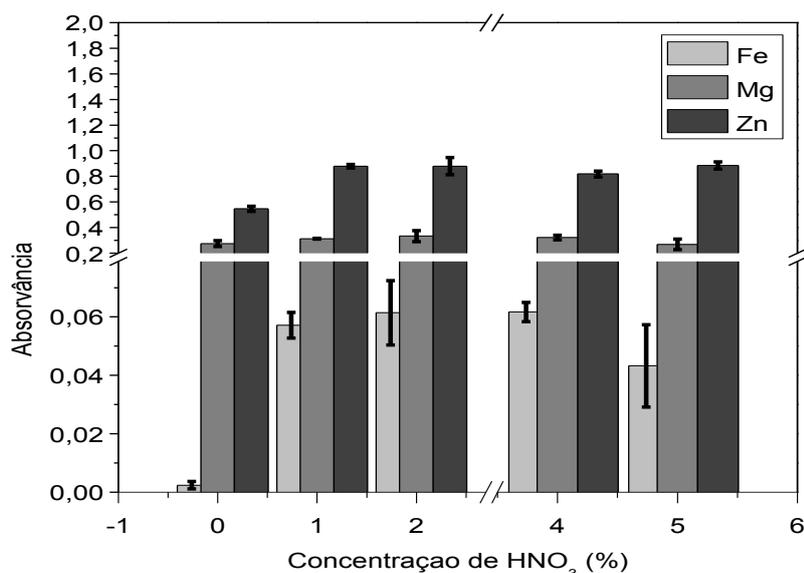


Figura 9. Efeito da concentração de HNO₃ sobre a extração e pré-concentração de Fe Mg e Zn. Condições experimentais: 5 g da mistura A, 10 min de aquecimento (90 ± 5°C), 20 s de vórtex e 10 min de ultrassom, 1 mL de mistura extratora contendo 500 µL de 2-propanol como solvente dispersor e 500 µL de HNO₃ com concentrações variando entre 0 e 7% (v/v).(n=3)

Os resultados expostos na Figura 9 remetem que a partir da concentração de 1% (v/v) não houve diferença significativa nos valores de absorvância para Fe, Mg e Zn, assim buscando o menor consumo de reagentes adotou-se a concentração de 1% (v/v) como condição ótima, uma vez que esta concentração foi adequada para uma extração eficiente dos analitos presentes na amostra.

5.1.4 Tempo de Ultrassom

Muitos autores já descreveram os efeitos da propagação do ultrassom em líquidos, onde o fenômeno de cavitação gera a implosão de bolhas no produto que levam a erosão e quebras de partículas, a macro-turbulências e formação de uma micro-mistura^{92,93,94,95}. O ultrassom foi empregado na RP-DLLME para proporcionar uma dispersão homogênea entre a mistura de solução extratora e a amostra em função dos efeitos gerados pela cavitação e macro-turbulências¹⁰⁹.

Foram avaliados tempos de ultrassom entre 5 e 25 min, os resultados obtidos, constam na Figura 10.

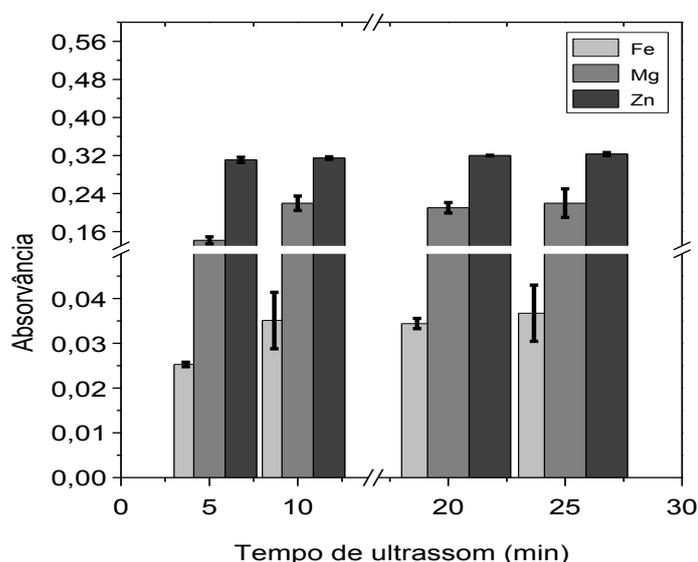


Figura 10. Influência do tempo de ultrassom na extração e pré-concentração de Fe, Mg e Zn. Condições experimentais: 5 g da mistura A, 10 min de aquecimento ($90 \pm 5^\circ\text{C}$), 20 s de vórtex, tempos entre 5 e 25 min de ultrassom, 1 mL de mistura extratora contendo 500 μL de ácido nítrico 1%(v/v) como extrator e 500 μL de 2-propanol como solvente dispersor. (n=3)

Os resultados da Figura 10 indicam, por meio dos valores de absorvância, que a ação o aumento do tempo de ultrassom melhora levemente os valores de absorvância referentes a Fe, entre os tempos de 5 e 10 min. Entretanto, a partir do tempo de 10 min de sonicação, não houve diferença significativa nos valores de absorvância para nenhum dos metais analisados. Desta maneira, para RP-DLLME as amostras foram submetidas à ação do ultrassom por 10 min.

5.1.5 Agitação em Vórtex

Em virtude da alta viscosidade das amostras, a rápida injeção da mistura contendo os solventes extrator e dispersor não proporcionava uma dispersão adequada da solução extratora nas amostras, mesmo com a redução da viscosidade promovida pelo aquecimento. Então, a agitação em vórtex foi avaliada conforme a Figura 11.

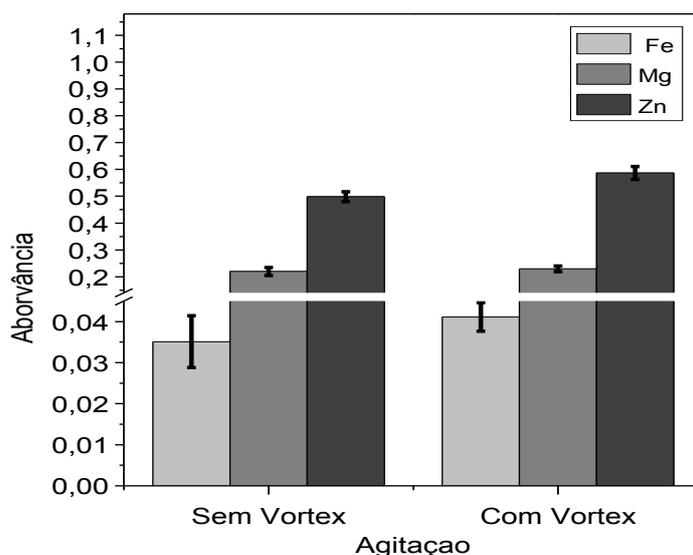


Figura 11. Efeito da agitação em vórtex sobre a extração e pré-concentração de Fe, Mg e Zn. Condições experimentais: 5 g da mistura A, 10 min de aquecimento ($90 \pm 5^\circ\text{C}$), agitação com vórtex e sem vórtex, 10 min de ultrassom, 1 mL de mistura extratora contendo 500 μL de ácido nítrico 1% como extrator e 500 μL de 2-propanol como solvente dispersor.

Apesar de não existir uma diferença significativa entre os valores de absorvância com e sem agitação por vórtex para os três metais, adotou-se a agitação com vórtex com o intuito de garantir a completa dispersão da mistura extratora na amostra e melhorar a precisão das medidas, uma vez que conforme os resultados da Figura 11, o procedimento com vórtex gerou menores valores de desvio padrão relativo, principalmente para o Fe.

As condições ótimas obtidas para determinação de Fe, Mg e Zn em óleos por RP-DLLME foram: 5 g da amostra aquecidas por 10 min a $90 \pm 5^\circ\text{C}$, a adição de 1 mL da mistura extratora, contendo 500 μL de 2-propanol e 500 μL de ácido nítrico 1% (v/v), agitação em vórtex por 20 s e tempo de ultrassom

de 10 min. O volume de solução extratora obtido após a RP-DLLME foi de aproximadamente 600 μL , encaminhados para determinação espectrométrica por F AAS com *delay* de 1 s e tempo de integração de 2s.

5. 2 PARAMETROS DE MÉRITO

Utilizando as condições otimizadas, foram obtidos os parâmetros de mérito para RP-DLLME na determinação de Fe, Mg e Zn, cujos valores estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de mérito para RP-DLLME na determinação de Fe, Mg e Zn em amostras de óleos vegetais por F AAS.

Parâmetro	Fe	Mg	Zn
Faixa de calibração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,05-0,50	0,01-0,10	0,02-0,20
Fator de Enriquecimento (FE)	27,5	10,7	12,7
LOD (ng g^{-1})	9	2	8
LOQ (ng g^{-1})	32	7	25
RSD (%)	2-10	1-10	2-11
Coefficiente Angular ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,2207 \pm 0,0068	1,4932 \pm 0,0608	1,9543 \pm 0,0846
Coefficiente Linear	0,0009 \pm 0,0002	0,0076 \pm 0,0016	0,0111 \pm 0,0011
R ²	> 0,9949	>0,9945	>0,9964

Na obtenção dos valores de LOD e LOQ da RP-DLLME, a solução extratora (mistura de 2-propanol e ácido nítrico 1% na proporção 1:1 v/v) foi adotada como branco. Com a RP-DLLME, as determinações de Fe, Mg e Zn em óleos vegetais, apresentaram valores de LOD de 9 ng g^{-1} , 2 ng g^{-1} e 8 ng g^{-1} respectivamente .

Nas determinações após digestão ácida, utilizou-se como branco a mesma mistura de reagentes aplicados nas amostras e submetidos às mesmas condições de digestão. Os valores de LOD obtidos para a determinação de Fe, Mg e Zn com a digestão ácida foram 418 ng g^{-1} , 604 ng g^{-1} ,364 ng g^{-1} nesta ordem. Os elevados valores de LOD e LOQ obtidos com a digestão ácida em relação aos encontrados para o método proposto são justificados pela grande dificuldade em realizar a digestão ácida nas amostras de óleos que emergiam em direção ao topo do tubo com as adições de ácidos e peróxido de hidrogênio sob elevadas temperaturas, o que pode ter gerado a perda de analitos e

também ao elevado fator de diluição partindo de 0,5 g de amostra para 50 mL de solução final.

Para atribuição do LOD na diluição direta, 2-propanol acidificado a 1% foi utilizado como branco e os valores foram 111 ng g^{-1} , 11 ng g^{-1} e 80 ng g^{-1} para Fe, Mg e Zn nesta ordem. Os resultados obtidos para LOD com diluição direta, apesar de inferiores aos obtidos por digestão ácida, apresentaram-se ainda muito maiores aos demonstrados pela RP-DLLME, isto é decorrente do fator de diluição atrelado ao procedimento direto, de 0,5 g de amostra para 10 mL de solução final, em contrapartida da pré concentração ocorrida na RP-DLLME.

Conforme constatado por meio dos valores de LOD a RP-DLLME apresentou ótimos resultados para determinação de Fe, Mg e Zn em óleos vegetais, quando comparada aos procedimentos convencionais usando digestão ácida ou diluição direta com 2-propanol.

Os valores de LOD e LOQ também foram comparados aos obtidos em metodologias propostas na literatura, utilizando diferentes procedimentos de preparo de amostra e diferentes técnicas analíticas, trabalhos estes expostos na Tabela 3. Na mesma tabela pode-se observar que os resultados obtidos pelo método proposto usando RP-DLLME são semelhantes ou até mesmo melhores que os obtidos por outras metodologias para a determinação de Fe, Mg e Zn em óleos.

Considerando o trabalho realizado por Acar (2012)¹¹¹ que envolveu a digestão ácida assistida por micro-ondas na determinação de metais em óleos de diferentes origens por ETA- AAS, os valores de LOD de $15,0 \mu\text{g g}^{-1}$ para Fe e $12,0 \mu\text{g g}^{-1}$ para Zn, chegam a ser mais de 1500 vezes superiores aos obtidos por RP-DLLME.

Ainda em relação à outros procedimentos expostos na Tabela 3, para determinação de espécies metálicas em óleos, como extração líquido-líquido^{17,112}, emulsão¹¹³, microemulsão⁵¹ e diluição direta⁴⁴, os valores de LOD são todos superiores aos obtidos com o método proposto.

Tabela 3. Valores de LOD obtidos por diferentes técnicas analíticas para determinação de Fe, Mg e Zn em amostras de óleos vegetais.

Matriz	Preparo de amostras	Técnica	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Referencia
Óleos comestíveis	Digestão ácida assistida por micro-ondas	ICP OES	0,41 (Fe) e 0,09 (Zn)	(110)
Óleos vegetais	Digestão ácida assistida por micro-ondas	ETA-AAS	15,0 (Fe) e 12,0 (Zn)	(111)
Óleos vegetais	Digestão ácida assistida por micro-ondas	ICP-MS	0,04 (Fe)	(47)
Óleo de argan	Digestão ácida assistida por micro-ondas	ICP OES	0,12 (Fe), 3,00 (Mg) e 0,04 (Zn)	(45)
Óleos comestíveis	Extração líquido-líquido	F AAS	0,067 (Fe III)	(112)
Óleos vegetais	Extração líquido-líquido assistida por ultrassom	HR-CS F AAS	0,061 (Fe) e 0,012 (Zn)	(17)
Óleos vegetais	Emulsão	ETV-ICP-MS	0,02 (Zn)	(113)
Óleos vegetais	Microemulsão	HR-CS F AAS	0,62 (Fe) e 0,12 (Zn)	(51)
Óleos comestíveis	Quebra de emulsão	F AAS	$1 \cdot 10^{-3}$ (Zn)	(62)
Óleos comestíveis	Quebra de emulsão	ICP-MS	$2,71 \cdot 10^{-4}$ (Fe), $9,3 \cdot 10^{-5}$ (Mg) e $1,77 \cdot 10^{-4}$ (Zn)	(114)
Óleo de semente de abóbora	Digestão ácida assistida por micro-ondas	ICP OES	0,320 (Fe), 0,030 (Mg) e 0,051 (Zn)	(115)
Óleo de oliva	Digestão ácida assistida por micro-ondas	ICP-MS	0,32 (Fe) e 0,31 (Mg)	(116)
Óleo de oliva	Diluição direta	GF AAS	$8,00 \cdot 10^{-6}$ (Fe)	(6)
(Óleos vegetais e biodiesel	Diluição direta	ICP OES	0,01 (Fe) e 0,05 (Zn)	(44)
Óleos vegetais	RP-DLLME	F AAS	$9 \cdot 10^{-3}$ (Fe), $2 \cdot 10^{-3}$ (Mg) e $8 \cdot 10^{-3}$ (Zn)	Presente trabalho

No trabalho de He e colaboradores (2014)¹¹⁴ em que ocorreu a determinação de espécies metálicas por ICP-MS, os LODs foram $2,71 \cdot 10^{-4} \mu\text{g g}^{-1}$ para Fe, $9,3 \cdot 10^{-5} \mu\text{g g}^{-1}$ para Mg e $1,77 \cdot 10^{-4} \mu\text{g g}^{-1}$ para Zn, valores inferiores aos obtidos com o método proposto, isto pode ser decorrente da sensibilidade da técnica espectrométrica aplicada.

Estas evidências indicam que a RP-DLLME representa uma ótima alternativa à determinação de espécies metálicas em óleos, que normalmente apresentam-se em baixas concentrações. Os menores valores de LODs com a RP-DLLME podem ser explicados pela pré-concentração dos analitos, tornando tais analitos mais facilmente detectáveis por técnicas espectrométricas.

Para os três metais os valores de coeficiente angular entre 0,2207 e 1,9543 e coeficiente linear entre 0,0009 e 0,0111, indicaram elevada sensibilidade do sinal em relação à concentração destes analitos nas amostras de óleos vegetais.

Os valores de coeficiente de determinação (R^2) de 0,9970, 0,9945 e 0,9964 para Fe, Mg e Zn nesta ordem, indicaram que as variações de absorvâncias são explicadas pelos valores de concentração em mais de 99%, isto indica a capacidade de determinação dos analitos com o método proposto.

Os valores de fator de enriquecimento (FE) foram de 27,5, 10,7 e 12,7 vezes para Fe, Mg e Zn respectivamente, demonstrando a elevada capacidade de pré-concentração do método. No trabalho de López-Garcia, Vicente-Matrinez e Hernández-Cordoba (2014)¹⁴ aplicando a RP-DLLME na determinação de Cd e Pb em óleos vegetais os fatores de enriquecimento foram de 140 e 146 vezes respectivamente, estes valores são superiores aos obtidos na metodologia proposta devido a utilização de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica que apresenta maior sensibilidade diante da FAAS e ainda ao menor volume de fase sedimentada de 67 μL .

5.2.1 Estudo da Precisão

Para avaliar a precisão de um método analítico verifica-se o desvio padrão relativo (RSD) aplicando a Equação de Horwitz, que relaciona o desvio padrão relativo aceito (RSD_R) com a concentração do analito (C), conforme está exposto na Equação 7^{117,118}.

$$RSD_R = 2^{(1-05\log C)} \quad (7)$$

Aplicando a Equação 7 à diferentes ordens de concentração, independente da matriz ou do analito obtém-se a relação exposta na Tabela 4 .

Tabela 4. Valores de desvio padrão relativo (RSD) máximos aceitáveis de acordo com a concentração do analito

Concentração do analito	RSD _R
1 (100%)	2
10 ⁻¹	2,8
10 ⁻² (1%)	4
10 ⁻³	5,6
10 ⁻⁴	8
10 ⁻⁵	11
10 ⁻⁶	16
10 ⁻⁷	23
10 ⁻⁸	32
10 ⁻⁹	45

Fonte: INMETRO (2011)¹¹⁷

As concentrações das espécies metálicas de Fe, Mg e Zn nas amostras de óleos vegetais apresentaram-se na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$, para esta ordem de concentração valores de RSD até 16% são aceitos. Diante disso os valores de desvio padrão relativo (RSD) obtidos entre 2-10% para Fe, entre 1-10% para Mg e entre 2-11% para o Zn demonstraram a boa precisão do método proposto.

5.2.2 Estudo da Exatidão

Buscando averiguar a interferência da matriz na determinação dos analitos e a exatidão do método, testes de recuperação foram realizados adicionando determinadas alíquotas de padrões organometálicos nas amostras de óleo de soja, óleo de milho e na mistura de óleo crambe e óleo de soja 1:4 (v/v). Os resultados obtidos para recuperação de Fe, Mg e Zn estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Teste de recuperação para Fe, Mg e Zn em diferentes amostras de óleos vegetais por RP-DLLME

Origem da amostra	Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	Inicial	Adicionado	Determinado
Milho	<0,032	0,200	0,162±0,003
Soja	<0,032	0,205	0,226±0,017
Crambe+Soja	0,210±0,010	0,205	0,431±0,007
Recuperação	81-110 (%)		
Origem da amostra	Mg ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	Inicial	Adicionado	Determinado
Milho	0,288±0,005	0,042	0,327±0,005
Soja	0,095±0,013	0,042	0,137±0,001
Recuperação	97-107(%)		
Origem da amostra	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	Inicial	Adicionado	Determinado
Milho	<0,025	0,100	0,092±0,010
Soja	<0,025	0,100	0,093±0,002
Crambe+Soja	0,213±0,010	0,099	0,314±0,018
Recuperação	92-102 (%)		

(n = 3)

Os intervalos de recuperação em função da concentração do analito, segundo a *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*¹¹⁷ constam na Tabela 6.

Tabela 6. Intervalos de recuperação aceitos de acordo com a concentração do analito.

Concentração do analito (%)	Intervalo de Recuperação aceito (%)
100	98-102
10	98-102
1	97-103
0,01	95-105
0,001	90-107
0,0001	80-110
0,00001	80-110
0,000001	80-110
0,0000001	60-115
0,00000001	40-120

Fonte: AOAC (2011)¹¹⁸

As concentrações de metais adicionadas para os testes de recuperação foram da ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$ e os valores de recuperação obtidos entre 81% e 110% para os 3 metais. Analisando o que é recomendado pela AOAC (2011)¹¹⁸, o fator de recuperação para concentrações na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$ pode variar entre 80-110%,

diante disto as recuperações obtidas foram satisfatórias em diferentes matrizes, o que demonstra a boa exatidão do método proposto.

5.4 COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS

A comparação do método proposto utilizando RP-DLLME com o método por digestão ácida não pode ser realizada, pois em todos os casos as concentrações das espécies metálicas de Fe, Mg e de Zn em óleos vegetais apresentaram-se abaixo dos valores de LOQ obtidos pela metodologia por digestão ácida de $1,39 \mu\text{g g}^{-1}$, $2,01 \mu\text{g g}^{-1}$ e $1,18 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente

Os elevados valores de LOQ da digestão ácida, em relação aos outros procedimentos propostos, são devidos ao elevado fator de diluição envolvido e a perdas por volatilização e/ou projeção durante o aquecimento em frasco aberto^{5,13}.

A comparação entre RP-DLLME e diluição direta na determinação de Fe e Zn foi possível em apenas 1 amostra, nas determinações de Fe e Zn. Já na determinação de Mg, a comparação foi possível entre 6 amostras analisadas.

Para realizar a melhor comparação entre os métodos, ocorreram adições de determinadas concentrações de padrões organometálicos de Fe e de Zn em amostras de óleos vegetais e posterior determinação do teor destes metais aplicando RP-DLLME e diluição direta com 2-propanol. Os resultados do teste T emparelhado e do teste F com $p < 0,05$ para a comparação entre as médias obtidas por RP-DLLME e por Diluição Direta constam na Tabela 7.

Em todas as determinações de Fe e de Zn, onde pode-se realizar a comparação entre as médias obtidas pelos procedimentos RP-DLLME e Diluição Direta, os valores para o teste T demonstraram-se inferiores ao $T_{\text{crítico}}$ de 4,30, também os valores de F ficaram abaixo do $F_{\text{crítico}}$ de 7,71 para o intervalo de confiança de 95%, diante disso as médias podem ser consideradas iguais.

Para a determinação de Mg nas amostras de óleos de canola, crambe+ soja B, gergelim, girassol, e oliva G os procedimentos por RP-DLLME e por diluição direta podem ser considerados iguais, pois a análise de variância expôs valores de T inferiores ao $T_{\text{crítico}}$ de 4,30 e valores de F inferiores ao $F_{\text{crítico}}$ de 7,71, com um nível de confiança de 95%.

Tabela 7. Concentrações de Fe, Mg e Zn em amostras de óleos vegetais determinadas aplicando e RP-DLLME e Diluição Direta e valores de teste T e teste F para comparação entre as médias

Origem	Concentração de Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)					Concentração de Mg ($\mu\text{g g}^{-1}$)					Concentração de Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)				
	Adição	RP-DLLME	Diluição Direta	T	F	Adição	RP-DLLME	Diluição Direta	T	F	Adição	RP-DLLME	Diluição Direta	T	F
CN						NA	0,51±0,04	0,51±0,05	0,13	0,02					
CSB	NA	0,33±0,01	0,39±0,01	-2,14	5,85	NA	1,73±0,03	1,771±0,04	-5,50	1,96	NA	0,49±0,03	0,46±0,03	2,01	1,77
GE						NA	0,24±0,02	0,26±0,02	-1,18	2,34					
GI						NA	0,14±0,01	0,12±0,02	2,13	6,41					
MI	5,00	5,63±0,24	5,50±0,05	0,88	0,85						0,80	0,84±0,05	0,88±0,10	-1,39	0,54
OG						NA	0,19±0,02	0,20±0,01	2,91	0,51					
SO						NA	0,09±0,01	0,09±0,01	0,10	0,02	0,80	0,89±0,02	0,89±0,03	0,98	0,53

CN – Canola; CSB- Crambé + Soja B; GE- Gergelim; GI- Girassol; MI- Milho; OG- Oliva G; OM - Oliva M; SO- Soja; NA – Não adicionado. (n=3)

Diante dos resultados positivos a igualdade entre as médias pode-se conceber que o método proposto tem boa exatidão para a determinação de Fe, Mg e Zn em óleos vegetais.

5.5 APLICAÇÃO ANALÍTICA

5.5.1 Determinações de Fe, Mg e Zn em Amostras de Óleos Vegetais

O método por RP-DLLME foi aplicado para extração e pré-concentração de Fe, Mg e Zn em 13 amostras de óleos vegetais com posterior determinação por F AAS. Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 8, onde estão também apresentados os resultados obtidos para determinação de Fe, Mg e Zn, nas mesmas amostras, aplicando digestão ácida e diluição direta em 2-propanol.

Entre as amostras analisadas, 11 foram utilizadas na forma como são comercializadas. O óleo crambe bruto não pode ser utilizado na forma natural, pois sua elevada viscosidade e complexidade de matriz não permitia uma mistura homogênea e a separação entre as fases não ocorria de maneira satisfatória, desta maneira o óleo crambe foi misturado ao óleo de soja em duas proporções: 1:4 (v/v) na amostra intitulada crambe + soja A e 1:2 (v/v) na amostra intitulada crambe + soja B.

O Fe foi encontrado em concentrações superiores aos LOQ, nas amostras com a mistura de óleo crambe e óleo de soja A e B e na amostra de óleo de girassol com concentrações variando entre $0,05 \pm 0,01$ e $0,33 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$, isto pode estar relacionado ao fato de a maioria das amostras ter passado por processos de purificação e refino nas indústrias, enquanto o óleo crambe foi utilizado na forma bruta.

Nas determinações de Mg pode-se perceber que todas as amostras analisadas apresentam uma concentração acima do LOQ de 8 ng g^{-1} , isto pode ser decorrente da maior utilização deste metal no metabolismo das plantas de origem dos óleos analisados.

Tabela 8. Concentrações de Fe, Mg e Zn em óleos vegetais obtidos com diferentes procedimentos de preparo de amostras

Origem da amostra	Concentração de Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)			Concentração de Mg ($\mu\text{g g}^{-1}$)			Concentração de Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	RP-DLLME	Digestão ácida	Diluição Direta	RP-DLLME	Digestão ácida	Diluição Direta	RP-DLLME	Digestão ácida	Diluição Direta
Canola	<0,03	<1,39	<0,37	0,519±0,043	<2,01	0,513±0,046	<0,025	<1,18	<0,27
Crambe + soja A	0,210±0,017	<1,39	<0,37	0,201±0,009	<2,01	ND	0,213±0,010	<1,18	<0,27
Crambe + soja B	0,335±0,022	<1,39	0,392±0,033	1,734±0,029	<2,01	1,771±0,035	0,488±0,027	<1,18	0,459±0,026
Coco	<0,03	<1,39	<0,37	0,287±0,003	<2,01	ND	0,094±0,003	<1,18	<0,27
Gergelim	<0,03	<1,39	<0,37	0,239±0,018	<2,01	0,261±0,019	0,174±0,011	<1,18	<0,27
Girassol	0,045±0,004	<1,39	<0,37	0,141±0,007	<2,01	0,125±0,016	<0,025	<1,18	<0,27
Linhaça	<0,03	<1,39	<0,37	0,228±0,061	<2,01	ND	0,286±0,001	<1,18	<0,27
Milho	<0,03	<1,39	<0,37	0,288±0,005	<2,01	ND	<0,025	<1,18	<0,27
Oliva M	<0,03	<1,39	<0,37	1,113±0,055	<2,01	ND	0,473±0,017	<1,18	ND
Oliva G	<0,03	<1,39	<0,37	0,191±0,013	<2,01	0,198±0,012	0,217±0,003	<1,18	<0,27
Oliva Q	<0,03	<1,39	<0,37	0,101±0,010	<2,01	ND	0,822±0,051	<1,18	ND
Oliva V	<0,03	<1,39	<0,37	0,207±0,041	<2,01	ND	0,334±0,007	<1,18	ND
Soja	<0,03	<1,39	<0,37	0,095±0,009	<2,01	0,093±0,009	<0,025	<1,18	<0,27

ND - não determinado. (n=3)

Concentrações de Zn foram encontradas na maioria das amostras, exceto para óleos provenientes de canola, girassol, milho, e soja que ficaram abaixo do LOQ. Todas as amostras de óleos originários de oliva apresentaram teores significativos de Zn, variando entre 0,217-0,822 $\mu\text{g g}^{-1}$. As amostras de óleo de oliva G, Q e V estavam armazenadas em embalagens metálicas, isto pode ser um fator que contribui para a maior concentração de Zn nas amostras.

As variações das concentrações entre espécies metálicas determinadas, Fe, Mg e Zn, podem ser justificadas pelas diferentes taxas de absorção de nutrientes do sistema radicular das plantas de origem, que dependem da morfologia e fisiologia dos vegetais e da necessidade metabólica de cada planta^{119,120}. Assim os macronutrientes como Ca, K e Mg são exigidos em maior quantidade, o que foi exposto com as concentrações mais elevadas de Mg, já micronutrientes (B, Cl, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se e Zn) são requeridos em menores concentrações¹²⁰. Também as variações nas condições de cultivo que envolvem o clima, a temperatura, o uso de fertilizantes e pesticidas e o tipo de solo podem ter gerado variações nas concentrações dos minerais determinados¹²¹.

Ao confrontar as concentrações de Fe, Mg e de Zn obtidas por RP-DLLME e as expostas em outros trabalhos, mesmo tratando-se de óleos vegetais de mesma origem existem diferenças significativas, pois tratam-se de amostras de diferentes locais, e conforme já ressaltado as condições de cultivo da planta podem interferir diretamente na absorção de minerais¹²⁰.

No entanto pode-se verificar que em parte dos trabalhos as concentrações destes minerais em óleos vegetais apresentam-se na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$, como no trabalho proposto. Benincasa e colaboradores (2007)¹¹⁶ determinaram minerais em diversas amostras de óleo de oliva e obtiveram como resultados concentrações de Fe variando entre $0,09 \pm 0,02$ e $0,55 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ e Mg entre $0,06 \pm 0,02$ e $1,03 \pm 0,14 \mu\text{g g}^{-1}$, também He e colaboradores (2014)¹¹⁴ verificaram concentrações de $0,176 \pm 0,05$, $0,369 \pm 0,01$ e $0,037 \pm 0,003 \mu\text{g g}^{-1}$ para Fe, Mg e Zn respectivamente, em uma amostra de óleo de canola. A ordem de grandeza destas concentrações são semelhantes às obtidas por RP-DLLME neste trabalho.

Os teores de Fe, Mg e de Zn determinados nas amostras analisadas demonstram a boa qualidade destes óleos pois apesar de não existir legislação vigente para as concentrações aceitáveis destes metais em óleos vegetais, os

valores na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$, indicam que não existiu contaminações durante o processamento.

A presença de Mg em todas as mostras analisadas expõem ainda o caráter benéfico destes óleos do ponto de vista nutricional. Mas em algumas amostras, como os óleos de oliva que apresentaram maiores concentrações de Zn, o processo de oxidação lipídica pode ser catalisado por este metal e a qualidade destes óleos prejudicadas à longo prazo.

6 CONCLUSÃO

O método proposto aplicando RP-DLLME no preparo de amostras provou ser simples, rápido e de baixo custo para a determinação de Fe, Mg e Zn em amostras de óleos vegetais com precisão e exatidão aceitáveis.

Elevados fatores de enriquecimento foram obtidos sendo 27,5 para Fe, 10,7 para Mg e 12,7 para Zn, indicando que o procedimento por RP-DLLME configura-se como uma ótima alternativa para a determinação de espécies metálicas, mesmo em baixas concentrações.

Os valores de LOD de 9 ng g^{-1} para Fe, 2 ng g^{-1} para Mg e 8 ng g^{-1} para Zn foram comparados aos obtidos por outras metodologias descritas na literatura e observou-se que tais valores são semelhantes ou até mesmo inferiores aos expostos na maioria dos outros trabalhos.

Na aplicação analítica do método proposto, 13 amostras de óleos vegetais foram analisadas. Em 3 amostras foram encontradas concentrações significativas de Fe variando entre $0,05 \pm 0,01$ e $0,33 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$. Na determinação de Mg todas as amostras analisadas apresentaram concentrações superiores ao LOD variando entre $0,09 \pm 0,01$ e $1,73 \pm 0,03 \mu\text{g g}^{-1}$. Já para as determinações de Zn, 9 amostras apresentaram concentrações entre $0,09 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,82 \pm 0,05 \mu\text{g g}^{-1}$. O trabalho demonstrou a boa qualidade dos óleos vegetais analisados, que expuseram concentrações na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$, o que se assemelha as concentrações obtidas para amostras de mesma origem em outros trabalhos.

Os bons resultados apresentados para a RP-DLLME neste trabalho, estimulam sua aplicação em trabalhos futuros, associada a outras técnicas analíticas como ICP OES ou ICP-MS na determinação espécies metálicas em amostras como óleos vegetais ou minerais, gorduras e biodiesel ou ainda na determinação de outros analitos como compostos fenólicos em amostras apolares.

7 REFERENCIAS

- 1 THOMAIDIS, N. S.; GEORGIU, C. A. Edible oil analysis by flow injection. **Laboratory Automation and Information Management**, v. 34, p.101-104, 1999.
- 2 INSTITUTE OF SHORTENING AND EDIBLE OILS – ISEO. **Foods fats and oils**, 9 ed., Washington, 2006.
- 3 SHAHIDI, F. Quality Assurance of fats and Oils. **Biley's Industrial Oil and Fat Products**. 6 ed. New York, 2005.
- 4 CHAIYASIT, W.; ELIAS, R. J.; McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 299-317, 2007.
- 5 LEPRI, F. G.; CHAVES, E. S.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. J.; CURTIUS, A. J.; de OLIVEIRA, L. C. C.; de Campos, R. C. Determination of trace elements in vegetable oils and biodiesel by atomic spectrometric techniques – A review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 46, n. 3, p. 175-206, 2011.
- 6 CABRERA-VIQUE, C.; BOUZAS, P. R.; OLIVERAS-LÓPEZ, M. J. Determination of trace elements in extra virgin olive oils: A pilot study on the geographical characterization. **Food Chemistry**, v. 134, p. 434-439, 2012.
- 7 ZEINER, M.; CINDRIC, I. J.; KANDLER, W.; STINGEDER, G. Trace determination of skin-irritating metals in tea tree oil by GF AAS. **Microchemical Journal**, p. 1-5, 2016.
- 8 MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, n. 4, v. 1, p. 35-51, 2012.
- 9 REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEIN, M. M.; AGHAE, E.; AGHAEI, E.; AHMADIA, F.; BERIJANI S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal Chromatographic**, v. 1, n. 1217, p. 2342-2357, 2006.

- 10 HASHEMI, P.; RAESI, F.; GHIASVAND, A. R.; RAHIMI, A. Reverse-phase dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein. **Talanta**, v. 80, p. 1926-1931, 2010.
- 11 GODOY-CABALLERO, M. P.; ACEDO-VALENZUELA, T.; GALEANO-DÍAZ, T. New reversed phase dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil by rapid resolution liquid chromatography with ultraviolet-visible and mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1313, p. 291-301, 2013.
- 12 LIU, S.; QILONG, X.; CHEN, J.; SUN, J. HE, H. ZHANG, X. Development and comparison of two dispersive liquid-liquid microextraction techniques coupled to high performance liquid chromatography for the rapid analysis of bisphenol A in edible oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1295, p. 16-23, 2013.
- 13 HOSSEINI, M.; HEYDARI, R.; ALIMORADI, M. Reversed-phase vortex-assisted liquid-liquid microextraction: A new sample preparation method for the determination of amygdalin in oil and kernel samples. **Journal Separation Science**, v. 38, n. 4, p. 663-669, 2015.
- 14 LÓPEZ-GARCIA, 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.
- 15 DUGO, G.; LA PERA, L.; LA TORRE, G.; GIUFFRIDA, D. Determination of Cd(II), Cu(II), Pb(II), and Zn(II) content in commercial vegetable oils using derivative potentiometric stripping analysis. **Food Chemistry**, v. 87, p. 639-645, 2004.
- 16 ZHU, F.; WENXIU, F.; XUEJING, W.; QU, L.; YAO, S. Health risk assessment of eight heavy metals in nine varieties of edible vegetable oils consumed in China. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 3081-3085, 2011.
- 17 TRINDADE, A. S. N.; DANTAS, A. F.; LIMA, D. C.; FERREIRA, S. L. C.; TEIXEIRA, S. G. Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction for determination of Cu, Fe, Ni and Zn in vegetable oils by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 185, p. 145-150, 2015.

- 18 GUNSTONE, F. D. **Vegetables Oils in Food Technology: properties and uses**, 2 ed. New Jersey: Wiley-Blakwell, 2011.
- 19 BRASIL, Ministério da Agricultura, do Abastecimento. Portaria nº 795. Norma de Identidade, Qualidade, Embalagem, Marcação e Apresentação do Óleo de Soja. **Diário Oficial da União**, Brasília, 15 de dezembro de 1993.
- 20 ISTA, International Statistical Agricultural Information. 2017. Disponível em: <<https://www.usda.gov/wps/portal/usda/usda>> Acesso: 1 set. 2017.
- 21 SASAKI, M. **Lípidios, carboidratos e proteínas de sementes de leguminosas do cerrado**. 2008. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- 22 ORDÓÑEZ, J. A. RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGILLÓN, G. D. G. F.; HOZ PERALES, L.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia dos alimentos : Componentes dos alimentos e processos**, v. 1, Porto Alegre: Artmed, 2007.
- 23 MENDIL, D.; ULUÖZLU, O. D.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v.165, p. 724-728, 2009.
- 24 NESTEL, P. J.; NOAKES, M.; BELLING, G. B.; MCARTHUR, R.; CLIFTON, P. M.; ABBEY, M. Plasma cholesterol-lowering potential of edible-oil blends suitable for commercial use. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 55, p. 46-50, 1992.
- 25 SIMOPOULOS, A. P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 5605-5695, 1999.
- 26 CAMPBELL, B. C. **Análise térmica aplicada ao estudo das reações de vulcanização em elastômeros: efeito de óleos vegetais e da cera de abelha**. 2016. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Instituto Politécnico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Nova Friburgo, 2016.
- 27 RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

- 28 FAHY E.; SUBRAMANIAM S; BROWN H. A.; GLASS C. K.; MERRILL A. H.; JR, MURPHY R. C.; RAETZ C. R.; RUSSELL D. W.; SEYAMA Y.; SHAW W.; SHIMIZU T.; SPENER F.; VAN MEER G.; VANNIEUWENHZE M.S.; WHITE S. H.; WITZTUM J. L.; DENNIS E. A. A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 839-861, 2005.
- 29 SILVA, F. A. M., BORGES, M. F., FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, p. 94-103, 1999.
- 30 RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. A Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 2-15, 2013.
- 31 DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**, 4 ed., São Paulo: Artmed, 2010.
- 32 BENINCASA, C.; LEWIS, J.; PERRI, E.; SINDONA, G.; TAGARELLI, A. Determination of trace element in Italian virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, p. 366-370, 2007.
- 33 MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. **Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives**. New York: Maecel Dekker, 1995.
- 34 ANGELO, A. J. S. Lipid oxidation in foods. **Critical Reviews in Foods and Nutrition**, v. 36, n. 3, p. 175-224, 1996.
- 35 AZEVEDO, F. A. CHASIN, A. . M. **Metais : Gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003.
- 35 ALLEN, L. B. SIITONEN, P. H., HAROLD, C.; THOMPSON, J. Determination of copper, lead and nickel in edible oils by plasma and furnace atomic spectroscopies. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, p. 477-481, 1998.

- 36 AFKAHAMI, A.; ABBASI-TARIGHAT, M.; KHANMOHAMMADI, H. Simultaneous determination of Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} ions in foodstuffs and vegetables with a new Schiff base using artificial neural networks. **Talanta**, v. 77, p. 995-1001, 2009.
- 37 AKHTER, P.; BALOCH, N. Z.; MOHAMMAD, D.; ORFI, S. D.; AHMAD, N. Assessment of strontium and calcium levels in Pakistani diet. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 73, p. 247-256, 2004.
- 38 MILLOUR, S.; NOËL, L.; CHEKRI, R.; VASTEL, C.; KADAR, A.; SIROT, V.; LEBLANC, J.; GUÉRIN, T. Strontium, silver, tin, iron, tellurium, gallium, germanium, barium and vanadium levels in foodstuffs from the Second French Total Diet Study. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, p. 108-129, 2012.
- 39 PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 202, p. 199-211, 2005.
- 40 PAYMASTER, N. J. Magnesium metabolism: a brief review. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v. 58, p.1-6, 1976.
- 41 FLINK, E. Magnesium Deficiency and Calcium and Parathyroid Hormone Interrelation. in **Trace Elements in Human Health and Disease**, v. 2. New York: Academic Press, 1976.
- 42 KAWAHARA, M.; MIZUNO, D.; KOYAMA, H.; KONOHA, K.; OHKAWARA, S.; SADAKAME, Y. Disruption of zinc homeostasis and the pathogenesis of senile dementia. **Biometal Science**, v. 6, p. 209-219, 2014.
- 43 CAPASSO, M.; JENG, J. M.; MALAVOTTA, M.; MOCCHIGIANI, E.; SENSI, S.; I. Zinc dyshomeostasis: a key modulator of neuronal injury. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 8 n. 2, p. 93-108, 2005.
- 44 BÖHM, K. Toxic effects of zinc ions on kinesin – Potential molecular cause of impaired intracellular transport. **Toxicology Letters**, v. 268, p. 58-62, 2017.
- 45 CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, n. 4, p.1-17, 2006.

- 46 CHAVES, E. S.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C.; CURTIUS, A. J.; FRANK, V. Determination of trace elements in biodiesel and vegetable oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry following alcohol dilution. **Spectrochimica Acta B**, v. 66, p. 733-739, 2011.
- 47 GOLSALVEZ, A.; GHANJAOU, M. E.; EL RHAZI, M.; GUARDIA, M. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy Determination of Trace Element Composition of Argan Oil. **Food Science and Technology International**, v. 16, n. 1, p. 65-71, 2010.
- 48 LIORENT-MARTÍNEZ, E.J.; ORTEGA-BARRALES, P.; FERNÁNDEZ-DE-CÓRDOVA, M. L.; DOMÍNGUEZ-VIDAL, A.; RUÍZ-MEDINA, A. Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1257-1262, 2011.
- 49 CASTILLO, J. R.; JIMÉNEZ, M. S.; EDBON, L. Semi quantitative simultaneous determination of metals in olive oil using direct emulsion nebulization. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, p. 1515-1518, 1999.
- 50 MELO, M. I. S.; SOUZA, J. R. Estudo do efeito de matriz na determinação de metais em óleos básicos rerrefinados por fluorescência de raios x por energia dispersiva. **Química Nova**, v. 38, p. 614-621, 2015.
- 51 GUNDUZ, S.; AKMAN, S. Investigation of trace element contents in edible oils sold in Turkey using microemulsion and emulsion procedures by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. **Food Science and Technology**, v. 64, p. 1329-1333, 2015.
- 52 VICENTINO, P. O.; BRUM, D. M.; CASSELLA, R. J. Development of a method for total Hg determination in oil samples by cold vapor atomic absorption spectrometry after its extraction induced by emulsion breaking. **Talanta**, v. 132, p. 733-738, 2015.
- 53 NUNES, L. S.; BARBOSA, J. T. P.; FERNANDES, A. P.; LEMOS, V. A.; SANTOS, W. N. L.; KORN, M. G. A.; TEIXEIRA, L. S. G. Multi-element determination of Cu, Fe, Ni and Zn content in vegetable oils samples by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry and microemulsion sample preparation. **Food Chemistry**, v. 127, p. 780-783, 2011.

- 54 ALMEIDA, J. S.; ANUNCIACÃO, T. A.; BRANDÃO, G. C.; DANTAS, A. L.; LEMOS, A. L.; TEIXEIRA, L. S. G. Ultrasound-assisted single-drop microextraction for the determination of cadmium in vegetable oils using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 107, p. 159-163, 2015.
- 55 PEREIRA, E.; ALMEIDA, T. S.; BORGES, D. L. G.; CARASEK, E.; WELZ, B.; FELDMANN, J.; MENOYO, J. C. Investigation of chemical modifiers for the direct determination of arsenic in fish oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 150, p. 142-147, 2016.
- 56 EWING, G. W. Métodos Instrumentais de Análise Química, v. 1, São Paulo: Bucher, 1972.
- 57 HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**, 6 ed., São Paulo: Bookman, 2009.
- 58 WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**, 3 ed., Weinheim: VCH, 1999.
- 59 CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciências, 2000.
- 60 SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, 8 ed, São Paulo: Thomson, 2006.
- 61 BUTLER, O. T.; CAIRNS, W. R. L.; COOK, J. M.; DAVIDSON, C. M. Atomic spectrometry update – a review of advances in environmental analysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, p. 35-89, 2016.
- 62 BAKIRCIOGLU, D. B.; TOPRAKSERVER, N.; KURTULUS, Y. B. Determination of zinc in edible oils by flow injection F AAS after extraction induced by emulsion breaking procedure. **Food Chemistry**, v. 151, p. 219-224, 2014.

- 63 INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 4.ed., São Paulo: 2008.
- 64 OLIVEIRA, E. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14. n. 2, 2003.
- 65 FLORES, E. M. M.; FLORES, E. L. M.; PANIZ, J. N. G.; BARIN, J. S.; MESKO, M. S.; KRUG, F. J. Decomposição de materiais orgânicos por combustão in **Preparo de Amostras para Análise Elementar**, São Paulo: EditSBQ, 2016.
- 66 BADER, R. B.; ZIMMERMANN, B. Sample preparation for atomic spectroscopic analysis: An overview. **Advances in Applied Science Research**, v.3, n. 3, 2012.
- 67 ZHENG, L.; CAO, F.; XIU, J.; BAI, X.; MOTTO-ROS, V.; GILON, N.; ZENG, H.; YU, J.; On the performance of laser-induced breakdown spectroscopy for directdetermination of trace metals in lubricating oils. **Spectrochimica Acta B**, v. 99, p. 1-8, 2014.
- 68 TURNER, Sustainable analytical chemistry—more than just being green. **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, p. 2217-2229, 2013.
- 69 PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; MARUBE, L. C.; ESCARRONE, A. L. V. An overview of advances in dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of pesticides and emerging contaminants from environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 14, p.1-18, 2017.
- 70 MARFIL, R.; CABRERA-VIQUE, C.; GIMENEZ, R.; BOUZAS, P. R.; MARTINEZ, O.; SÁNCHEZ, J. A. Metal content and physicochemical parameters used as quality criteria in virgin argan oil: Influence of the extraction method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7279-7284, 2008.
- 71 MOREIRA, B. J.; YOKOYA, J. M. C.; GAITANI, C. M. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 6, n. 3, p. 186-204, 2014.

- 72 MELLO, P. A.; DUARTE, F. A., MESKO, M. F.; NOGUEIRA, A. R. A.; FLORES, E. M. M. Preparo de amostras para especificação química in **Preparo de Amostras para Análise Elementar**. São Paulo: EditSBQ, 2016.
- 73 REZAEI, M.; YADOLLAH, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2342-2357, 2010.
- 74 ABDOLMOHAMMAD-ZADEH, H.; SADEGHI, G. H. A novel microextraction technique based on 1-hexylpyridinium hexafluorophosphate ionic liquid for the preconcentration of zinc in water and milk samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 649, p. 211-217, 2009.
- 75 ZHAO, R.; WANG, X.; ZHANG, L.; WANG, A.; YUAN, J. Ionic liquid/ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction, a new sample enrichment procedure for the determination of hexabromocyclododecane diastereomers in environmental water samples. **Analytical Methods**, v. 3, p. 831-836, 2011.
- 76 SUN, J.; SHI, Y.; CHEN, J. Simultaneous determination of plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate and its metabolite in human urine by temperature controlled ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 5, p. 1427-1434, 2013.
- 77 LEONG, M.; HUANG, S. Dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1211, p. 8-12, 2008.
- 78 GUO, L. H. Low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. **Journal of Chromatography**, v. 1218, n. 31, p. 5040-5046, 2011.
- 79 LI, X.; LI, Q.; XUE, A.; CHEN, H.; LI, S. Dispersive liquid–liquid microextraction coupled with single-drop microextraction for the fast determination of sulfonamides in environmental water samples by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. **Analytical Methods**, v. 3, p. 517-525, 2016.

- 80 SILVA, K. R. N. **Avaliação da Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Reversa como Estratégia para o Preparo de Amostra de Biodiesel para Determinação de Ca, Mg, Na e K por Espectrometria Atômica**. 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 2017.
- 81 KOKOSA, J. M. Advances in solvent microextraction techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, 2013.
- 82 BORGES, K B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. **Preparo de amostras para análises de compostos orgânicos**, 1 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.
- 83 AL-SAIDI, H. M.; EMARA, A. A. A. The recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration and determination of inorganic analytes. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p. 745-761, 2014.
- 84 BIPARVA, P.; MATIN, A. A. Microextraction Techniques as a Sample Preparation Step for Metal Analysis. Atomic Absorption Spectroscopy, in: **Atomic Absorption Spectroscopy**, InTech, 2012
- 85 ZANG, X.; WU, Q.; ZHANG, M.; XI, G.; WANG, Z. Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 161-168, 2009.
- 86 ANDRUCH, V.; BURDEL, M.; KOCÚROVÁ, L.; SANDREJOVÁ, J.; BALOGH, I. S. Application of ultrasonic irradiation and vortex agitation in solvent microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 49, p. 1-19, 2013.
- 87 DUARTE, J. S.; DORES, E. F. G. C.; VILLA, R. D. Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vortex e ultrassom aplicada à determinação de agrotóxicos triazinas, triazinonas e o triazol flutriafol em água. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 925-931, 2016.
- 88 CINELLI, G.; AVINO, P.; NOTARDONATO, I.; CENTOLA, A.; RUSSO, M. V. Rapid analysis of six phthalate esters in wine by ultrasound-vortex-assisted dispersive liquid-liquid micro-extraction coupled with gas chromatography-flame ionization detector or gas chromatography-ion trap mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 769, p. 72-78, 2013.

- 89 ZIYAADINI, M.; ZAHEDI, M M.; KHOSRAVINIA, S. Ultrasound-assisted extraction combined with reverse phase-dispersive liquid-liquid micro extraction as a new approach for preconcentration and spectrophotometric determination of total phenol in marine sediments of Chabahar Bay. **Marine Pollution Bulletin**, v. 109, p. 104-109, 2016.
- 90 CHISVERT, A. BENEDÉ, J. I.; PEIRÓ, M. PEDRÓN, I.; SALVADOR, A. Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography. **Talanta**, v. 166, p. 81-86, 2017.
- 91 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) **NBR 15554**: Produtos derivados e óleos e gorduras – Ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos – Determinação de teor de sódios, potássio, magnésio e cálcio por espectrometria de absorção atômica por chama, Rio de Janeiro, 2008.
- 92 WU, C ; KUO, C; LO S. Removal of Metals from Industrial Sludge by Extraction with Different Acids. **Journal of Environmental Science and Health**, Part A, v. 39, p. 206-218, 2004.
- 93 SUSLICK, K.; PRICE, G. J. Applications of ultrasound to materials chemistry. **Annual Review of Material Science**, v. 29, p. 295-326, 1999.
- 94 VILKHU, K; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 161-169, 2008.
- 95 CHEMAT, F.; ROMBAUT, N. SICAIRE, A.; MEULLEMIESTRE, A. FABIANO-TIXIER, A.; ALBERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540-560, 2017.
- 96 HADJMOHAMMADI, M. R.; GHOREISHI, S. S. Determination of Estrogens in Water Samples Using Dispersive Liquid Liquid Microextraction and High Performance Liquid Chromatography. **Acta Chimica Slovenica**, v. 58, p. 765-771, 2011.

- 97 SHRIVAS, K.; JAISWAL, N. K. Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of copper in cereals and vegetable food samples using flame atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2263-2268, 2013.
- 98 DITTERT, I. M.; VITALI, L.; CHAVES, E. S.; MARANHÃO, T. A.; BORGES, L. G.; FÁVERE, V. T.; CURTIUS, A. J. Dispersive liquid-liquid microextraction using ammonium O,O-diethyl dithiophosphate (DDTP) as chelating agent and graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination of silver in biological samples. **Analytical Methods**, v. 6, p. 5584-5589, 2014.
- 99 ROSA, F. C.; DUARTE, F. A.; PANIZ, J. N. G.; HEIDRICH, G. M.; NUNES, M. A. G.; FLORES, M. M.; DRESSLER, V. Dispersive liquid-liquid microextraction: Na eficiente approach for the extraction of Cd and Pb from honey and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 211-217, 2015.
- 100 CHISVERT, A. BENEDÉ, J. I.; PEIRÓ, M. PEDRÓN, I.; SALVADOR, A. Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography. **Talanta**, v. 166, p. 81-86, 2017.
- 101 KORN, M. G.; SANTOS, D. C. M. B.; GUIDA, M. A. B.; BARBOSA, I. S.; PASSOS, M. I.; SRAIVA, M. L. M. F.; LIMA, J. L. Evaluation of Digestion Procedures for Simultaneous Determination of Ca, P, Mg, K. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 12, p. 2278-2284, 2010.
- 102 MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**, 6 ed. Gosport: Printed by Ashford Colour Pres, 2010.
- 103 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO 3534-1. **Statistics-Vocabulary and Symbols Part 1: Probability and General Statistical Terms**, 1993.
- 104 SKOOG D. A.; WEST D. M.; HOLLER F. J.; CROUCH S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 9 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.
- 105 HUO, X.; LI, Q.; LIN, X.; CHEN, X.; BI, K.. Application of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Analysis of Six Fungicides in Fruit Samples by GC-ECD. **Chromatographia**, v. 73, p. 313-319, 2011.

- 106 ANTHEMIDIS, A. N.; KALLIRROY-IOANNA, I. G. Recent developments in homogeneous and dispersive liquid–liquid extraction for inorganic elements determination. A review. **Talanta**, v. 80, p. 413-421, 2009.
- 107 SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, v. 1, 9 ed., Rio de Janeiro: LTC, 2009
- 108 ZANG, X; WU. Q.; Z. M. XI, G.; WANG, Z. Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 161-168, 2009.
- 109 CHEN, H.; DING, W. Determination of aqueous fullerene aggregates in water by ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction with liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1223, p. 15-23, 2012.
- 110 CINDRIC, I. J.; ZEINER, M.; STEFFAN I. Trace elemental characterization of edible oils by ICP–OES and GF AAS, **Microchemical Journal**, v.85, p.136–139, 2007.
- 111 ACAR, O. Evaluation of cadmium, lead, copper, iron and zinc in Turkish dietary vegetable oils and olives using electrothermal and flame atomic absorption spectrometry. **Grasas y Aceites**, v. 63, p. 383-393, 2012.
- 112 TOKAY, F.; BAGDAT, S. Determination of Iron and Copper in Edible Oils by Flame Atomic Absorption Spectrometry After Liquid–Liquid Extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 92 n.317, p. 317-322, 2015.
- 113 HUANG, S. JIANG, S. Determination of Zn, Cd and Pb in vegetable oil by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.16, p. 664-668, 2001.
- 114 HE, Y.; CHEN, J.; ZHOU, Y.; WANG, X.; LIU, X. Extraction induced by emulsion breaking for trace multi-element determination in edible vegetable oils by ICP-MS. **Analytical Methods**, v. 6, p. 5105-5111, 2014.
- 115 JURANOVIC, I.; BREINHOELDER, P.; STEFFAN, I. Determination of trace elements in pumpkin seed oils and pumpkin seeds by ICP OES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 18, p. 54-58, 2003.

- 116 BENINCASA, C.; LEWIS, J.; PERRI, E.; SINDONA, G.; TAGARELLI, A. Determination of trace element in Italian virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, p. 366-370, 2007.
- 117 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos analíticos: Revisão 05 **DOQ-CGCRE-008**. Rio de Janeiro, 2016
- 118 ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F)**. Gaithersburg: AOAC International, 2012.
- 119 HORN, D; ERNANI, P. R; SANGOI, L; SCHWEITZER, C; CASSOL, P. C. Parâmetros Cinéticos e Morfológicos da Absorção de Nutrientes em Cultivares de Milho com Variabilidade Genética Contrastante. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 77-85, 2006.
- 120 SILVA D. J; VENEGAS, V. H. A; RUIZ, H.A. Transporte de enxofre para as raízes de soja em três solos de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 8, p. 1161-1167, 2002.
- 121 KEOGH, J. L.; SABBE, W. E.; E CAVINESS, C. E. Nutrient concentration of selected soybean cultivars. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 3, n, 1, p. 29-35, 1972.