UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

VANESSA DE JESUS FERREIRA

MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM EMULSIFICAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO E DETERMINAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA

JEQUIÉ – BA
MAIO/2016

VANESSA DE JESUS FERREIRA

MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM EMULSIFICAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO E DETERMINAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Química.
Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof.Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva
Coorientador: Prof.Dr. Fábio Alan Carqueja Amorim

JEQUIÉ – BA
MAIO/2016

Ferreira, Vanessa de Jesus.
F444 Microextração líquido-líquido com emulsificação assistida por ultrassom para pré-concentração de cádmio e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama/Vanessa de Jesus Ferreira.- Jequié, UESB, 2016.
63 f: il.; 30cm. (Anexos)

Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Química)- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2016. Orientador: Profº. Drº. Erik Galvão Paranhos da Silva.

1. Microextração líquido-líquido – Determinação de cádmio por espectrometria de absorção atômica com chama 2. Cádmio(pré-concentração) – Emulsificação por ultrassom I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título.

CDD – 543

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual Nº 9.996, de 02.05.2006
Programa de Pós-Graduação em Química

Vanessa de Jesus Ferreira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM **06/05/2016.**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva (UFBA, Salvador-BA, 2009)
(Orientador)

Prof. Dr. Fábio Alan Carqueija Amorim (UFBA, Salvador-BA, 2008)
(Coorientador)

Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes (UFBA, Salvador-BA, 2011)

Prof. Dr. Daniel de Castro Lima (UFBA, Salvador-BA, 2011)

Rua José Moreira Sobrinho, s/n – Jequiezinho
CEP: 45.208-091 - Jequié – Bahia
Telefone: (73) 3528-9630 Email: ppgquimica@uesb.edu.br

Aos meus pais e a minha irmã, com quem sempre pude contar em todos os momentos e que sempre acreditaram na realização dos meus ideais, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo fôlego de vida, sustento em todos os momentos de dificuldades e por mais essa vitória.

Ao Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva, pela orientação, apoio e transmissão de seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Fábio Alan Carqueja Amorim, pela coorientação e compartilhamento de experiências que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos, que dedicou seu tempo e amizade compartilhando suas experiências.

A todos os mestres que muito contribuíram para a minha formação, em especial ao Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra, Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira e Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes.

À minha família, em especial a minha mãe Mariluce, meu pai Edivandro, minha avó Almerinda, pelos ensinamentos, apoio e incentivo. A minha irmã Bruna e meu cunhado Bruno, por me encorajarem e me apoiarem nos momentos difíceis.

À Marina Santos de Jesus, por ter se dedicado no auxílio da realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Águas e de Química Analítica da UESC, em especial a Ívero, Hoanna, Luciano, Luana, Lucas, Mayara e Madson, pelo acolhimento.

Ao Laboratório de Química Analítica da UESC, pela colaboração com uso de equipamentos.

Aos colegas do mestrado, pelo companheirismo e amizade que foram fundamentais para tornar os desafios mais leves.

Aos amigos, em especial a Anne por suas orações e torcida; Cris, que mesmo estando longe sei que sempre torce por mim; Jeferson Barreto, com quem posso contar sempre; Lucília, que mesmo com a distância sempre se mostrou disponível a colaborar com o que fosse possível; João Honorato, que sempre se mostrou preocupado com o andamento do meu trabalho.

Aos companheiros de república da época da graduação, Adailson Lany, Nólia, Sandra, Deborah e Mariana (em memória), pelo companheirismo de sempre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UESB, pela oportunidade de aperfeiçoamento.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

O impossível é pra quem não tem um sonho e não crê que pela fé tudo é capaz Inalcançável é pra quem não tem o dom de transformar desejos em pontes pra chegar.

Trecho da música a Fé Faz O Herói
Compositor: Beno César/Solange de César

Microextração líquido-líquido com emulsificação assistida por ultrassom para pré-concentração de cádmio e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama

Autora: Vanessa de Jesus Ferreira
Orientador: Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva
Coorientador: Prof.Dr. Fábio Alan Carqueija Amorim

RESUMO: Neste trabalho foi desenvolvido um método baseado na microextração líquido-líquido com emulsificação assistida por ultrassom (USAEME) para a determinação de cádmio por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). O procedimento baseia-se na utilização da mistura do 1,2 dicloroetano e tricloroetileno como solvente extrator, o 2-(2-piridilazo-5-bromo)-5-(dietilamino)fenol como reagente quelante e etanol como solvente dispersor em uma solução aquosa contendo cádmio. Após emulsificação por ultrassom, a mistura é centrifugada para a separação das fases. Posteriormente, a fase enriquecida é recolhida e o teor de cádmio é dosado por FAAS. As seguintes variáveis foram otimizadas utilizando estratégia multivariada: composição do solvente extrator (1,2 dicloroetano e tricloroetileno), composição do solvente dispersor (etanol), volume do extrator (70 µL), pH (8,7) e tempo de sonicação (5,0 minutos). Os limites de detecção e quantificação, calculados sob condições otimizadas foram, respectivamente, 0,39 e 1,3 µg L^{-1}. O fator de enriquecimento obtido foi de 21. A exatidão do método foi testada através da análise dos materiais de referência certificados BCR-713 (efluente) e CRM 1566b (tecido de ostra). O procedimento foi aplicado à determinação de cádmio em amostras de molusco bivalve, água e efluente urbano coletados na Baía do Pontal na cidade de Ilhéus, Bahia. O método proposto é simples, rápido, eficiente e utiliza pouco volume de solventes orgânicos para a determinação de cádmio por FAAS.

Palavras-chave: *Microextração líquido-líquido, Emulsificação por ultrassom, Cádmio.*

Microextração líquido-líquido com emulsificação assistida por ultrassom para pré-concentração de cádmio e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama

Author: Vanessa de Jesus Ferreira

Advisor: Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva
Co-Advisor: Prof. Dr. Fábio Alan Carqueja Amorim

ABSTRACT: In this work, a method based on ultrasound-assisted emulsification liquid-liquid microextraction (USAEME) for the determination of cadmium by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) is developed. The procedure is based on the use of the mixture of 1,2-dichloroethane and trichlorethylene as extraction solvents, 2-(2-bromo-5-pyridylazo)-5-(diethylamino)phenol as a chelating reagent and ethanol as disperser solvent in an aqueous solution containing cadmium. After emulsification by ultrasound, the mixture is centrifuged to separate the phases. Subsequently, the enriched phase is collected and the cadmium content is measured by FAAS. The following variables were optimized using multivariate strategy: extraction solvent composition (1,2-dichloroethane, trichlorethylene), disperser solvent composition (ethanol), volume of extraction solvent (70 μL), pH (8.7) and sonication time (5.0 min). The limits of detection and quantification, calculated under optimum conditions were, respectively, 0.39 and 1.3 μg L^{-1}. The obtained enrichment factor was 21. The accuracy of the method was tested by analysis of certified reference materials BCR-713 (effluent) and CRM 1566b (oyster tissue). The procedure was applied to the determination of cadmium in bivalve mollusk, water and urban wastewater samples, collected in Pontal Bay in the city of Ilhéus, Bahia, Brazil. The proposed method is simple, fast, efficient and uses few amount of organic solvents for the determination of cadmium by FAAS.

Keywords: *Liquid-liquid microextraction, Ultrasound emulsification, Cadmium.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização da baía do Pontal no município de Ilhéus-Bahia 4
Figura 2. Baía do Pontal.....5
Figura 3. (a) Espaço experimental para sistemas com duas variáveis independentes. (b) Espaço experimental para processos com três fatores independentes. (c) Superfície de resposta para possíveis misturas com três componentes.....8
Figura 4. Obtenção dos pontos experimentais para a matriz Box-Behnken a partir de um planejamento fatorial de três níveis para três variáveis 9
Figura 5. Sistema de microextração com gota suspensa e imersão direta. 12
Figura 6. Sistema de microextração com gota suspensa headspace.....13
Figura 7. Sistema de microextração com gota orgânica solidificada. 14
Figura 8. Modos de extração utilizados na HF-LPME. 15
Figura 9. Etapas de um procedimento utilizando microextração dispersiva líquido-líquido.....16
Figura 10. Microextração por emulsificação assistida por ultrassom.....17
Figura 11. Cavitação ultrassônica. 18
Figura 12. Aspecto da solução durante o procedimento de extração.....22
Figura 13. Gráfico de contorno obtido através do planejamento de mistura para a composição do solvente extrator.....27
Figura 14. Gráfico de contorno do planejamento de mistura para a composição do solvente dispersor 28
Figura 15. Superfícies de resposta para o planejamento Box-Behnken.....31
Figura 16. Curva analítica referente à medida direta de cádmio por FAAS.....34
Figura 17. Curva analítica referente à microextração por emulsificação assistida por ultrassom para a pré-concentração de cádmio. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições experimentais para operação do espectrômetro de absorção atômica com chama. 20
Tabela 2. Variável e níveis estudados no planejamento de mistura para o solvente extrator e dispersor. 23
Tabela 3. Variáveis e níveis estudados no planejamento Box- Behnken.....23
Tabela 4. Planejamento de mistura para a composição do solvente extrator.....26
Tabela 5. Planejamento de mistura para a composição do solvente dispersor. 28
Tabela 6. Matriz Box-Behnken para quatro variáveis. 29
Tabela 7. Valores críticos obtidos para o planejamento Box-Behnken. 30
Tabela 8. Análise de variância para o modelo quadrático. 30
Tabela 9. Efeito de vários íons que interferem na determinação de cádmio usando o método proposto 37
Tabela 10. Determinação de cádmio em água e efluente urbano.....38
Tabela 11. Teores cádmio encontrados nas amostras de molusco bivalve. 39
Tabela 12. Comparação com outros métodos 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Br-PADAP - 2- (2 - piridilazo - 5 -bromo) -5- (dietilamino) fenol

CONAMA - O Conselho Nacional do Meio Ambiente

DLLME - Microextração Dispersiva Líquido-Líquido (do inglês Dispersive Liquid-Liquid Microextraction)

DI-SDME - Microextração em gota suspensa por imersão direta

ETAAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (do inglês Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry)

FAAS - Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry)

HS-SDME - Microextração em gota suspensa por headspace

HF-LPME - Microextração em fase líquida suportada em fibra oca (do inglês supported liquid phase microextraction hollow-fiber)

HS-SDME - Microextração em gota suspensa por headspace

IARC - Agência Internacional para Pesquisa do Câncer

LLE - Extração Líquido-Líquido

LD - Limite de Detecção

LQ - Limite de Quantificação

LLME - Microextração líquido-líquido

SPE - Extração em fase sólida (do inglês Solid Phase extraction)

SPME - microextração em fase sólida (do inglês Solid Phase microextraction)

SDME - Microextração em gota suspensa (do inglês Microextraction hanging drop)

SFODME - Microextração em Gota Orgânica Solidificada (do inglês Solidified Floating Organic Drop Microextraction)

USAEME - Microextração por emulsificação assistida por ultrassom (do inglês Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction)

SUMÁRIO

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA *1*

1.0. INTRODUÇÃO *2*

1.1. CÁDMIO 3

1.2. BAÍA DO PONTAL 4

1.2. OTIMIZAÇÃO E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA 6

1.2.1. Planejamento de mistura *7*

1.3.2. Planejamento Box-Behnken *8*

1.3. METÓDOS DE EXTRAÇÃO DE ELEMENTOS 11

1.3.1. Microextração em gota suspensa *12*

1.3.1.1. Microextração com gota suspensa e imersão direta *12*

1.3.1.2. Microextração com gota suspensa headspace *13*

1.3.2. Microextração com gota orgânica solidificada *13*

1.3.3. Microextração em fase líquida com fibra oca *14*

1.3.4. Microextração dispersiva líquido-líquido *15*

1.3.5. Microextração por emulsificação assistida por ultrassom *16*

1.3.5.1. Princípios da extração assistida por ultrassom *17*

PARTE EXPERIMENTAL *19*

2.0. EXPERIMENTAL 20

2.1. INSTRUMENTAÇÃO 20

2.2. MATERIAIS E REAGENTES 20

2.3. SOLUÇÕES 21

2.4. PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO 22

RESULTADOS E DISCUSSÃO *25*

3.0. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS 26

3.1. COMPOSIÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR *26*

3.1. Composição do solvente dispersor *27*

4.0. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS 33

4.1. Linearidade *33*

4.2. Limite de detecção e quantificação *35*

4.3. Fator de enriquecimento (FE) *35*

5.0. EFEITO DE INTERFERENTES 36
6.0. EXATIDÃO E APLICAÇÃO 37
7.0. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 41
8.0. REFERÊNCIAS 42

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.0. INTRODUÇÃO

Atualmente, com o crescimento da população e da atividade industrial, a produção de resíduos tóxicos aumentou consideravelmente. Grande parte desses resíduos contém espécies metálicas e são lançados diretamente no meio ambiente, o que tem provocado a contaminação de mares, rios e outros cursos d`água. É amplamente conhecido que a intoxicação por metais potencialmente tóxicos representa um grande risco para a saúde humana [1].

O cádmio está entre os principais agentes contaminantes do meio ambiente. Este elemento é muito utilizado na fabricação de baterias e na galvanoplastia. Trata-se de um metal de transição considerado potencialmente perigoso por ser bioacumulável e persistente no meio ambiente, podendo percorrer grandes distâncias pelo vento e pelo curso das águas. O cádmio pode afetar a saúde humana causando sérios problemas, como a doença *Itai-Itai* caracterizada por causar fraturas e má formação nos ossos [1,2].

Considerando a ampla utilização do cádmio na indústria e a decorrente contaminação de ambientes aquáticos, evidencia-se a necessidade de monitoramento dos teores desse elemento e de seus compostos em diversas matrizes. As concentrações de cádmio em algumas matrizes podem se apresentar em quantidades traço, dificultando a sua quantificação. Desta forma, uma etapa prévia de separação e pré-concentração pode ser requerida, para o enriquecimento da amostra e posterior quantificação.

Diversas técnicas de extração têm sido utilizadas para o enriquecimento de amostras. Entre estas técnicas, destaca-se a extração líquido-líquido (LLE), que, entre outras, apresenta a vantagem da extração simultânea de vários componentes e versatilidade, pois existe a possibilidade de utilização de uma grande variedade de solventes orgânicos. Entretanto, a LLE utiliza grandes volumes desses solventes, que podem ser tóxicos ou inflamáveis, o que dificulta o manuseio. A microextração líquido-líquido (LLME) foi concebida com o objetivo de reduzir consideravelmente a quantidade de amostras e solventes utilizados nos procedimentos de extração. Recentemente, a microextração por emulsificação assistida por ultrassom (USAEME) tem tido destaque na literatura. Esta técnica se baseia no uso de ondas

ultrassônicas que proporcionam um aumento da transferência de massa da fase aquosa para fase orgânica, beneficiando a extração.

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um novo método baseado em microextração por emulsificação assistida por ultrassom para pré-concentração e quantificação de cádmio por espectrometria de absorção atômica com chama. Para otimização das condições experimentais e tratamento dos resultados foram utilizadas técnicas de otimização multivariada. Após otimização o método foi aplicado em amostras de molusco bivalve, água e efluentes urbano lançados na Baía do Pontal na cidade de Ilhéus-BA.

1.1. CÁDMIO

O cádmio é um elemento metálico representado pelo símbolo Cd, situado no grupo 12 da classificação periódica apresentando número atómico 48 e massa atômica 112,4 u. Apresenta-se no estado sólido à temperatura ambiente. Foi descoberto pelo químico alemão Friedrich Strohmeyer em 1817 como impureza em compostos de zinco [2]. É um elemento relativamente raro e não ocorre na natureza na forma pura, encontra-se associado a outros elementos. Grande parte do cádmio utilizado com fins industriais é obtido como produto da fundição de rochas que contêm zinco [1]. As aplicações são amplas, sendo empregado na fabricação de baterias níquel-cádmio, além de seus usos mais tradicionais como na produção de pigmentos, estabilizadores e recobrimentos [3].

A contaminação dos ambientes aquáticos ocorre pelo descarte inadequado dos resíduos e possivelmente por derrame de resíduos e efluentes contaminados. Devido a sua mobilidade, pode ser facilmente transportado pela a água e o ar por longas distâncias e ainda ampliar o potencial de contaminação por contato direto com solos próximos, inundações e irrigação agrícola [3,4].

O cádmio é considerado um elemento bioacumulável, ou seja, pode acumular-se em plantas, animais e atingir o homem. No organismo do ser humano pode ficar acumulado por longos períodos, sobretudo nos rins e fígado [2].

A intoxicação por cádmio causa problemas nos ossos, nos rins e fígado. Além de ser considerado cancerígeno, segundo a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC). Outro problema ligado a intoxicação por este metal é a enfermidade conhecida como doença de *Itai-Itai* ou dói-dói, onde ocorre a substituição do cálcio

pelo cádmio. Isso ocorre devido a semelhança química entre os dois metais. A doença de *Itai-Itai* atinge principalmente as mulheres e é caracterizada por atingir os rins e os ossos, tornando-os frágeis, osteoporóticos, e com consolidação irregular. O que ocasiona várias fraturas, fortes dores e deformação na estatura, além de poder levar a morte [2].

O ser humano está exposto ao cádmio através de duas fontes principais: a primeira é por via oral (por ingestão de água e alimentos contaminados), e a segunda por inalação. Os fumantes estão mais expostos a contaminação por cádmio, uma vez que o metal oriundo do solo se acumula nas folhas do tabaco [1].

1.2. BAÍA DO PONTAL

O município de Ilhéus, situado na região sudeste da Bahia, abrange uma área de 1.841 km², Figura 1. É a cidade com o mais extenso litoral entre os municípios do estado, com cerca de 80 km de extensão, limitado ao norte pelo rio Sargi e ao sul pelo rio Acuípe [5].

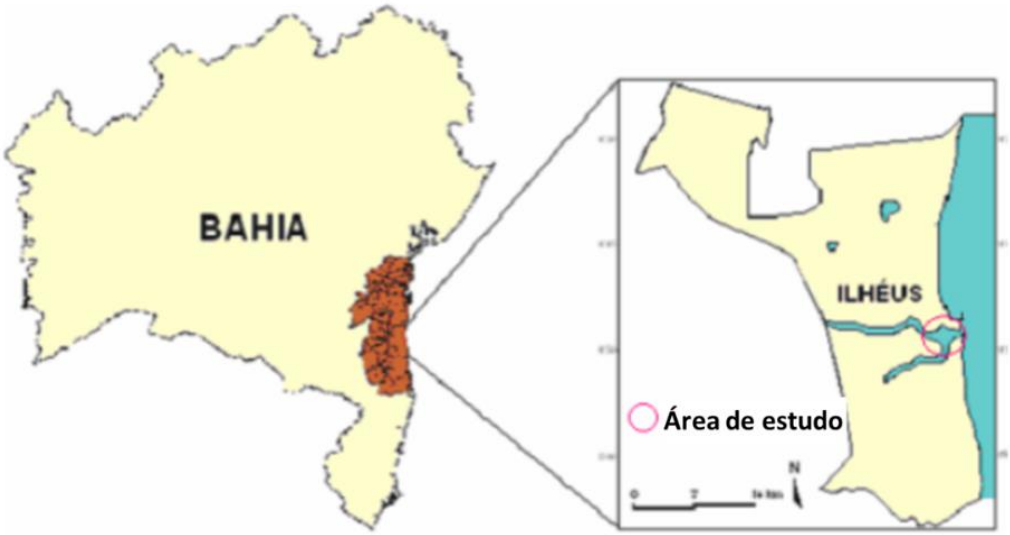

Figura 1. Localização do município de Ilhéus-Bahia. Fonte: Amorim, 2006

Assim como a maioria dos municípios do litoral sul-baiano, o clima caracteriza-se pelo tipo tropical úmido, com média de pluviosidade anual entre 2.000 a 2.400 milímetros. O regime pluviométrico é regular, com chuvas bem distribuídas durante o ano [6].

O estuário de maior extensão é o do rio Cachoeira, que desagua em meio à área urbana do município, banhando o centro da cidade e o bairro do Pontal. Juntamente com os rios Fundão e Santana forma o complexo estuarino que recebe o nome de Baía do Pontal, Figura 2. Este sistema estuarino tem um papel socioeconômico significativo para o município de Ilhéus, compreendendo uma fonte de alimento e renda para a população que vive as margens dos rios, baseado na pesca e mariscagem [6,7].

Figura 2. Imagem da Baía do Pontal. Fonte: Almeida Et al, 2016

Há vários anos a Baía do Pontal recebe efluentes domésticos e industriais, bem como resíduos sólidos provenientes dos municípios de Itabuna e Ilhéus. Existe ainda uma Estação de Tratamento de Esgoto que, mesmo após tratamento primário, lança efluentes rico em nutrientes no Rio Cachoeira. Esta ação pode interferir na qualidade ambiental e consequentemente na qualidade de vida das comunidades ribeirinhas, que em muitos casos utiliza os rios para da população ribeirinha, as quais utilizam ecossistema para obtenção de alimentos [8,9]. Diante disto, o monitoramento da contaminação de metais neste ambiente se faz necessário.

1.2. OTIMIZAÇÃO E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A otimização dos parâmetros experimentais é uma das etapas mais relevantes do desenvolvimento de um procedimento analítico. Convencionalmente é utilizado como modo de otimização a metologia univariada, ou seja, procedimentos onde se é otimizada uma variável por vez. Esse procedimento fornece resultados que podem ser facilmente interpretados, no entanto não se considera a interação entre as variáveis e envolve um grande número de experimentos, o que requer grandes quantidades de reagentes e tempo. Em decorrência disso, nos últimos anos a metodologia multivariada vem ganhando espaço em diversos trabalhos publicados na literatura, pois reduz o número de experimentos e fornece uma correlação entre as variáveis, uma vez que a otimização é feita com duas ou mais variáveis simultaneamente, o que pode gerar um valor ótimo mais confiável.

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma técnica de otimização que consiste em um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas empregada para modelagem e análise em processos em que há a influência de vários fatores em uma resposta e a finalidade é otimizar essa resposta [10].

A MSR apresenta duas etapas: modelagem e deslocamento. Estas etapas devem ser repetidas tantas vezes quanto forem necessárias, com a finalidade de obter uma região ótima da superfície estudada. A modelagem geralmente é feita ajustando-se modelos simples, normalmente lineares ou quadráticos, as respostas obtidas com planejamentos fatoriais ou fatoriais fracionários. O deslocamento se dá em todo tempo ao longo do caminho de máxima inclinação de um certo modelo, que é a rota na qual a resposta varia de forma mais pronunciada [11].

A Superfície de Resposta pode ser definida como a representação geométrica que descreve a resposta em função das demais variáveis estudadas, disponibilizando informações valiosas sob o comportamento das variáveis na região estudada. O primeiro passo para aplicação da MSR é a obtenção de uma estimativa apropriada da relação funcional entre a resposta e os fatores estudados. A função polinomial deve representar uma boa descrição da relação entre os fatores e a resposta dentro de um domínio experimental delimitado [12,13].

1.2.1. Planejamento de mistura

Um sistema envolvendo misturas é aquele no qual dois ou mais componentes são misturados para dar origem ao produto final, e a propriedade a ser medida é determinada pelas proporções dos componentes da mistura e não por valores absolutos.

O planejamento de mistura objetiva a modelagem e a análise da superfície de resposta da mistura a partir das combinações pré-selecionadas dos componentes. A partir deste procedimento, poderá: (1) obter a influência de cada componente na resposta, em separado, ou em combinação; (2) fazer previsões da resposta para qualquer composição dentro da região estudada [14].

A soma das proporções dos componentes de uma mistura é sempre 100%. Dessa forma, para uma mistura com q componentes, pode-se escrever a equação 1.

$$\sum_{i=1}^{q} x_i = 100\% = 1 \qquad \text{Equação 1}$$

onde x_i representa a proporção do i-ésimo componente. Esta equação retira um grau de liberdade das proporções. Para descrever a composição da mistura basta fixar as proporções de q -1 componentes. A proporção do último componente será sempre o que falta para completar 100%.

Para uma mistura formada por apenas dois componentes (binária) a equação 1 reduz-se $x_1 + x_2 = 1$. Sendo que, todas as possíveis misturas dos dois componentes correspondentes ficam restritos a pontos localizados sobre uma reta, como mostra a figura 3 (a). Para sistemas com três fatores independentes, os valores estarão inseridos em um cubo como o da Figura 3(b). Todas as composições

possíveis da mistura ternária são representadas pelos pontos pertencentes ao triângulo, obedecendo à restrição $x_1 + x_2 + x_3 = 1$. Os vértices correspondem aos componentes puros e os lados às misturas binárias. Os pontos situados no interior do triângulo representam as misturas de três componentes. A variação de uma dada propriedade com a composição da mistura, pode ser descrita por uma superfície de resposta mostrada na figura 3(c) [14,15].

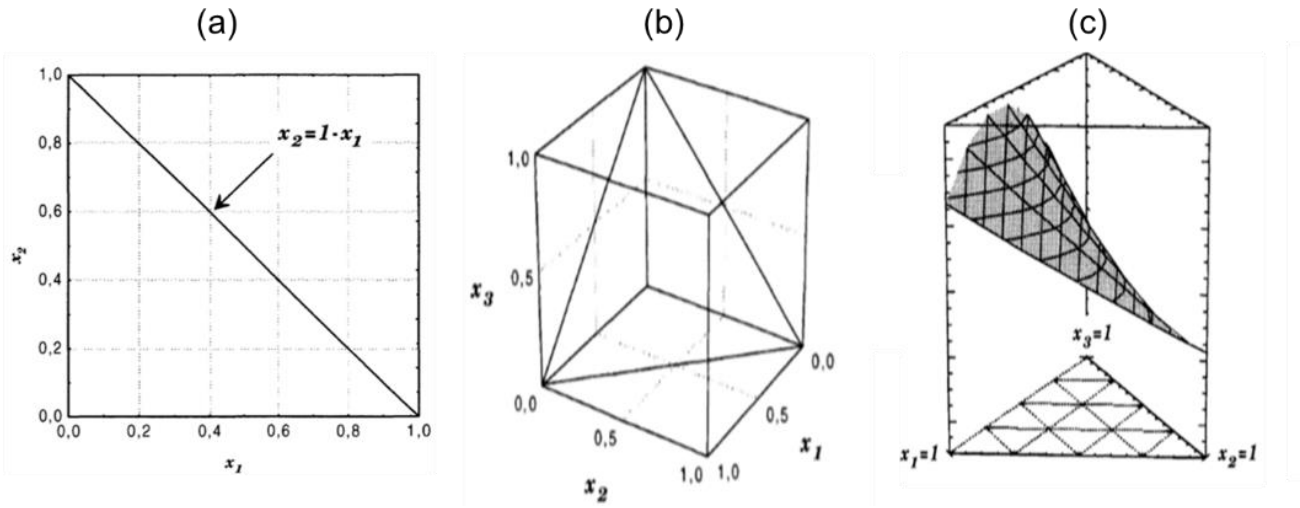

Figura 3. (a) Espaço experimental para sistemas com duas variáveis independentes. (b) Espaço experimental para processos com três fatores independentes. (c) Superfície de resposta para possíveis misturas com três componentes. Fonte: Neto et al, 2010.

1.3.2. Planejamento Box-Behnken

O planejamento Box-Behnken consiste em uma das mais conhecidas metodologia de superfícies de resposta e foi instaurado por Box e Behnken em 1960, [16]. É obtido com base em um planejamento fatorial de três níveis a partir da subtração de pontos [17], como mostra a figura 4.

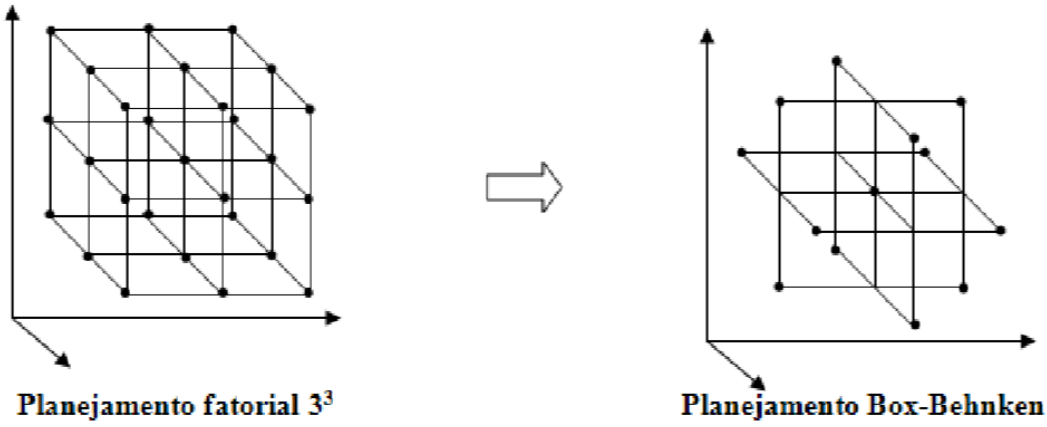

Figura 4. Obtenção dos pontos experimentais para a matriz Box-Behnken a partir de um planejamento fatorial de três níveis para três variáveis. Fonte: Massart et al, 1997.

Esse tipo de planejamento é amplamente utilizado na química, sobretudo, em química analítica, na otimização de procedimentos experimentais, a fim de estabelecer as melhores condições para a análise.

Esse modelo de planejamento experimental requer um número de experimentos de acordo com a fórmula N = 2k (k-1) + C, onde k representa o número de variáveis e C o número de réplicas do ponto central. Cada fator é estudado em somente 3 níveis (-1, 0, +1) [17].

Atualmente, diversos trabalhos publicados utilizam o planejamento Box-Behnken para otimização empregando diferentes técnicas analíticas. Ferreira et al [18] aplicaram o planejamento Box-Behnken na otimização de um sistema de pré-concentração em linha para determinação de cádmio em amostras de água por espectrometria de absorção atômica com chama, obtendo uma precisão calculada como desvio padrão relativo de 2,7 %.

Khajeh [19] otimizou um procedimento de extração assistida por microondas para determinação de zinco e cobre em amostras de alimentos utilizando este planejamento. A exatidão do procedimento otimizado foi confirmada por meio da análise de materiais de referência certificados.

1.3. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA - FAAS

A espectrofotometria de absorção atômica com chama (FAAS - *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) é uma das técnicas mais utilizadas para quantificação de metais traços em diferentes amostras, por apresentar uma excelente precisão instrumental, ser uma técnica simples, rápida e apresentar um menor custo de aquisição e manutenção, quando comparada a outras técnicas [20].

Esta técnica se baseia no princípio de que átomos no estado gasoso e fundamental gerados em um atomizador são capazes de absorver radiação de frequência específica que é emitida por uma fonte espectral. Dessa forma é possível a determinação da concentração do analito, medindo a intensidade de absorção ou emissão da radiação eletromagnética no comprimento de onda característico [20].

Um processo de atomização pelo uso de uma fonte de energia é necessário para que os elementos estejam em seu estado gasoso para absorverem a radiação, neste caso a fonte de energia empregada é a chama (ar/acetileno ou óxido nitroso/ ar) [20].

Para cada elemento a ser analisado, normalmente é empregada uma fonte de radiação específica, sendo assim apenas as linhas do próprio elemento são emitidas pela fonte e cada espécie atômica absorverá em um comprimento de onda específico, dando origem a um espectro, que é o conjunto de comprimentos de onda absorvidos por uma espécie [21].

Na FAAS, a amostra líquida é aspirada por um nebulizador pneumático e convertida em um aerossol, que é transportado para uma câmara de pré mistura, onde se mistura ao gás combustível e comburente. Neste momento as gotas menores chegam à chama, onde ocorre a vaporização e atomização dos elementos presentes na amostra, que poderão interagir com a radiação. O tempo de permanência do analito na chama é muito pequeno, mas é suficiente para que ocorra a interação da radiação e a absorção da mesma pelos átomos presentes no caminho óptico, sendo possível a quantificação do analito, segundo a lei de Lambert Beer [20]. Entretanto, a FAAS apresenta limitações para detectar concentrações menores que mg L^{-1}, o que a torna inadequada para análise de traços. Desta forma, para determinação de analitos em concentração abaixo do limite de detecção do instrumento deve ser empregado algum método de preparo de amostra, onde haja

uma etapa de extração e pré-concentração dos analitos de interesse. Isso permite superar essa limitação de detecbilidade da técnica e conseguir atingir baixos limites de detecção.

1.3. METÓDOS DE EXTRAÇÃO DE ELEMENTOS

Há muito tempo se tem utilizado as técnicas clássicas de preparo de amostras nos procedimentos de separação do teor de elementos em diversos tipos de matrizes. A extração em fase sólida (SPE) e a extração líquido-líquido (LLE) convencionais são estratégias muito comuns para o preparo de amostras em diversos métodos publicados na literatura. Entretanto, estas metodologias apresentam algumas desvantagens, tais como o emprego de grandes volumes de solventes orgânicos tóxicos, como clorofórmio, tetracloreto de carbono, diclorometano, éter dietílico, etc. O uso destas substâncias acarreta excessiva geração de resíduos e um alto risco de exposição [22].

A utilização de solventes orgânicos em procedimentos analíticos é uma questão que tem sido alvo de preocupação constante, pois grande parte desses solventes apresentam toxicidade significativa a seres humanos, animais e meio ambiente. A redução ou eliminação do uso dos solventes é bastante pertinente, e algumas soluções têm sido implementadas com sucesso, como a aplicação de procedimentos miniaturizados, ou seja, sistemas que requerem poucos microlitros. Nesse caso, as técnicas de microextração podem ser bastante eficazes. A microextração em fase sólida (SPME) e a microextração líquido-líquido (LLME) foram, então, originadas, com base nas vantagens da redução do volume de solventes e amostras [22].

A miniaturização da extração em fase líquida convencional deu origem a diferentes abordagens de microextração, que podem ser divididas em três categorias: microextração em gota suspensa (SDME), microextração dispersiva líquido-liquido (DLLME) e microextração líquido-líquido com fibra oca (HF-LPME) [23].

Atualmente, surgiram novas modalidades baseadas nos princípios dessas três categorias, como a microextração com gota orgânica solidificada (SFODME), a

microextração com emulsificação assistida por ultrassom (USAEME), entre outras [24].

1.3.1. Microextração em gota suspensa

A microextração em gota suspensa (SDME) é uma técnica baseada na extração do analito através da formação de uma microgota imiscível em água. Nesta técnica, os analitos de elevado coeficiente de partição podem atingir altas concentrações, uma vez que são transferidos por difusão de um expressivo volume de amostra para um pequeno microextrato [25].

Pode ser considerado um procedimento de baixo custo, simples e de baixo impacto ambiental. Existem várias abordagens de SDME, as principais são: imersão direta (DI-SDME), headspace (HS- SDME) e gota solidificada (SFODME) [22].

1.3.1.1. Microextração com gota suspensa e imersão direta

Na microextração com gota suspensa e imersão direta (DI-SDME) uma microgota de um solvente é suspensa diretamente na ponta da agulha de uma microseringa e é imersa na solução sob constante agitação. Esse solvente deve ser imiscível na água. O analito é transferido da fase aquosa para a microgota do solvente, esta é recolhida e está pronta para análise [26]. A figura 5 mostra um esquema ilustrando a DI-SDME.

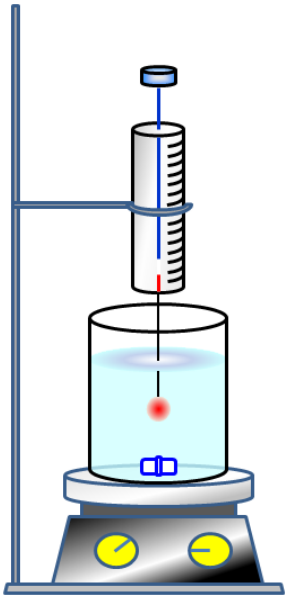

Figura 5. Sistema de microextração com gota suspensa e imersão direta.

1.3.1.2. Microextração com gota suspensa headspace

Em microextração com gota suspensa headspace (HS-SDME) uma microgota de solvente apropriado é colocada no espaço superior da solução da amostra para extrair analitos voláteis e semi-voláteis [27], conforme figura 6. É uma técnica simples, rápida e barata. Outra vantagem do HS-SPME é a variedade de solventes que podem ser escolhidos [28].

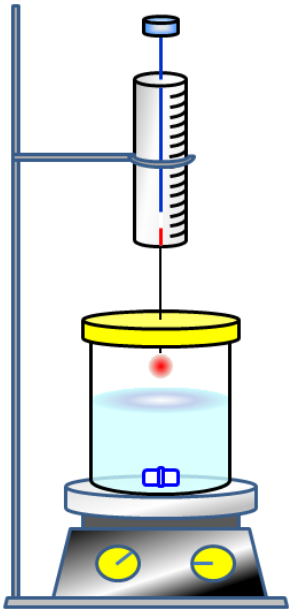

Figura 6. Sistema de microextração com gota suspensa headspace.

1.3.2. Microextração com gota orgânica solidificada

Na microextração com gota orgânica solidificada (SFODME), é utilizado um solvente orgânico com um ponto de fusão próximo à temperatura ambiente. Esse solvente é adicionado à solução aquosa e a solução é agitada. Posteriormente a amostra é colocada em banho de gelo, onde o solvente orgânico é solidificado e transferido para um pequeno recipiente, após fundir-se à temperatura ambiente, este pode então ser usado para a determinação dos analitos [29]. Uma representação esquemática desse sistema é mostrada na Figura 7.

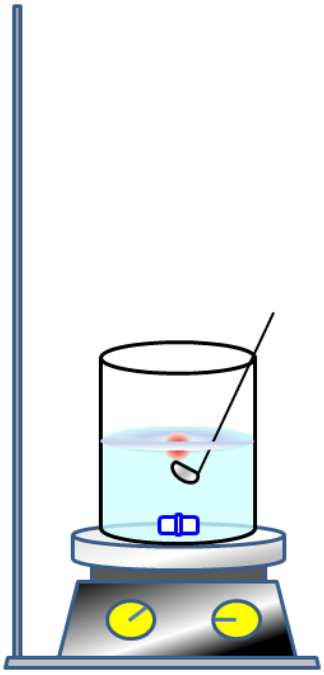

Figura 7. Sistema de microextração com gota orgânica solidificada.

1.3.3. Microextração em fase líquida com fibra oca

A microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) foi desenvolvida na tentativa de ganhar estabilidade com relação à SDME. Neste método, utiliza-se uma membrana capilar porosa e hidrofóbica impregnada com o solvente orgânico, formando uma barreira entre as fases aquosas [30], como mostra a Figura 8.

A HF-LPME pode ser aplicada de duas formas diferentes: com duas ou três fases, a depender do analito de interesse. No sistema de duas fases, o analito é extraído da amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros da membrana, passando então para o solvente orgânico (fase aceptora) presente no interior da fibra. No modo de três fases, a fase orgânica atua como uma barreira entre as fases aceptora e doadora (ambas aquosas), impedindo a mistura das duas fases [30].

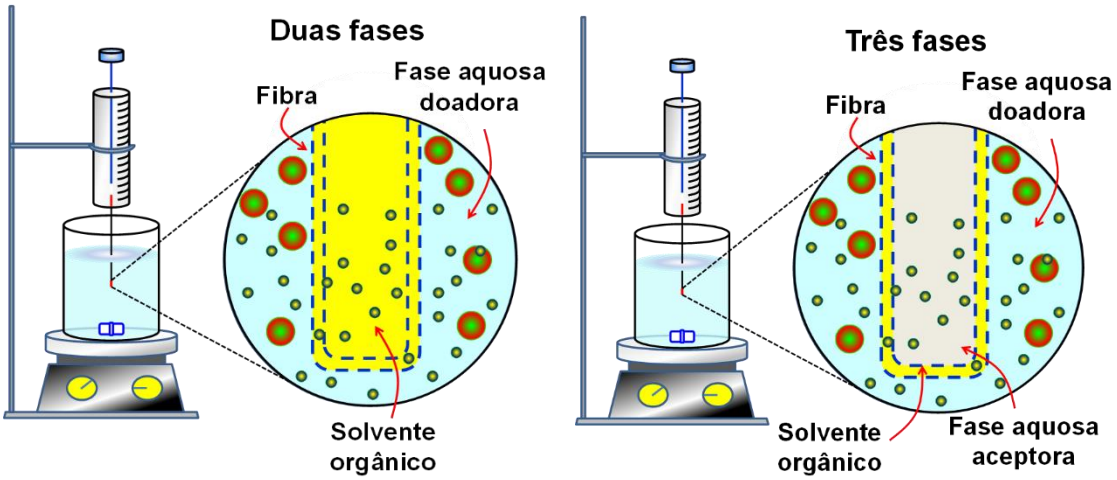

Figura 8. Modos de extração utilizados na HF-LPME.

1.3.4. Microextração dispersiva líquido-líquido

A microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) é considerada uma evolução direta da LLE. Esta técnica se baseia na injeção rápida de um extrator (solvente orgânico ou liquido iônico) e um dispersor de solvente, (geralmente metanol ou acetona) para amostras aquosas, originando uma solução turva. O contato entre a amostra e o solvente extrator orgânico permite acelerar a transferência de massa entre as fases imiscíveis. Após a centrifugação da mistura, onde ocorre a separação das fases, os analitos podem ser quantificados na fase orgânica enriquecida [31].

Alguns fatores como o solvente extrator, o solvente dispersor, o pH da fase aquosa e as quantidades dos solventes são de grande importância na eficiência da extração por DLLME [32]. A Figura 9 representa as etapas de DLLME.

Assim como em outras técnicas de microextração, novas modificações foram surgindo nos últimos anos. Por exemplo, o uso de energias de ultrassom para obter a solução turva, processo rápido e eficiente denominado de USAEME [22].

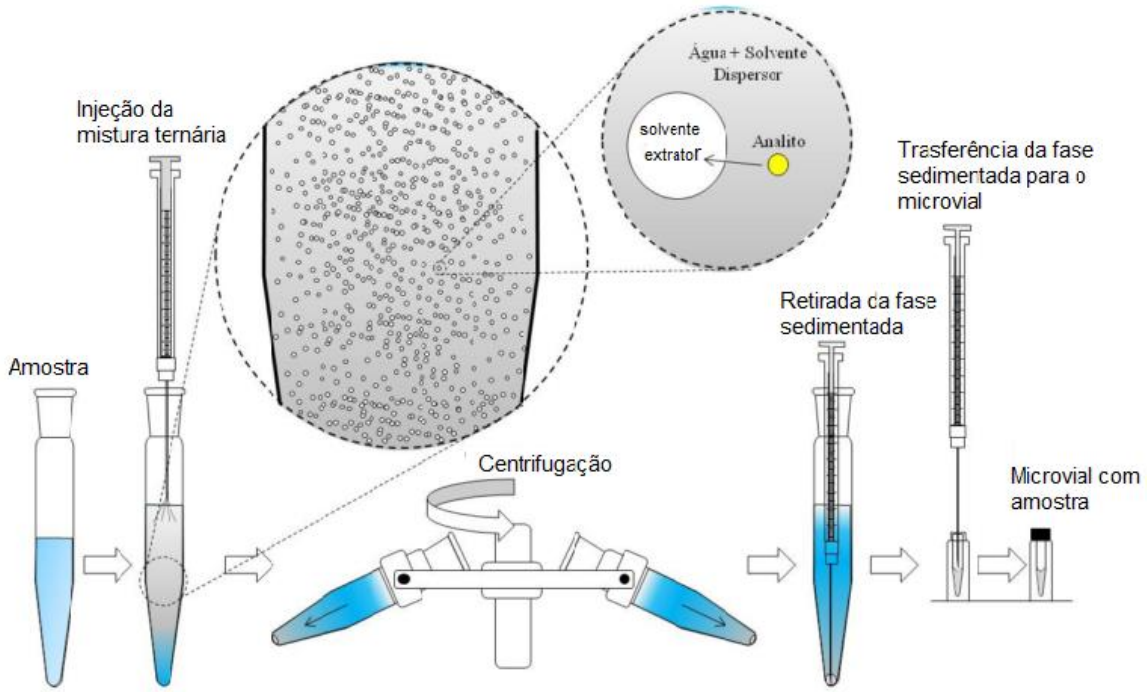

Figura 9. Etapas de um procedimento utilizando microextração dispersiva líquido-líquido. Adaptado de BERIJANI S. A. Y e colaboradores, 2006

1.3.5. Microextração por emulsificação assistida por ultrassom

A microextração por emulsificação assistida por ultrassom (USAEME) é uma abordagem baseada na DLLME que utiliza radiação de ultrassom para facilitar a emulsificação entre duas fases imiscíveis, como pode ser visto na Figura 10 [33]. Essa radiação acelera a transferência de massa a partir da solução aquosa para a fase orgânica, melhorando assim a eficiência da extração [34]. Uma das vantagens da USAEME é que se utiliza quantidades mínimas ou nenhuma de solvente dispersor, o que evita perdas do analito de interesse.

O principal efeito do ultrassom é a fragmentação de uma das fases para formar uma emulsão, o que aumenta a superfície de contato entre os dois líquidos. Combinando o benefício da microextração com ondas ultrassônicas, tornou-se possível estabelecer uma técnica de pré-concentração eficiente para analitos em níveis traço de concentração [35,36,37].

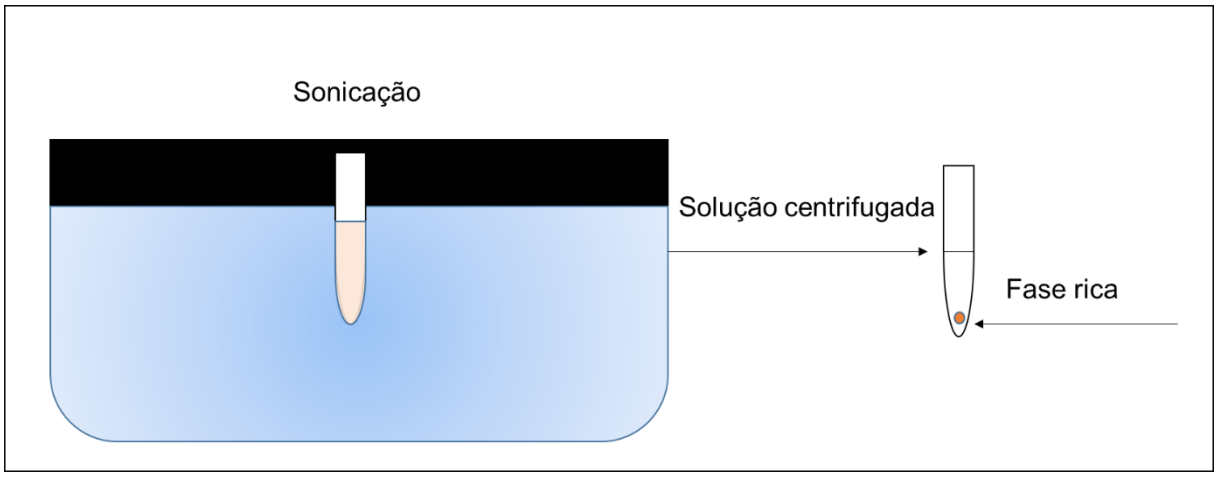

Figura 10. Microextração por emulsificação assistida por ultrassom.

1.3.5.1. Princípios da extração assistida por ultrassom

Ultrassom são ondas mecânicas que necessitam de um meio elástico para se propagar. A diferença entre o som e o ultrassom é a frequência da onda; o ultrassom é um som a uma frequência superior àquela que o ouvido do ser humano pode perceber, aproximadamente 20 kHz. Já o som são ondas a frequências auditivas humanas (16 Hz a 16 - 20 kHz) [38,39].

As utilizações de ultrassom são caracterizadas em dois grupos: alta intensidade e baixa intensidade. O uso de ultrassom de baixa intensidade envolve análise não destrutiva da amostra. Esta abordagem é muito aplicada como uma técnica analítica para fornecer informações sobre propriedades físico-químicas dos alimentos (por exemplo, firmeza e acidez). Enquanto o uso de ultrassom de alta intensidade pode alterar as propriedades da amostra, sendo usado entre outras aplicações para acelerar e melhorar a eficiência na preparação de amostras [40, 41,42].

Durante o processo de sonicação, ondas longitudinais são criadas quando uma onda sonora encontra um meio líquido, criando desse modo regiões de compressão e alternando a rarefação das ondas induzidas sobre as moléculas do meio, como mostra a Figura 11 [38]. Nestas regiões de alteração de pressão, a cavitação ocorre e as bolhas de gás são formadas. Estas bolhas têm uma maior área de superfície durante o ciclo de rarefação, o que aumenta a difusão do gás, fazendo a bolha expandir. O ponto crítico é alcançado durante o ciclo de compressão em que a energia ultrassônica fornecida não é suficiente para reter a

fase de vapor dentro da bolha. Como consequência, ocorre a rápida condensação e grandes quantidades de energia são liberadas [34-41].

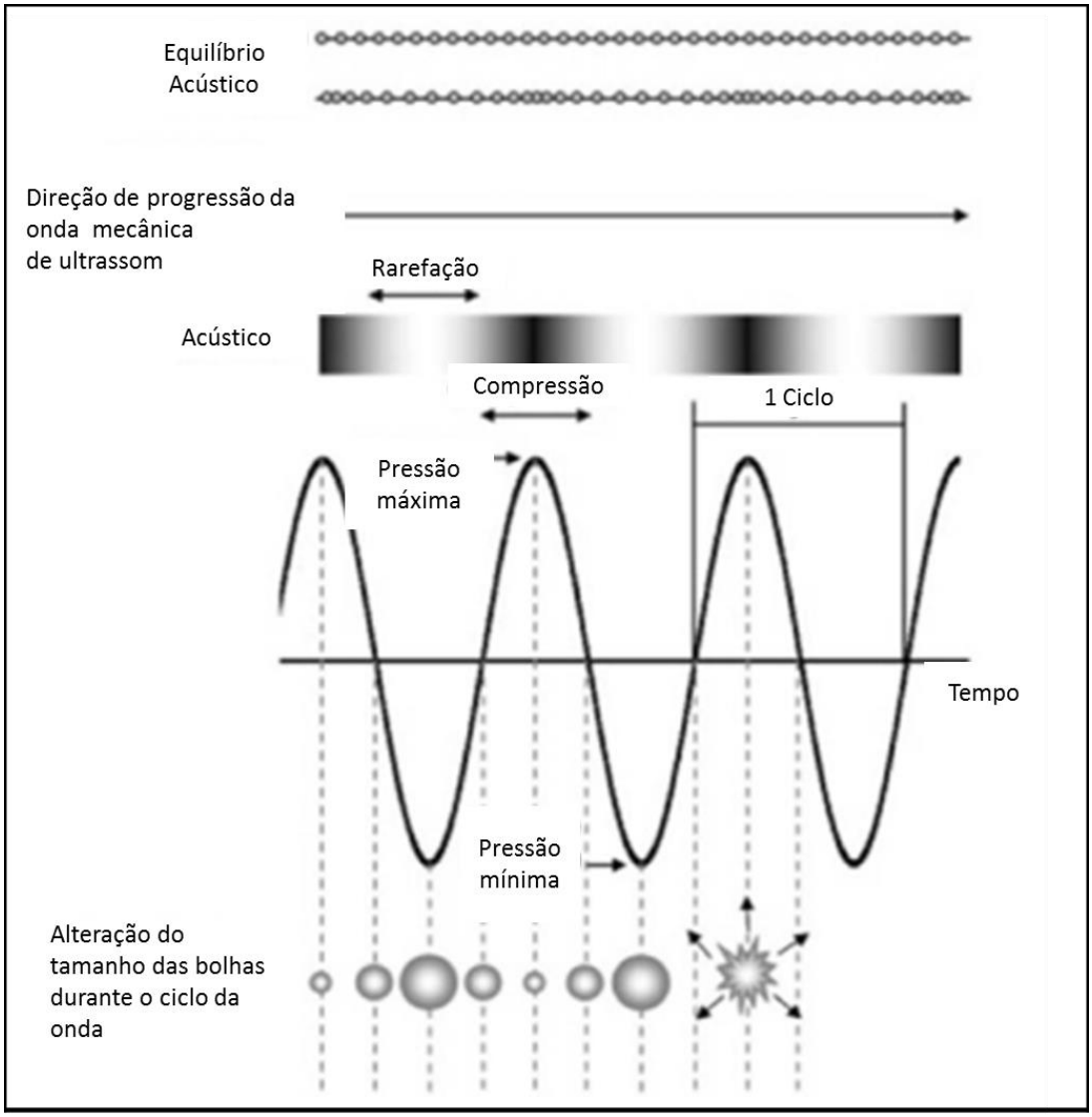

Figura 11. Cavitação ultrassônica. Adaptado de A.C. Soria, M. Villamiel.

PARTE EXPERIMENTAL

2.0. EXPERIMENTAL

2.1. Instrumentação

- Espectrômetro de absorção atômica com chama (VARIAN, Mulgrave, Austrália) modelo SpectrAA 240FS equipado com queimador para chama de ar-acetileno. As condições instrumentais empregadas para o funcionamento do equipamento foram sugeridas pelo fabricante e estão apresentadas na Tabela 1.
- Centrífuga (Centribio) modelo 80-2B
- Ultrassom (Unique) modelo USC -1450
- Balança analítica (Shimadzu) modelo AY 220
- Medidor de pH (Quimis) modelo Q400AS

Tabela 1. Condições experimentais para operação do espectrômetro de absorção atômica com chama.

Elemento	Cádmio
Sistema de atomização	Nebulizador e queimador
Tipo de chama	Ar - acetileno
Vazão de ar (L min^{-1})	13,5
Vazão de acetileno (L min^{-1})	2,0
Fonte de radiação	Lâmpada de cátodo oco
Sistema de correção de radiação de fundo	Lâmpada de deutério
Corrente da lâmpada (mA)	4,0
Largura da fenda (nm)	2,0
Comprimento de onda (nm)	228,8

2.2. Materiais e reagentes

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico.

- Ácido nítrico 65% (m/v) (Merck).
- Ácido clorídrico 37% (m/v) (Merck).
- Borato de sódio (QM).

- Tris (hidroximetil) aminometano (Sigma-Aldrich)
- Álcool etílico absoluto (Merck).
- Solução de Cádmio a 1000 µg mL^{-1} (Fluka).
- 2- (2 - piridilazo - 5 -bromo) -5- (dietilamino) fenol (Sigma-Aldrich).
- Tricloroetileno (Vetec).
- 1,2 Dicloroetano (Vetec)
- Micropipetas (Transferpette).
- Vidraria.
- Peróxido de hidrogênio

2.3. Soluções

Água desionizada ultrapura com resistividade 18 MΩ cm foi utilizada no preparo de todas as soluções. Toda a vidraria foi mantida em solução de ácido nítrico a 10% v/v durante 24 horas e, então, enxaguadas com água desionizada.

Soluções de cádmio (0,0 a 100,0 µg L^{-1}): preparadas a partir de uma solução estoque 1000 µg mL^{-1} do elemento, com ajuste de pH com 10,0 mL de solução-tampão correspondente e diluição até 100,0 mL com água desionizada.

Solução-tampão tris (pH 7,2-7,5): preparadas pela dissolução de quantidades apropriadas do tris para 0,1 mol/L em 100 mL de água desionizada e ajustou-se ao pH desejado com solução de ácido clorídrico.

Soluções-tampão borato de sódio (pH 8,0-9,5): preparadas pela dissolução de quantidades apropriadas de borato de sódio para 0,1 mol/L em 100 mL de água desionizada e ajuste ao pH desejado com soluções de ácido bórico ou hidróxido de sódio.

Soluções do reagente Br-Padap: preparadas pela dissolução de quantidades apropriadas do reagente 2- (2 -piridilazo - 5 -bromo) -5- (dietilamino) fenol para 0,015% m/v em uma proporção dos solventes tricloroetileno e 1,2 dicloroetano.

2.4. Procedimento de extração

Soluções contendo cádmio 10 µg/L (5,0 mL) foram transferidas para um tubo de ensaio de 10,0 mL. Então, foram acrescentados 70 µL da solução do reagente quelante Br-PADAP 0,015% (m/v) em uma mistura dos solventes extratores tricloroetileno e 1,2 dicloroetano 3:2 (v/v). Posteriormente acrescentou-se 100 µL do solvente dispersor etanol. Após breve agitação manual, o sistema foi colocado em banho ultrassônico. Durante a sonicação, ocorreu a imediata turvação da mistura. O sistema foi mantido no banho ultrassônico por 5,0 minutos. Então, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 4,0 min para promover a deposição da fase rica no fundo do tubo. Recolheu-se a fase orgânica enriquecida e o teor de cádmio foi determinado empregando-se a espectrometria de absorção atômica com chama. A Figura 12 ilustra o procedimento desenvolvido.

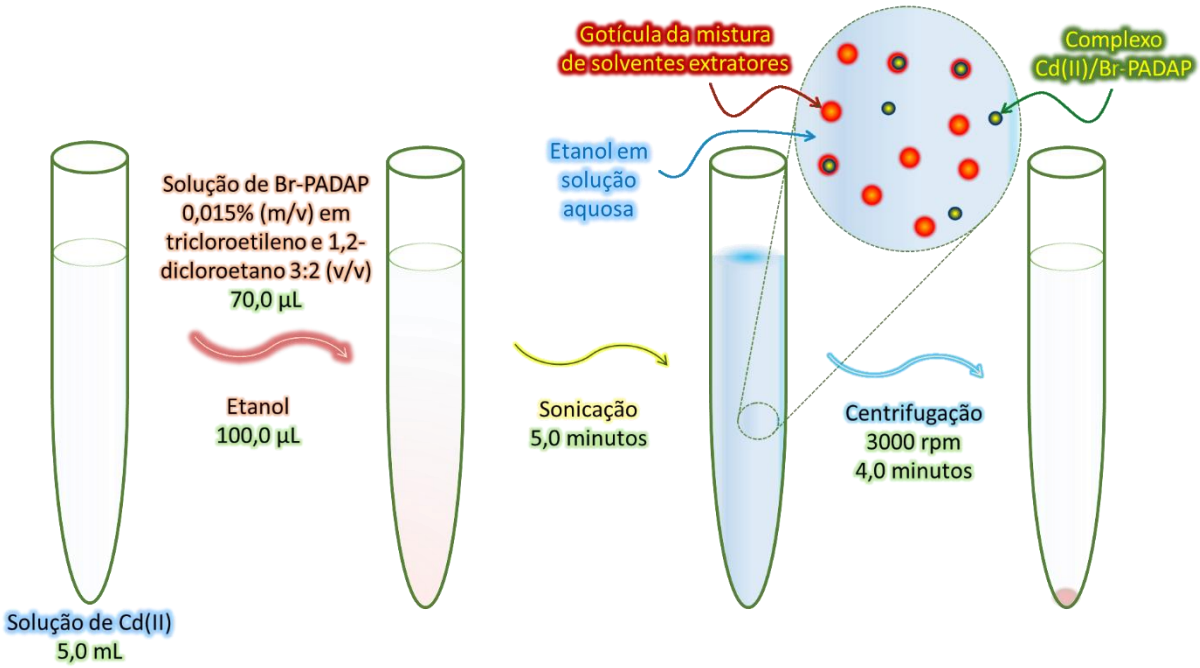

Figura 12. Aspecto da solução durante o procedimento de extração.

2.5. Otimização

O procedimento proposto foi otimizado empregando-se estratégia de otimização multivariada. Utilizou-se o planejamento de mistura para estudo da composição do solvente extrator e do solvente dispersor. O planejamento Box-Behnken com 4 fatores foi aplicado para avaliação das variáveis. A resposta experimental foi processada usando o programa *STATISTICA 7*. A Tabela 2 apresenta as variáveis e seus respectivos níveis estudados nos planejamentos de mistura. As variáveis experimentais e os seus respectivos níveis avaliados no planejamento Box-Behnken estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 2. Variáveis e níveis estudados no planejamento de mistura para o solvente extrator e dispersor.

Variáveis	**Níveis estudados**
Solvente extrator	Clorofórmio, 1,2 Dicloroetano e Tricloroetileno
Solvente dispersor	Acetonitrila, Etanol e metanol

Tabela 3. Variáveis e níveis estudados no planejamento Box-Behnken.

Variáveis	**Níveis estudados**
Volume do solvente extrator (µL)	70; 100 e 120
pH	7,2; 8,2 e 9,2
Volume do solvente dispersor (µL)	0; 100 e 200
Tempo de sonicação (min)	1; 4 e 7

2.3 Amostras

Foram coletadas amostras de molusco bivalve, água e efluente urbano em cinco pontos da Baía do pontal no município de Ilhéus, Bahia.

As amostras de molusco bivalve foram digeridas em bloco de digestão com adição de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio. Posteriormente, ajustou-se o pH com adição de hidróxido de sódio e executou-se o procedimento de pré-concentração.

As amostras de água e efluente foram filtradas e o procedimento de pré concentração foi executado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.0. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

A otimização multivariada de algumas condições experimentais foi executada, com o objetivo de possibilitar a máxima extração possível de cádmio, obtendo-se maior eficiência na extração e melhor sensibilidade na determinação.

3.1. Composição do solvente extrator

Em procedimentos de extração a escolha do solvente extrator é uma das etapas de maior importância, pois pode-se conseguir uma melhora significativa na eficiência da extração. Algumas propriedades são necessárias para que um solvente orgânico possa ser empregado em procedimentos que envolvem microextração em fase líquida. Entre estas propriedades estão baixa solubilidade ou insolubilidade em água, prevenindo a dissolução na fase aquosa; baixa volatilidade, evitando a perda de fase orgânica durante a extração e solubilidade adequada para o analito de interesse [43].

Neste trabalho foi realizado um planejamento de mistura para estudar a melhor composição entre três solventes extratores, sendo eles o clorofórmio, 1,2 dicloroetano e o tricloroetileno. A matriz experimental é apresentada da tabela 4.

Tabela 4. Planejamento de mistura para a composição do solvente extrator

Experimento	1,2 Dicloroetano (µL)	Tricloroetileno (µL)	Clorofórmio (µL)	ABS
1	100	0,0	0,0	0,0646
2	0,0	100	0,0	0,0506
3	0,0	0,0	100	0,0236
4	50	50	0,0	0,0679
5	50	0,0	50	0,0853
6	0,0	50	50	0,0504
7 PC	33	33	33	0,0600
8 PC	33	33	33	0,0578
9 PC	33	33	33	0,0601

PC - Ponto central

Os dados tratados no programa *STATÍSTICA* gerou o gráfico de contorno, apresentado na Figura 13.

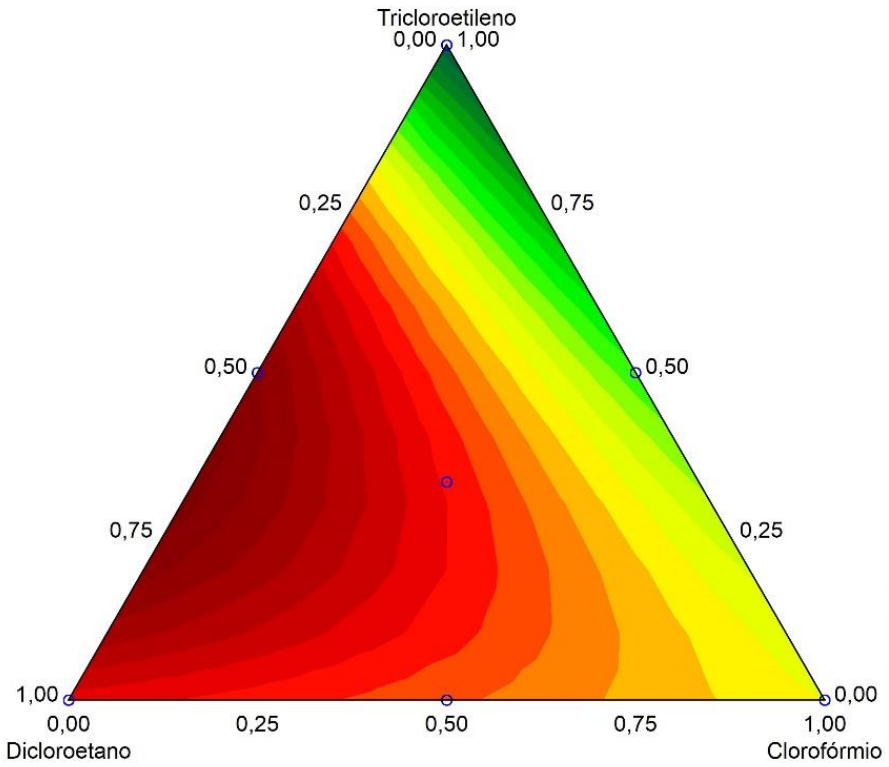

Figura 13. Gráfico de contorno obtido através do planejamento de mistura para a composição do solvente extrator.

De acordo com os resultados é possível identificar a melhor composição para se obter uma maior extração. A região de máximo é referente ao uso da mistura dos solventes 1,2 dicloroetano e tricloroetileno. Ou seja, as maiores quantidades de cádmio extraídas foram proporcionadas pelo uso combinado desses solventes. Portanto, em todos os experimentos posteriores, utilizou-se como solvente extrator 60 µL do 1,2 dicloroetano e 40 µL do tricloroetileno.

3.1. Composição do solvente dispersor

O estudo do solvente dispersor também é muito importante. Pois ele precisa ter solubilidade adequada tanto na água como na fase orgânica, já que tem a função de dispersar o solvente extrator na fase aquosa facilitando a emulsificação, garantido consequentemente uma melhor extração. Dessa forma, desenvolveu-se um planejamento de mistura para o estudo da composição do solvente dispersor utilizando Acetonitrila, metanol e etanol. A matriz experimental utilizada e os valores de absorvância para o cádmio são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Planejamento de mistura para a composição do solvente dispersor.

Experimento	Acetonitrila (µL)	Metanol (µL)	Etanol (µL)	ABS
1	100	0,0	0,0	0,0475
2	0,0	100	0,0	0,0768
3	0,0	0,0	100	0,0947
4	50	50	0,0	0,0965
5	50	0,0	50	0,0901
6	0,0	50	50	0,0475
7 PC	33	33	33	0,0608
8 PC	33	33	33	0,0619
9 PC	33	33	33	0,0629

PC - Ponto central

Os dados que compõem esta matriz foram tratados no programa *STATÍSTICA* e gerou a o gráfico de contorno, apresentado na Figura 14.

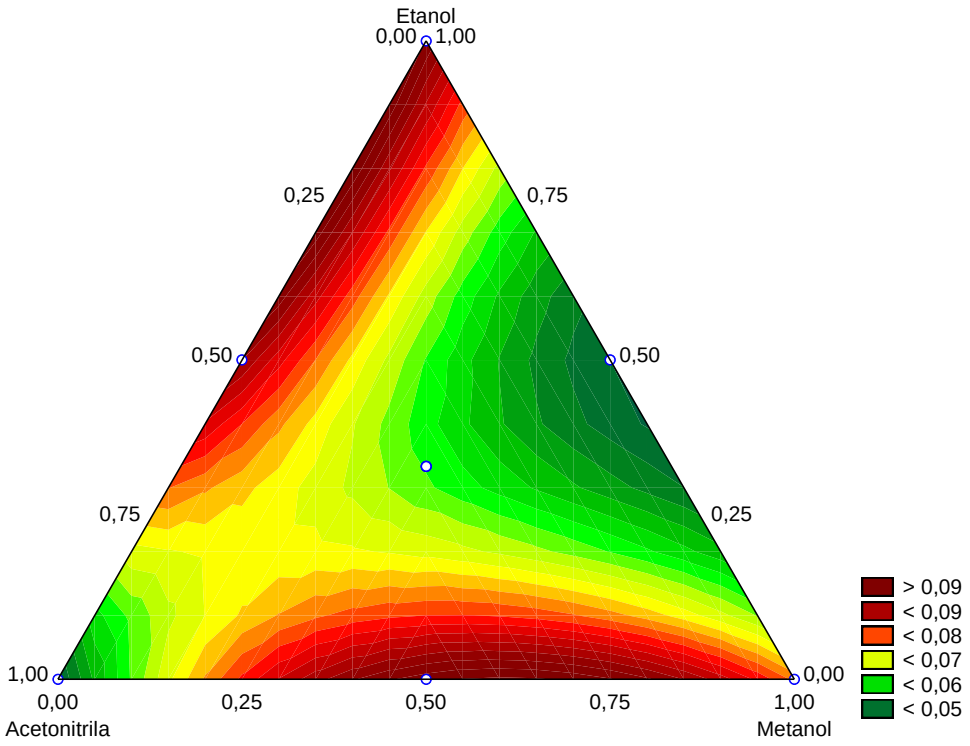

Figura 14. Gráfico de contorno do planejamento de mistura para a composição do solvente dispersor

Considerando o gráfico obtido, é possível verificar que não há um ponto de máximo. O que existe é uma região ótima para o uso do etanol e outra para o uso da mistura binária metanol e acetonitrila, formando um ponto de cela. No entanto, levando em consideração o fato de existir uma região ótima para o uso do etanol e este ser o solvente de menor toxicidade com relação aos demais, é justificável o seu

uso. Sendo assim, o etanol foi utilizado como solvente dispersor em todos os experimentos posteriores.

3.2. Otimização usando planejamento Box-Behnken

Após a otimização da composição do solvente extrator e dispersor, foi aplicado um planejamento Box-Behnken para otimizar as variáveis do processo (pH, tempo de sonicação, volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor). A matriz do planejamento é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6. Matriz Box-Behnken para quatro variáveis.

Experimento	pH	T.sonicação (min)	V.Sol.extrator (µL)	V.Sol.dispersor (µL)	ABS
1	7,2	1	100	100,0	0,0000
2	9,2	1	100	100,0	0,1002
3	7,2	7	100	100,0	0,0000
4	9,2	7	100	100,0	0,1278
5	8,2	4	70	0,0	0,1380
6	8,2	4	130	0,0	0,0866
7	8,2	4	70	200,0	0,1685
8	8,2	4	130	200,0	0,1020
9	7,2	4	70	100,0	0,0000
10	9,2	4	70	100,0	0,1173
11	7,2	4	130	100,0	0,0000
12	9,2	4	130	100,0	0,0708
13	8,2	1	100	0,0	0,1002
14	8,2	7	100	0,0	0,1388
15	8,2	1	100	200,0	0,1597
16	8,2	7	100	200,0	0,0948
17	7,2	4	100	0,0	0,0000
18	9,2	4	100	0,0	0,1142
19	7,2	4	100	200,0	0,0000
20	9,2	4	100	200,0	0,1051
21	8,2	1	70	100,0	0,1256
22	8,2	7	70	100,0	0,1336

23	8,2	1	130	100,0	0,0784
24	8,2	7	130	100,0	0,0811
25 (PC)	8,2	4	100	100,0	0,1283
26 (PC)	8,2	4	100	100,0	0,1243
27 (PC)	8,2	4	100	100,0	0,1261

PC - Ponto central

Os dados foram tratados no programa *STATÍSTICA* e geraram as superfícies de resposta, apresentadas na Figura 15.

A tabela 7 apresenta os valores críticos, que representam pontos ótimos, gerados pelo programa.

Tabela 7. Valores críticos obtidos para o planejamento Box-Behnken.

Variável	Mínimo	Crítico	Máximo
pH	7,2	8,72	9,2
T. de sonicação (min)	1,0	5,03	7,0
V. de extrator (µL)	70	58,8	130
V. de dispersor (µL)	0	109,5	200

A análise de variância (ANOVA) do modelo, está apresentada na Tabela 8, os termos significativos estão em vermelho. Como se pode observar, a falta de ajuste é significativa. No entanto, é justificada pelo fato do modelo matemático sugeri um deslocamento do domínio experimental para o uso de volume de solvente extrator abaixo de 60 µL, resultando em uma limitação instrumental. Portanto, mesmo com a falta de ajuste significativa pode-se considerar o método otimizado.

Tabela 8. Análise de variância para o modelo quadrático.

Fator	SQ	gl	MQ	F	P
(1) pH (Q)	0,025248	1	0,025248	6291,048	0,000159
(2) T. de sonicação (Q)	0,000174	1	0,000174	43,239	0,022355
(3) V. de extrator (Q)	0,000587	1	0,000587	146,279	0,006767
(4) V. de dispersor (Q)	0,000041	1	0,000041	10,111	0,086294
Falta de ajuste	0,002121	10	0,000212	52,839	0,018712
Erro puro	0,000008	2	0,000004		
Total SQ	0,075375	26			

SQ: soma quadrática; **gl:** graus de liberdade; **MQ:** média quadrática.

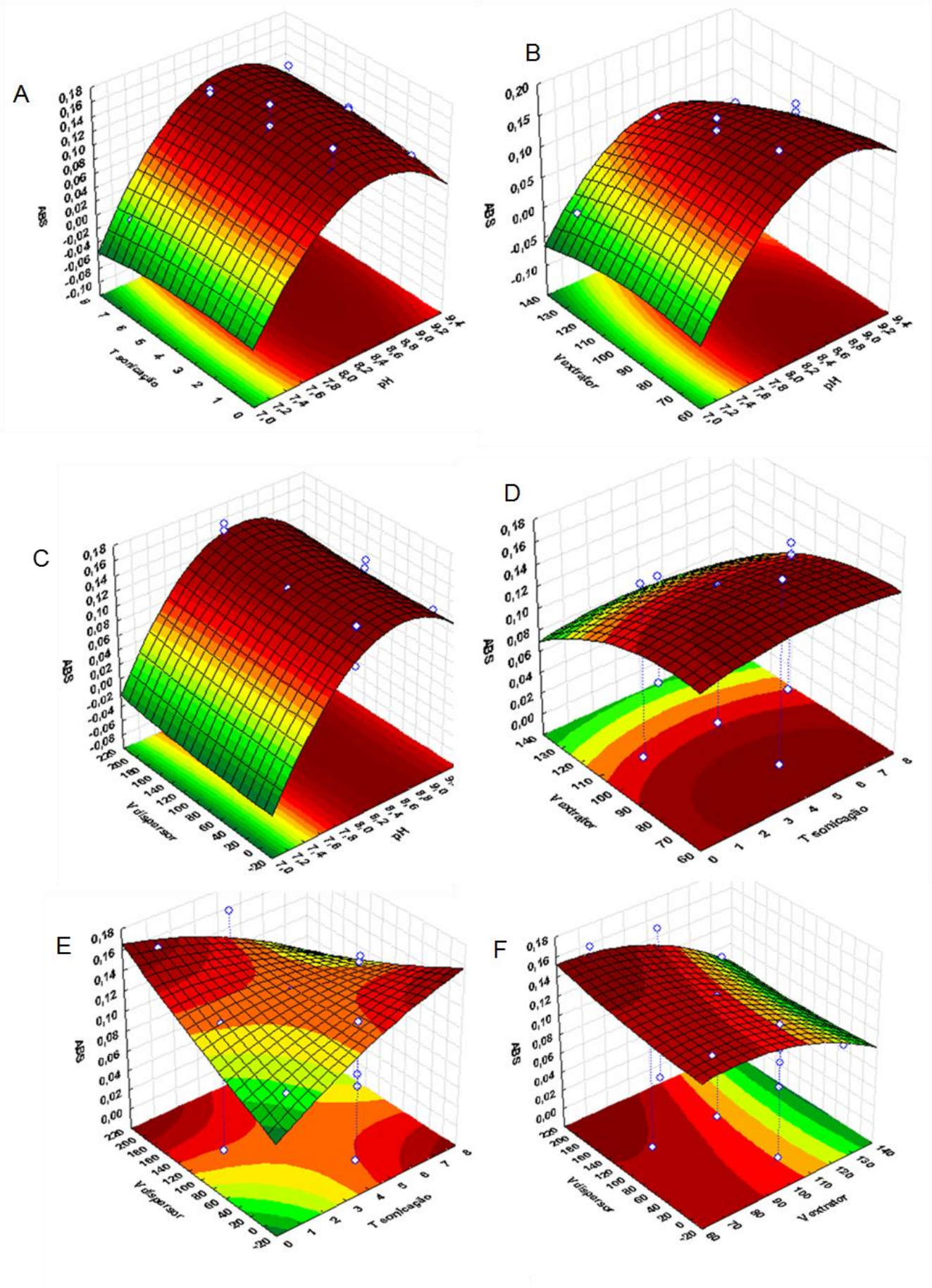

Figura 15. Superfícies de resposta para o planejamento Box-Behnken.

Analisando as informações contidas nas tabelas 7 e 8 e nas superfícies de reposta obtidas, figura 15, foi possível identificar os pontos ótimos para as variáveis estudadas.

Volume de solvente extrator- Considerando os resultados obtidos, observa-se que maiores quantidades de cádmio são extraídas quando utilizado um volume de 60 µL de solvente extrator. No entanto, este volume está no extremo do dominio da superfie de resposta. Além disso existem algumas dificuldades de se trabalhar com volume de 60 µL por ser muito pequeno, como por exemplo a formação uniforme da gota do solvente enriquecido, no fundo do tubo de ensaio. Sendo assim, em todos os experimentos subsequentes, 70 µL de solvente extrator foram utilizados.

Volume de solvente dispersor- O solvente dispersor tem a finalidade de quebrar o solvente extrator em gotículas, promovendo um maior contato do solvente extrator com a fase aquosa contendo o analito. Analisando os resultados, foi possivel identificar região de máximo para volumes em torno de 100 µL. Dessa forma, nos experimentos posteriores foi uitlizado 100 µL de solvente dispersor.

Tempo de sonicação- Na microextração liquido-liquido com emulsificação assistida por ultrassom, a sonicação tem a função de promover a formação de pequenas gotículas do solvente, que extraem o analito. O aumento da área superficial do solvente, sob a forma de muitas gotículas, viabiliza uma boa extração. De acordo com os resultados, extrações mais efetivas são obtidas com 5,0 minutos de sonicação. Períodos de sonicação muito curtos podem resultar em extração incompleta devido ao insuficiente tempo de contato entre as fases. Se, entretanto, a extração for promovida a intervalos de tempo relativamente altos, pode ocorrer a dissolução das espécies Cd(II)-Br-PADAP ou do solvente na fase aquosa. Desta forma, em todos os experimentos posteriores, a sonicação do meio de extração foi promovida em 5,0 minutos.

pH- Na extração de íons metálicos, a complexação e a eficiência da extração estão intimamente relacionadas ao pH da solução do elemento. De acordo com os resultados apresentados na figura 15, existe uma região de máximo quando se tem valores de pH em torno de 8,7. Portanto, uma solução-tampão borato de sódio (pH 8,7) foi utilizada para o ajuste do pH das soluções de cádmio, em todos os experimentos posteriores.

4.0. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Após a otimização das condições experimentais obteve-se as características analíticas do método proposto.

4.1. Linearidade

A capacidade de um método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância estudada é chamada linearidade. Esta, pode ser estabelecida por uma correlação dos dados. Sendo assim, é obtida uma função matemática que melhor represente essa relação [44]. Geralmente, a relação matemática entre o sinal analítico e a concentração ou massa do analito dever ser determinada experimentalmente. Essa relação pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica ou curva de calibração.

A linearidade da curva analítica pode ser calculada a partir da regressão linear. Através do coeficiente de correlação (R) obtido é possível fazer uma estimativa da qualidade da curva, já que quanto mais próximo de 1,0 menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza do coeficiente de regressão estimado [45].

A fim de verificar a linearidade do método e comparar os sinais analíticos construiu-se duas curvas neste trabalho. Sendo uma curva de medida direta de cádmio por FAAS e a outra referente ao sistema de pré-concentração e determinação de cádmio desenvolvido. Os resultados obtidos estão representados nas figuras 16 e 17 respectivamente.

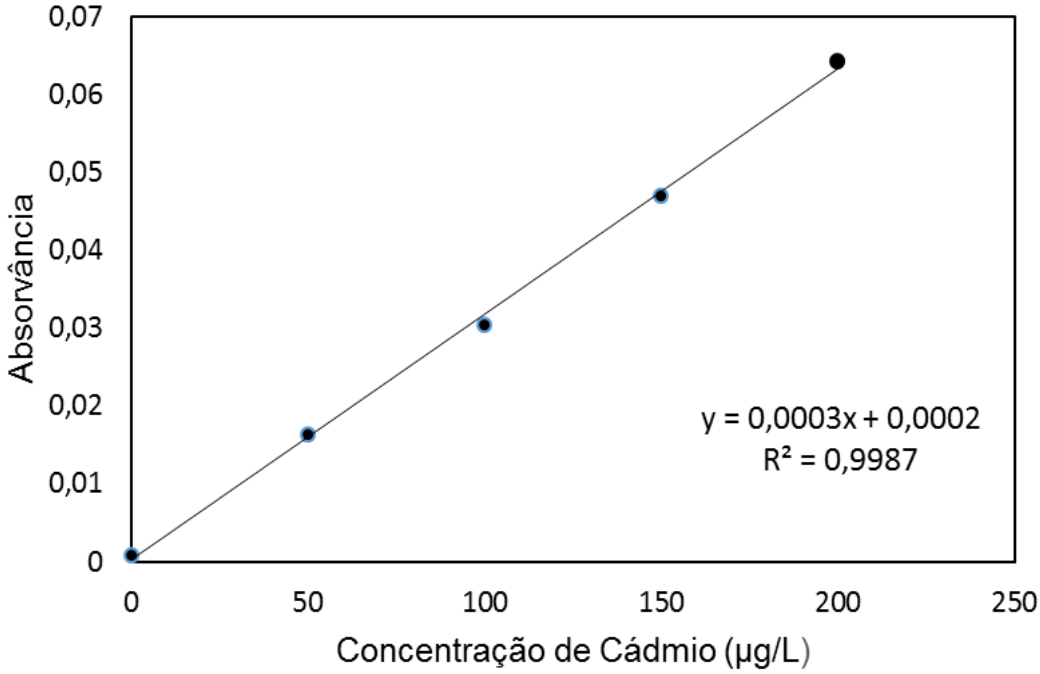

Figura 16. Curva analítica referente à medida direta de cádmio por FAAS.

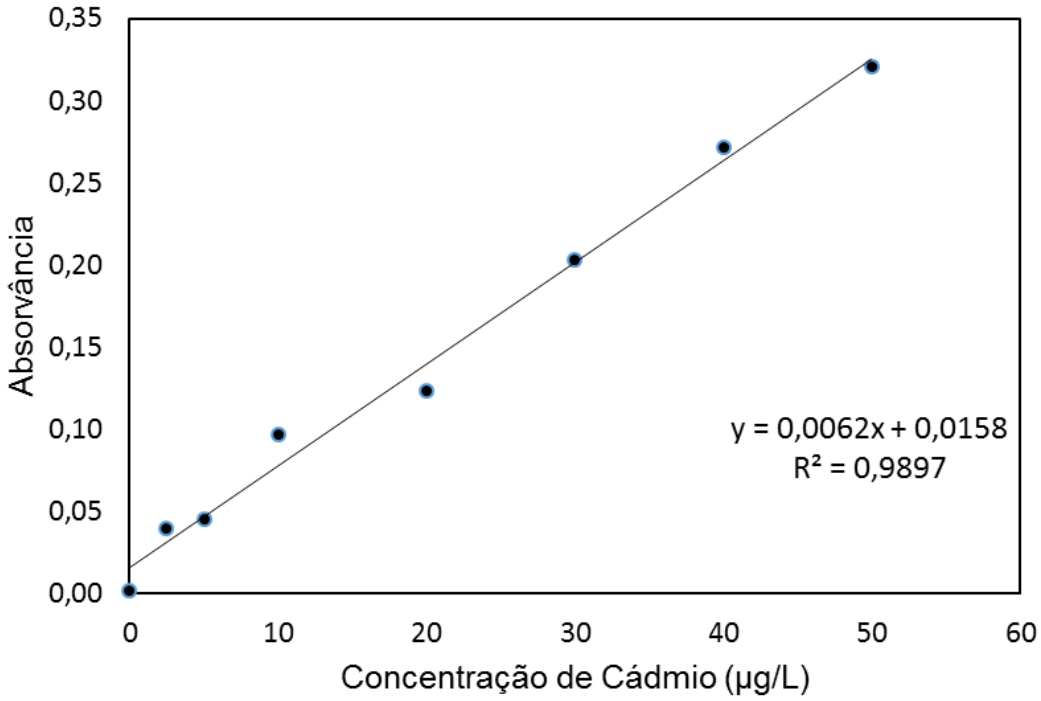

Figura 17. Curva analítica referente à microextração por emulsificação assistida por ultrassom para a pré-concentração de cádmio.

4.2. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a concentração mínima do analito que pode ser detectada por um determinado procedimento analítico. O LD pode ser obtido a partir da seguinte da equação 2.

$$LD = \frac{3S_{Br}}{b} \qquad \text{Equação 2}$$

Onde S_{Br} é o desvio padrão da resposta analítica correspondente ao branco e b é o coeficiente angular da curva analítica correspondente a cada espécie.

O limite de detecção encontrado para o método proposto foi de 0,39 μgL^{-1}

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito, que pode ser medida com grau de precisão e exatidão aceitáveis. O LQ é matematicamente expresso como dez vezes o desvio padrão do valor do sinal analítico correspondente ao branco dividido pelo coeficiente angular da curva analítica, como mostra a equação 3.

$$LQ = \frac{10S_{Br}}{b} \qquad \text{Equação 3}$$

O limite de quantificação referente ao método proposto foi de 1,3 μgL^{-1}

4.3. Fator de enriquecimento (FE)

O fator de enriquecimento (FE) é um critério usado para avaliar o desempenho de um sistema de pré-concentração, isto é, em quantas vezes o sistema consegue aumentar o sinal analítico com relação à medida direta. O FE é calculado através da razão entre os coeficientes angulares das curvas analíticas com pré-concentração e de medida direta.

Os valores dos coeficientes angulares das curvas analíticas, obtidas mediante o procedimento de pré-concentração e por leitura direta, foram respectivamente, 0,0062 e 0,0003. Dessa forma, o fator de enriquecimento encontrado para o método proposto foi 21.

4.4. Precisão

A precisão de um método analítico descreve a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados de análises independentes de uma mesma amostra, repetidas exatamente da mesma forma.

É um parâmetro que mede o grau de incerteza de um método analítico devido à dispersão das respostas instrumentais e da execução dos procedimentos.

Matematicamente, a precisão é expressa pelo desvio padrão relativo, RSD% (ou coeficiente de variação), o mesmo é calculado pela razão entre o desvio padrão de várias medidas em uma determinada concentração (S) e a média dessas medidas (ẋ), geralmente em percentagem [46], como mostra a equação 4.

$$RSD(\%) = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100 \qquad \text{Equação 4}$$

Para verificar a precisão do procedimento proposto realizou-se 12 medidas de soluções padrão contendo 2,5 e 50 µg L^{-1} de cádmio sob as mesmas condições, em diferentes dias. Os desvios padrões relativos encontrados através da equação foram, 4,0% e 3,8%.

5.0. EFEITO DE INTERFERENTES

A tolerância do método a outros íons foi avaliada adicionando alguns íons selecionados em várias concentrações em soluções de cádmio 10 µg L^{-1}. O efeito desses íons foi considerado significativo quando foi observada uma variação de ± 10 % no sinal analítico em relação a solução pura de cádmio. A tabela 9 apresenta os íons testados e a concentração máxima para que não haja interferência.

Tabela 9. Efeito de vários íons que interferem na determinação de cádmio usando o método proposto

Íon	Concentração máxima ($\mu g\ L^{-1}$)
Al^{3+}	10000
Ca^{2+}	5000
Cl^{-}	15000
Co^{2+}	100
Cu^{2+}	500
K^{+}	15000
Mg^{2+}	5000
Mn^{2+}	200
Na^{+}	15000
Ni^{2+}	100
NO_3^{-}	15000
Pb^{2+}	100
SO_4^{2-}	15000
Zn^{2+}	10000

Como pode ser observado na tabela 9, os íons Co (II), Mn (II) , Ni (II) e Pb (II) produzem interferências em concentrações relativamente baixas. Estes íons podem competir com cádmio (II), na formação de complexos com o reagente Br-PADAP, e assim, atrapalhar a extração do analito de interesse. As demais espécies testadas não interferiram em um grau significativo.

6.0. EXATIDÃO E APLICAÇÃO

A exatidão do método indica a proximidade entre o resultado encontrado em um determinado procedimento e o valor de referência. Para a avaliação da exatidão pode-se determinar o analito em um material de referência certificado, comparar resultados obtidos por métodos ou utilizar o método de adição e recuperação de analito na amostra [46].

O procedimento proposto foi aplicado à determinação de cádmio em material de referência certificado BCR-713 - efluente e CRM NIST 1566b - tecido de ostra, e em amostras reais de água e efluente urbano lançados na Baía do Pontal, na cidade de Ilhéus, Bahia. Para efeito de comparação, as amostras também foram analisadas

por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS). As concentrações de cádmio encontradas nas amostras analisadas estão apresentadas nas tabelas 10 e 11.

O teste *t*-Stundent revelou que os resultados encontrados empregando a metodologia proposta apresenta concordância com o indicado nos materiais de referência certificado a nível de confiança de 95%.

As concentrações de cádmio nas amostras de água e de molusco bivalve estão abaixo do limite de detecção do método proposto. Entretanto, a amostra de efluente urbano apresentou teor de cádmio de 3,20 ± 0,10 µg L^{-1}. O CONAMA estabelece o limite máximo de 20,0 µg/L de cádmio em efluente [47].

Tabela 10. Determinação de cádmio em água e efluente urbano.

Amostra	**Teor de cádmio (µg L^{-1})**	
	Método proposto	ETAAS
Água Rio cachoeira	< L.Q.	< L.Q.
Água Rio fundão	< L.Q.	< L.Q.
Efluente urbano Princesa Isabel	3,20 ± 0,10	3,40 ± 0,04
Água Nova Brasília	< L.Q.	< L.Q.
Água Caís do centro	< L.Q.	< L.Q.
	Método proposto	Certificado
CRM BCR 713 - Efluente	6,0 ± 0,9	5,1 ± 0,6

Tabela 11. Teores cádmio encontrados nas amostras de molusco bivalve.

Amostra	**Teor de cádmio (µg g^{-1})**	
	Método proposto	ETAAS
Chumbinho 1	< L.Q.	< L.Q.
Chumbinho 2	< L.Q.	< L.Q.
Lambreta 1	< L.Q.	< L.Q.
Lambreta 2	< L.Q.	< L.Q.
Moapem 1	< L.Q.	< L.Q.
Moapem 2	< L.Q.	< L.Q.
Sururu 1	< L.Q.	< L.Q.
Sururu 2	< L.Q.	< L.Q.
CRM NIST 1566b	Método proposto	Certificado
Tecido de ostra	2,32 ± 0,13	2,48 ± 0,08

Os resultados obtidos com o método proposto foram comparados com outros métodos de pré-concentração para determinação de cádmio, como mostra a tabela 12.

Tabela 12. Comparação com outros métodos

Técnica de extração	Solvente extrator	Volume de amostra (mL)	FE	LD ($\mu g\ L^{1}$)	Técnica de detecção	Amostra	Ref.
VALLME	1-butil-3-metilimidazólio-hexafluorofosfato	10,0	20	0,50	FAAS	Águas	[48]
IL-USAME	1-hexil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato	5,0	40	0,10	FAAS	Mexilhão	[49]
IPSA-DLLME	Clorofórmio	10,0	50	0,28	FAAS	Águas	[50]
SS-CPE	Triton x-114	10,0	54	0,29	FAAS	Águas	[51]
DLLME	Tricloroetileno	40,0	16	0,03	ICP-OES	Mariscos	[52]
LLE	Metil-isobutil-cetona	250,0	86	0,29	FAAS	Sal	[53]
USAEME	1,2 dicloroetano e tricloroetileno	5,0	21	0,39	FAAS	Águas e moluscos	Este trabalho

VALLME -Microextração líquido-líquido assistida por vortex; IL-USAME- Microextração com liquido iônico e emulsificação assistida por ultrassom; IPSA-DLLME- Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por surfactante íon par; SS-CPE- Extração no ponto nuvem de etapa única; DLLME- Microextração líquido-líquido dispersiva; LLE-Extração líquido-líquido; USAEME- Microextração com emulsificação assistida por ultrassom. FAAS- Espectrometria de absorção atômica com chama; ICP-OES- Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.

7.0. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O método desenvolvido neste trabalho, mostrou ser um procedimento simples, rápido e de baixo custo para pré-concentração e determinação de cádmio em água, efluentes e molusco bivalve utilizando a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS).

As variáveis otimizadas melhoraram a eficiência da extração, permitindo obter um limite de detecção de 0,39 µg L^{-1} e de quantificação de 1,3 µg L^{-1} e um fator de enriquecimento de 21. Com isso, o método se mostra uma ótima alternativa para pré-concentração e determinação de cádmio.

As amostras analisadas apresentaram teor de cádmio bem abaixo do limite máximo permitido pelo CONAMA (20 µg L^{-1}).

O planejamento de mistura e planejamento Box-Behnken se mostraram ótimas ferramentas de otimização.

Como perspectivas para trabalhos futuros tem-se a aplicação do procedimento proposto para pré-concentração e determinação de cádmio em outras matrizes e a utilização do mesmo para pré-concentração de outros metais.

8.0. REFERÊNCIAS

[1] RAMÍREZ A. Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. Fac de Med Univ Nac Mayor de Sn Marcos, v. 63, n.1, p.51-64, 2002.

[2] FERNANDES, L.A; MAINIER,F.B. Os riscos da exposição ocupacional ao cádmio. Sistemas & Gestão, v.9, p.194-199, 2014.

[3] MARINHA, M.S.S. Níveis de cádmio em sangue e urina dos habitantes do entorno de uma reserva ecológica no Pantanal Mato-grossense.2011. 70f. Dissertação (Mestrado em ciências na área de saúde pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2011.

[4] SOUZA, P.J. Toxicidade do cádmio em uma cadeia alimentar constituída por uma microalga (*Scenedesmus quadricauda*), um cladócero (*Simocephalus serrulatus*) e um peixe (*Hyphessobrycon eques*). 2012. 122f. Tese (Doutorado em ciências) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-São Paulo, 2012.

[5] AMORIM, R. R. Chaves de identificação de ambientes com ênfase nos aspectos pedogeomorfológicos para o município de Ilhéus: uma ferramenta ao ensino da Geografia. 2006. 43p. (Monografia). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA. 2006.

[6] DE ALMEIDA, A.O.; COELHO, P.A; DOS SANTOS, J. T. A.; FERRAZ, N.R. Crustáceos decápodos estuarinos de Ilhéus, Bahia, Brasil. Biota Neotropica. v. 6, 2006.

[7] MARTINS, P. T. A. Os reflexos da crise da lavoura cacaueira nos ecossistemas de manguezal do município de Ilhéus, Bahia. Geografia - v. 16. 2007.

[8] FONTES, I. B. DE M; DE ARAUJO, Q. R; SEVERO, M. I. G; DE OLIVEIRA, A. H. Avaliação dos micropoluentes inorgânicos da Estação de Tratamento de Esgoto de ilhéus (Bahia). Geografia - v. 18,2009

[9] NASCIMENTO, L.D. Avaliação espacial e temporal das concentrações de metais potencialmente disponíveis nos sedimentos de fundo do sistema estuarino do rio cachoeira, Ilhéus-BA. Dissertação de mestrado, 2015.

[10] BOSQUE-SENDRA, J.M; NECHAR, M; RODRIGUES, L.C; MOLINA, M.F. Optimzation of analytical methods by using Doehlert´s design. Anal. Proc. I. Anal. Comunications, v. 32, p. 375. 1995

[11] NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2010

[12] MONTGOMERY, D. C. Design and analysis of experiments. 4ª ed. New York: Wiley, 1996

[13] NOVAES, G.C. Aplicação de técnicas quimiométricas na otimização de métodos usando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de absorção atômica com chama visando a análise de amostras ambientais. Tese de Doutorado, 2011.

[14] NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

[15] CAMPOS, L. F. A.; AMORIM, L. V.; FERREIRA, H. C. Utilização do planejamento experimental no estudo do efeito da composição de misturas de bentonitas na reologia de fluidos de perfuração. Parte II: composições ternárias, Cerâmica, v. 53, p. 68-73, 2007.

[16] BOX, G.E.P., BEHNKEN, D.W., Technometrics 2, p. 455, 1960.

[17] FERREIRA, S.L.C; BRUNS, R.E; FERREIRA, H.S; MATOS, G.D; DAVID, J.M; BRANDÃO, G.C; SILVA, E.G.P. DA; PORTUGAL, L.A; REIS, P.S. DOS; SOUZA, A.S; DOS SANTOS , W.N.L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. Anal. Chem. Acta, v. 597, p. 179–186,2007

[18] SOUZA, S.A; DOS SANTOS, W.N.L; FERREIRA, S.L.C. Application of Box–Behnken design in the optimisation of an on-line pre-concentration system using knotted reactor for cadmium determination by flame atomic absorption spectrometry. Spectrochim Acta Part B, v. 60, p. 737–742, 2005.

[19] KHAJEH, M; Optimization of microwave-assisted extraction procedure for zinc and copper determination in food samples by Box-Behnken design. Jpn of Food Comp. and Anal. v. 22, p. 343–346, 2009.

[20] MIOR R.; DUTRA B. N. J; CARASEK E.; Desenvolvimento de um método analítico baseado em microextração líquido-líquido para a determinação de cromo (vi) em amostras aquosas com detecção por espectrometria de absorção atômica em chama. Quim. Nova, Vol. XY, No. 00, 1-5, 2013

[21] BORGES, D.L.G. et al. Fundamentos da Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. Revista Analytica, n.18, 2005.

[22] N. CABALEIRO, I.; DE LA CALLE, C. BENDICHO.; I. LAVILLA. Current trends in liquid-liquid and solid–liquid extraction for cosmetic analysis: a review, Anal. Methods, v.5, p.323-340, 2013.

[23] F. PENA-PEREIRA.; I. LAVILLA.; C. BENDICHO, Spectrochim. Acta, Part B, 64, 1-15, 2009.

[24] LEMOS, V. A; FERREIRA, V. J; BARRETO, J. A; MEIRA, L. A. Development of a Method Using Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction for the Determination of Nickel in Water Samples. Water, air and Soil Pollution, v. 226, n. 141. 2015.

[25] JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent Microextraction into a Single Drop. Anal. Chem. v.68, p.2236-2240,1996.

[26] SILVA , E. S. DOS. Determinação de molibdênio em amostras de águas utilizando espectrometria de absorção atômica eletrotérmica após pré-concentração por microextração dispersiva líquido-líquido. Dissertação (Mestrado) 2012.

[27] WU, Y. ; XIA, L. ; CHEN, R. ; HU, B. Headspace single drop microextraction combined with HPLC for the determination of trace polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. Talanta, v.74 p.470–477, 2008.

[28] FANG, C.; XIONG, Y. ; LIANG, Q.; LI, Y.; PENG, P. Optimization of headspace single-drop microextraction technique for extraction of light hydrocarbons (C6–C12) and its potential applications. Organic Geochemistry, v.42, p.59–565, 2011.

[29] OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M.; BONATO. P. S. Micro-extração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. Química Nova, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

[30] S. PEDERSEN-BJERGAARD, K. E. RASMUSSEN.; J. A. JONSSON, Liquid-Phase Microextraction (LPME) Utilizing Porous Hollow Fibers, in Handbook of Sample Preparation. J. Pawliszyn and H. L. Lord, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, New Jersey, US, pp. 125–148, 2010.

[31] F. PENA-PEREIRA.; I. LAVILLA.; C. BENDICHO, Spectrochim. Acta, Part B, 64, 1–15, 2009.

[32] M. REZAEE.; Y. YAMINI.; M. FARAJI, J. Chromatogr., A, 1217, 2342–2357,2010.

[33] J. REGUEIRO.; M. LLOMPART.; C. GARCÍA-JARES.; J. C. GARCÍA-MONTEAGUDO.; R. Cela, J. Chromatogr., A, 1190
27–38, 2008.

[34] M. REZAEE.; Y. YAMINI.; M. FARAJI. J. Chromatogr., A, 1217, 2342–2357, 2010.

[35] J.L. YANG.; D. Li, C.J. Sun, Anal. Methods v. 4 , 3436, 2012.

[36] H.Y. YAN, J.D. QIAO, H. WANG, G.L. YANG, K.H. ROW, Analyst, (Cambridge, UK) 136, 2629, 2011.

[37] S. GAO, X. YANG, W. YU, Z. LIU, H. ZHANG, Talanta . v. 99, 875. 2012

[38] A.C. SORIA, M. VILLAMIEL, Trends food sci. Technol. v. 21, 323.2010

[39] Y. PICO, IN: Y. PICO , Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications, Elsevier, Oxford, UK, p. 117.2012

[40] F. CHEMAT, ZILL-E-HUMA, M.K. KHAN, Ultrason. Sonochem. 18, 813.2011

[41] T.S. AWAD, H.A. MOHARRAM, O.E. SHALTOUT, D. ASKER, M.M. YOUSSEF, Food Res. Int. 48, 410.2012

[42] T.J. MASON, L. PANIWNYK, J.P. LORIMER, Ultrason. Sonochem. v. 3 S253–S260.1996

[43] DE OLIVEIRA A. R. M.; DOS SANTOS I. R. M.; DE SANTANA; F. J. M.; BONATO P. S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. Química Nova, v. 31, 637-644, 2008.

[44] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. e MELO, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. Quimica Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

[45] MACIEL, M. V. Desenvolvimento de um sistema em linha para pré-concentração e determinação de selênio em amostras ambientais por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos. Dissertação (Mestrado). 2012.

[46] SKOOG, A.D.; WEST, M.D.; HOLLER; CROUCH, S.R. Fundamentos de química analítica. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2006.

[47] BRASIL, C. C. N. d. M. A. R. C. n., de 18 de junho de 1986: estabelece classificação das águas e os níveis de qualidade exigidos. Disponível em: http/www.mma.gov.br/port/conama/frlegis.html.

[48] KHAN, S.; YILMAZ, E.; KAZI, G.T.; SOYLAK, M. Vortex Assisted Liquid–Liquid Microextraction Using Triton X-114 for Ultratrace Cadmium Prior to Analysis. Clean – Soil, Air, Water 42 (8), 1083–1088. 2014.

[49] LEMOS, V. A.; OLIVEIRA, L. A. Ultrasound-assisted temperature-controlled ionic liquid microextraction for the preconcentration and determination of cadmium content in mussel samples. Food Control Jornal. v. 50, p. 901–906. 2015.

[50] REZAEE, M., ASSADI, Y., HOSSEINI, M. M, AGHAEE, E., AHMADI, F., BERIJANI,S., Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction, Jpn Chromatography A, v.1116, p.1–9, 2006.

[51] NAEEMULLAH ; KAZI, T. G; TUZEN, M. Development of novel simultaneous single step and multistep cloud point extraction method for silver, cadmium and nickel in water samples. Jpn. Ind. Eng. Chemistry. v. 35, p. 93–98, 2016.

[52] LEMOS, V.A; VIEIRA, E. V. DOS S. Method for the determination of cadmium, lead, nickel, cobalt and copper in seafood after dispersive liquid–liquid micro-extraction. Food Addi & Contaminants: Part A, v. 31, No. p. 1872–1878, 2014.

[53] AMORIM, F. A.C; FERREIRA, S.L.C. Determination of cadmium and lead in table salt by sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry.Talanta, v. 65, p. 960-964, 2005.