UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
CAMPUS DE JEQUIÉ-BA

JOABES DOS SANTOS TRINDADE

Desenvolvimento de método analítico baseado na microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de cobre e manganês em água de coco *in natura* e industrializadas com detecção por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)

JEQUIÉ – BA
JULHO DE 2020

JOABES DOS SANTOS TRINDADE

Desenvolvimento de método analítico baseado na microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de cobre e manganês em água de coco *in natura* e industrializadas com detecção por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)

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 Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Brasil

JEQUIÉ – BA
JULHO DE 2020

T833d Trindade, Joabes dos Santos.

Desenvolvimento de método analítico baseado na microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de cobre e manganês em água de coco in natura e industrializadas com detecção por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) / Joabes dos Santos Trindade. - Jequié, 2020.

100f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra)

1.Água de coco 2.DLLME 3.Metais 4.Preparo de amostras 5.Planejamento de mistura 6.Planejamento Doehlert I.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

CDD – 540

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇAO

JOABES DOS SANTOS TRINDADE

Desenvolvimento de método analítico baseado na microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de cobre e manganês em água de coco *in natura* e industrializadas com detecção por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)

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.

COMISSÃO EXAMINADORA

Marcos de Almeida Bezerra

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra
(UFBA, Salvador - BA, 2006)
(Orientador)

Fábio de Souza Dias

Prof. Dr. Fábio de Souza Dias
(UFBA, Salvador - BA, 2010)

Prof. Dr. Marcelo Eça Rocha
(UFBA, Salvador - BA, 2016)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em 30 / 07 / 2020

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a DEUS, por ser o autor e alicerce da minha vida, o amor incondicional e suporte de todos os meus dias.

Agradeço a minha família, Carmelita (Mãe), Anibal (Pai), Edson, Shirley e Alessandra (Irmãos), aos meus sobrinhos que amo muito, Oseias, Pérola, Marcela, Emanuelly, Daniel e Valéria, que sempre estão comigo, agradeço muito todo o apoio. Agradeço por cada momento, conselho, abraço e carinho que recebo sempre de vocês. Lembrem-se, que foi a fé e orações de vocês, que me ajudaram a concluir este trabalho.

Ao meu amigo e irmão filho de outros pais, Adonias, por me aturar, todas as vezes que a gente conversava, sempre me orientando, sem a ajuda dele minha caminhada teria sido muito mais árdua.

Aos meus amigos(as) ou melhor, minha segunda família, Ana, Vovó Nete, Carlos, Junior (Nunno), Juce, Daina, Erisson, Taís, Caique, Iris e Laysa, aos meus pequenos Erick, Pietro, Nicole e a todos os componentes do grupo do WhatsApp “Liga dos Fígados de Aço”, por me proporcionarem muitos momentos de felicidades, companheirismo e pelas amizades.

Em especial, quero agradecer também, ao meu grande amigo Jadson, que a todo momento do curso esteve ao meu lado, meu companheiro de viagem em todos os concursos que pleiteie uma vaga como professor e mesmo não conseguindo, ele sempre me apoiou, sem falar das inúmeras vezes que ele foi solidário, só quero que saiba que seu apoio e companheirismo, foi fundamental para eu chegar até aqui, como Mestre em Química Analítica.

Aos meus amigos do mestrado, Vanessa, Daniel, Tiago, Rosivan, Tarcísio, Erica, Dhiéssica, Adrianne, Ivan e Thaiane, pelos momentos bons e por sempre estarem atentos e dispostos a resolverem alguns dos meus problemas, muito obrigado.

Ao professor Dr. Marcos de Almeida Bezerra. “Gratidão” é a palavra que tenho para expressar, o quão fundamental foi sua orientação para que conseguisse concluir este trabalho. Agradeço pelo incentivo, confiança, pelas suas correções, paciência e por ter contribuído para o meu crescimento profissional e acadêmico, tornando possível a realização deste trabalho. Sempre ouvir falar da sua humildade Professor Marcos, sempre prestativo, sempre apoiando e ajudando a todos seus orientados e nesses dois anos e

alguns meses, tive a honra de ser seu orientando. Agradeço por todos os seus ensinamentos inestimáveis, que sempre estarão na minha memória.

Aos meus amigos do LQA II, Juh e Darci, em especial Uillian, que me auxiliou durante algumas análises, pelas sugestões e conversas que contribuíram para escrita deste trabalho.

Quero também, agradecer a todos os professores do curso de química da UESB campus de Jequié, em especial, aos professores do PGQUI por todos os ensinamentos que foram fundamentais para minha formação na pós-graduação.

Aos funcionários da UESB pelos serviços prestados, em especial, o pessoal da coordenação dos laboratórios, pela simpatia e disponibilidade de sempre poder ajudar.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia por estar me proporcionado uma formação de qualidade como Mestre em Química.

A CAPES pela parceria e financiamento deste trabalho.

Dedico este trabalho com muito amor, carinho e gratidão.

A Deus, por me conceder o dom da sabedoria.

À minha mãe Carmelita e ao meu pai Anibal pelos ensinamentos de vida.

Aos meus irmãos Edson, Shirley, Alessandra e aos meus sobrinhos, pelo apoio incondicional.

“Ninguém se enganem. Se alguém dentre vós se tem por sábio neste mundo, faça-se louco para ser sábio.”

I Coríntios 3:18

“Mas a sabedoria que vem do alto é, primeiramente, pura, depois, pacífica, moderada, tratável, cheia de misericórdia e de bons frutos, sem parcialidade e sem hipocrisia.”

Tiago 3:17

Desenvolvimento de método analítico baseado na microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de cobre e manganês em água de coco *in natura* e industrializadas com detecção por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)

Autor: Joabes dos Santos Trindade

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra

RESUMO: No presente trabalho foi desenvolvido uma estratégia analítica, baseada na microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para extração e pré-concentração de cobre e manganês em amostras de água de coco *in natura* e industrializada, com determinação por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Primeiramente, realizou-se a otimização das soluções extratoras usadas na DLLME, através da aplicação de um planejamento de mistura com restrição para três componentes, obtendo como resposta a desejabilidade global. As condições ótimas para realização das análises nesta etapa, foram 500 µL de clorofórmio (solvente extrator), 3,8 mL de acetonitrila (solvente dispersor) e 700 µL de Br-PADAP (complexante). Na segunda etapa, otimizou-se simultaneamente as variáveis pH, volume da solução tampão e volume da solução de NaCl para extração de ambos os metais, utilizando uma matriz Doehlert combinada com a função de desejabilidade. Encontrou-se as seguintes condições experimentais para o Cu e Mn, respectivamente: pH 4,0 e 9,5; volume da solução tampão 3,0 e 2,8 mL; volume da solução de NaCl 2,0 e 1,9 mL. Os limites de detecção obtidos para os analitos Cu e Mn foram 1,45 µg L^{-1} e 0,99 µg L^{-1} respectivamente, os limites de quantificação obtidos para o Cu foi de 4,83 µg L^{-1} e 3,32 µg L^{-1} para o Mn. Os fatores de enriquecimento obtidos para o Cu e Mn foram de 11 e 8, respectivamente. Os desvios padrão relativo foram 6,62 % para o Cu e 6,00 % para o Mn. A exatidão do método foi avaliada a partir das recuperações dos analitos, variando entre 96,5 – 120 % para o Cu e de 99 – 107 % para o Mn. Com relação as concentrações dos metais nas amostras de águas de coco *in natura*, para o Cu foram de 11 – 22 µg L^{-1} e Mn de 13,9 - 16,8 µg L^{-1}, já nas amostras de água de coco industrializadas as concentrações encontradas para o Cu foram de 40 – 44 µg L^{-1} e para o Mn foram de 8,0 – 17,6 µg L^{-1}.

Palavras Chaves: Água de coco, DLLME, metais, preparo de amostras, planejamento de mistura e planejamento Doehlert

Development of analytical method based on dispersive liquid-liquid microextraction for copper and manganese in industrial and "in natura" coconut water with detection by flame atomic absorption spectrometry (FAAS)

Author: Joabes dos Santos Trindade

Advisor: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra

ABSTRACT: In the present work, an analytical strategy was developed, based on liquid-liquid dispersive microextraction (DLLME) for extraction and pre-concentration of copper and manganese in fresh and industrialized coconut water, with determination by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). First, the extraction solutions used in DLLME were optimized, through the application of a constrained mixture design for three components, obtaining a response to the global desirability. The conditions selected to carry out the analyzes in this step were 500 µL of chloroform (extractor solvent), 3.8 ml of acetonitrile (dispersing solvent) and 700 µL of Br-PADAP (complexing). In the second step, the process variables such as pH, volume of the buffer solution and volume of the NaCl solution were simultaneously optimized for the extraction of both metals, using a Doehlert matrix combined with the desirability function. Due to the fact that the optimal conditions are in different regions, the optimization of copper and manganese was carried out separately. The following experimental conditions were found for Cu and Mn, respectively: pH 4.0 and 9.5; buffer volume 3.0 2.8 mL; volume of NaCl solution 2.0 and 1.9 mL. The detection and quantification limits obtained for the Cu, Mn analytes were 1.45 µg L^{-1}, 0.99 µg L^{-1} and 4.83 µg L^{-1}, 3.32 µg L^{-1}, respectively. The pre-concentration factors obtained for Cu and Mn were 11 and 8, respectively. The relative standard deviations were 6.62% for Cu and 6.00% for Mn. The accuracy of the method was assessed from the recoveries of the analytes, ranging between 96.5 - 120% for Cu and 99 - 107% for Mn. Regarding the concentrations of metals in the samples of fresh coconut water, for Cu they were 11 - 22 µg L^{-1} and Mn of 13.9 - 16.8 µg L^{-1}, whereas in industrialized coconut water samples the concentrations for Cu were 40 - 44 µg L^{-1} and for Mn they were 8.0 - 17.6 µg L^{-1}.

Keywords: Coconut water, DLLME, metals, sample preparation, mixture design, Doehlert design

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema de microextração com gota suspensa, 1A. Microextração com gota suspensa por imersão direta e 1B. Microextração com gota suspensa por Headspace....14

Figura 2 – Sistema dos modos de extração utilizados em HF-LPME; 2A – Modo de extração bifásico; 2B - Modo de extração trifásico.. 17

Figura 3 - Diagrama completo demostrando as etapas de extração da DLLME realizada neste trabalho até a análise por FAAS. 19

Figura 4 – 4A - Fórmula estrutural do Br-PADAP; 4B - Complexo Cu(II)-Br-PADAP; 4C - Complexo Mn(II)-Br-PADAP. 24

Figura 5 - Representação gráfica de uma mistura ternária. 31

Figura 6 - Representação gráfica para os tipos de restrições em uma mistura ternária. (6A) Restrição com limite superior; (6B) Restrição com limite inferior; (6C) Combinação entre os limites, formando uma sub-região proveniente da região original 31

Figura 7 - Representação espacial de um sólido geométrico cubooctaedro no plano (A) cujas projeções geram modelo Doehlert de três variáveis e os três tipos de projeções possíveis geradas que correspondem a; projeção sob face quadrada (B); projeção sob face triangular (C) e projeção sob o vértice (D).. 33

Figura 8 - Sistema de digestão em placa aquecedora. 38

Figura 9 - Região experimental delimitada pelas restrições inferiores e superiores dos componentes da mistura estudada na microextração líquido-líquido dispersiva. 39

Figura 10 - Distribuição dos pontos experimentais da matriz Doehlert para otimização das variáveis de processo, com projeção sob face quadrada gerada para este trabalho. 41

Figura 11 - Estudo do solvente extrator (SE), solvente dispersor (SD) e agente complexante (AC) para determinação de Cu(II) por microextração líquido-líquido dispersiva. 43

Figura 12 - Estudo do solvente extrator (SE), solvente dispersor (SD) e agente complexante (AC) para determinação de Mn(II) por microextração líquido-líquido dispersiva. 43

Figura 13 - Seleção da quantidade de volume extrator para análise no FAAS para determinação de Cu^{2+}. 44

Figura 14 - Seleção da quantidade de volume extrator para análise no FAAS para determinação de Mn^{2+}. 44

Figura 15 - Gráficos de valores observados versus valores preditos para os diferentes modelos matemáticos ajustados à desejabilidade global calculada a partir dos dados gerados da aplicação do planejamento de misturas. 49

Figura 16 - Gráficos de resíduos para os diferentes modelos matemáticos ajustados à desejabilidade global calculada a partir dos dados gerados da aplicação do planejamento de misturas. 50

Figura 17 - Superfície de resposta gerada pelo modelo cúbico especial. 51

Figura 18 - Perfis de desejabilidades individuais e global. 51

Figura 19 - Gráficos de valores observados versus valores preditos e gráficos de resíduos para o modelo linear (A) e (B) para o modelo quadrático, para modelagem da extração do manganês por DLLME. 54

Figura 20 - Gráficos de valores observados versus valores preditos (A) para o modelo linear e (B) para o modelo quadrático e gráficos de resíduos (A) para o modelo linear e (B) para o modelo quadrático para modelagem da extração do cobre por extração líquido-líquido dispersiva. 55

Figura 21 - Superfícies de respostas obtidas pelo ajuste do modelo quadrático às respostas do manganês (A) e do cobre (B) na otimização da DLLME. 56

Figura 22 - Gráficos de valores observados versus valores preditos (A) e gráfico de resíduos para o modelo linear (B) do novo planejamento Doehlert para otimização da extração do cobre por DLLME. 58

Figura 23 - Gráficos de valores observados versus valores preditos (A) e gráfico de resíduos (B) para o modelo quadrático do novo planejamento Doehlert para otimização da extração do cobre por DLLME. 58

Figura 24 - Superfícies de resposta para o cobre em novo delineamento experimental 59

Figura 25 - Curvas analíticas (A) sem pré-concentração e (B) com pré-concentração usando a microextração líquido-líquido dispersiva para o cobre. 62

Figura 26 - Curvas analíticas (A) sem pré-concentração e (B) com pré-concentração usando a microextração líquido-líquido dispersiva para o manganês. 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas da água de coco da espécie Cocos nucifera Linnaeus (Variedade anã) em diferentes estágios de maturação. 7

Tabela 2 - Aplicações da DLLME com diferentes técnicas de detecção analítica. 26

Tabela 3 - Parâmetros operacionais do espectrômetro de absorção atômica com chama para a determinação de Cu e Mn. 35

Tabela 4 - Pseudocomponentes e componentes originais utilizados no planejamento de mistura com restrição..... 40

Tabela 5 - Matriz de Doehlert para o planejamento experimental. 41

Tabela 6 - Matriz experimental e resultado do planejamento de misturas empregado na otimização da microextração líquido-líquido dispersiva do cobre e do manganês. 47

Tabela 7 - Valores de p para a falta de ajuste obtidos após o ajuste de diferentes funções matemáticas. 48

Tabela 8 - Planejamento Doehlert aplicado à otimização das variáveis de processo da microextração líquido-líquido dispersiva e respostas em termos de absorvância. 52

Tabela 9 - Novo planejamento Dohelert para a otimização da extração do cobre por microextração líquido-líquido dispersiva. 57

Tabela 10 - Resumo das condições otimizadas com o planejamento de mistura com restrições e com a matriz Doehlert para aplicação da DLLME. 60

Tabela 11 - Linearidade e parâmetros das curvas analíticas para extração e pré-concentração de Cu^{2+} e Mn^{2+} 61

Tabela 12 - Limites de detecção, quantificação, desvio padrão relativo e fator de enriquecimento calculados para o método..... 65

Tabela 13 - Determinação de cobre e manganês (µg L^{-1}) em amostras de água coco (N = 3) usando a pré-concentração por microextração líquido-líquido dispersiva e determinação por FAAS. 67

Tabela 15 - Comparação entre o método de DLLME proposto neste trabalho, com outros métodos de extração e microextração reportados na literatura para cobre e manganês. 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva (Do inglês: dispersive liquid-liquid microextraction)

IL-DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico (Do inglês: Ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction)

HF-LPME - Microextracção em fase líquida de fibra oca; (Do inglês: Hollow fiber-based liquid phase microextraction)

SDME - Microextração com gota suspensa ou microextração em gota única (Do inglês: Single-drop microextraction)

DI-SDME - Microextração com gota suspensa por imersão direta (Do inglês: Direct immersion single-drop microextraction)

LLLME - Microextração líquido-líquido-liquído (Do inglês: Liquid-liquid-liquid microextraction)

IL - Líquido ionico (Do inglês: Ionic liquid)

LLE - Extração líquido-líquido; (Do inglês: Liquid–liquid extraction)

LPME - Microextração em fase líquida; (Do inglês: Liquid-phase microextraction)

SPE - Extração em fase sólida; (Do inglês: Solid phase extraction)

SPME - Microextração em fase sólida; (Do inglês: Solid phase microextraction)

SLM - Membrana líquida suportada (Do inglês: Supported Liquid Membrane)

FE - Fator de enriquecimento (Do inglês: Enrichment fator)

Br-PADAP - 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol

PAR - 4-(2-piridil)azoressorcinol

ACN - Água de coco natural

ACI - Água de coco industrializada

SD - Solvente dispersor

SE - Solvente extrator

VSD - Volume do solvente dispersor

VSE - Volume do solvente extrator

RSD - Desvio padrão relativo (Do inglês: Relative standard deviation)

F AAS - Espectrometria de absorção atômica com chama (Do inglês: Flame atomic absorption spectrometer)

GF AAS - Espectrometria de absorção atômica eletrotérmica com forno de grafite (Do inglês - Graphite Furnace Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry)

CE - Eletroforese capilar (Do inglês - Capillary Electrophoresis)

MS - Espectrometria de massas (Do inglês - Mass spectrometry)

GC - Cromatografia gasosa (Do inglês - Gas Chromatography)

HPLC - Cromatografia líquida de alto eficiência (Do inglês: High-performance Liquid Chromatography)

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO 1

2 - REVISÇÃO BIBLIOGRÁFICA 4

2.1 – Estudo da água de coco: características fundamentais 4

2.2 - Generalidade sobre o Cobre 8

2.3 - Generalidade sobre o Manganês 9

2.4 - Uso de métodos de microextrações na separação e pré-concentração de metais10

2.4.1 - Microextração em gota única (SDME) – aspectos gerais 12

2.4.2 - Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) – aspectos gerais 15

2.5 - Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) – Fundamentos e aplicações na pré-concentração de metais traços 17

2.5.1 - O tipo de solvente extrator 19

2.5.2 - O tipo da fase dispersora 21

2.5.3 - Ajuste do pH no desenvolvimento da DLLME 22

2.5.4 - Força iônica (adição de sais) 22

2.5.5 – Tempo de extração na DLLME 23

2.5.6 - Uso do Br-PADAP como agente complexante 23

2.5.7 – Aplicações da DLLME: Uma breve revisão 24

2.6 – Otimização da microextração líquido-líquido dispersivo com auxílio de ferramentas quimiométricas 29

2.6.1 - Planejamento de misturas com restrição 29

2.6.2 - Planejamento Doehlert 32

3 - OBJETIVOS 34

3.1 - Objetivo Geral 34

3.2 – Objetivos específicos 34

4 - PARTE EXPERIMENTAL 35

4.1 - Equipamentos 35

4.2 - Materiais 35

4.3 - Reagentes 36

4.4 - Métodos 36

4.4.1 - Preparo das soluções de cobre e manganês 36

4.4.2 - Preparo da solução tampão citrato-fosfato (pH 4,0) 37

4.4.3 - Preparo da solução tampão bórax-hidróxido de sódio (pH 9,5) 37

4.4.4 - Solução de Br-PADAP 37

4.4.5 - Pré-tratamento e coleta das amostras 37

4.5.6 - Procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para extração e pré-concentração de cobre e manganês em amostras de água de coco *in natura* e industrializada 38

4.6 – Etapas de otimização da DLLME 39

4.6.1 - Seleção do volume do solvente extrator, dispersor e reagente complexante 39

4.6.2 - Matriz de Doehlert 40

4.6.3 - Análise estatística 41

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 42

5.2 – Estudos preliminares: seleção do tipo de solvente extrator, dispersor e agente complexante 42

5.2 – Estudo do volume do solvente extrator para análise por FAAS 44

5.2.1 – Otimização das variáveis envolvidas na microextração líquido-líquido dispersiva usando o planejamento de misturas com restrições 45

5.3.2 - Planejamento Doehlert para otimização do pH, volume da solução tampão e volume da solução de NaCl 52

5.4 – Características analíticas da DLLME 60

5.4.1 – Linearidade 60

5.4.2 - Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ) 64

5.4.3 - Precisão 64

5.4.4 – Exatidão e aplicação da DLLME após a otimização para pré-concentração e extração de cobre e manganês em amostras reais..... 65

6 - CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS 70

REFERÊNCIAS..... 72

ANEXOS..... 84

1 – INTRODUÇÃO

A cocoicultura constitui-se como uma das principais culturas de planta perene do Brasil, fazendo parte não apenas do setor econômico, mas também do setor social, constituindo-se como uma das mais importantes fontes de renda para os pequenos e médios produtores de coco do país, devido não só apenas pela exploração da água de coco, mas também das diversas variabilidades de produtos e subprodutos que podem ser obtidos através do coqueiro [3].

A cultura do coqueiro, condiciona o Brasil a um patamar de destaque em termos de produção mundial. Atualmente o Brasil ocupa a quinta posição dos maiores produtores de coco do mundo, com 3,8% da produção mundial do fruto, entretanto, o Brasil possui a mais elevada produtividade de coco verde, comparada com os principais produtores, que são a Indonésia, Filipinas e Índia, respectivamente, que detêm um total de 72,8% da produção mundial [1].

O destaque em termos de produção vai para Região Nordeste, que é o maior produtor de coco do país, principalmente as regiões mais litorâneas, com 82,9% de área cultivada e 74,0% da produção nacional de coco, mas com relação ao consumo da água de coco, a Região Sudeste é a que mais consome esse líquido tão apreciado por muitos, com destaque para São Paulo, seguida do Nordeste [1].

Pode-se perceber, que a exploração da água de coco *in natura* tem se destacado no setor econômico, com grandes perspectivas para o crescimento das exportações nos próximos anos e também das importações deste produto, promovendo o crescimento das indústrias de envasamento, que tem disponibilizado a água de coco vigorosamente no varejo, principalmente nos supermercados, restaurantes e lanchonetes [1,5].

Diante disso, percebe-se que nos últimos anos houve um aumento expressivo do consumo da água de coco, este, pode estar associado ao crescimento da indústria fitness, que vem influenciando a população, na implementação de práticas e hábitos nutritivos mais saudáveis, sendo assim, a água de coco se apresenta como sendo uma excelente fonte nutritiva para tais fins, além de ostentar propriedades funcionais e sensórias superiores as da água natural.

Vale salientar, que a formação da água de coco, faz parte do fruto do coqueiro (*Cocos nucifera Linnaeus*) esta, por sua vez, é uma estratégia ecofisiológica do coqueiro, para o armazenamento de substâncias nutritivas como carboidratos, proteínas, lipídios,

vitaminas e sais minerais (Na, Ca, K, Mg, Fe, Zn, etc.), que servem de reserva energética para sobrevivência da espécie, durante seu desenvolvimento e em eventuais fenômenos ambientais, como escassez hídrica ou qualquer outro fenômeno atípico que possa influenciar de forma negativa a sua sobrevivência [2].

Esta propriedade ecofisiólogica do coqueiro, faz com que a água produzida pelo fruto, possua propriedades salutares únicas, como por exemplo no esporte, esta, é uma excelente fonte de reidratação natural, na biotecnologia serve como meio de cultura natural e como conservante de sêmen animal (caprino, ovino, suíno e aves), na medicina pode ser empregada como plasma sanguíneo, para tratamentos de emergência sem efeitos adversos e para tratamento de pacientes com cólera ou outros formas mais severas de gastrenterites, nestes dois últimos casos, a água de coco pode ser utilizada como fluído de reidratação intravenosa [4,5,6].

Diante desse aspecto e do crescente consumo da água de coco, desperta-se o interesse dos pesquisadores, para o desenvolvimento de metodologias, que possibilitem monitorar de maneira simples e eficiente, a composição elementar deste tipo de amostra, principalmente, se tratando do teor das espécies metálicas, presentes na mesma. Uma vez que, é sabido que em uma dieta bem equilibrada, alguns elementos traços, dentre eles o cobre e manganês, são essências para o funcionamento do metabolismo humano e de diversas espécies.

Vale destacar também, que a composição elementar, com relação aos níveis das espécies inorgânicas presentes na água de coco, além de assegurar a qualidade nutricional do fruto, podem também, fornecer informações importantes, sobre os níveis de contaminação do solo onde a planta estar sendo cultivado [3].

Entretanto, os níveis dos elementos traço geralmente são encontrados em pequenas quantidades em amostras alimentares e, a interferência que este tipo de matriz pode causar, dificulta a quantificação destes elementos, na maioria das técnicas analíticas disponíveis [35]. Sendo assim, para lidar com esses problemas, é necessário que a amostra passe por alguma(s) etapa(s) de tratamento antes das determinações, como extração e pré-concentração, esta etapa por sua vez, é sem dúvida o passo mais importante no processo analítico, porque a precisão e a exatidão do método analítico se baseiam amplamente nessa(s) etapa(s) [34,57].

Os métodos de microextrção em fase líquida, apresentam-se como sendo uma excelente alternativa para o tratamento de amostras aquosas, estes, tem se tornado tendências na química analítica, para o preparo das amostras, tornando-as compatíveis

com a técnica que será utilizada, bem como eliminar qualquer interferência durante as análises, obtendo como vantagem melhoria da qualidade dos resultados analíticos, ao mesmo tempo, que vem permitindo o desenvolvimento de novas tecnologias baseadas na miniaturização, simplificação e automação de todo o procedimento analítico, com foco nas atuais tendências da química analítica verde [57].

Atualmente, dentre os métodos miniaturizados mais difundidos na literatura, estão a microextação líquido-líquido dispersiva (DLLME, versão miniaturizada da extração líquido-líquido - LLE), microextração em fase sólida (SPME, versão miniaturizada extração em fase sólida - SPE), microextração com gota suspensa ou microextração em gota única (SDME) e microextração em fase líquida com fibra oca (HF - LPME).

Todos estes métodos, tem como objetivos, a diminuição e/ou substituição de solventes orgânicos tóxicos, diminuição dos custos das análises e dos resíduos, utilização de pequenas quantidades de amostras, eliminação dos efeitos da matriz, facilidade de operação, possibilidade de automação e o não comprometimento da seletividade durante as análises [32,33].

Portanto, este trabalho consiste no desenvolvimento de um método baseado na DLLME, para a determinação de cobre e manganês em amostras de água de coco *in natura* e industrializada e detecção por FAAS. No entanto, para o desenvolvimento de um método de microextração, se faz necessário otimizar as variáveis que afetam o desempenho das análises e para isso, aplicou-se métodos multivariados para otimização das variáveis do método proposto.

Para isso, utilizou-se o planejamento de mistura com restrição para três componentes, para otimizar as proporções entre solvente extrator, dispersor e o volume do agente complexante, estes, são responsáveis por promover as extrações dos metais. E para estabelecer de forma simultânea a melhor condição para realização das análises, aplicou-se a função de desejabilidade. Empregou-se também, a metodologia de superfície de resposta associada a matriz Doehlert, para otimização das variáveis de processo como pH, volume da solução do tampão e o volume da solução salina.

As características analíticas do método foram avaliadas a partir do limite de detecção e quantificação, linearidade das curvas analíticas, precisão mediante determinação de desvio padrão relativo e exatidão avaliada através dos testes de adição e recuperação. Esse método foi aplicado para determinação de cobre e manganês em amostras de água de coco, adquiridas em estabelecimentos comerciais e feiras livres do município de Jequié localizado no Estado da Bahia.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Estudo da água de coco: características fundamentais

O coqueiro é uma espécie de planta arbórea considerada como perene, do grupo das Monocotiledôneas da família da Arecaceae (família da palma). O gênero *Cocos* é constituído apenas pela espécie *Cocos nucifera Linnaeus*, da qual é composta por diversas variedades, entre as quais, duas delas se destacam como sendo as mais importantes (Em níveis de frutos e econômicos), para os setores socioeconômicos e agroindustriais, são as variedades: Typica (var. Gigante) e Nana (var. Anã), importância essa, decorrentes dos produtos que podem ser obtidos através dos seus frutos [3].

Os principais produtos resultantes destes frutos são: água de coco, óleo, ácido láurico, leite de coco, copra (albúmen seco ou endosperma sólido), farinha de coco e a fibra.

No Brasil, a variedade mais consumida em termo do fruto *in natura* e na agroindústria de água de coco é a anã, devido suas características sensoriais de sabor ser superior, comparado com o sabor da água de coco do coqueiro gigante, quando o uso do fruto *in natura* é na culinária (bolos e doces) e agroindústria (copra, farinha de coco, leite de coco, dentre outros), a variedade gigante se destaca consideravelmente quando comparada com a anã, sendo essa última comparação, provenientes de características de maior interesse agroeconômico, como precocidade, produção de frutos e copra [3,4]

A crescente popularidade e consumo da água de coco, é por esta ser uma excelente fonte de hidratação natural, se destacando também, por ser um excelente repositor de sais e eletrólitos nos casos de desidratação, devido aos altos teores de macronutrientes essenciais para o metabolismo do corpo humano como cálcio, magnésio, potássio e sódio, assim como micronutrientes também essenciais como manganês, cobre, alumínio e zinco [5].

Estas características, torna a água de coco um isotônico natural, atribuindo-lhe uma excelente eficácia na reidratação, após a práticas de exercícios físicos, sendo essa atribuição responsável pela popularidade e aumento do consumo da água de coco in natura, motivado pela inclusão e práticas de hábitos saudáveis no comportamento da população brasileira [6].

Entretanto, temos que destacar também que a qualidade do sabor da água de coco, quando comparado com água natural, a primeira é bem superior, seguido de suas

propriedades funcionais para a saúde, devido à presença de algumas citocininas, hormônios vegetais que desempenham papéis importantes em vários aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas e, com grande potencial nas aplicações médicas [7].

Estes hormônios assim como seus derivados, podem ser potencialmente usados para aplicações médicas, como a supressão do crescimento de tumores em mamíferos, impedindo coágulos sanguíneos e retardando o início do envelhecimento nas células da pele humana [7,8]. Assim, acredita-se que o consumo frequente de água de coco, possa proporcionar alguns efeitos de antienvelhecimento aos consumidores, além dos seus benefícios nutricionais, já citados anteriormente.

Portanto, chamamos a atenção, que as propriedades nutricionais, bem como os benefícios para saúde humana e as propriedades sensórias da água de coco, estão diretamente relacionadas com estágio de maturação do fruto, sendo este um indicador de qualidade relacionado à planta, ao fruto e às características químicas e sensoriais da água [9,10].

No processo de desenvolvimento do fruto até chegar ao ponto ideal de maturação, o fruto passa por dois estágios desde o início da inflorescência (parte da planta onde se localiza as flores): a pré-fertilização (polinização e fecundação da flor feminina), processo que leva em média de 8 a 28 dias depois da abertura da espata (bráctea responsável por proteger a flor do fruto durante seu desenvolvimento) para se findar [11].

Ainda de acordo os estudos de Rezende et al. (2002) [11], esse primeiro estágio varia de acordo a espécie cultivada, logo em seguida começa a pós-fertilização, onde começa os estágios de formação da água de coco e do albúmen (endosperma sólido).

A água de coco começa a se formar em pequenas quantidades na cavidade dentro do coco, o responsável por transportar os nutrientes (produzidos durante a fotossíntese) em forma de liquido para dentro dessa cavidade é o floema, o transporte tem início a partir do 2° mês após a abertura natural da inflorescência e atinge o volume máximo entre o 6° e 8° mês (300 a 500 mL, dependendo de como o fruto foi cultivado e das condições ambientais), este volume de água é o equivalente a 25% do peso do fruto neste intervalo de tempo [3,11].

É nesse período (6° ao 8° mês), que o ponto de maturação e as propriedades organolépticas da água encontra-se ideais para o consumo, devido a quantidade total de sólidos solúveis (TSS) ou Brix estarem em maiores quantidades [3,11].

O TSS/Brix é o indicativo da doçura da água de coco e este, encontra-se em maiores concentrações, a partir do 7° mês até o final do 8° ao início do 9° mês de idade do fruto, onde encontram-se dissolvidos as maiores quantidades de açúcares como glicose e frutoses, bem como maiores teores de proteínas e sais minerais e dissolvidos na água de coco [8,10,12].

A partir do 8° mês de maturação, o albúmen começa se formar em maiores quantidades no interior da cavidade do fruto e o conteúdo de açúcares, sais minerais e proteínas diminuem, consequentemente aumenta-se a formação de gorduras que estão correlacionados aos processos bioquímicos que envolve a absorção e evaporação da água, para formação do endosperma sólido, por ação do aumento da pressão interna do fruto, quando a pressão é liberada a água evapora e é parcialmente substituída pelo albúmen [6,13].

No 12° mês de maturação o fruto atinge a quantidade máxima do albúmen presente no fruto. No Brasil, o albúmen também é uma matéria-prima de grande interesse econômico e social, pois este é processado para a fabricação do óleo de coco, do leite de coco, coco ralado e na própria comercialização do coco seco.

De acordo com as pesquisas, em cada um dos estágios de maturação, podem-se identificar diferentes teores de sais minerais dissolvidos, bem como diferentes composições de proteínas, açúcares e diferentes pHs [6,8]. Na pesquisa de TAN et al. (2014) [8], os autores classificaram os estágios da água de coco em três tipos: água de coco imaturo (ACI, 5 a 6 meses), água de coco maduro (ACM, 7 a 8 meses) e água de coco excessivamente maduro (ACEM, 10 a 12 meses), cada um dos estágios com características físico-químicas diferentes.

Estes estágios de maturação da água de coco, confere algumas características importantes, principalmente no que diz respeito a quantidade de macro e micronutrientes essenciais dissolvidos na água de coco, teores de açúcares, pH e proteínas, etc. A Tabela 1, descreve melhor este comportamento de acordo as pesquisas encontradas na literatura.

Tabela 1 - Características físico-químicas da água de coco da espécie *Cocos nucifera Linnaeus* (Variedade anã) em diferentes estágios de maturação.

Propriedades físico-químicas	Estágio de maturação do coco			Referência
	6 a 7 meses	**8 a 9 meses**	**10 a 12 meses**	
TSS (Brix)	5,60 ± 0,14	6,15 ± 0,21	4,85 ± 0,17	[8]
pH	4.78 ± 0,13	5,34 ± 0,12	5,71 ± 0,10	[8]
Açúcares total				
Glicose (mg/mL)	35,43 ± 0,510	29,96 ± 0,243	19,06 ± 0,19	[8]
Frutose (mg/mL)	39,04 ± 0,824	32,52 ± 0,227	21,48 ± 0,21	[8]
Sacorese (mg/mL)	0,85 ± 0,010	6,36 ± 0,06	14,37 ± 0,25	[8]
MINERAIS				
Sódio (mg/100mL)	7,61 ± 0,041	5,60 ± 0,016	36,51 ± 0,020	[8]
Potássio (mg/100mL)	220,94 ± 0,320	274,32 ± 0,139	35,11 ± 0,133	[8]
Magnésio (mg/100mL)	22,03 ± 0,069	20,87 ± 0,023	31,65 ± 0,038	[8]
Cálcio (mg/100mL)	8,75 ± 0,045	15,19 ± 0,028	23,98 ± 0,054	[8]
Ferro (mg/100mL)	4,2 ± 0,30	4,6 ± 0,70	4,0 ± 0,40	[12]
Proteínas (mg/mL)	0,041 ± 0,007	0,042 ± 0,002	0,217 ± 0,018	[8]

Como podemos perceber, os macronutrientes (Na, Mg, Ca e Fe) estão em maiores quantidades no período de 10 a 12 meses, com exceção do potássio, no qual a quantidade diminui bruscamente nesse período, entretanto, o teor de potássio entre 8 a 9 mês são os maiores. Com relação aos micronutrientes Mn e Cu, de acordo com Santoso et al. [**Erro! Indicador não definido.**] as maiores concentrações encontram-se a partir do 10° mês de maturação do fruto.

Portanto, vale destacar que a presença de altos teores destes macronutrientes faz da água de coco uma alternativa atraente para o desenvolvimento de produtos fluidos de reidratação [8], pois esta, pode efetivamente substituir a perda de eletrólitos após exercícios físicos como citado anteriormente e até mesmo em casos mais extremos de desidratação.

Já os micronutrientes citados (cobre e manganês), estes são classificados como essenciais para o bom funcionamento do organismo humano, o que os tornam de grande interesse nesse estudo, com relação aos teores destes, na água de coco *in natura* e na água de coco industrializada.

Entretanto, a um fator negativo com relação a estes micronutrientes, que é, o excesso na ingestão destes os tornam potencialmente tóxicos para o organismo humano, enquanto que a deficiência dos mesmos, os relacionam com manifestações de algumas doenças e podem ocasionar a uma série de distúrbios no metabolismo humano.

2.2 - Generalidade sobre o Cobre

O cobre é um elemento químico que existe naturalmente nos ecossistemas, podendo ser encontrado em minérios como calcopirita ($CuFeS_2$), calcocita (Cu_2S), bornita (Cu_5FeS_4) etc., nos diversos sistemas aquáticos no estado de oxidação Cu^{+2} como hexaaquocomplexo e na sua forma metálica. Apresenta alta capacidade de adotar quatro estados de oxidação: Cu^0, Cu^+, Cu^{2+} e Cu^{3+} essas são consideradas espécies inorgânicas do cobre, destes vários estados de oxidação do cobre, os mais relevantes no seu papel biológico são o Cu^+ e Cu^{2+} [14,15].

Atualmente o cobre já está bem estabelecido como um oligoelemento ou micronutriente essencial para os diversos tipos de organismo existentes, sejam eles plantas, humano, leveduras ou animais. Este oligoelemento não é sintetizado pelo nosso organismo, de tal forma, que para uma dieta equilibrada, faz-se necessário a ingestão de alimentos que contenha o mesmo em sua composição, tais como, oleaginosas e carnes (principalmente o fígado), ou em alguns casos através de suplementos alimentares.

Essa versatilidade do cobre com relação aos seus estados de oxidação, atribui-lhe um papel fundamental como ligante nas metaloproteínas, funcionando também como metaloenzimas, sendo estas de maior interesse para o funcionamento de vários processos metabólicos do organismo humano.

Biologicamente falando, aproximadamente 30 enzimas demostram a utilização do cobre como cofator, sendo esta característica que torna o cobre insubstituível, pois só o cobre confere as propriedades redox necessárias nestas e nas diversas metaloenzimas das quais o cobre é um componente estrutural [16,17].

As metaloenzimas contendo cobre são particularmente importantes para o metabolismo do ferro e das catecolaminas, uma enzima essencial, que atuam como neurotransmissores, hormônios circulantes no controle do sistema nervoso central e autônomo, e está presente na glândula adrenal, onde é necessária para a produção de

epinefrina; síntese de hemoglobina, elastina e colágeno; e inativação de radicais livres [14,18].

A principal forma circulante do cobre é como cofator da ceruloplasmina, uma glicoproteína azul sintetizada no fígado contendo de seis a oito átomos de cobre por molécula [19]. Ainda não se sabe todas as funções metabólicas que essa proteína exerce no organismo humano; no entanto, são importantes para o metabolismo do ferro como ferroxidase, proteína responsável pelo transporte e fluxo do ferro armazenado nos tecidos para ser utilizado na síntese de hemoglobina e por fim, esta proteína também funciona como indicador do teor de cobre no organismo e diagnóstico da doença de WILSON [20,21].

É reportado na literatura que as principais disfunções causadas pelo cobre estão relacionadas pelo excesso ou ausência deste no organismo [18,22]. Estima-se que para uma dieta equilibrada e segura, o recomendável é a ingestão diária para adultos, varia de 2 a 5 mg/dia de cobre [23].

O excesso de cobre é excretado na bílis com pequenas quantidades encontradas na urina, a menos que haja danos renais ou se substâncias excretadas ao cobre, a deficiência de cobre leva à anemia microcítica hipocrômica com neutropenia acentuada, resistente à terapia com ferro [24]. Os estudos mostram que, cerca de 30% de todo o cobre ingerido por um indivíduo é absorvido no intestino ligado à albumina e transportado para o fígado e rins, onde é armazenado [25].

2.3 - Generalidade sobre o Manganês

O manganês é um metal amplamente distribuído na crosta terrestre, podendo ser encontrado, principalmente no solo, rochas, na maioria dos alimentos e nos ambientes aquáticos. É um metal que assume diversos estados de oxidação, variando do Mn^0 ao Mn^{+7}.

O Mn também faz parte dos oligoelementos ou micronutrientes essenciais para o metabolismo humano, desempenhando função tanto como ativador enzimático, como constituinte de metaloenzimas e sendo indispensável para sustentar funções e regulação apropriadas de inúmeros processos biológicos [26].

Vale destacar ainda, que das atividades vitais para o organismo, o Mn exerce ações antioxidantes, pois faz parte da enzima superóxido dismutase (MnSOD), esta é a mais

abundante no corpo humano, responsável por eliminar os radicais livres, sendo estes os principais responsáveis pelo envelhecimento [27].

No entanto, como citado anteriormente, o Mn como ativante enzimático, é responsável pela ativação da glicosiltransferase de extrema importância para os mucopolissacarídeos. Este é responsável pela formação do material gelatinoso ou lubrificante, que são dispersos durante a formação da cartilagem, dos ossos, tecidos conjuntivos, hormônios sexuais e também responsável pelo o crescimento cerebral e diversas funções neurais [28,29].

Sendo assim, temos que compreender que as principais patologias associadas ao Mn, estão relacionadas ao excesso deste metal no organismo [28]. Atualmente sabe-se que o excesso de Mn no organismo, leva a um quadro de intoxicação conhecido por manganismo, distúrbio neurodegenerativo que se assemelha a doença de Parkinson, este distúrbio provoca tremores permanentemente, dificuldades de coordenação motora e problemas de memória, que se não tratado no tempo certo, torna o quadro da doença irreversível [30, 31].

Já as consequências da ausência de Mn no organismo humano são raras, pois estas só se manifestam durante a formação e crescimento de ossos e durante desenvolvimento dos tecidos conjuntivos. As principais consequências da deficiência de Mn, é caracterizada por problemas de perda de peso, anormalidade nos ossos e pode interferir diretamente no crescimento [23,28].

Portanto em uma dieta balanceado o consumo nutricional sugerido para ingestão de Mn são 2,3 mg/dia para homens e 1,6 mg/dia para mulheres, já para crianças e adolescentes demandam em torno de 1,2 - 2,2 mg/dia [23,31]. Estas sugestões nutricionais podem ser encontradas em alimentos como oleaginosas incluindo a água de coco, suco de abacaxi e farinha de aveia preparada com água [23].

2.4 - Uso de métodos de microextrações na separação e pré-concentração de metais

O preparo e/ou tratamento de amostras é considerado a etapa mais delicada para os pesquisadores, principalmente na determinação e quantificação analítica de metais potencialmente tóxicos em matrizes complexas. Isso porque na maioria das vezes, estes, estão presentes em níveis traços nas amostras, fazendo-se necessário a separação,

extração e pré-concentração, promovendo algumas etapas adicionais, que dependendo do método escolhido podem ser tediosas e de difícil automação.

O desafio se torna maior ainda, quando as determinações são em amostra de alimentos ou amostras sólidas, visto que estas, em geral podem ser incompatíveis com a técnica analítica disponível, bem como conter espécies interferentes (estes afetam diretamente na identificação e a quantificação dos analitos de interesse), necessitando assim de uma etapa adicional para o pré-tratamento da amostra [32,33].

Existem uma grande variedade de procedimentos para extração e pré-concentração de metais traços, tanto em matrizes simples ou complexas, como a extração líquido-líquido (do inglês Liquid–Liquid Extraction - LLE), extração em fase sólida (do inglês Solid Phase Extraction - SPE), co-precipitação e extração em ponto nuvem (do inglês Cloud Point Extraction - CPE), sendo estes considerados como métodos tradicionais de pré-concentração e extração de metais e/ou compostos orgânicos [34, 35].

No entanto, os métodos mais tradicionais possuem algumas desvantagens como: exigem grandes quantidades de reagentes orgânicos, que na maioria são tóxicos (para a saúde humana e o meio ambiente) e o alto consumo destes reagentes é o principal responsáveis pelo custo do método, tornando-os economicamente caros, geram numerosos resíduos e requerem muito tempo [32,33,36].

Por fim e mais importante no atual cenário, no que diz respeito sobre a introdução da ideia da química analítica verde, dos princípios de desenvolvimento sustentável e à implementação desses princípios em laboratórios de pesquisas, estas técnicas tradicionais se tornaram ecologicamente inviáveis para aplicações rotineiras, impulsionando os pesquisadores à introdução de novas tecnologias para o desenvolvimento de métodos de extração e pré-concentração miniaturizados, tendo como objetivo a eliminação ou substituição dos solventes tóxicos utilizados nestes métodos, afim de reduzir drasticamente os resíduos gerados durante as pesquisas [37,38].

Tendo-se como objetivos o alcance destas perspectivas, tem aumentado o número de publicações com aplicações dos chamados métodos de microextação.

Estes, oferecem vantagens por serem de fácil automação na preparação das amostras, são métodos menos demorados se tratando das extrações, são mais eficientes, apresentam alto fator de enriquecimento, com menor custo, ou seja, exigem quantidades menores de solventes orgânicos, em escala de microlitros ou alternativas para eliminação destes solventes (principalmente os clorados, estes são os mais utilizados na maiorias dos métodos de extração e pré-concentração) e por fim, são métodos mais precisos, pois

possibilitam limites de quantificação (LQ) melhores quando comparado com os métodos tradicionais [32,35].

Sendo assim, a miniaturização dos métodos se tornou uma excelente alternativa para superar os problemas encontrados nas pesquisas em química analítica, com relação ao preparo de amostras [36].

Atualmente existem vários métodos de microextração amplamente difundidos, dentre eles, os que mais se destacam pela eficiência, rapidez, baixo custo, aplicabilidade com os diversos métodos instrumentais e por serem ambientalmente amigáveis, principalmente comparado com os métodos tradicionais, são;

- Microextração em fase sólida, SPME (do inglês Solid-Phase Microextraction) [39];
- Microextração com gota suspensa ou microextração em gota única, SDME (do inglês single-drop microextraction) [40]
- Microextração em fase líquida com fibra oca, HF - LPME (do inglês Hollow fiber liquid phase Microextraction [41]
- Microextração líquido-líquido dispersiva, DLLME (do inglês Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) [42,43].

O crescente número de publicações utilizando estes métodos comprovam as aplicabilidades dos mesmos em diversos tipos de amostras, biológica, alimentos, bebidas alcóolicas ou não, solos, efluentes e etc (ver tabela 2). Ratificando que no delineamento deste trabalho, serão abordados maiores detalhes sobre a técnica de DLLME e algumas considerações teóricas das demais técnicas de microextração em fase líquida citadas anteriormente, excetuando a SPME, esta pode ser encontrada com mais detalhes em artigos de revisão como de Souza-Silva et al. [44,45].

2.4.1 - Microextração em gota única (SDME) – aspectos gerais

Em 1996 Jeannot e Cantwell desenvolveram o método de microextração com gota suspensa ou microextração em gota única (SDME) testada com sucesso para extrair e pré-concentrar o composto 4-metilacetofenona (4-MAP) da água, utilizando apenas 8 µL de n-octano como extrator. Este, estava suspenso em uma haste no final de um tubo Teflon, imerso na solução aquosa sobre constante agitação por um certo período de tempo e ao final desse processo, o extrator foi analisado por cromatografia gasosa [40].

Esta técnica é uma das pioneiras relacionadas com tendência da miniaturização, pois apresentam vantagens como, baixo custo, simplicidade e atende alguns princípios da química analítica verde, como diminuição significativa de solventes tóxicos.

Nesta técnica, a extração pode ser realizada de duas formas, como apresentada na Figura 1, em sistema de duas fases (amostra/solvente extrator) e a outra é baseada em um sistema de três fases (amostra/headspace/microgota) [38].

Na primeira, o equilíbrio de distribuição do analito ocorre por partição entre duas fases, uma denominada aquosa (amostra) e a outra orgânica (solvente extrator). Logo, uma microgota de solvente imiscível em água é suspensa na ponta de uma microsseringa, que fica submersa na amostra aquosa, a qual é agitada continuamente por um período de tempo predeterminado até alcançar o equilíbrio, quando este é alcançado, a gota é retirada de volta para a seringa e imediatamente submetida à análise pelo método instrumental escolhido (Figura 1) [46,47].

Este modo de extração citado anteriormente é classificado como microextração com gota suspensa por imersão direta (do inglês direct immersion single-drop microextraction - DI-SDME) a qual ocorre entre duas fases (amostra/microgota). Um outro modo popular de extração é a microextração de gota única por headspace (do inglês Headspace Single-drop Microextraction – HS-SDME), ou extração indireta, este ocorre em um sistema de três fases (amostra/headspace/microgota). A figura 1 demostra melhor os dois tipos de SDME.

Na extração por HS-SDME a configuração da microgota (solvente extrator) é semelhante à da DI-SDME, a única diferença é que na HS-SDME o solvente extrator estar acima da amostra, no espaço denominado headspace, ou seja, não há contato direto entre a amostra e a fase extratora como na DI-SDME.

Sendo assim a HS-SDME é direcionada para extração de analitos voláteis e/ou semivoláteis, polares ou apolares. Os compostos extraídos devem volatilizar da fase aquosa (amostra) para o headspace, ou seja, a partição ocorre entre a amostra/headspace e posteriormente a transferência do analito do headspace para microgota (solvente extrator), enquanto que o método de DI-SDME é direcionado para extração de analitos não voláteis e/ou de baixar pressão de vapor [38,48].

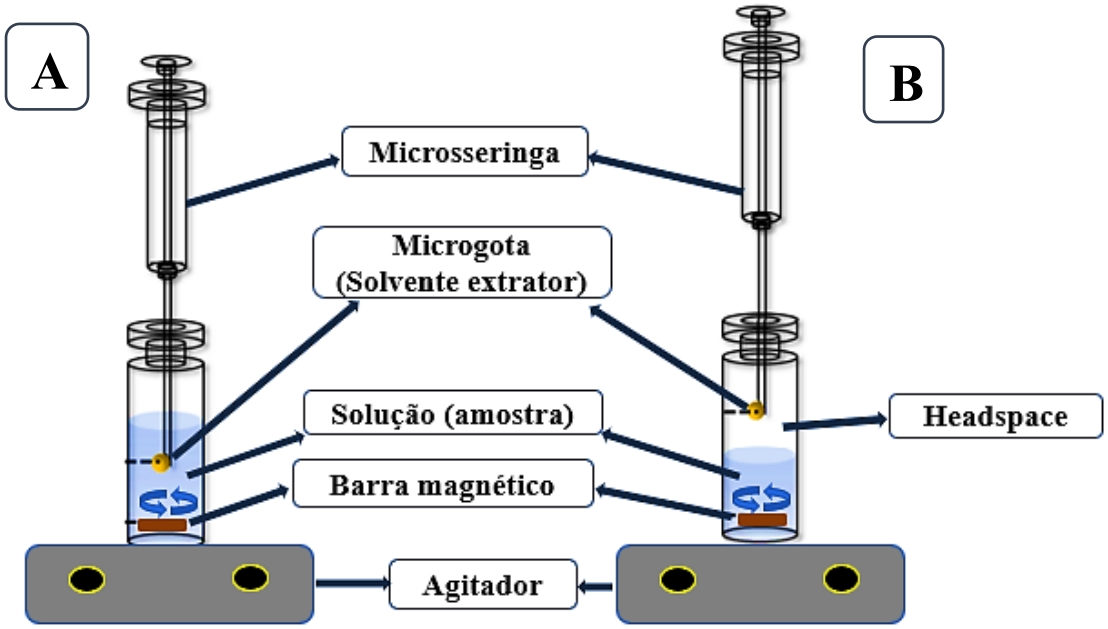
Na HS-SDME a configuração de extração confere-lhe algumas vantagens exclusivas, como a interferência da matriz ser desprezível, pois não há contato direto entre a fase extratora e a fase aquosa. Essa característica oferece maior estabilidade da gota, por esta não entrar em contato direto com a amostra, o que evita a solubilização na

solução aquosa, permitindo assim maior agitação, facilitando no desenvolvimento de um modelo teórico de cinética de transferência de massa entre as fases (amostra/headspace/microgota), obtendo assim altos fatores de enriquecimento e existe mais possibilidade de escolha da seleção dos solventes extratores disponíveis, pois este, inclui os solventes miscíveis em água [38,46].

O que tornar a SDME atraente, é sua ampla faixa de aplicabilidade com diversos tipos de matriz, desde as amostras biológicas mais complexas a amostras mais simples, para pré-concentração de íons inorgânicos e diversos compostos orgânicos.

Outra característica interessante da SDME, é compatibilidade com as diversas técnicas analíticas instrumentais como espectrometria de absorção atômica eletrotérmica com forno de grafite (GF AAS - Graphite Furnace Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry) [49], eletroforese capilar (CE - Capillary Electrophoresis) [50], espectrometria de absorção atômica com chama (flame atomic absorption spectrometry - FAAS), espectrometria de massas (MS - mass spectrometry), cromatografia gasosa (GC - Gas Chromatography), cromatografia líquida de alto eficiência (HPLC - High-performance Liquid Chromatography), sendo essas duas últimas com maiores índices de publicações quando comparadas com as demais técnicas [38, 48].

Figura 1 - Sistema de microextração com gota suspensa, 1A. Microextração com gota suspensa por imersão direta e 1B. Microextração com gota suspensa por Headspace. Fonte: Adaptado de Tang et al. [47].



Em contrapartida, algumas desvantagens da SDME inclui basicamente a instabilidade da gota devido a própria configuração do sistema de extração, tais como: variação no volume da microgota (limitando a temperatura) durante o processo de extração, bem como o deslocamento da gota (devido a agitação, ou até mesmo pela presença de partículas sólidas), pois para evitar que isso aconteça é necessário operações manuais minuciosas e bem elaboradas, afetando diretamente a precisão método e é um método de extração relativamente demorado [39,47,48]. Para superar estas limitações, alguns anos após, surge a microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME), que será aborda no próximo tópico.

2.4.2 - Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) – aspectos gerais

Após o surgimento da SDME, começaram a surgir novas técnicas de microextração que superassem as limitações presentes nesta (principalmente com relação a instabilidade da gota). Sendo assim, em 1999 Pedersen-Bjergaard e Rasmussen desenvolveram a técnica de HF-LPME para extração e pré-concentração de metanfetamina em urina e plasma humano com detecção por eletroforese capilar [41].

Apesar desta técnica ter sido desenvolvida quase que exclusivamente para determinação de compostos orgânicos, mais recentemente, despertou-se o interesse crescente na determinação de espécies inorgânicas através desta técnica, devido aos altos fatores de enriquecimento alcançados com a mesma [51].

LÓPEZ-GARCÍA et al. (2012) [51] utilizou a HF-LPME para determinação de mercúrio, com detecção por espectrometria de absorção atômica eletrotérmica, utilizando o 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), com o tolueno imobilizado na parede da membrana capilar porosa e hidrofóbica de polipropileno de fibra oca (configuração que forma a membrana líquida suportada, Supported Liquid Membrane - SLM), o interior da membrana (lúmen) foi preenchido com iodeto de amônio (solvente extrator), os autores obtiveram um fator de enriquecimento de 270, com limite de detecção do mercúrio de 0,06 g L^{-1}.

No mesmo ano, VERGEL et al. (2012) [52], desenvolveram um sistema trifásico de HF-LPME para a pré-concentração de níquel em águas naturais, antes da análise por

espectrometria de absorção atômica e sob condições ótimas, o novo sistema permitiu obter um fator de enriquecimento de 29,80.

Em ambos os trabalhos, a amostra (fase aquosa) não entra em contato direto com o solvente extrator (fase orgânica), e assim, a membrana SLM é responsável por formar uma barreira porosa entre as fases, permitido vigorosas taxas de agitação para acelerar a cinética da extração, sem preocupação com a instabilidade do solvente extrator (microgota), como citado anteriormente [53].

O processo da HF-LPME também é realizado de duas formas, a bifásica e a trifásica (Figura 2), na bifásica, o analito é extraído da solução aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico (fase receptora) imiscível na amostra, sendo que este também, está imobilizado nos poros da membrana oca, este processo forma a SLM e o lúmen é preenchido com o mesmo solvente orgânico (fase receptora) utilizado na SLM (por isso chama-se bifásica), logo, a microextração dos analitos na amostra ocorre por difusão passiva, da solução aquosa diretamente para o solvente orgânico no lúmen da fibra [53,54].

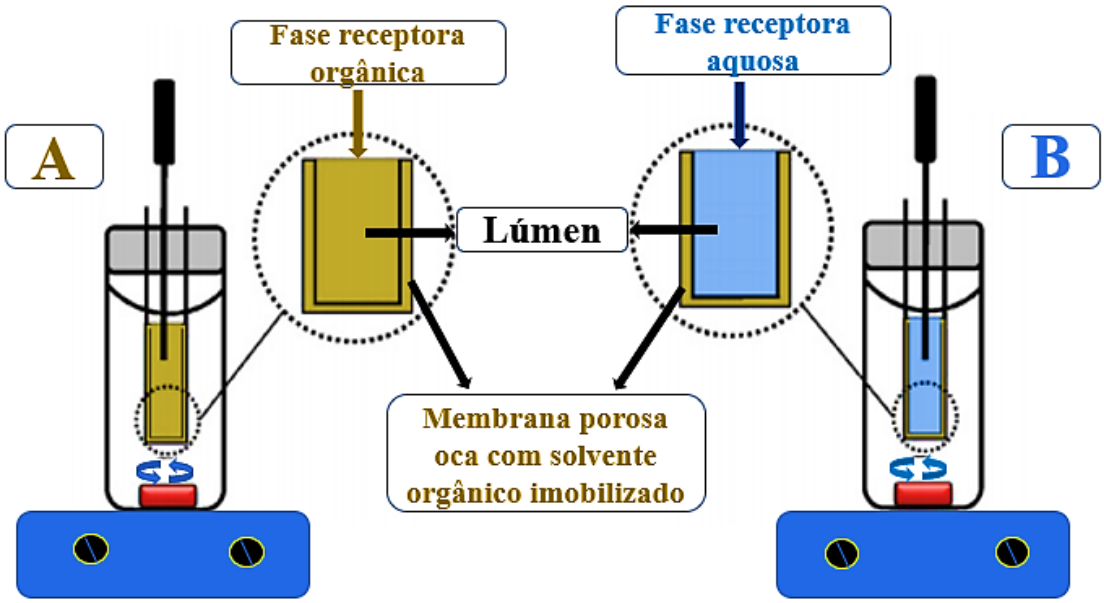
Para aumentar a eficiência neste processo de extração bifásico, os compostos ou analitos de interesse, devem ser fracamente e/ou altamente hidrofóbicos, contendo grupos ionizáveis ácido ou básico, sendo assim, a eficiência do método é dependente do pH da solução, o que torna o pH uma etapa crítica para o processo de extração, sendo que este deve ser cuidadosamente ajustado para que os analitos migrem para o lúmen [55,56].

Na HF-LPME trifásica, a extração do analito se processa de forma análoga a bifásica, a diferença é que a fase receptora (extrator) no lúmen é uma solução aquosa, já o solvente que forma a SLM é um solvente orgânico totalmente imiscível em ambas as fases. Assim, a SLM atua apenas como uma barreira hidrofóbica, impedindo o contato direto entre amostra e solvente extrator [54].

Estas três fases formam o que Pederseen-Bjergaard et al. inicialmente chamaram de microextração líquido-líquido-liquído (do inglês, liquid-liquid-liquid microextraction - LLLME) [41]. Para melhor visualização dos modos de extração ver Figura 2.

Em ambos os processos de extração, o extrato obtido ao final do equilíbrio é recolhido com o auxílio de uma microssiringa/micropipeta e analisado pela técnica instrumental apropriada.

Figura 2 – Sistema dos modos de extração utilizados em HF-LPME; 2A – Modo de extração bifásico; 2B - Modo de extração trifásico. Fonte: adaptado de Hamadi et al. [52].



A HF-LPME é de baixo custo, devido à natureza da fibra ser descartável em cada unidade de extração, eliminando a possibilidade de efeito de memória ou "carry-over". Em comparação com outras técnicas de microextração que utilizam membranas, consegue-se altos fatores de enriquecimento, seletividade e aplicações em diversos tipos de matriz [56]. O fato de a fibra ser descartável acaba se tornando uma desvantagem da técnica seguida de difícil automação da mesma.

2.5 - Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) – Fundamentos e aplicações na pré-concentração de metais traços

Sem dúvidas a LPME foi um avanço significativo para as técnicas laboratoriais miniaturizadas nas diversas áreas de pesquisas, apresentando maior rapidez, baixo custo, consumo insignificante de solventes orgânicos, o que significa um avanço, ainda que estes sejam tóxicos, tornando-a uma alternativa melhor para práticas ambientalmente responsáveis [54,57].

Dentre todas estas técnicas de pré-concentração/extração, a que mais se destaca atualmente é a DLLME proposta por Rezaee e colaboradores [42], devido sua versatilidade e alta capacidade de extração e pré-concentração comprovada por diversos trabalhos que utilizaram a DLLME como método de aplicação (Tabela 2), principalmente

se tratando do tempo de extração, da simplicidade do método, baixo custo e obtenção de excelentes fatores de enriquecimento [57,58].

A DLLME é baseada em um sistema ternário semelhante à LLE, mas ao contrário da LLE, a DLLME consome quantidade insignificantes de solvente orgânicas (microlitros) e necessita de pequenas quantidades de amostra, sem que haja interferência na alta eficiência de extração e pré-concentração e a extração ocorre em apenas uma etapa, diferente das sucessivas extrações que ocorrem na LLE [57,58].

O processo de aplicação da DLLME, envolve basicamente duas etapas: na primeira, uma mistura pré-estabelecida entre um solvente extrator (fase orgânica) e um solvente dispersor (miscível na fase orgânica e na amostra) é adicionada em uma solução aquosa (amostra), em seguida esse sistema ternário é submetido a segunda etapa, que é a agitação, podendo esta ser, manual (esta foi utilizada no presente trabalho), vórtex [59] e ultrassom [60].

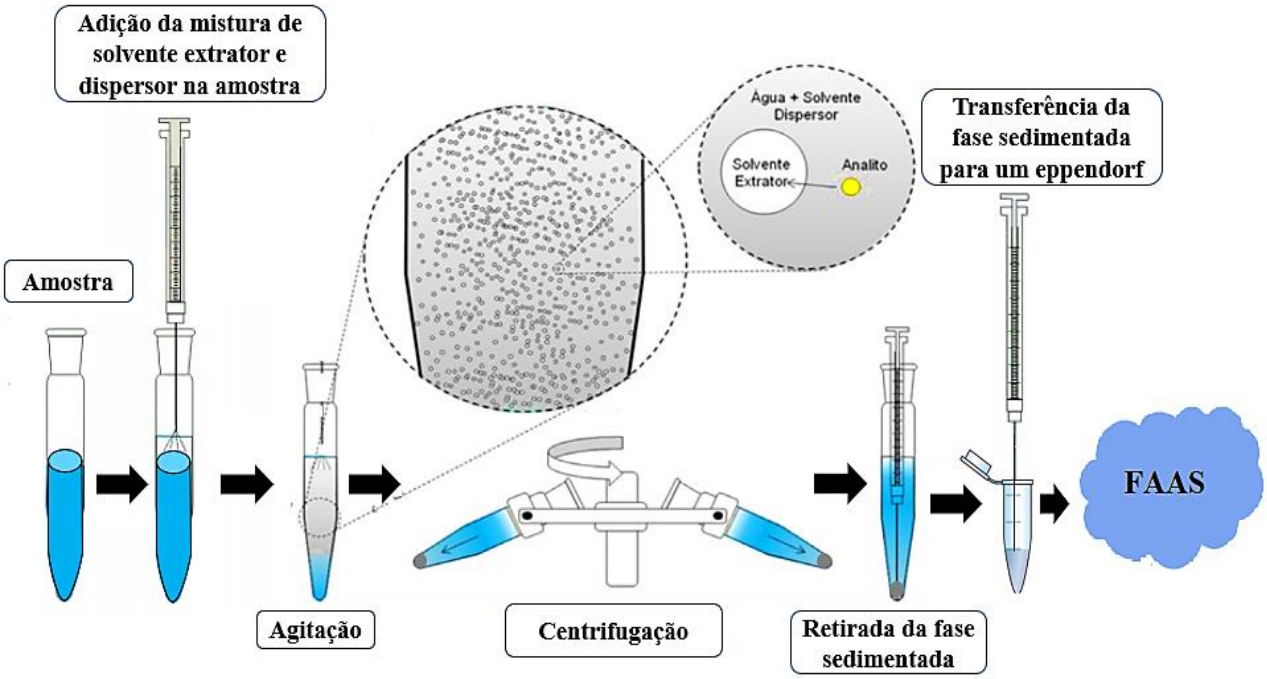
Esta segunda etapa é responsável por aumentar a dispersão do solvente orgânico na amostra em forma de pequenas microgotículas, formando uma solução turva (indicativo que a dispersão ocorreu como o esperado) e é neste instante que ocorre a partição dos analitos (Figura 3).

Este processo aumenta significativamente a área superficial entre a amostra e o solvente extrator, aumentando também o estado de equilíbrio que é alcançado rapidamente entre as fases analito/extrator. Isto reduz consideravelmente o tempo de extração e consequentemente aumenta a eficiência da extração por DLLME, sendo estas características as maiores vantagens da mesma [61,58].

Após as etapas citadas anteriormente, a amostra é então submetida a centrifugação para separação das fases, ao final da centrifugação o solvente extrator que estava disperso na amostra, sedimenta no fundo do tubo cônico. Esta fase sedimentada (apenas alguns microlitros) que contém os analitos de interesse é recolhido com ajuda de uma micropipeta/microsseringa e então submetida a análise (Figura 3).

No entanto, para obtenção de melhores resultados na extração utilizando a DLLME, é necessário estudar e otimizar alguns parâmetros que influência diretamente na eficiência do método como: volume e o tipo de solvente extrator (SE); volume e o tipo de solvente dispersor (SD); volume/concentração e o tipo de complexante; pH; volume da solução do tampão e adição de sal [42,58].

Figura 3 - Diagrama completo demostrando as etapas de extração da DLLME realizada neste trabalho até a análise por FAAS, adaptado de Martins et al. [66].



2.5.1 - O tipo de solvente extrator

Nos primeiros anos após a introdução da DLLME, os principais solventes extratores utilizados durante o processo de extração foram os solventes clorados como tetracloreto de carbono (CCl_4) [62, 63], diclometano (CH_2Cl_2) [64], tetracloretileno (C_2Cl_4) [65], clorobenzeno (C_6H_5Cl) [66,67] e clorofórmio ($CHCl_3$).

Estes solventes obedecem as condições importantes que um solvente extrator possui para aplicação da DLLME convencional, tais como, alta densidade comparada com a densidade da solução aquosa, pressão de vapor relativamente baixa e temperatura de ebulição relativamente alta, para evitar perdas significativas da fase orgânica (visto que este é o principal responsável pelo fator de enriquecimento durante o processo de extração), imiscibilidade na solução aquosa [68].

Essas características permite uma boa separação das fases após a dispersão em forma de microgotas ao adicionar o solvente dispersor, adaptabilidade a diversas técnicas analíticas e apresentam ótima eficiência de extração [32].

No entanto, os estudos encontrados na literatura, apontam diversas mudanças que têm sido propostas na DLLME, desde a sua primeira aplicação, principalmente no que diz respeito ao tipo de solvente extrator utilizado, como por exemplo, com relação a densidade.

Existem algumas aplicações com solventes menos densos que a solução aquosa, o uso deste, foi desenvolvido por Chen et al. e Guo et al. [69, 70], propondo a microextração líquido-líquido dispersiva terminada com solvente de extração de baixa densidade (do inglês Low-density Extraction Solvent-based Solvent Terminated Dispersive Liquid–Liquid Microextraction – ST-DLLME), utilizando solventes como n-hexano, tolueno, ciclo-hexano, 1-octanol como fase extratora para pré-concentração de pesticidas em águas.

O uso destes solventes, tem como vantagem de serem menos tóxicos (ou na maioria das vezes atóxicos) comparado com os solventes clorados, não necessitam da etapa de centrifugação, tornando-o mais rápido que a DLLME convencional. Por outro lado, o emprego de solventes menos densos que a solução aquosa, requer adaptações no procedimento de extração originalmente proposto da ST-DLLME, visto que neste caso a fase orgânica será o sobrenadante o que torna a recuperação trabalhoso [69].

Uma outra proposta interessante para superar o uso de solvente tóxicos utilizados na DLLME tradicional, são as aplicações dos líquidos iônicos (do inglês Ionic liquids – IL) como fase extratora. A aplicação da DLLME baseada em líquido iônico (do inglês ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction - IL-DLLME), tem se tornado cada vez mais frequente em química analítica devido a versatilidade relacionadas as suas propriedades físico-químicas. O modo de extração da IL-DLLME é semelhante à DLLME, diferindo praticamente com solvente extrator, pois este, é geralmente atóxico na IL-DLLME.

Os IL são solventes iônicos não moleculares, compostos por cátions orgânicos e diversas espécies de ânions, com propriedades químicas e físicas exclusivas, tornando-os ambientalmente amigáveis, devido à pressão de vapor desprezível em temperatura ambiente, alta estabilidade térmica (mesmo em altas temperaturas), líquidos não inflamáveis, boa capacidade de extração para vários compostos orgânicos, metálicos como complexos neutros ou carregados, viscosidade e miscibilidade ajustáveis com água e solventes orgânicos, resultando na capacidade para solubilizar compostos orgânicos ou iônicos [71,72].

Com relação a escolha do volume do solvente extrator (VSE), este, afeta diretamente o fator de enriquecimento, bem como sua escolha também depende da seleção do volume do solvente dispersor (VSD), devido ao aumento da solubilidade entre extrator/dispersor. Por isso, o volume ideal depende de algumas tentativas que devem ser feitas para definir, o volume exato da fase sedimentada, que será obtida usando um volume desejado do SD. A escolha de ambos os volumes, serão abordados durante a discursão dos resultados.

2.5.2 - O tipo da fase dispersora

A escolha do solvente dispersor na DLLME tradicional depende exclusivamente da sua solubilidade nas duas fases imiscíveis (solução aquosa/fase extratora), sendo assim, os solventes dispersores mais utilizados são acetona [42,62,64], metanol [73], acetonitrila e etanol [74], pois todos eles são miscíveis em água e em compostos orgânicos.

O solvente dispersor desempenha um papel importante na DLLME, visto que este é responsável pelo grau de dispersão do solvente extrator na fase aquosa, ou seja, o dispersor deve proporcionar: o aumento superficial infinitamente grande entre a solução aquosa/fase extrator, devido sua solubilidade em ambas as fases como citado anteriormente e isso significa que o SD também determina a eficiência de extração [58, 68].

Portanto, variações no seu volume influência diretamente a formação das microgotas e consequentemente variações no volume da fase sedimentada, afetando diretamente no fator de enriquecimento [57].

Logo, um aumento indesejado no volume do solvente dispersor, pode aumentar a solubilidade do solvente extrator na solução aquosa (amostra) e consequentemente diminuição no fator de enriquecimento, o inverso também ocorre. Baixos volumes do solvente dispersor aumenta o volume da fase sedimentada, o que pode significar que não ocorreu a dispersão adequada do solvente extrator, ou, não houve o turvamento da solução (indicativo da formação de infinitas microgotas), indicando que o processo de extração foi incompleto [58,68].

Recentemente alguns trabalhos publicados demostraram algumas adaptações no modo de dispersar o solvente extrator na amostra, sem o uso de um solvente dispersor,

usando apenas ondas ultrassônicas e/ou vórtice como forma de dispersão. Esse novo modelo é chamado de microextração líquido-líquido com dispersão assistida por agitação em vortex e ultrassom (do inglês ultrasound-vortex-assisted dispersive liquid–liquid microextraction - USVADLLME) [75,76].

Nesta técnica (USVADLLME), a agitação em vortex e radiação ultrassônica fornece energia suficiente para obter uma fase extratora finamente dispersa na amostra, aumentando a superfície de contato entre analito e a fase extratora e consequentemente aumenta a partição dos compostos de interesse para o solvente extrator [75].

Esta técnica de agitação melhora a precisão das medidas e aumenta a eficiência da extração, pois proporcionar uma dispersão mais homogênea quando comparada com agitação manual, bem como, pode suprimir a utilização do solvente dispersor, o que resolve o problema da solubilização do solvente extrator na amostra pela presença deste solvente. No entanto, a USVADLLME demanda mais tempo e etapas comparados com a DLLME tradicional [75].

2.5.3 - Ajuste do pH no desenvolvimento da DLLME

O pH é um parâmetro de extrema importância para todos os métodos de extração, principalmente se tratando da pré-concentração de íons metálicos em soluções aquosas, visto que a eficiência de extração e complexação está intimamente relacionada ao pH do sistema [74]. O ajuste do pH permite que os analitos permaneçam na sua forma neutra, diminuído sua solubilidade na solução aquosa e consequentemente aumenta sua afinidade com o solvente extrator [68].

2.5.4 - Força iônica (adição de sais)

A eficiência de extração na DLLME também depende da força iônica do meio, uma vez que, com a adição de sais altamente solúveis no sistema como NaCl, $CaCl_2$ e $AlCl_3$, estes se dissociam/hidrolisam, formando ânions e cátions e com isso, a água forma esfera de hidratação ao redor destes íons, reduzindo a disponibilidade de água para solvatar as moléculas do analito de interesse na fase aquosa, diminuindo a solubilidade dos analitos na fase aquosa e favorecendo a partição destes para fase extratora, efeito conhecido como *salting out* [33,68].

No entanto, deve-se ter o cuidado durante a otimização desse parâmetro, pois este efeito é ruim quando o analito é polar, visto que estes podem participar das interações eletrostáticas com os íons do sal em solução e como resultado, reduz capacidade de extração do SE [77]. A adição de sal também pode influência no volume de fase sedimentada, devido a redução da solubilidade do SE na amostra, o que pode ocasionar o aumento do volume da fase sedimentada e este afeta de forma negativa o fator de enriquecimento [32].

2.5.5 – Tempo de extração na DLLME

A maior vantagem da DLLME é exatamente o tempo de extração. Este é extremamente rápido e o responsável por isso são as microgotas finamente dispersas na solução aquosa. Estas fornecem uma superfície de contato infinitamente grande entre o solvente extrator e a amostra, fazendo com a transferência do analito da solução aquosa para o solvente extrator seja muito rápida, sendo assim, o equilíbrio de partição dos analitos entre solução aquosa/solvente extrator é atingido rapidamente [32,33,56].

Portanto, o tempo de extração pode ser definido como o intervalo entre a adição da mistura de solvente extrator e solvente dispersor na amostra, seguido da agitação (formação da solução turva/microgota), antes da centrifugação [54]. As pesquisas mostram que o tempo de extração tem pouco efeito sobre a eficiência de extração na DLLME.

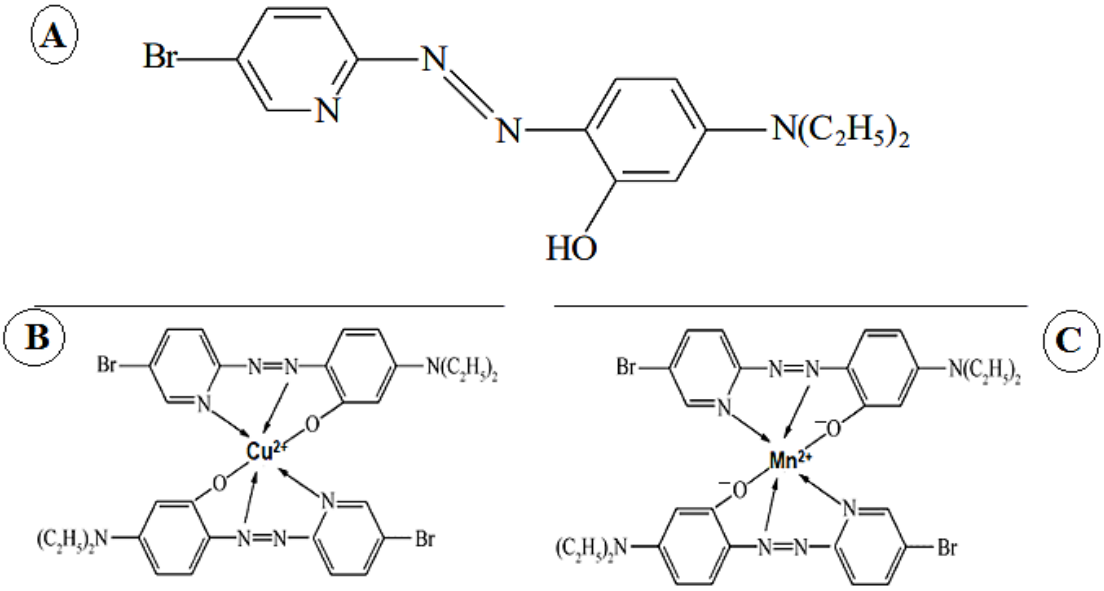
2.5.6 - Uso do Br-PADAP como agente complexante

Quando se trata da extração e quantificação de metais traços, esta, na maioria das vezes, só é possível com o uso de agentes complexantes adequados, que ao se ligarem com os íons metálicos, formarão complexos ou quelatos estáveis para que possam ser extraídos da fase aquosa para o pequeno volume do solvente extrator [78]. Sendo assim o uso do (Br-PADAP) em procedimentos de microextração se apresentam como uma excelente escolha, devido a este formar complexos altamente estáveis e sensíveis com diversos metais (Figura 4) [79].

O 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(dietilamino)-fenol (Br-PADAP) é um corante sólido laranja derivado do reagente 4-(2-piridil)azoressorcinol (PAR) possuindo as mesmas estruturas quelantes [80].

Os complexos metálicos formados com estes reagente não são solúveis em água, porém, são altamente solúveis em solventes orgânicos e é essa característica que torna o Br-PADAP um excelente agente complexante para ser usado na DLLME tradicional, devido à baixa solubilidade dos complexos formados na presença do Br-PADAP, fazendo com que a partição destes Metal-Br-PADAP/fase extratora aumente. Outro fator importante, é que a determinação dos complexos metálicos formados com o Br-PADAP são duas vezes mais sensíveis quando comparado com os complexos do PAR [79,80].

Figura 4 – 4A - Fórmula estrutural do Br-PADAP; 4B - Complexo Cu(II)-Br-PADAP; 4C - Complexo Mn(II)-Br-PADAP.



2.5.7 – Aplicações da DLLME: Uma breve revisão

A DLLME é uma técnica poderosa de pré-concentração, por apresentar numerosas vantagens frente as técnicas convencionais de extração e pré-concentração (como por exemplo LLE e SPE). Após seu surgimento, os métodos tradicionais de extração foram praticamente abandonados e atualmente a DLLME e suas diversas formas estão presentes nas distintas áreas de pesquisa, sejam biológicas, medicina, farmacêutica e química nos diferentes campos de atuação.

As diversas aplicabilidades e modificações encontradas na literatura, confirmam o potencial da DLLME comparada com outras técnicas de extração, principalmente, por esta superar as principais dificuldades encontradas nos métodos convencionais de tratamento de amostras, seguida da versatilidade de adaptação com as distintas técnicas analíticas de detecção.

Na Tabela 2 estão resumidas algumas aplicações encontradas na literatura, para extração e pré-concentração de espécies inorgânicas em diferentes matrizes [81-106].

Tabela 2 - Aplicações da DLLME com diferentes técnicas de detecção analítica.

Analito	Amostra	LD	FE	Técnica de Microextração	Técnica Analítica	Ref.
Cu(II)	Água	0,03 µg L^{-1}	312	DLLME	GFAAS	[81]
Te(IV) **Te(VI)**	Água	0,004 ng mL^{-1} 0,033 pg	125	DLLME	ETAAS	[82]
Pb(II)	Água	0,95 ng L^{-1}	20	DLLME	AFS	[83]
Pd(II)	Água	0,007 µg L^{-1}	231	DLLME	ETAAS	[84]
Pb(II) **Cu(II)**	Água	1,2 0,12 (µg L^{-1})	187 310	DLLME	FAAS	[85]
Mn(II) **Mn(VII)**	Chá	0,26 1,86 (ng mL^{-1})	20	IL-DLLME	FAAS	[86]
Arsênio total	Óleo comestível	0.03 ng g^{-1}	--	DLLME	ETAAS	[87]
Cd(II)	Água	0,06 µg L^{-1}	35	IL-DLLME	FAAS	[88]
Cr(III) e Cr(VI)	Água	0,05 µg L^{-1}	159	IP-SA-DLLME	FO-LADS	[89]
Cd(II) **Pb(II)** **Ni(II)** **Cu(II)** **Co(II)**	Frutos do mar (camarão, mexilhão, baixo, tainha)	0,03 0,11 0,12 0,18 0,12 (µg L^{-1})	16 34 20 34 12	DLLME	ICP-OES	[90]

Analito	Amostra	LD	FE	Técnica de Microextração	Técnica Analítica	Ref.
Cd	Água potável e bebida alcoólica	0,8	--	DLLME	ICP-OES	[91]
Ni		1,1				
Zn		1,7				
Pb		2,1				
Co		3,3 (µg L^{-1})				
U	Água	0,26 µg L^{-1}	117	IL-DLLME	Espectrofotômetro	[92]
Tl(III)	Água e Espinafre	0,03 µg L^{-1}	112	DLLME	ETAAS	[93]
Cu(II)	Cabelo	0,11 µg L^{-1}	60	SM-DLLME	FAAS	[94]
Ag	Água de Lago	0,3	58	DLLME	ICP-QMS	[95]
Pd		0,05	51			
Cd		0,1	65			
Ta		0,1	27			
Re		0,05	59			
Os		0,1	55			
Ir		0,08	49			
Pt		0,04	75			
		(ng L^{-1})				
Cu	Água	0,062	40	LT-DLLME	ICP-OES	[96]
Cr		0,53	36			
Cd		0,046	34			
Ni		0,042	38			
Mn		0,37	40			
Pb		0,33	39			
		(µg L^{-1})				

Analito	Amostra	LD	FE	Técnica de Microextração	Técnica Analítica	Ref.
Cu(II)	Farinha, Arroz e água	0,93µg L^{-1}	20	DLLME-SFO	FAAS	[97]
Cd	Água e Sedimento	0,23 µg L^{-1}	14	USADLLME	FAAS	[98]
Cd **Pb**	Refrigerante	0,006 0,072 (ng L^{-1})	--	DLLME	GFAAS	[99]
Sn **Sb**	Suco de frutas e Refrigerante	0,0025 0,0012 (µg L^{-1})	250 275	UA-IL-DLLME	ICP OES	[100]
Al(III) **Cr(VI)**	Folhas de Chá Tomate, Pimenta Cogumelo	0,02 0,05 (µg L^{-1})	95 135	VA-IL-DLLME	FAAS	[101]
Fe	Água, Banana Cenoura	5,0 µg L^{-1}	22	DLLME	UV-VIS	[102]
Cd(II) **Cu(II)** **Pb(II)**	Leite	0,38 0,42 0,40 (µg L^{-1})	--	DES-DLLME	FAAS	[103]
Ni	Chocolate	0,1 mg kg^{-1}	17	PV-IS-DLLME	FAAS	[104]
Cd(II) **Pg(II)** **Hg(II)**	Óleo	0,01-0,010-03 (µg kg^{-1})	157 172 114	DLLME−SDES	GFAAS	[105]
Mo	Carne e pasto bovino	0,03 µg L^{-1}	200	DLLME	ETAAS	[106]

2.6 – Otimização da microextração líquido-líquido dispersivo com auxílio de ferramentas quimiométricas

As ferramentas de otimização quimiométricas multivariadas têm ganhado a atenção dos pesquisadores, devido suas potencialidades em avaliar os efeitos das interações entre as variáveis e seus respectivos níveis, permitindo que estas sejam otimizadas simultaneamente [116].

Além disso, estas ferramentas apresentam vantagens como redução do número de experimento, sem afetar a qualidade dos resultados e consequentemente, redução do consumo de reagentes e tempo. Diferente dos tradicionais métodos de otimização univariado, onde a otimização ocorre pelo monitoramento de um fator por vez, para avaliar a sua influência sobre a resposta experimental [114].

O desenvolvimento de métodos para pré-concentração de cobre e manganês, usando microextração líquido-líquido dispersiva e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), necessita que as variáveis que afetam seu desempenho sejam otimizadas.

Para isto, a utilização dos métodos de otimização multivariada apresenta-se como sendo uma excelente alternativa, devido as características citadas anteriormente. Dessa forma, duas ferramentas de otimização multivariada podem fornecer as melhores condições para pré-concentração destes metais, sendo (1) o planejamento de misturas com restrições e (2) a metodologia de superfícies de respostas associada à matriz de Doehlert, estas foram empregados para encontrar os valores ótimos das variáveis estudadas, no desenvolvimento da DLLME realizada neste trabalho.

2.6.1 - Planejamento de misturas com restrição

O planejamento de misturas apresenta-se como uma excelente alternativa na busca por condições ideais para um sistema de multicomponentes, visto que, todos os componentes de uma mistura são interdependentes e para isso devemos lidar com algumas restrições, que são implícitas para formação de uma mistura ternária. Sendo assim, o somatório de todos os componentes deve ser igual a 1 (correspondente a 100%), como mostra a equação 1, sendo X_i, as variáveis que representam as proporções de k componentes da mistura [107].

$$\sum_{i=1}^{k} X_i = 1 = 100\%$$

Com isso, temos que levar em consideração que os componentes de uma mistura, não podem ser variados independentemente, visto que, quando ocorre a alteração na proporção de um componente (variável/volume), haverá também alterações nas proporções dos demais componentes, logo, as misturas são sistemas cujas propriedades dependem exclusivamente das proporções relativas dos seus componentes (variáveis e seus níveis) e não do tipo ou de suas concentrações [108,109,110].

Portanto, sempre que modificarmos as proporções de um componente qualquer em uma mistura ternária, as novas proporções deverão obedecer às restrições impostas pela equação 1 ($X_1 + X_2 + X_3 = 1$), que geometricamente é definida por um triângulo equilátero e está representado na Figura 5, onde os pontos pretos localizados nos vértices correspondem aos componentes puros, os pontos amarelos nas laterais correspondem às interações das misturas binárias e os pontos vermelhos no interior do triângulo representam possíveis interações de uma mistura ternária [111,113].

O planejamento de mistura com restrição gerado nesse trabalho, foi por meio do uso de pseudocomponentes, estes, são definidos em função dos componentes originais e dos seus limites (inferior ou superior) ou uma combinação entre eles [112].

O uso de pseudocomponentes, ocorre quando são estabelecidas restrições adicionais entre os limites inferiores e/ou superiores, para formação das proporções dos componentes em uma mistura, de forma a delimitar um novo campo experimental e evitar regiões impossíveis ou difíceis de trabalhar [112]. Com isso, a região delimitada para experimentação pode ser reduzida a uma sub-região da região original e assim podemos redefinir novas coordenadas da sub-região, afim de estabelecer restrições nas proporções de alguns dos componentes, dando origem a um novo planejamento que adequa-se a sua aplicação na prática (Figura 6) [112,113].

No entanto, com este novo planejamento, surge também, novos componentes puros, mas estes componentes não são na realidade puros, mas sim, componentes do novo domínio experimental e por essa razão eles são chamados de pseudocomponentes. Com o uso destes, torna-se mais fácil planejar o experimento e ajustar o modelo devido as restrições que são impostas aos componentes para formação de uma mistura com três componentes [116].

Figura 5 - Representação gráfica de uma mistura ternária. Fonte: Adaptado de LEARDI [113].

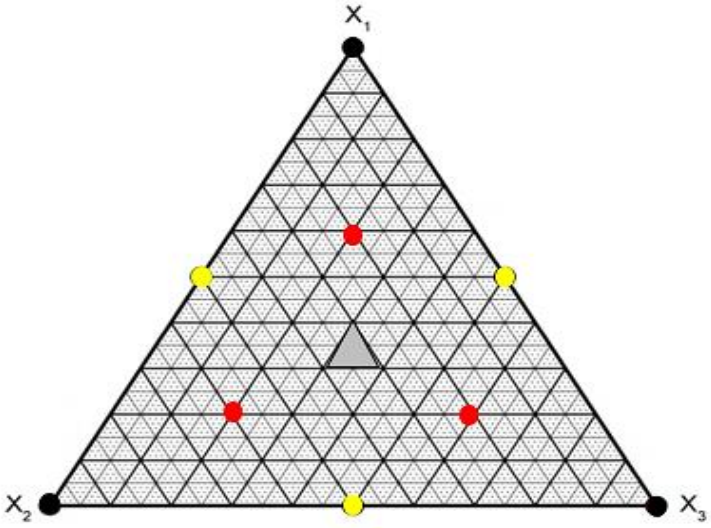
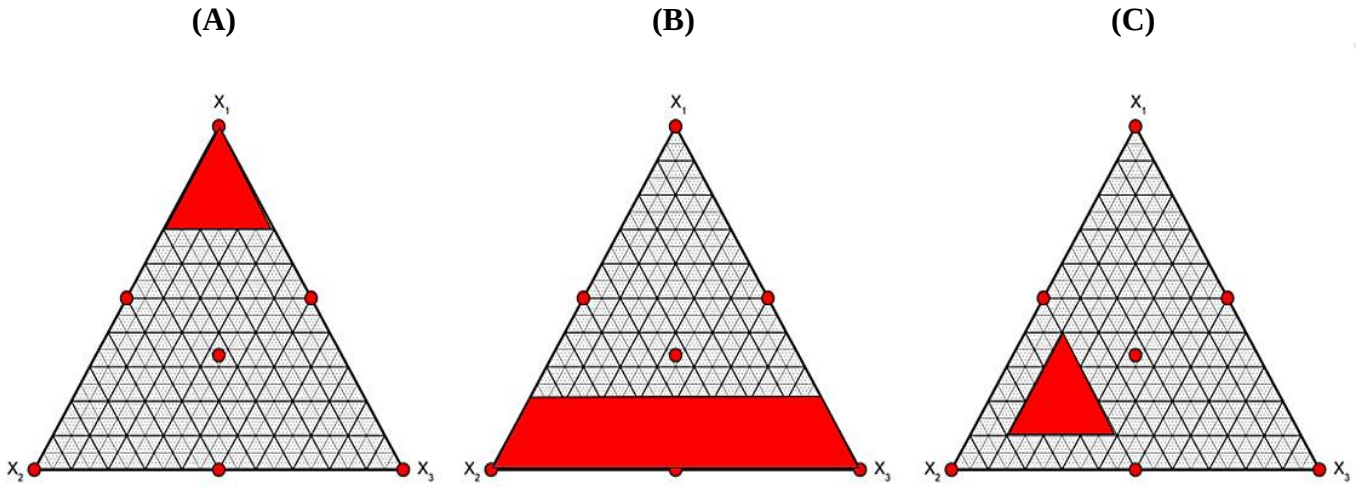


Figura 6 - Representação gráfica para os tipos de restrições em uma mistura ternária. (6A) Restrição com limite superior; (6B) Restrição com limite inferior; (6C) Combinação entre os limites, formando uma sub-região proveniente da região original. Adaptado de LEARDI [113].



2.6.2 - Planejamento Doehlert

O planejamento ou matriz Doehlert, é um método de otimização multivariada e vem se difundindo na química analítica e várias outras ciências, como ferramenta estatística de otimização para planejamentos experimentais de segunda ordem.

Um planejamento Doehlert busca as melhores condições para aplicação de um método, com principal objetivo de reduzir o número de experimentos, o que significa redução do uso de reagentes e consequentemente redução dos custos financeiros e economia de tempo. Permitindo a otimização de todas as vareáveis (fatores) simultaneamente, ao mesmo tempo que se estuda as interações entre todas as vareáveis e seus diferentes níveis [114].

O número de experimentos (N) necessários para execução de um planejamento Doehlert é dado pela expressão $N = K^2 + K + pc$, onde K é o número de variáveis e pc é o número de réplicas no ponto central. Estas são realizadas por meio da estimativa da variância experimental [116].

Vale lembrar também, que o planejamento Doehlert é uma matriz não rotativa, o que significa, que as variáveis (K), podem ser trabalhadas em níveis distintos. Por exemplo, uma ou mais variáveis podem ser estudadas em cinco níveis, enquanto a outra pode ser estudada em três níveis e isto, torna a matriz Doehlert uma ferramenta atraente de otimização, pois permite maior flexibilidade em atribuir aos fatores (variáveis) diferentes níveis. Entretanto, é preferível escolher a variável que exerça o maior efeito experimental, ou seja, aquela que tenha o maior número de nível, a fim de obter a o máximo de informações possíveis do sistema [115,114].

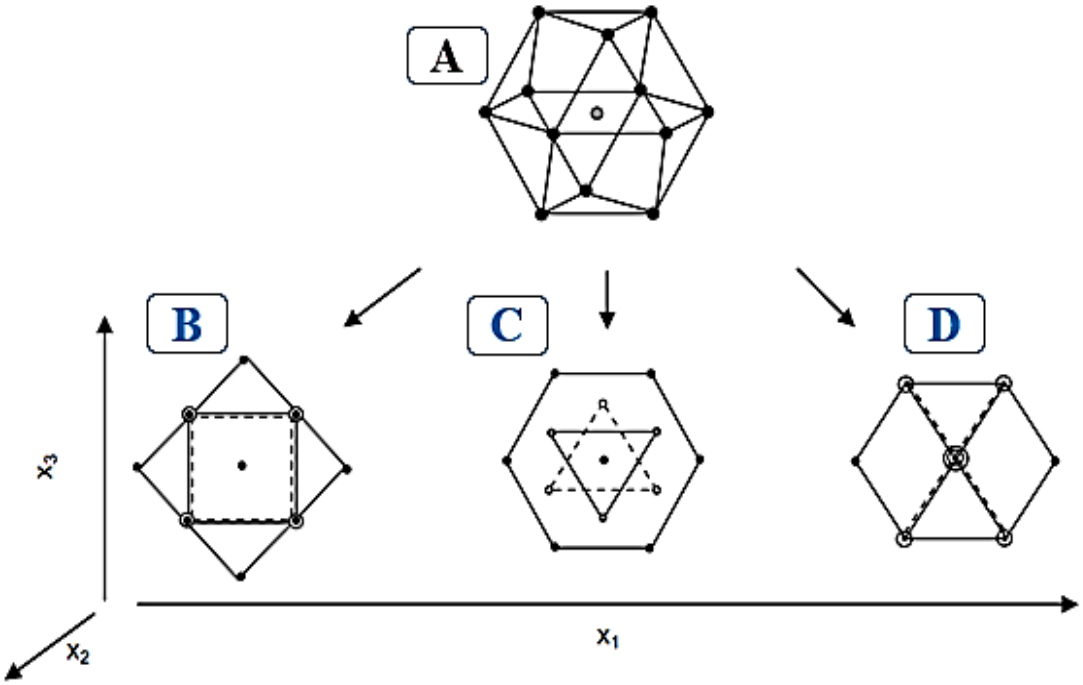
O uso do planejamento Doehlert para otimização das variáveis em um sistema ternário é uma ótima alternativa, pois estas podem ser estudados em diferentes níveis, bem como é possível identificar suas interações como citado anteriormente, o que torna mais interessante, quando se tem interesse em investigar a significância e a influência que os fatores exercessem em quantidades maiores ou menores de níveis, isso tudo com um menor número de experimentos quando comparado com outros tipos de planejamentos [116].

Outra característica interessante da matriz Doehlert é, a sua mobilidade entre seus domínios experimentais. Estes podem ser facilmente explorados, aproveitando-se pontos do planejamento inicial, para explorar uma nova região, já que esta surge através dos

pontos do planejamento inicial, isso ocorre sem interferência na eficiência analítica do planejamento, com um número reduzido de experimentos [116,117].

Quando se utiliza uma matriz Doehlert para otimizar três variáveis, é possível encontrar uma matriz com um domínio experimental representada por um sólido geométrico chamado de cubooctaedro, cujas as formas de projeções em um plano, podem variar de acordo o número de variáveis e níveis que foram definidos [116]. Ao total são três tipos de projeções como mostra a **Figura 7**, a projeção sob face quadrada, face triangular e sob o vértice.

Figura 7 - Representação espacial de um sólido geométrico cubooctaedro no plano (A) cujas projeções geram modelo Doehlert de três variáveis e os três tipos de projeções possíveis geradas que correspondem a; projeção sob face quadrada (B); projeção sob face triangular (C) e projeção sob o vértice (D). Fonte: Novaes et al. [116].



3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Desenvolver métodos analíticos para determinação de cobre e manganês em amostras de água de coco industrializada e *in natura* utilizando pré-concentração por microextração líquido-líquido dispersiva com detecção por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS).

3.2 – Objetivos específicos

- Avaliar o desempenho da metodologia analítica com base na técnica DLLME para pré-concentração de metais traços e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS);
- Utilizar técnicas de planejamento multivariado (metodologia de superfícies de respostas associada à matriz de Doehlert, planejamento de misturas com restrição) na otimização das variáveis que afetam o desempenho da DLLME;
- Validar a metodologia desenvolvida acessando suas características analíticas tais como: limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão, fator de enriquecimento, etc.;
- Aplicar a DLLME para a pré-concentração e determinação de metais traços em água de coco *in natura* e industrializada.

4 - PARTE EXPERIMENTAL

4.1 - Equipamentos

As análises foram feitas em um espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS) Perkin Elmer, (Norwalk, CT, EUA), modelo AAnalyst 200 equipado com lâmpada de deutério como corretor de fundo foi utilizado para as medidas de absorvância.

A chama foi composta por ar atmosférico e acetileno. Os valores de comprimentos de ondas para as lâmpadas de cátodo oco (HCL) utilizadas nas determinações de Cobre e Manganês foram de 324,75 e 279,48 nm, respectivamente. A Tabela 3 descreve alguns parâmetros do espectrômetro de absorção atômica com chama recomendados pelo fabricante e adotados nesse trabalho.

Tabela 3 - Parâmetros operacionais do espectrômetro de absorção atômica com chama para a determinação de Cu e Mn.

PARÂMETROS	VALORES
Altura do queimador (mm)	13,5
Abertura da fenda (nm)	0,2
Vazão de fluxo do acetileno (L min-1)	2,0
Vazão de fluxo do ar (L min-1)	13,5
Vazão de fluxo do nebulizador (L min-1)	5,0 a 7,0

4.2 - Materiais

- Chapa aquecedora QUIMIS, modelo Q313M;
- Micropipetas (Transferpette Digital - Brand, RB704174, RB704178; Sealpette ER 33832; Kacil S; ponteiras (Brand, 18170, 18266, 702533);
- Tubos tipo Falcon graduados de 50,0 mL com tampa de rosca (Corning);
- Balança analítica Modelo AX200, Shimadzu. Filipinas;
- Deionizador de água, Permution (Labnorte, Salvador - BA);
- Vidrarias convencionais, mantida em solução de HNO_3 5% (v/v) durante 24 horas para descontaminação e posteriormente enxaguada com água deionizada e secas antes do uso em ambiente livre de poeira
- pHmetro Quimis, modelo Q400AS.

4.3 - Reagentes

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico e estão listados abaixo:

- 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(dietilamino)-fenol (Br-PADAP) - da marca SIGMA – ALDRICH;
- 1,5-difeniltiocarbazona (Ditizona);
- Ácido clorídrico 37% (m/m) (F. Maia, Santo André - SP);
- Ácido nítrico 65% (m/m) (F.Maia, Santo André - SP);
- Hidróxido de sódio (F. Maia, Santo André - SP);
- Peróxido de hidrogênio (Êxodo Científica, Hortolândia – SP);
- Padrão de Cu e Mn para AAS (Sigma-Aldrich, Suíça);
- Tetracloreto de carbono (Vetec, Duque de Caxias – RJ);
- Clorofórmio (Química Moderna, Barueri – SP);
- Acetonitrila (NEON, São Paulo – SP);
- Acetona (NEON, São Paulo – SP);
- Álcool Etílico (Êxodo Científica, Hortolândia – SP);
- Metanol (Química Moderna, Barueri – SP);
- Ácido cítrico (Belga Química, Santa Maria - RS);
- Fosfato de sódio dibásico (Synth, Diadema – SP);
- Ácido bórico (CINÉTICA, Jandira – SP);
- Bórax (REATEC, Jardim Ivana – SP).

4.4 - Métodos

4.4.1 - Preparo das soluções de cobre e manganês

As soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtida de um deionizador Permution (Labnorte, Salvador - BA). As soluções de trabalho de cobre e manganês foram preparadas diluindo-se as soluções estoques de 1000 ± 2 μg mL^{-1} (padrão para absorção e emissão atômica) com água deionizada a fim de obter as concentrações relativas às curvas analíticas.

4.4.2 - Preparo da solução tampão citrato-fosfato (pH 4,0)

As soluções foram preparadas pela diluição de 1,932 g de ácido cítrico e 5,368 g de fosfato de sódio dibásico em água deionizada e ambas soluções foram quantitativamente transferidas para balões volumétricos de 100 mL, completou-se o volume com água deionizada. Em seguida foram retiradas alíquotas de 30,7 e 19,3 mL da solução de ácido cítrico e fosfato de sódio dibásico, respectivamente. Logo após, ambas as alíquotas foram transferidas para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água deionizada. O pH requerido foi ajustado com ácido clorídrico.

4.4.3 - Preparo da solução tampão bórax-hidróxido de sódio (pH 9,5)

Pesou-se 1,901 g de bórax e 0,806 g hidróxido de sódio e posteriormente ambas as massas foram dissolvidas e transferidas para balões volumétricos de 100 mL os quais foram preenchidos com água deionizada. Em seguida retirou-se alíquotas de 25,0 e 8,8 mL da solução de bórax e hidróxido de sódio respectivamente, transferindo-as para um balão volumétrico de 100 mL e o pH requerido foi ajustado com hidróxido de sódio e ácido clorídrico.

4.4.4 - Solução de Br-PADAP

Preparou-se soluções de 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(dietilamino)-fenol (Br-PADAP) na concentração de 0,02 % (m/v), pesando-se 0,02 g do reagente e diluindo-o em etanol e este foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL o volume foi completado com etanol.

4.4.5 - Pré-tratamento e coleta das amostras

As amostras de água de coco *in natura* foram adquiridas em mercados e nas principais feiras da cidade Jequié-Ba. A água de coco industrializada foi adquirida apenas nos mercados da cidade. Ambas as amostras foram digeridas em sistema aberto com auxílio de uma chapa aquecedora, utilizando 30,0 mL das amostras (este foi o volume utilizado em todos os procedimentos), adicionou-se 2,0 mL de ácido nítrico concentrado e 1 mL de peróxido de hidrogênio.

As amostras foram digeridas a uma temperatura de 110-120 ºC por aproximadamente 2h. Os brancos da digestão foram preparados do mesmo modo que as

amostras digeridas. O sistema digestão das amostras utilizado neste trabalho pode ser visualizado na Figura 8.

Após o resfriamento para temperatura ambiente, o pH requerido das amostras foram ajustados com solução concentrada de hidróxido de sódio e ácido clorídrico e posteriormente as amostras foram transferidas para tubos Falcon de 50,0 mL. As determinações dos metais foram então realizadas por FAAS. Os resultados obtidos da quantificação dos metais presentes nas amostras foram expressos em termos de µg L^{-1}.

Figura 8 - Sistema de digestão em placa aquecedora.

Fonte: Acervo de foto do autor

4.5.6 - Procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para extração e pré-concentração de cobre e manganês em amostras de água de coco *in natura* e industrializada

Para os experimentos foram usados tubos falcon graduados de 50 mL, aos quais foram adicionados 30,0 mL das amostras (fase aquosa) já digeridas e com o pH previamente ajustado com a solução tampão. Em seguida adicionou-se a solução de NaCl e o agente complexante e em seguida foi adicionada o solvente extrator e solvente dispersor. Para facilitar a dispersão dos solventes, a mistura foi agitada manualmente, onde foi possível observar a turvação da solução.

Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min para a separação das fases. O sobrenadante foi descartado e a fase orgânica sedimentada, aproximadamente 450 µL contendo os analitos, foi determinado por FAAS. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos em função da absorvância e concentração em µg L^{-1}.

4.6 – Etapas de otimização da DLLME

4.6.1 - Seleção do volume do solvente extrator, dispersor e reagente complexante

Os volumes dos componentes da mistura (solvente extrator, solvente dispersor e reagente complexante) para aplicação da DLLME, foi otimizado utilizando um planejamento de mistura com restrição. O planejamento de mistura foi gerado por meio de pseudocomponentes e os experimentos foram realizados em triplicata. As composições das misturas são mostradas na Tabela 4 e o gráfico gerado é mostrado na Figura 9.

Figura 9 - Região experimental delimitada pelas restrições inferiores e superiores dos componentes da mistura estudada na microextração líquido-líquido dispersiva.

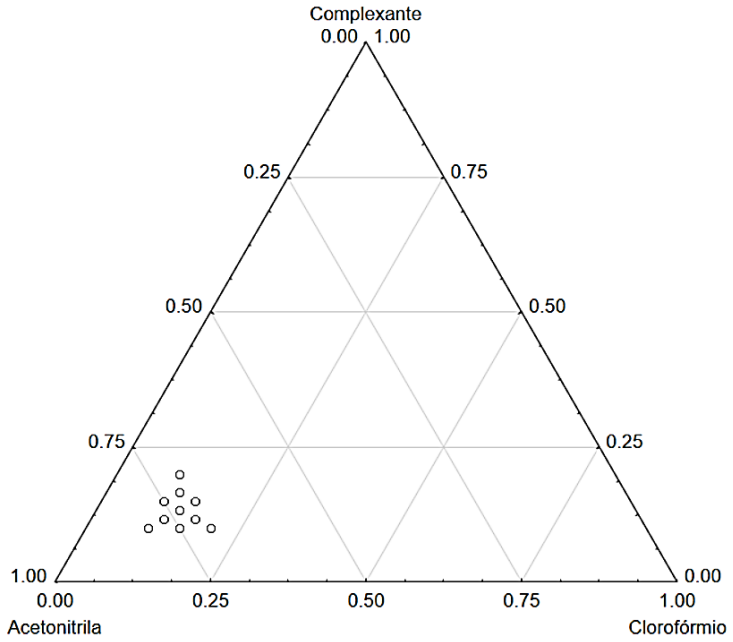


Tabela 4 - Pseudocomponentes e componentes originais utilizados no planejamento de mistura com restrição.

Experimentos	Acetonitrila	Clorofórmio	Complexante
1	4000 (0,8000)	500 (0,1000)	500 (0,1000)
2	3500 (0,7000)	1000 (0,2000)	500 (0,1000)
3	3500 (0,7000)	500 (0,1000)	1000 (0,2000)
4	3750 (0,7500)	750 (0,1500)	500 (0,1000)
5	3750 (0,7500)	500 (0,1000)	750 (0,1500)
6	3500 (0,7000)	750 (0,1500)	750 (0,1500)
7	3667 (0,7334)	666 (0,1332)	667 (0,1334)
8	3833 (0,7666)	583 (0,1166)	583 (0,1166)
9	3583 (0,7166)	833 (0,1666)	583 (0,1166)
10	3583 (0,7166)	583 (0,1166)	833 (0,1666)

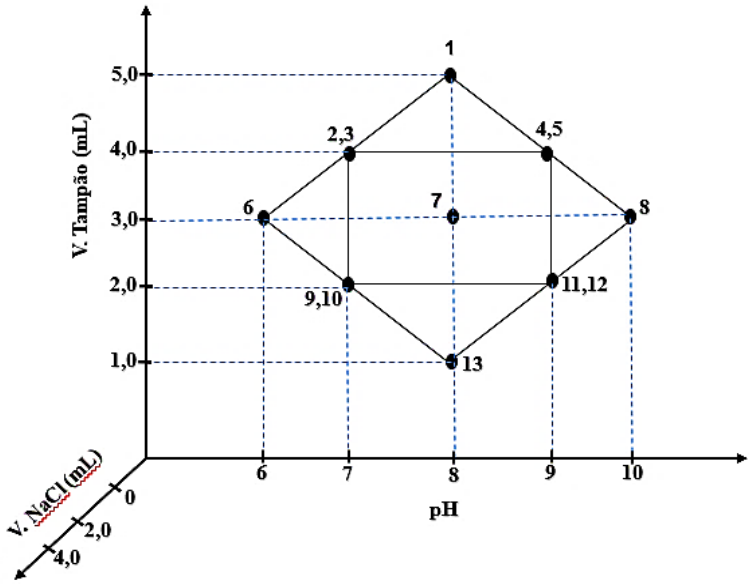
4.6.2 - Matriz de Doehlert

O uso planejamento Doehlert permitiu uma quantidade menor de experimentos combinado as variáveis em diferentes níveis. Logo, foram 13 experimentos no total para otimização. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas, as variáveis estudadas foram pH (6-10) e volume da solução tampão (1,0 – 5,0 mL). Estas foram exploradas em cinco níveis, enquanto a variável que corresponde ao volume da solução de NaCl (0 – 4,0 mL) foi explorada em apenas três níveis (Tabela 5). A matriz Doehlert gerada neste trabalho foi com projeção sob face quadrada e está representada na Figura 10.

Tabela 5 - Matriz de Doehlert para o planejamento experimental.

EXPERIMETNO	pH	V. TAMPÃO (mL)	V. NaCl (mL)
1	8	5	2
2	7	4	0
3	7	4	4
4	9	4	0
5	9	4	4
6	6	3	2
7	8	3	2
8	10	3	2
9	7	2	0
10	7	2	4
11	9	2	0
12	9	2	4
13	8	1	2

Figura 10 - Distribuição dos pontos experimentais da matriz Doehlert para otimização das variáveis de processo, com projeção sob face quadrada gerada para este trabalho.



4.6.3 - Análise estatística

Todo processo de otimização quimiométrica para a realização e avaliação dos resultados dos experimentos, como planejamento de mistura com restrição e a metodologia de superfícies de respostas associada à matriz de Doehlert, foram processadas com auxílio do software Statistica versão 10.0, já os parâmetros estatísticos básicos como gráficos de colunas e as curvas analíticas foram obtidos através do Office Excel 2016.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2 – Estudos preliminares: seleção do tipo de solvente extrator, dispersor e agente complexante

Os principais parâmetros a serem definidos para otimização de um procedimento de extração por DLLME, para pré-concentração de metais traços ou qualquer outro tipo de analito, é a seleção do tipo de solvente extrator (SE), solvente dispersor (SD) e agente complexante (AC). Estes podem afetar diretamente a eficiência e a precisão do método, bem como pode afetar o sucesso na determinação analítica.

Para escolha do tipo de SE, foi levado em consideração as principais características citadas anteriormente, como imiscibilidade com a amostra escolhida para a pesquisa, densidade elevada, pressão de vapor relativamente baixa, para evitar perdas significativas da fase sedimentada durante a extração e adaptabilidade com a técnica de detecção, para evitar tratamento prévio antes de ser analisado pelo FAAS.

A escolha do SD também obedeceu aos fatores citados anteriormente, como miscibilidade no SE e na solução aquosa (amostra), apresentar alta capacidade de fragmentar e dispersar o SE em forma de microgotas, fazendo com que a área superficial entre SE/solução aquosa (amostra onde estão os analitos) seja infinitamente grande, para proporcionar o aumento na eficiência de extração.

Neste trabalho foram testados como SE o clorofórmio (Clorof) e tetracloreto de carbono (CCl_4), como SD foram testados acetonitrila, acetona (AC), etanol (ET) e o metanol (MET) e como AC foram testados o BR-PADAP e Ditizona, os experimentos foram realizados em pH 9,0 utilizando 30 mL de solução padrão (cobre e manganês a 10 µg L^{-1}). Os gráficos das Figuras 11 e 12 mostram os resultados obtidos através das diferentes combinações realizadas, para seleção da mistura que apresenta maior eficiência de extração.

Analisando os resultados, percebe-se que a mistura clorofórmio, acetonitrila e Br-PADAP apresentaram as melhores extrações, tanto para o cobre, quanto para o manganês, como é demonstrado pelos sinais de absorvância. Sendo assim, optou-se por realizar os demais experimentos utilizando esta composição, para aplicação da DLLME durante a realização deste trabalho.

Figura 11 - Estudo do solvente extrator (SE), solvente dispersor (SD) e agente complexante (AC) para determinação de Cu(II) por microextração líquido-líquido dispersiva.

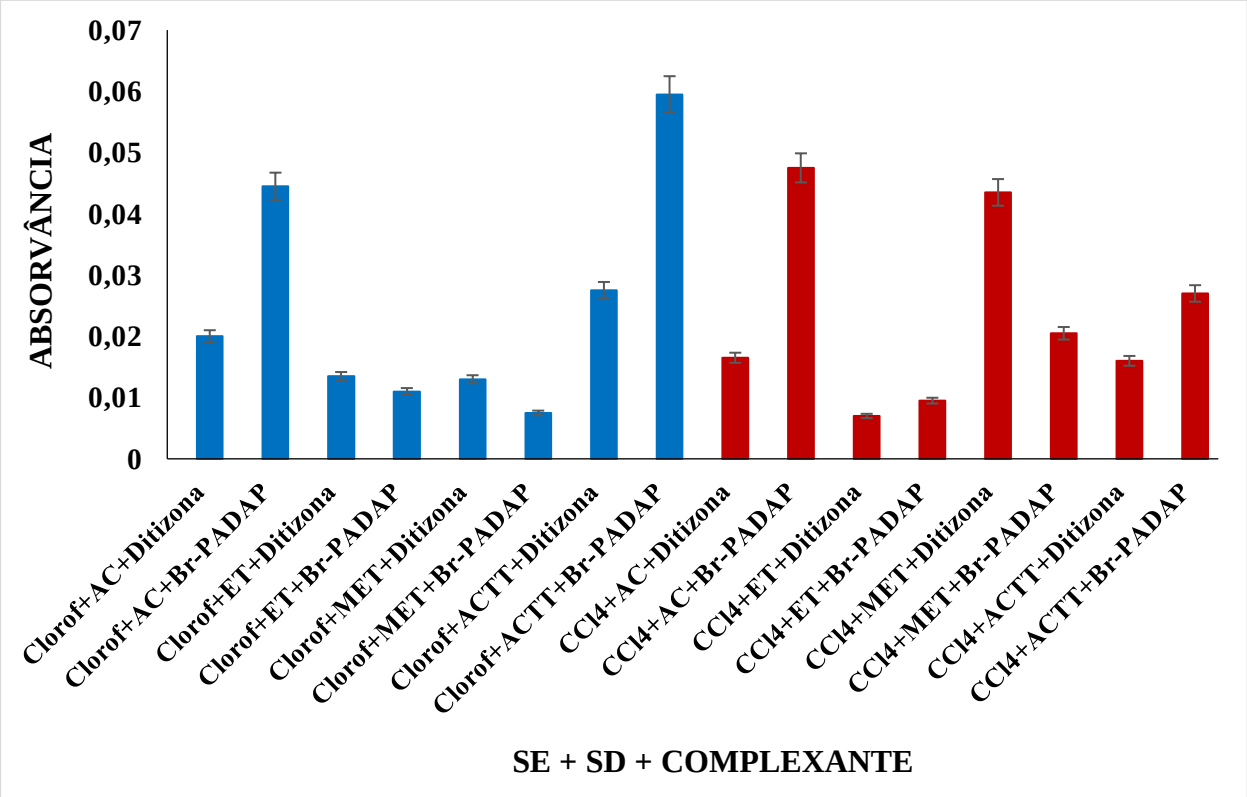
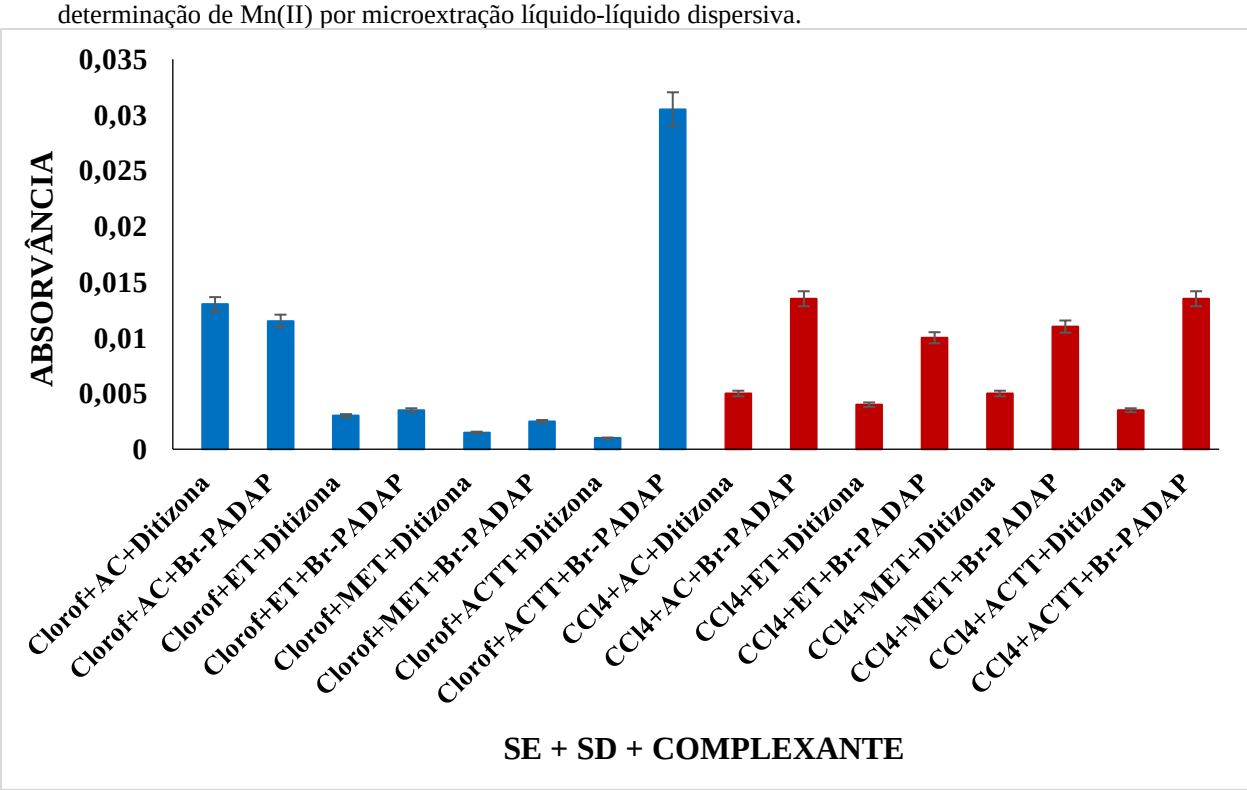


Figura 12 - Estudo do solvente extrator (SE), solvente dispersor (SD) e agente complexante (AC) para determinação de Mn(II) por microextração líquido-líquido dispersiva.



5.2 – Estudo do volume do solvente extrator para análise por FAAS

O estudo do volume do solvente extrator (fase sedimentada) que é injetado no FAAS é um parâmetro que também deve ser levado em consideração, uma vez que, ao injetar certas quantidades de soluções orgânicas no instrumento, esta pode causar instabilidade na chama e consequentemente interferir na precisão do método.

Neste estudo, a quantidade de solvente extrator selecionado para leitura por FAAS, foi feita variando-se o volume de clorofórmio ($CHCl_3$) entre 20 e 60 µL, os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 13 e 14, a seguir;

Figura 13 - Seleção da quantidade de volume extrator para análise no FAAS para determinação de Cu^{2+}.

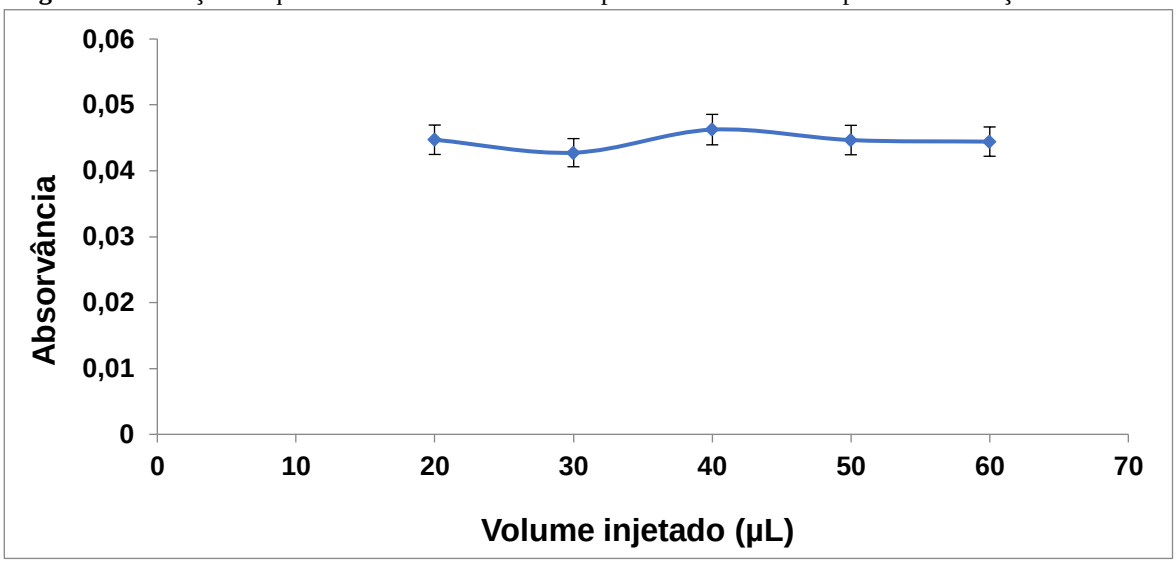
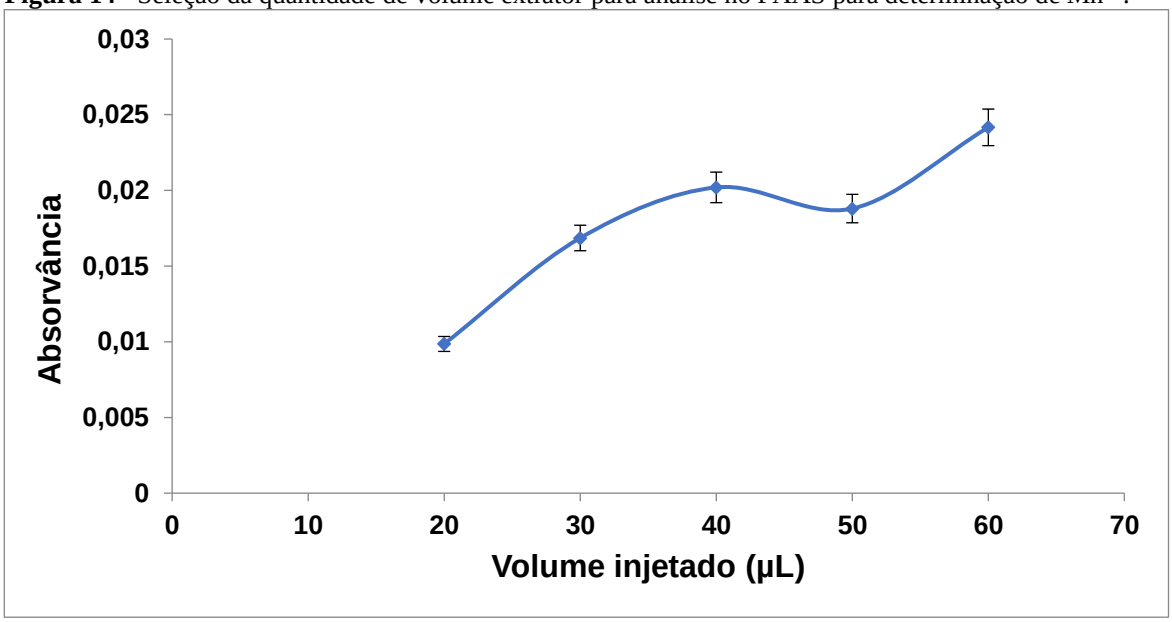


Figura 14 - Seleção da quantidade de volume extrator para análise no FAAS para determinação de Mn^{2+}.



Os resultados mostram que as maiores absorvâncias para o cobre e manganês, ocorrem quando se utilizam 40 e 60 μL, respectivamente. Entretanto, ao fazer leituras sucessivas com 40 μL, foi possível notar grandes oscilações entre cada sinal fornecido para ambos os elementos, diferente do que acontecia ao fazer as leituras com 60 μL, um volume muito grande do solvente extrator (VSE), causava a instabilidade da chama e das leituras, a chama se apagava, devido à grande quantidade de matéria orgânica do próprio solvente extrator.

Sendo assim, a quantidade do volume selecionado foi de 50 μL, visto que nesta quantidade, as respostas obtidas foram mais precisas, livre de instabilidade da chama e não há diferença significativa entre os resultados obtidos, como pode ser visto ao analisar as respostas. Portanto, todas as demais análises foram feitas através da injeção de 50 μL do solvente extrator no FAAS.

5.2.1 – Otimização das variáveis envolvidas na microextração líquido-líquido dispersiva usando o planejamento de misturas com restrições

Para otimização das proporções da mistura que promove a extração (acetonitrila, clorofórmio e solução do complexante), usou-se um planejamento de misturas para três componentes. Restrições inferiores e superiores às variáveis foram adotadas para delimitar o campo experimental e evitar regiões impossíveis ou difíceis de trabalhar.

Para otimização simultânea das duas respostas trabalhadas, adotou-se a estratégia de otimização multi-resposta, aplicando-se uma função de desejabilidade.

Esta metodologia é baseada em cada uma das respostas obtidas, que são chamadas de desejabilidades individuais (di), esta, podendo variar em uma escala de 0 a 1, estes valores representam respostas indesejáveis e desejáveis, respectivamente. Com o agrupamento de todas as desejabilidades individuas, torna-se possível obter como resultado a desejabilidade global (D), que é definida como a média geométrica das desejabilidades individuais (di), conforme a equação 2, onde *m* é o número de respostas estudadas no processo de otimização [116];

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \qquad \text{Equação 2}$$

Sendo assim, para alcançar uma resposta que otimiza simultaneamente todas as variáveis, basta calcular os níveis das variáveis que maximizem a desejabilidade global

de acordo a equação 3, sendo y a resposta monitorada, L é a menor resposta aceitável, T é o valor alvo e s é peso que pode ser atribuído para cada resposta.

$$d = \begin{cases} 0 \; se \; y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^s \; se \; L \leq y \leq T \\ 1 \; se \; y > T \end{cases} \qquad \text{Equação 3}$$

A matriz experimental e as respostas obtidas são apresentadas na Tabela 6. Os experimentos foram realizados em triplicata para avaliar a estimativa do erro experimental. Modelos matemáticos, tais como o linear, o quadrático, o cúbico especial e o cúbico completo foram ajustados à desejabilidade global (obtida pela transformação das duas respostas) com a finalidade de descrever, da melhor forma possível, o comportamento dos dados dentro da região experimental estudada. Para avaliar a qualidade dos modelos ajustados, testes de falta de ajuste e a avaliação dos gráficos de resíduos e dos gráficos de valores observados versus valores preditos, foram obtidos.

Tabela 6 - Matriz experimental e resultado do planejamento de misturas empregado na otimização da microextração líquido-líquido dispersiva do cobre e do manganês.

Exp.	Volume (µL)			Absorvância	
	Acetonitrila	Clorofórmio	Complexante	Cu	Mn
1.1	4000	500	500	0,075	0,018
1.2	3500	1000	500	0,011	0,005
1.3	3500	500	1000	0,037	0,027
1.4	3750	750	500	0,026	0,008
1.5	3750	500	750	0,073	0,029
1.6	3500	750	750	0,021	0,006
1.7	3666	666	666	0,029	0,009
1.8	3833	583	583	0,040	0,010
1.9	3583	833	583	0,021	0,005
1.10	3583	583	833	0,022	0,013
2.1	4000	500	500	0,063	0,029
2.2	3500	1000	500	0,011	0,004
2.3	3500	500	1000	0,032	0,017
2.4	3750	750	500	0,019	0,007
2.5	3750	500	750	0,067	0,034
2.6	3500	750	750	0,017	0,006
2.7	3666	666	666	0,026	0,010
2.8	3833	583	583	0,042	0,010
2.9	3583	833	583	0,018	0,005
2.10	3583	583	833	0,029	0,012
3.1	4000	500	500	0,062	0,015
3.2	3500	1000	500	0,014	0,002
3.3	3500	500	1000	0,052	0,022
3.4	3750	750	500	0,022	0,006
3.5	3750	500	750	0,064	0,032
3.6	3500	750	750	0,021	0,009
3.7	3666	666	666	0,023	0,010
3.8	3833	583	583	0,032	0,010
3.9	3583	833	583	0,016	0,003
3.10	3583	583	833	0,028	0,013

Para o teste de falta de ajuste, considera-se que o modelo está bem ajustado, quando o valor de probabilidade p for maior que o valor de α adotado para um determinado nível de probabilidade. O nível de confiança adotado neste trabalho foi 95%, o que corresponde a um valor de $\alpha > 0,05$. Dessa forma, valores de p, para falta de ajuste encontrados abaixo desse valor ($p < 0,05$) são considerados significativos e indica que modelos mais adequados devem ser usados.

No entanto, muitas vezes o comportamento dos dados não consegue ser descritos com precisão mesmo usando funções matemáticas de alta ordem. Nesse caso, deve-se escolher a função que mais aproxima sua previsão aos dados reais. Os testes, realizados com os parâmetros obtidos da análise de variância mostraram que todas as quatro funções apresentaram falta de ajuste (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores de p para a falta de ajuste obtidos após o ajuste de diferentes funções matemáticas.

Modelo matemático	Valor p
Linear	0
Quadrática	0,000007
Cúbico especial	0,000135
Cúbico completo	0,005506

Pela análise dos gráficos de valores observados versus valores preditos (Figura 15), nota-se que o modelo que apresenta melhor correlação entre os valores preditos e observados é o cúbico completo. No entanto, o modelo cúbico especial mostra sua capacidade de descrição do comportamento dos dados muito próximo do modelo cúbico completo, sem ser tão complexo como este último.

Já a análise dos gráficos de resíduos apresentados na Figura 16 reforça a capacidade de modelagem dos modelos cúbicos completo e especial. Os resíduos são menores e com menos tendência quando se aplica esses dois modelos. Dessa forma, o modelo cúbico completo foi escolhido para indicar as condições ótimas.

Figura 15 - Gráficos de valores observados versus valores preditos para os diferentes modelos matemáticos ajustados à desejabilidade global calculada a partir dos dados gerados da aplicação do planejamento de misturas.

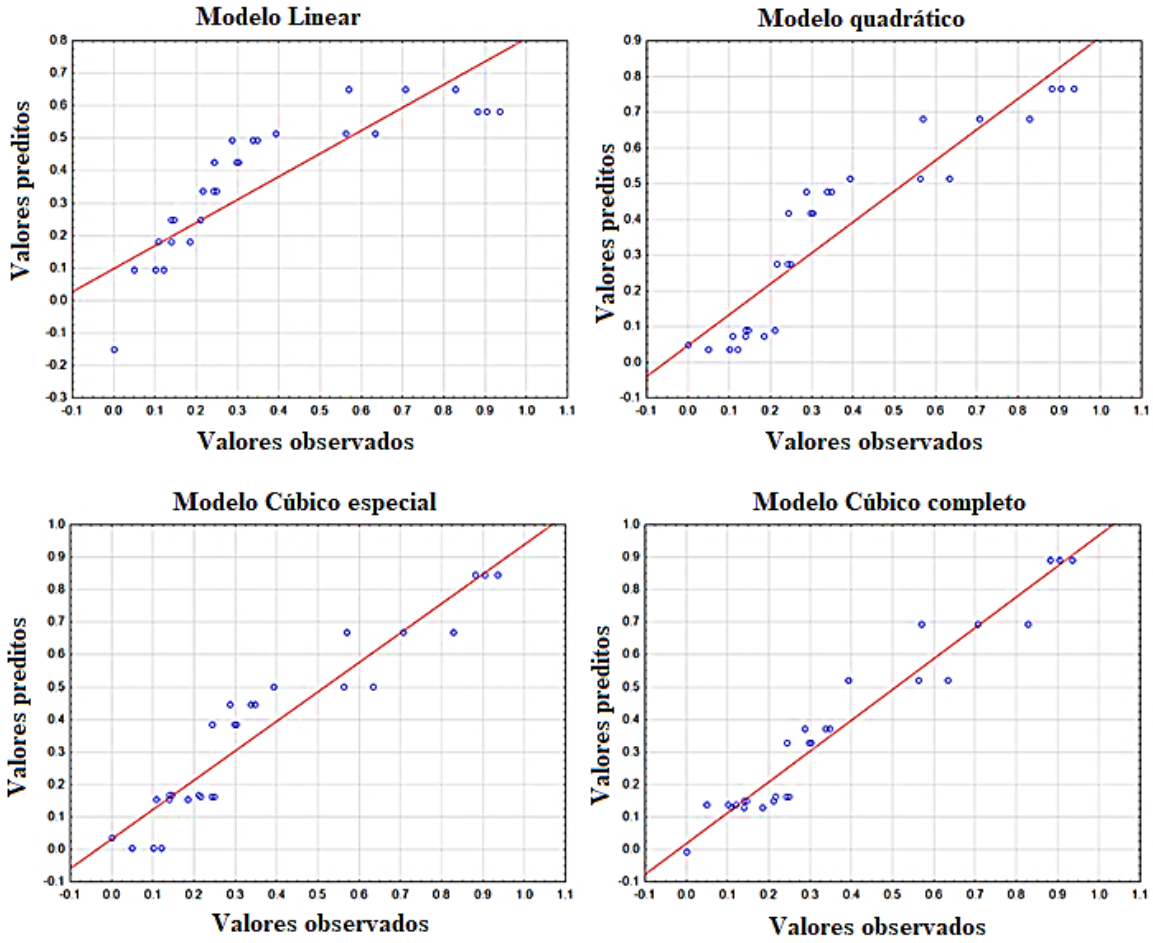
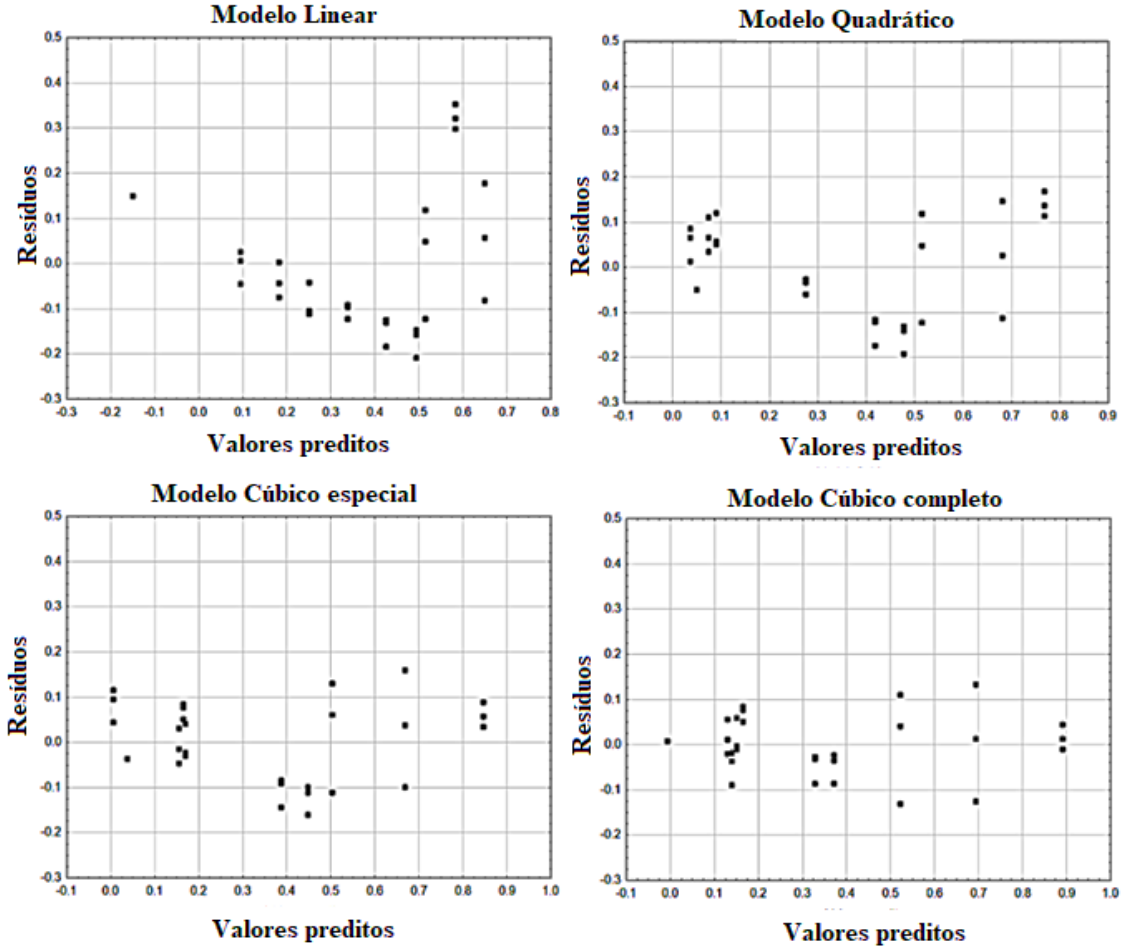


Figura 16 - Gráficos de resíduos para os diferentes modelos matemáticos ajustados à desejabilidade global calculada a partir dos dados gerados da aplicação do planejamento de misturas.



A superfície de resposta apresentada na Figura 17 foi obtida pelo ajuste do modelo cúbico. Nesse caso, as condições ótimas podem ser facilmente localizadas por análise dos perfis de desejabilidade apresentados na Figura 18.

Figura 17 - Superfície de resposta gerada pelo modelo cúbico especial.

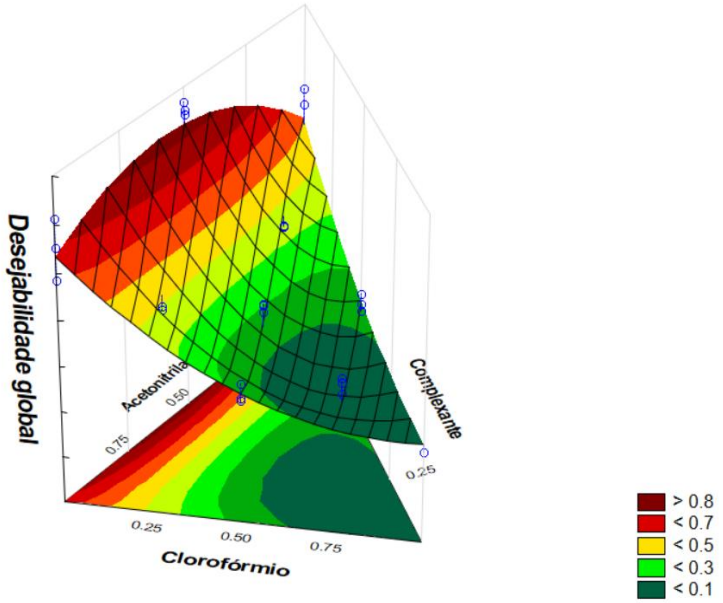
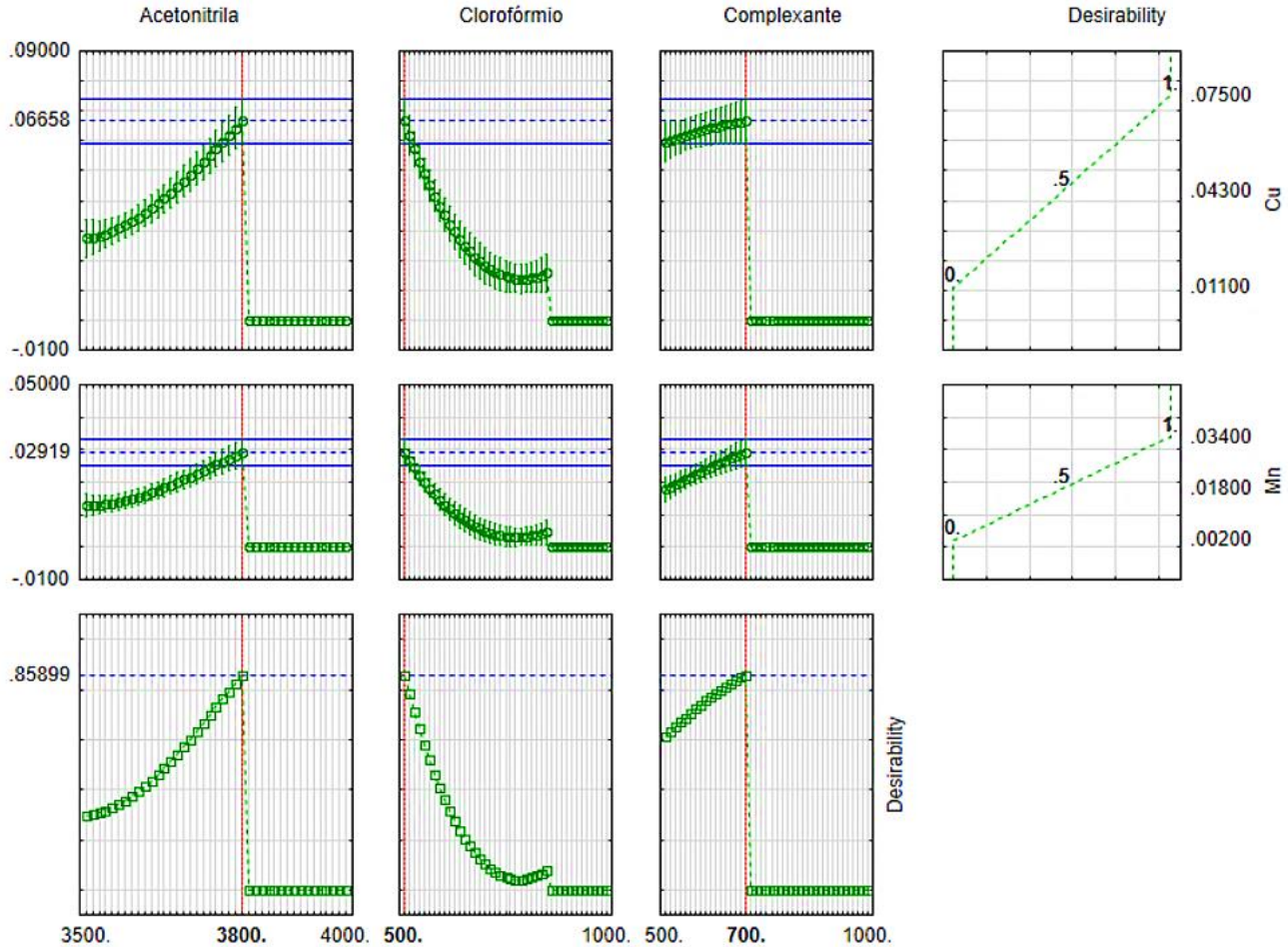


Figura 18 - Perfis de desejabilidades individuais e global.



Dessa forma, as proporções ótimas dos reagentes que compunham a mistura extratora foram 3800 µL (76%) de acetonitrila, 500 µL (10%) de clorofórmio e 700 µL (14%) da solução do complexante Br-PADAP, estes valores estão representados pela linha de cor vermelha que estar na vertical representada na Figura 18, estas proporções satisfazem simultaneamente, todas as respostas que foram consideradas neste planejamento, para extração de ambos os metais, aplicando a DLLME.

5.3.2 - Planejamento Doehlert para otimização do pH, volume da solução tampão e volume da solução de NaCl

O desempenho da extração líquido-líquido dispersiva também depende de variáveis de processo como o pH, volume da solução tampão e do volume da solução de NaCl. Para a otimização dessas variáveis de processo, aplicou-se o planejamento Doehlert cuja matriz experimental é apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 - Planejamento Doehlert aplicado à otimização das variáveis de processo da microextração líquido-líquido dispersiva e respostas em termos de absorvância.

Experimentos	pH	Volume (mL)		Absorvância	
		Tampão	NaCl	Mn	Cu
1.1	8	5	2	0,010	0,024
1.2	8	5	2	0,009	0,021
2.1	7	4	0	0,003	0,029
2.2	7	4	0	0,002	0,025
3.1	7	4	4	0,001	0,032
3.2	7	4	4	0	0,031
4.1	9	4	0	0,019	0,024
4.2	9	4	0	0,018	0,021
5.1	9	4	4	0,018	0,028
5.2	9	4	4	0,020	0,028
6.1	6	3	2	0	**0,049**
6.2	6	3	2	0,001	**0,045**
7.1	8	3	2	0,016	0,025
7.2	8	3	2	0,015	0,024
8.1	10	3	2	0,014	0,018

8.2	10	3	2	0,012	0,021
9.1	7	2	0	0,002	0,034
9.2	7	2	0	0,002	0,033
10.1	7	2	4	0,002	0,027
10.2	7	2	4	0,002	0,028
11.1	9	2	0	**0,025**	0,031
11.2	9	2	0	**0,021**	0,031
12.1	9	2	4	**0,023**	0,018
12.2	9	2	4	**0,022**	0,017
13.1	8	1	2	0,002	0,022
13.2	8	1	2	0,001	0,024

Neste caso, para a descrição do comportamento dos dados, é possível apenas ajustar os modelos linear e quadrático devido à quantidade de pontos experimentais disponíveis.

Função de desejabilidade também foi usada para tentar a otimização simultânea das duas respostas. Porém, o valor de desejabilidade global obtido foi muito pequeno, indicando que não existe uma região experimental que satisfaça as duas respostas simultaneamente.

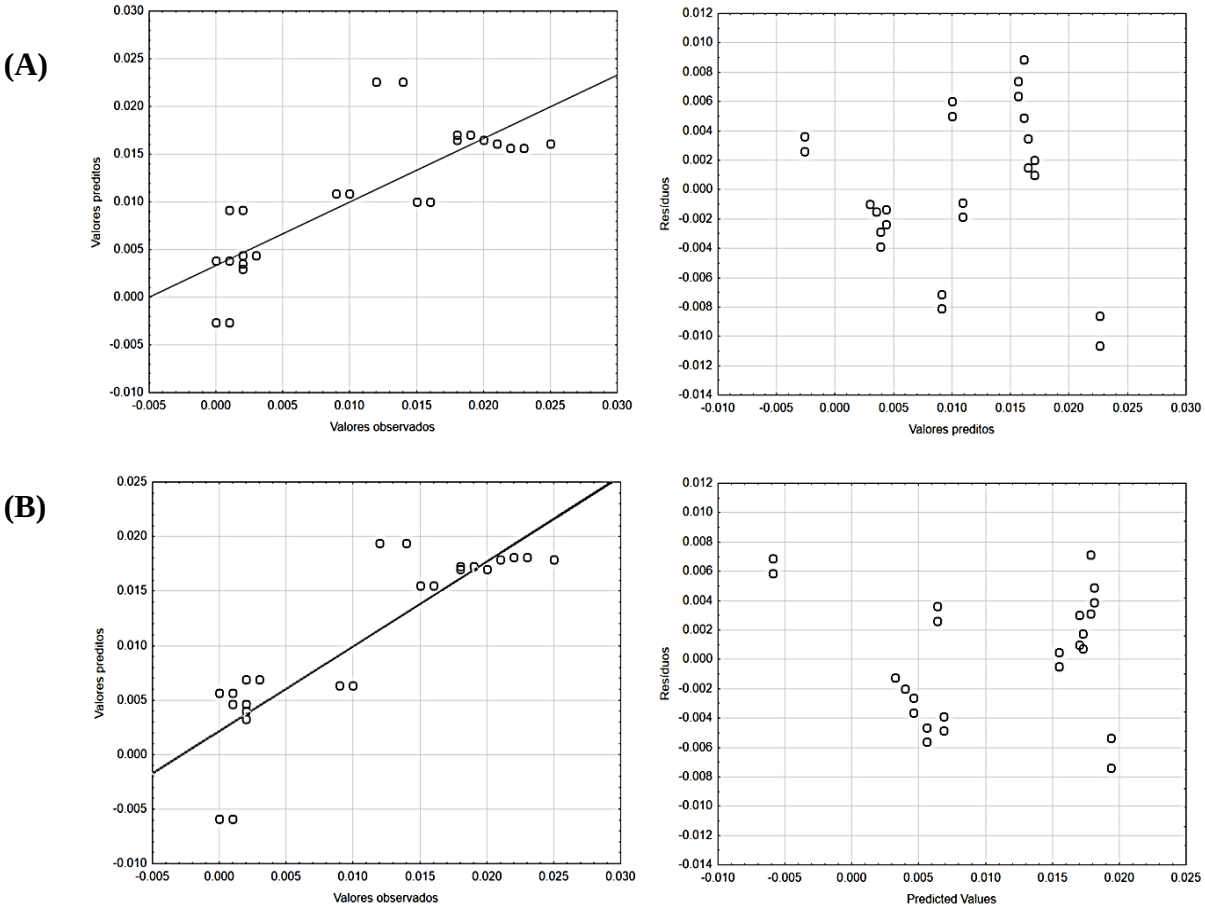
Dessa forma, decidiu-se realizar a otimização dessas duas respostas separadamente. Isso significa, que no final do processo, ter-se-á dois métodos diferentes. Um para a extração do cobre e outro para o manganês.

Modelos lineares e quadráticos foram ajustados aos sinais de absorvância dos analitos e para avaliar a adequação desses modelos, realizou-se o teste de falta de ajuste (usando-se dados da Análise de Variância) e avaliou-se os gráficos de valores observados e preditos e os gráficos de resíduos.

Para o Mn (Figura 19) observa-se que o modelo quadrático é superior ao modelo linear. A correlação entre os valores preditos e observados é melhor para o modelo quadrático (os pontos estão mais próximos da linha reta) do que para o linear. Pelo gráfico de resíduos, também, nota-se que os resíduos gerados pelo modelo quadrático são menores e menos tendenciosos que o modelo linear. Embora tanto o modelo quadrático, quanto o modelo linear apresentem falta de ajuste, o primeiro deixa menores resíduos entre os valores preditos e observados e por isso foi escolhido para predizer os valores ótimos para extração do Mn.

A Figura (21 - a) mostra as três superfícies de respostas parciais (obtidas fixando-se uma variável no seu nível médio) obtidas para o Mn. Analisando-se essas superfícies, nota-se que os valores ótimos para a extração do Mn são os seguintes: pH (9,5), volume do tampão (2,8 mL) e volume da solução de NaCl (1,9 mL).

Figura 19 - Gráficos de valores observados versus valores preditos e gráficos de resíduos para o modelo linear (A) e (B) para o modelo quadrático, para modelagem da extração do manganês por DLLME.

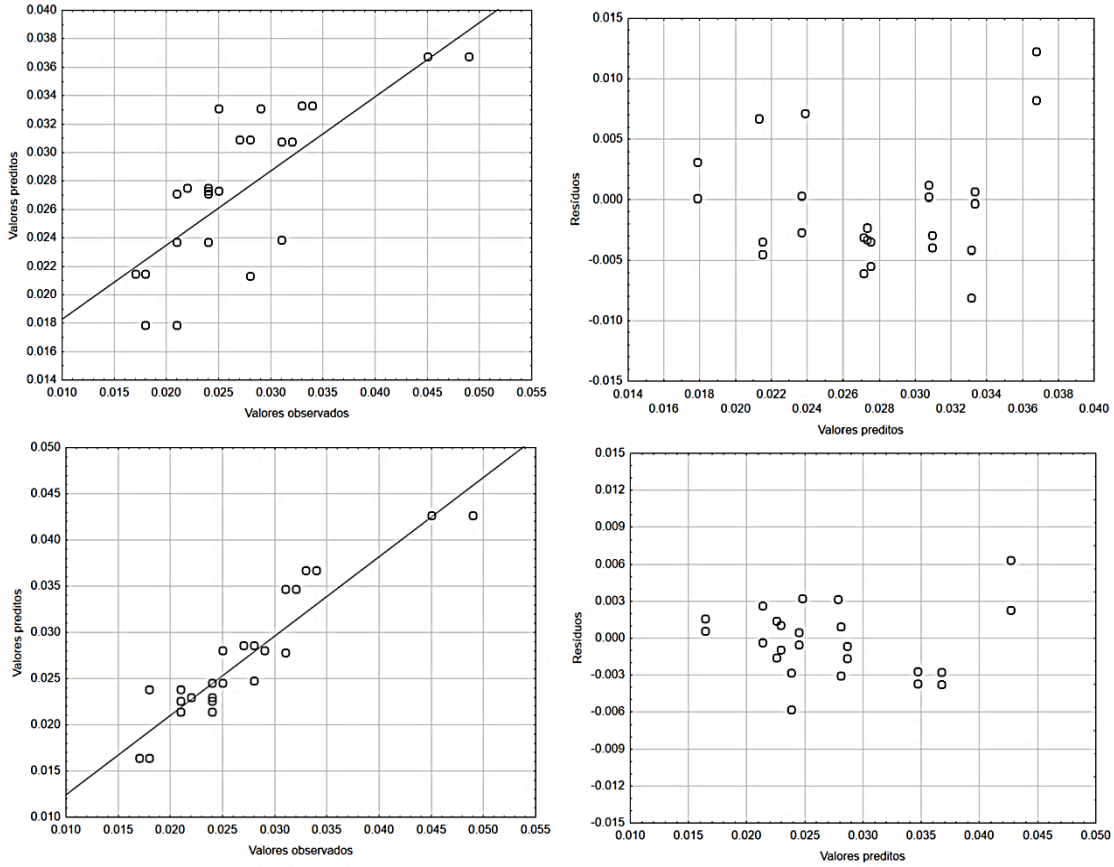


Para a extração do cobre, o modelo quadrático também se mostrou superior ao modelo linear. Embora ambos os modelos apresentem falta de ajuste, nota-se pela análise dos gráficos apresentados na Figura 20, que a correlação entre os valores observados experimentalmente e os valores preditos pela função matemática possui uma melhor correlação no modelo quadrático. Novamente, os resíduos deixados pelo modelo também são menores e apresentam menos tendências com o modelo quadrático.

Figura 20 - Gráficos de valores observados versus valores preditos (A) para o modelo linear e (B) para o modelo quadrático e gráficos de resíduos (A) para o modelo linear e (B) para o modelo quadrático para modelagem da extração do cobre por extração líquido-líquido dispersiva.

(A)

(B)



Analisando-se as superfícies parciais obtidas para o cobre (Figura 21 - b) observa-se que ela apresenta um comportamento que indica que o ponto ótimo está fora da região experimental delimitada, principalmente para a variável pH. O sinal analítico aumenta bastante quando se dirige para regiões de pH baixo. Visando-se encontrar as melhores condições experimentais, resolveu-se deslocar o planejamento para regiões de menores pHs. Sendo assim, outro planejamento foi realizado e sua matriz experimental é apresentado na Tabela 9.

Figura 21 - Superfícies de respostas obtidas pelo ajuste do modelo quadrático às respostas do manganês (A) e do cobre (B) na otimização da DLLME.

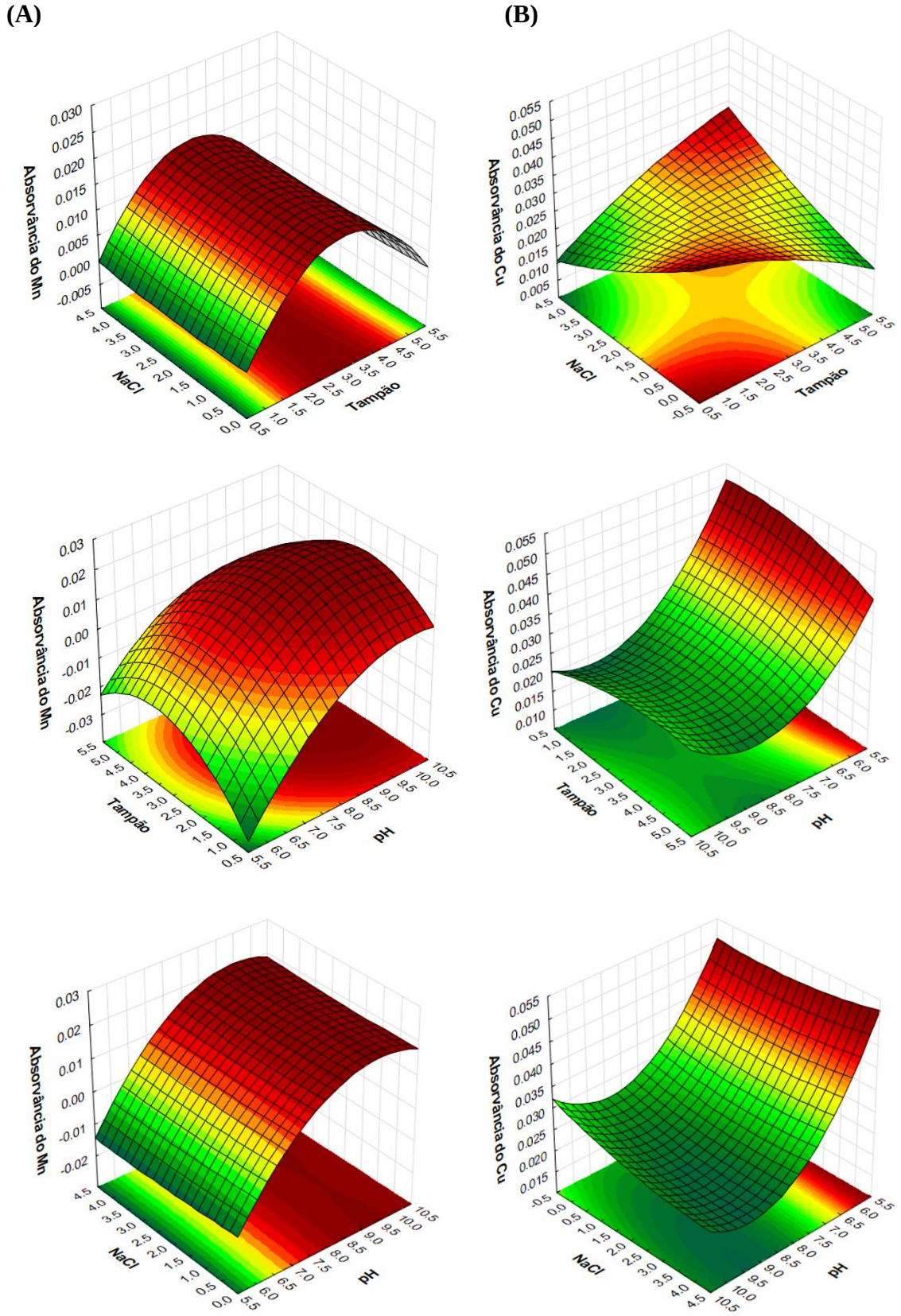
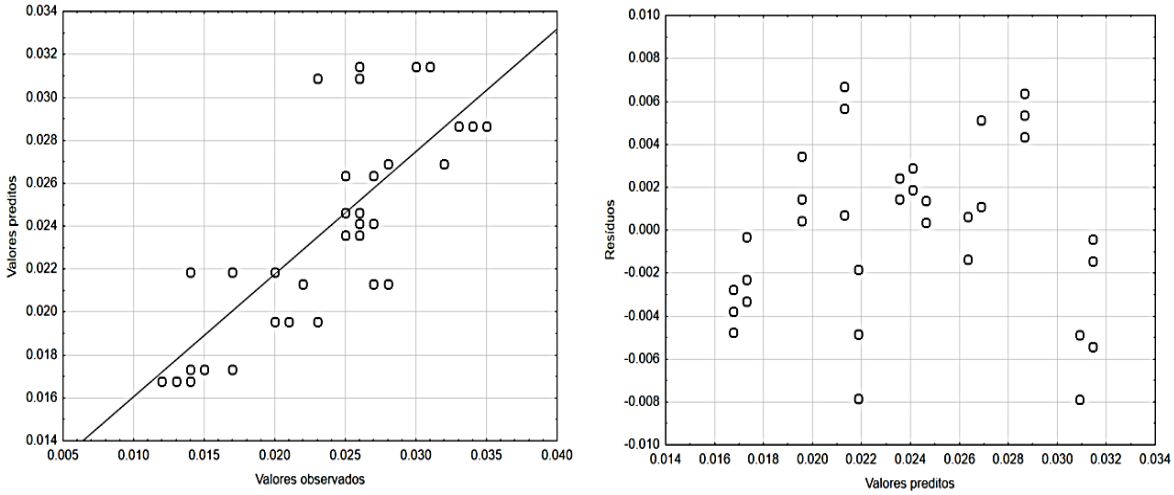


Tabela 9 - Novo planejamento Doehlert para a otimização da extração do cobre por microextração líquido-líquido dispersiva.

Experimento	pH	V.Tampão (mL)	V.NaCl (mL)	Absorvância (Cu)
1.1	6	5	2	0,025
1.2	6	5	2	0,026
1.3	6	5	2	0,026
2.1	5	4	0	0,015
2.2	5	4	0	0,017
2.3	5	4	0	0,018
3.1	5	4	4	0,026
3.2	5	4	4	0,030
3.3	5	4	4	0,031
4.1	7	4	0	0,014
4.2	7	4	0	0,015
4.3	7	4	0	0,017
5.1	7	4	4	0,028
5.2	7	4	4	0,032
5.3	7	4	4	0,032
6.1	4	3	2	0,033
6.2	4	3	2	0,034
6.3	4	3	2	0,035
7.1	6	3	2	0,026
7.2	6	3	2	0,027
7.3	6	3	2	0,027
8.1	8	3	2	0,020
8.2	8	3	2	0,021
8.3	8	3	2	0,023
9.1	5	2	0	0,022
9.2	5	2	0	0,027
9.3	5	2	0	0,028
10.1	5	2	4	0,023
10.2	5	2	4	0,023
10.3	5	2	4	0,026
11.1	7	2	0	0,012
11.2	7	2	0	0,013
11.3	7	2	0	0,014
12.1	7	2	4	0,025
12.2	7	2	4	0,025
12.3	7	2	4	0,027
13.1	6	1	2	0,025
13.2	6	1	2	0,025
13.3	6	1	2	0,026

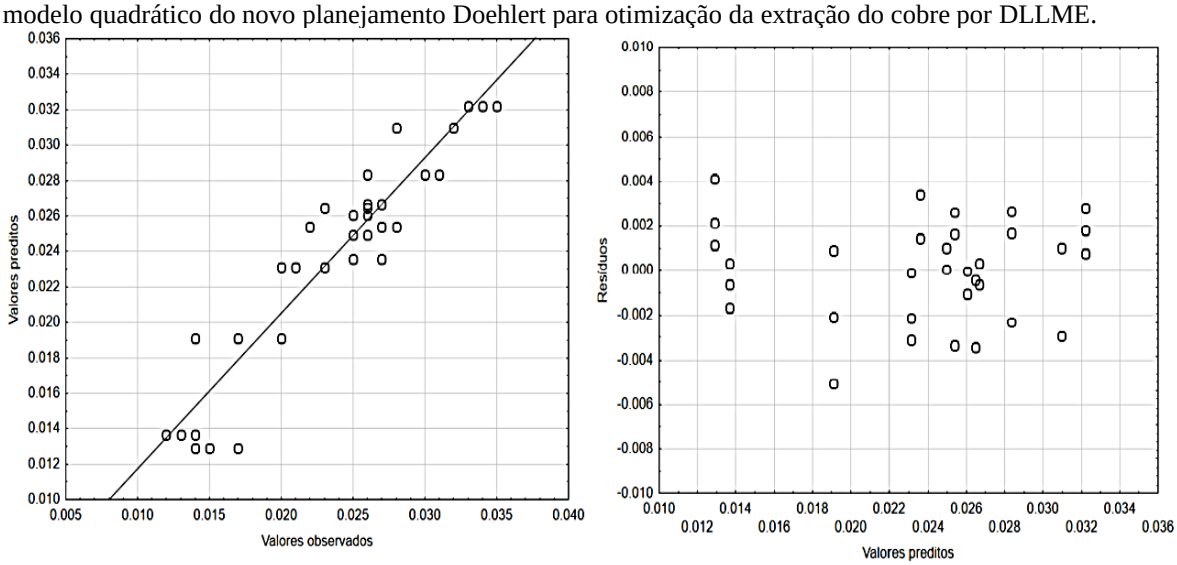
Os gráficos de valores observados versus valores preditos e os gráficos de resíduos são apresentados para a função linear na Figura 22, enquanto a Figura 23 apresenta os gráficos para o modelo quadrático. Nota-se que novamente o modelo quadrático consegue descrever melhor o comportamento dos dados, apresentando uma correlação melhor e resíduos menores e com menos tendência que o linear. A Figura 24 mostra as superfícies parciais obtidas para o cobre usando-se esse novo planejamento. Nota-se que agora existe a tendência para o sinal atingir um patamar em relação ao pH.

Figura 22 - Gráficos de valores observados versus valores preditos (A) e gráfico de resíduos para o modelo linear (B) do novo planejamento Doehlert para otimização da extração do cobre por DLLME.



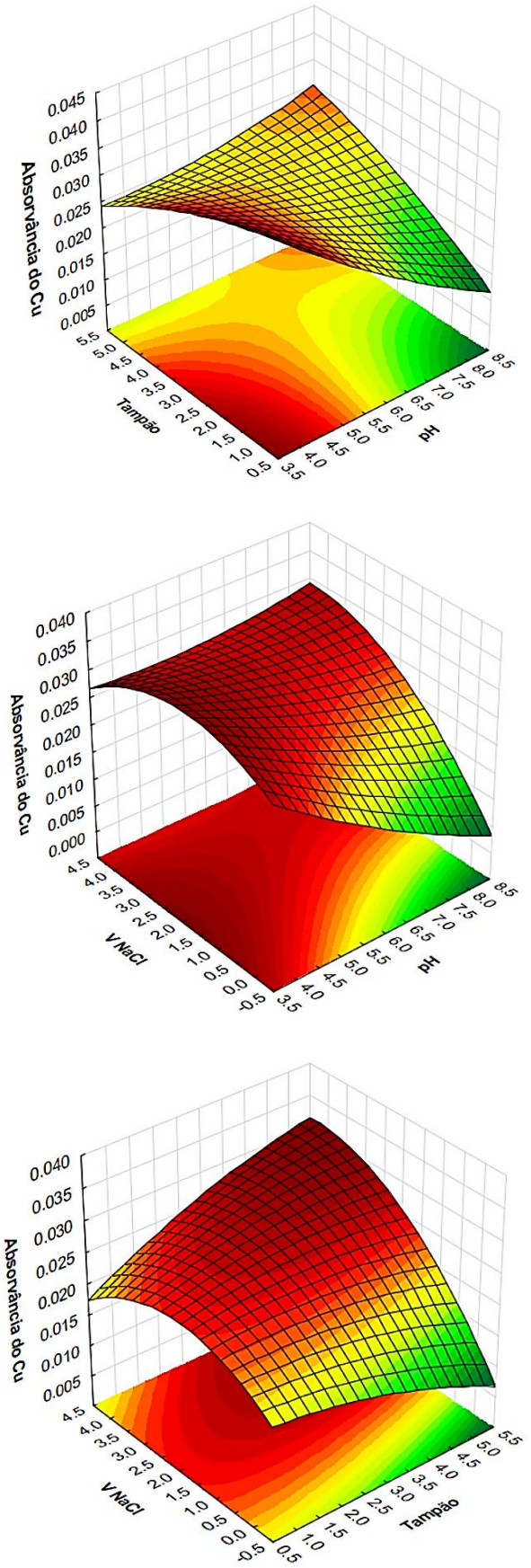
(A) **(B)**

Figura 23 - Gráficos de valores observados versus valores preditos (A) e gráfico de resíduos (B) para o modelo quadrático do novo planejamento Doehlert para otimização da extração do cobre por DLLME.



(A) **(B)**

Figura 24 - Superfícies de resposta para o cobre em novo delineamento experimental.



Apesar do modelo quadrático ainda apresentar falta de ajuste ($p = 0.000424 < 0.05$), ele foi usado para indicar as tendências de comportamento dos dados e indicar as condições ótimas, que são as seguintes: pH (4), volume do tampão (3,0 mL) e volume da solução de NaCl (2,0 mL). A Tabela 10 mostra o resumo da otimização da DLLME.

Tabela 10 - Resumo das condições otimizadas com o planejamento de mistura com restrições e com a matriz Doehlert para aplicação da DLLME.

Analito	VSE (µL)	VSD (mL)	V. Complexante (µL)	pH	V.Tampão (mL)	V.NaCl (mL)
Cu	500	3,8	700	4,0	3,0	2,0
Mn	500	3,8	700	9,5	2,8	1,9

5.4 – Características analíticas da DLLME

É imprescindível validar um método analítico, principalmente, quando se trata da aplicação deste em uma determinada matriz. Validar significa, expressar a eficiência e desempenho do método durante sua aplicação, atribuindo maior confiabilidade aos resultados, e para isto, existem alguns parâmetros de desempenho que devem ser obtidos para que o método seja validado, tais como linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão, esta última foi avaliada através do teste de adição/recuperação do metal à amostra .

5.4.1 – Linearidade

A linearidade é capacidade que o método analítico tem em gerar resultados proporcionais as concentrações dos analitos de interesse, ou seja, resultados que sejam lineares dentro da faixa de concentração pré-estabelecida pelo analista.

Para estudar a correlação entre o sinal analítico (considerado neste trabalho como absorvância) e as concentrações das especíes em estudo nas soluções padrões. Esta correlação é avaliada através do coeficiente de determinação (R^2), obtido através de uma função linear, que geralmente é chamada de equação da reta, fornecida pela curva de calibração, logo, para que a linearidade seja satisfatória, o coeficiente de determinação deve apresentar valores entre $1 \geq R^2 \geq 0{,}91$, o que significa, que quanto mais próximo de 1 menor a dispersão entre os pontos experimentias e menor a incerteza da estimativa dos coeficiente de regressão [118, 119].

Neste trabalho a linearidade do método foi avaliada através de dois tipos de curvas analíticas, uma com pré-concentração, com aplicação da DLLME, e outra sem pré-concentração (sem a DLLME) com leituras diretas no FAAS.

Foram geradas quatro curvas analíticas que estão apresentadas nas Figuras 25 e 26. As equações obtidas e a faixas de concentrações estudadas encontram-se nas Tabelas 11, com os respectivos valores de R^2 encontrados para o cobre e manganês e ambos valores estão acima de 0.99 e foram considerados adequados.

Tabela 11 - Linearidade e parâmetros das curvas analíticas para extração e pré-concentração de Cu^{2+} e Mn^{2+}.

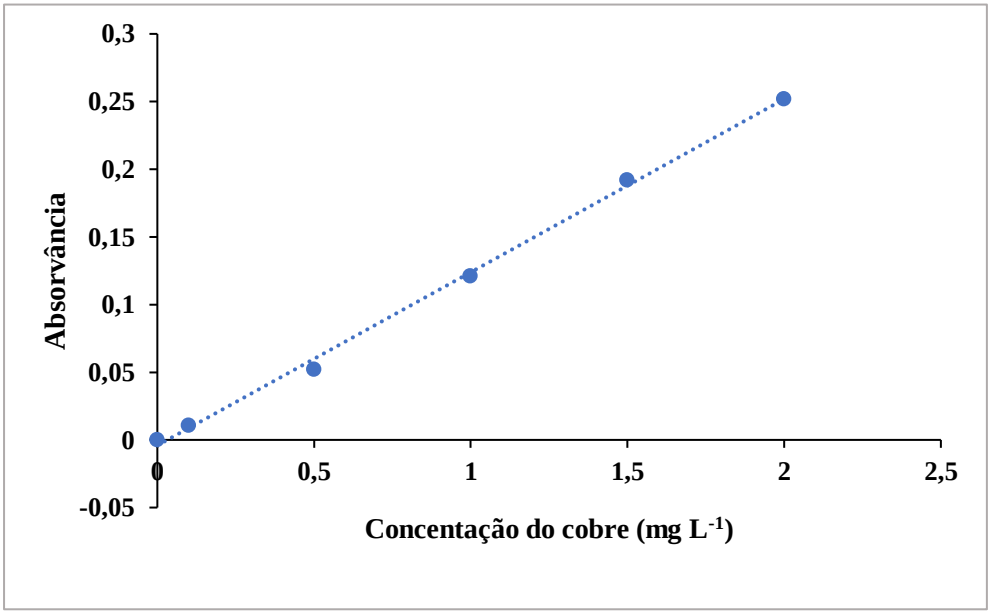
Padrão	Curva	Equação	R^2	Faixa de concentração (µg L^{-1})
Cu	Com pré-concentração (DLLME)	$Abs = 0{,}0014 * [Cu^{2+}] + 5x10^{-1}$	0,9957	0 – 50,0
Mn		$Abs = 0{,}0018 * [Mn^{2+}] - 0{,}0001$	0,9972	0 – 50,0
Cu	Sem pré-concentração	$Abs = 0{,}128 * [Cu^{2+}] - 0{,}0041$	0,9979	**Faixa de concentração (mg L^{-1})** 0 – 2,0
Mn		$Abs = 0{,}2251 * [Mn^{2+}] - 0{,}0059$	0,9996	0 – 3,0

Com as estimativas dos coeficientes angulares obtidos através das duas curvas analíticas, foi possível também calcular o fator de enriquecimento (FE), tendo-se o cuidado de expressar as curvas nas mesmas unidades de concentração.

O FE indica a eficiência do método analítico proposto, este, é definido matematicamente, como a razão entre o coeficiente angular da curva de calibração com pré-concentração e o coeficiente angular da curva de calibração sem pré-concentração. As curvas analíticas estão apresentadas nas Figuras 25 e 26. Os valores de fatores de pré-concentração encontrados para cobre e manganês estão apresentados na Tabela 12.

Figura 25 - Curvas analíticas (A) sem pré-concentração e (B) com pré-concentração usando a microextração líquido-líquido dispersiva para o cobre.

(A)



(B)

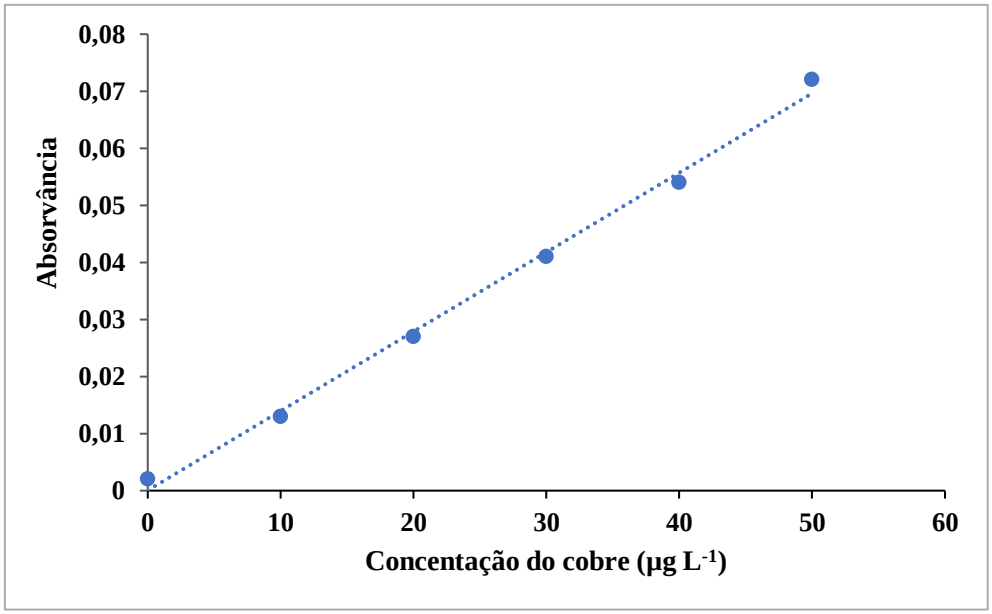
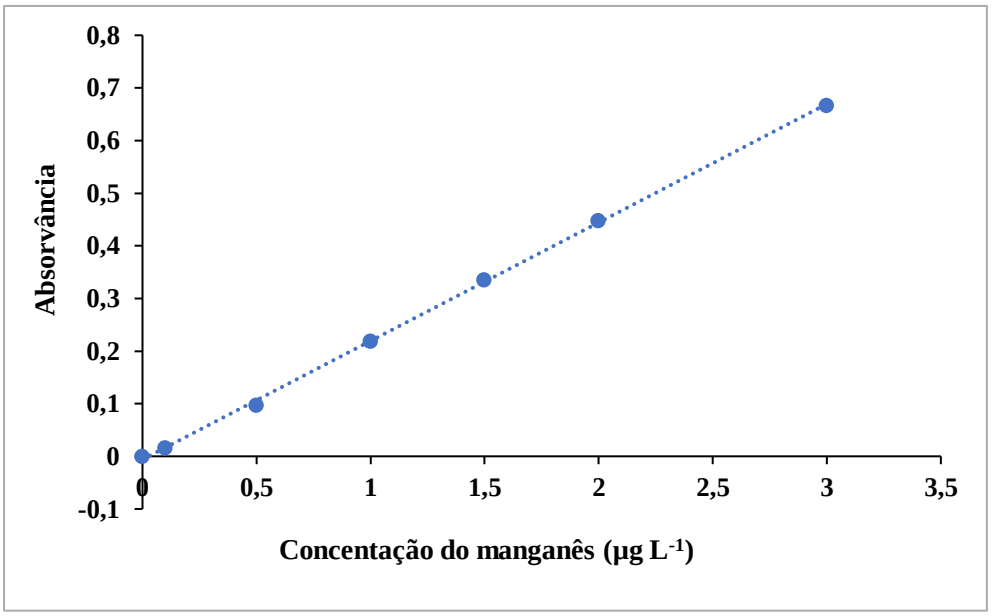
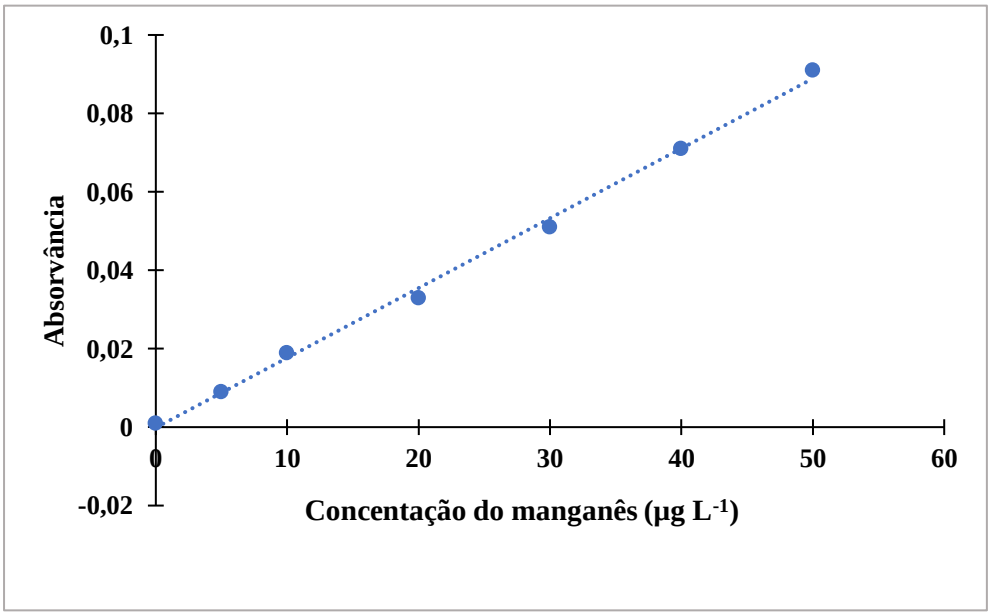


Figura 26 - Curvas analíticas (A) sem pré-concentração e (B) com pré-concentração usando a microextração líquido-líquido dispersiva para o manganês.

(A)



(B)



5.4.2 - Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) foram calculados como recomendado pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) com base no desvio padrão calculado para dez determinações dos sinais obtidos através dos brancos. O LD é definido como a menor concentração que um analito pode ser detectado por uma técnica analítica instrumental, ou seja, é a capacidade da técnica em distinguir entre o sinal analítico fornecido pela menor concentração do analito do ruído de fundo [118].

O LD pode ser calculada como sendo 3,3 vezes o desvio-padrão (S_{Br}) das respostas obtidas pelas leituras sucessivas de no mínimo dez determinações do branco, dividida pelo coeficiente angular (X) obtido da curva analítica com a aplicação do método proposto, de acordo a equação 4.

$$LD = \frac{3{,}3 * S_{Br}}{X} \qquad \text{Equação 4}$$

Por outro lado, o LQ é o nível acima do qual os resultados quantitativos podem ser obtidos em um determinado grau de confiança. O LQ é calculado de forma semelhante ao LD, sendo que o LQ é dez vezes o desvio-padrão (S_{Br}) das respostas obtidas pelas leituras sucessivas do branco (n=10), de acordo a equação 5. Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação para o cobre e manganês encontram-se na **Tabela 12.**

$$LQ = \frac{10 * S_{Br}}{X} \qquad \text{Equação 5}$$

5.4.3 - Precisão

A precisão de um método analítico é comumente definida de duas maneiras, repetibilidade e reprodutibilidade, no primeiro avalia-se o grau de dispersão dos resultados, ou seja, é um indicativo da concordância dos resultados individuais obtidos pelo o mesmo método sob as mesmas condições instrumentais, por um curto intervalo de tempo, quanto maior for a concordância entres os valores individuais, maior a precisão do método e vice-versa [118]. Já a reprodutibilidade é equivalente ao primeiro, porém, em condições distintas [14].

A precisão do método foi acessada como repetibilidade, através do desvio padrão relativo percentual (%RSD) de cinco medidas consecutivas, obtidas após pré-concentração dos padrões de Cu e Mn com concentrações de 10 μg L^{-1}. O %RSD é calculado como a razão entre o desvio padrão (S_c) das medidas nas suas respectivas concentrações e a média ($\bar{C}$) destas concentrações, conforme a Equação 5. O valor calculado para o desvio padrão relativo do método encontra-se na Tabela 12.

$$\%RSD = \left(\frac{S_c}{\bar{C}}\right) x100 \qquad \text{Equação 5}$$

Tabela 12 - Limites de detecção, quantificação, desvio padrão relativo e fator de enriquecimento calculados para o método.

Analito	LD (μg L^{-1})	LQ (μg L^{-1})	RSD (%)	FE
Cu	1,45	4,83	6,62	11
Mn	0,99	3,32	6,00	8

5.4.4 – Exatidão e aplicação da DLLME após a otimização para pré-concentração e extração de cobre e manganês em amostras reais

O método desenvolvido com base na microextração líquido-líquido dispersiva foi aplicado para extração e pré-concentração de cobre e manganês em amostras de água de coco natural (ACN) e industrializada (ACI) comercializadas no munícipio de Jequié/Bahia e também com aplicação em amostras de águas naturais (águas de rio) coletadas no município de Jequié/Bahia e Aiquara/Bahia.

A exatidão deste procedimento foi avaliada através do teste de adição/recuperação dos metais nas amostras. O princípio do teste, baseia-se na adição dos analitos de interesse com concentração conhecida à amostra, seguida da determinação da concentração que foi adicionada. Este procedimento expressa a variação da resposta obtida entre a quantidade de analito adicionada antes da extração e aquela decorrente da adição da mesma quantidade do analito após o processo de extração [119].

A exatidão expressa a eficiência do método através da recuperação, como também avalia o erro sistemático percentual inerente ao processo, logo, para que o método apresente uma boa exatidão, as recuperações aceitáveis para compostos em níveis traços,

devem estar no intervalo entre 75 e 125% [118-119]. Para isso, a quantidade percentual de recuperação do processo pode ser calculada de acordo a equação 6:

$$\%\text{Recuperação} = \left(\frac{C_{\,metal\ adicionada} - C_{real\ do\ metal\ na\ amosta}}{C_{\,metal\ adicionado}}\right) x100 \qquad \text{Equação 6}$$

Nesta etapa, tentamos aplicar o método para extração dos metais na água de coco sem qualquer tratamento prévio das amostras. No entanto, o desempenho do FAAS em fornecer bons sinais analíticos, foi afetado pela composição da matriz, por esta apresentar em sua composição química alto teor de gordura, proteínas, carboidratos (glicose, frutose e sacarose) e ácidos orgânicos, como ácidos tartárico, cítrico e málico [8,**Erro! Indicador não definido.**].

Sendo assim, fez-se necessário uma etapa extra para tratamento da amostra e para isso, a amostra foi submetida a digestão convencional na presença de HNO_3/H_2O_2 com aquecimento, afim de eliminar os interferentes que, particularmente estão associados a técnica de detecção empregada nesse trabalho. No entanto, este método possui algumas desvantagens como utilização de ácidos concentrados e por esta ser a parte que demanda mais tempo durante a realização da pesquisa. Os resultados após a digestão das amostras estão apresentados na Tabela 13.

Com a análise dos resultados, percebe-se que as concentrações do cobre em todas as amostras de ACI é de duas a quatro vezes maiores em comparação com as concentrações deste mesmo elemento nas amostras de ACN, isso pode ser explicado devido a possíveis contaminações inerentes aos processos envolvidos para comercialização da água de coco. Por outro lado, as concentrações do manganês na ACN (2) e ACI (4) apresentaram composição química similares com relação a este elemento.

Tabela 13 - Determinação de cobre e manganês (µg L^{-1}) em amostras de água coco (N = 3) usando a pré-concentração por microextração líquido-líquido dispersiva e determinação por FAAS.

Amostras	Analito	Adicionado (µg L^{-1})	Encontrado	Recuperação (%)
ACN (1)	**Cu**	0	11 ± 0,4	120
		30	47 ± 0,4	
	Mn	0	13,9 ± 0,5	107
		30	46 ± 0,6	
ACN (2)	**Cu**	0	22 ± 1	-
	Mn	0	16,8 ± 0,3	-
ACI (3)	**Cu**	0	44 ± 2	98
		30	73 ± 1	
	Mn	0	8 ± 1	107
		30	40 ± 1	
ACI (4)	**Cu**	0	51,4 ± 1,9	-
	Mn	0	17,6 ± 0,8	-
ACI (5)	**Cu**	0	41 ± 1	-
	Mn	0	-	-

Na procura por trabalhos publicados com relação a determinação de constituintes inorgânicos (principalmente cobre e manganês) em água de coco natural e industrializada, encontramos o trabalho de Sousa et al. [120], os autores determinaram Ca, Mg, Mn, Fe, Zn e Cu em amostras de água de coco processada e natural com detecção por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES).

No entanto, a preparação da amostra consistiu apenas da etapa de filtração, seguida por uma diluição em ácido nítrico (2% v/v), neste tipo de procedimento realizado pelos autores, não foi possível quantificar o teor de Cu nas amostras de ACN, a quantificação deste elemento, só possível nas amostras de água de coco processadas.

A aplicação deste procedimento para determinação simultânea de cobre e manganês em água de coco, é o primeiro trabalho fazendo uso da DLLME para extração e pré-concentração destes elementos seguida de determinação por FAAS, os trabalhos publicados dão ênfases em determinações de macronutrientes (Na, K, Mg, Ca) presentes neste tipo de amostra ou a determinação de pesticidas em água de coco [121,122].

Em um dos trabalhos encontrados, os autores determinaram cádmio e chumbo em água de coco industrializada [123]. Entretanto, em nenhum destes trabalhos usou-se a DLLME como referência no desenvolvimento das pesquisas.

As características analíticas obtidas com o método desenvolvido neste trabalho, foram comparadas com as de outros métodos já publicados na literatura, para extração e determinação de cobre e manganês em diferentes amostras, com detecção em distintas técnicas analíticas, como mostrado na Tabela 15. Portanto, pode-se verificar que o método desenvolvido neste trabalho possui característica analíticas satisfatórias, comparáveis com diversos métodos publicados na literatura.

Tabela 14 - Comparação entre o método de DLLME proposto neste trabalho, com outros métodos de extração e microextração reportados na literatura para cobre e manganês.

Téc. de extração	Amostra	Analito	Agente complexante	Fase extratora	LD (µg L^{-1})	RSD (%)	FE[a]	FE[b]	Detecção	Ref.
SS-LPME	Água, alimento e cabelo	Cu	PAN	TEA	1,8	3,8	17,6	25	FAAS	[124]
DLLME	Água de rio e mineral	Cu Mn	-	Clorofórmio	7 6	-	6,5	-	ICP-AES	[125]
SPE	Água e vegetais secos	Cu Mn	-	PTMAAm-co-DVB-co-AMPS	2,2 0,90	2	-	75	FAAS	[126]
AA-DLLME	Cachaça	Mn	PAN	Tricloetileno	1,64	4,5	18	-	FAAS	[127]
USA-EME-SFO	Água de rio	Mn	Br-PADAP	1-Undecanol	0,30	3,3	-	160	GFAAS	[128]
IL-DLLME	Água	Cu	DDTC	$C_{16}C_4$Im-Br	3,3	8,8	-	54	FAAS	[129]
DLLME	Água de coco	Cu Mn	Br-PADAP	Clorofórmio	1,45 0,99	6,62 6,00	11 8	125	FAAS	Este trabalho

PAN - 1- (2-piridilazo) -2 naftol; TEA – Trietilamina; DDTC - Dietil ditiocarbamato; $C_{16}C_4$Im-Br - Brometo de 1-hexadecil-3-butilimidazólio SS-LPME - microextração em fase líquida comutável à base de solvente; ICP-AES espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado; a - Fator de enriquecimento calculado como a razão entre o coeficiente angular da curva de calibração com pré-concentração e o coeficiente angular da curva de calibração sem pré-concentração; b - Fator de pré-concentração calculado como sendo a razão entre o volume inicial da amostra e volume final da fase extratora (PF = V_a/V_f); PTMAAm-co-DVB-co-AMPS - ácido poli[fenil tiadiazol metacrilamida-co-divinilbenzeno-co-2-acrilamido-2-metilpropano sulfônico]; AA-DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ar; USA-EME-SFO - Microextração por emulsificação assistida por ultrassom baseada em gota orgânica flutuante de solidificação.

6 - CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O método DLLME-FAAS desenvolvido neste trabalho, mostrou-se eficiente para extração e quantificação de cobre e manganês em amostras de água de coco. O procedimento proposto é simples, de baixo custo, principalmente em relação a quantidade de reagentes utilizados, sendo estes, de uso comum em laboratórios de pesquisa, não necessitando de reagentes de alto custo, além disso, o tempo de extração dos analitos é extremante rápido, tornado a DLLME que foi desenvolvida neste trabalho, ainda mais interessante, para determinação de metais traços em matrizes distintas.

Portanto, podemos considerar que a DLLME-FAAS, se mostra acessível à laboratório de análise de rotina, visto que, a técnica de detecção empregada também é acessível a maioria dos laboratórios de análises químicas, por ser considerada uma técnica simples e bem estabelecida para detecção de espécies metálicas.

No entanto, vale lembrar, que apesar do método proposto utilizar solvente organoclorado, o volume utilizado deste tipo de solvente, para aplicação do método, é na faixa de microlitros (<1000 μL), logo, os resíduos gerados são bem menores, comparado com os resíduos gerados por métodos clássicos de pré-concentração (LLE, SPE, etc.), sendo assim, podemos considerar que o método DLLME-FAAS, atende os objetivos da química analítica verde.

As características analíticas do procedimento DLLME-FAAS, mostraram-se satisfatória, sendo possível alcançar baixos níveis dos limites de detecção e quantificação para ambos os analitos, boa precisão e exatidão satisfatória, esta última, evidenciada pela recuperação dos analitos (96–120%), percebe-se também que o método não foi afetado pelo efeito de matriz. Os resultados apresentados neste trabalho, também demostra a eficiência da DLLME-FAAS para extração e quantificação de espécies metálicas em matrizes mais complexas.

O uso das ferramentas quimiométricas como planejamento de mistura com restrição, seguida da aplicação da função de desejabilidade e a metodologia de superfícies de respostas associada à matriz de Doehlert, mostraram-se essenciais para o delineamento deste trabalho, para estabelecer as melhores condições para a determinação de cobre e manganês nas amostras de água de coco, com um número reduzido de experimentos, sem interferir na precisão e exatidão do método e, contribuindo também para a redução dos custos e do tempo de preparo de soluções e das análises.

Por fim, tem-se como perspectiva futura a aplicação da DLLME-FAAS, para determinação de outros íons metálicos principalmente aqueles potencialmente tóxicos neste tipo de matriz, justificado pela escassez de informação relacionada a presença destes tipos de analitos na água de coco tanto in natura, quanto industrializada, bem como a aplicação deste método em outros tipos de matrizes, na busca por determinações cada vez mais sensíveis e também combina-lo com outras técnicas analíticas de detecção.

REFERÊNCIAS

[1] CADERNO SETORIAL ETENE. **Produção de Coco: O Nordeste é destaque nacional**. Ano 3, nº 61, dezembro de 2018.

[2] ROSA, THALLES R.; RODRIGUES, JOSÉ GUILHERME A.; FERREIRA, RAFAEL DE Q. Uso do planejamento experimental para otimização de um procedimento voltamétrico para determinação simultânea das concentrações dos metais Zn, Cd, Pb e Cu livres em água de coco. **Química Nova.**, v. 39, p. 221-228, 2015.

[3] ARAGÃO, W. M.; ISBERNER, I. V.; CRUZ, E. M. de O. **Água de coco**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001. (Série Documentos, 24).

[4] CAMBUI, ÉRICA VERENA; ARAGÃO, WILSON MENESES; LEAL, LOURDES SILVA. Variabilidade Genética entre cultivares de coqueiro anão (Cocos nucifera L.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. 165-167, 2007.

[5] CARVALHO, J. M., MAIA, G. A., DE SOUSA, P. H. M., & MAIA JR, G. A. Água-de-coco: propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Semina: Ciências Agrárias**, 27(3), 437-452, 2006.

[6] PRADES, A., DORNIER, M., DIOP, N., & PAIN, J. P. Coconut water uses, composition and properties: a review. **Fruits**, 67(2), 87-107, 2012.

[7] GE, L., YONG, J. W. H., TAN, S. N., YANG, X. H., & ONG, E. S**.** Analysis of cytokinin nucleotides in coconut (Cocos nucifera L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction**. Journal of Chromatography A**, 1133(1-2), 322-331, 2006.

[8] TAN, THUAN-CHEW, et al. Composition, physicochemical properties and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase from coconut (Cocos nucifera) water obtained from immature, mature and overly-mature coconut**. Food Chemistry**, v.142: 121-128, 2014.

[9] ASSA, R. R., PRADES, A., KONAN, A. G., NEMLIN, J., & KONAN, J. L. Sensory evaluation and sugars contents of coconut (# Cocos nucifera# l.) water during nuts ripening. **African Journal of Food Science**, 7(7), 186-192, 2013.

[10] JACKSON, J. C., GORDON, A., WIZZARD, G., MCCOOK, K., & ROLLE, R. Changes in chemical composition of coconut (Cocos nucifera) water during maturation of the fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** 84(9), 1049-1052, 2004.

[11] RESENDE, J. M., de ASSIS, J. S., REIS, C. D. S., & Aragão, W. M. **Colheita e manuseio pós-colheita**. Embrapa Semiárido-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E), 2002.

[12] APPAIAH, P., SUNIL, L., KUMAR, P. P., & KRISHNA, A. G. Physico-chemical characteristics and stability aspects of coconut water and kernel at different stages of maturity. **Journal of food science and technology**, 52(8), 5196-5203, 2015.

[13] AROUCHA, E. M. M., DE MAGALHÃES, J. A. S., AROUCHA, M. C. M., VIANA, A. P., & VIANNI, R. Composição lipídica do albúmen do coco anão verde e anão vermelho em diferentes estádios de maturação**. Revista Caatinga**, 18(3), 143-147, 2005.

[14] Bezerra, M. D. A. Aplicação de matriz de Doehlert na otimização de um sistema de pré-concentração em linha para determinação de cobre usando Espectrometria de absorção atômica com chama**. Dissertações de Mestrado,** Programa de Pós-Graduação em Química da UFBA, 2003.

[15] GOMES, Catarina Salgueiro de Magalhães. **Cobre: fisiologia e fisiopatologia**. Dissertação de Mestrado da IUEM - Ciências Farmacêuticas, 2016.

[16] COHU, C. M., & Pilon, M. Cell biology of copper. In Cell biology of metals and nutrientes. **Springer, Berlin, Heidelberg**, p. 55-74, 2010.

[17] SILVA, D. A. F.; MENEZES, M. L.; KEMPINAS, W. G. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de catecolaminas em órgãos reprodutores de ratos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica. **Eclética Química**, v. 32, n. 4, p. 35-42, 2007.

[18] CAO, X., QIN, M., LI, P., ZHOU, B., TANG, X., GE, M., & LIU, J. Probing catecholamine neurotransmitters based on iron-coordination surface-enhanced resonance Raman spectroscopy label**. Sensors and Actuators B: Chemical**, 268, 350-358, 2018.

[19] PIRES, A. M. M. **Doença de Wilson e o metabolismo do cobre**. Dissertação de mestrado., Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Univ. do Algarve, 2012.

[20] SARGENTELLI, V., MAURO, A. E., & MASSABNI, A. C. **Aspectos do metabolismo do cobre no homem**. Química Nova, 19(3), 290-293, 1996.

[21] GROTTO, H. Z. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e hemoterapia**, 30(5), 390-397, 2008.

[22] TURNLUND, J. R. Human whole-body copper metabolism. **The American journal of clinical nutrition**, 67(5), 960S-964S, 1998.

[23] FIORINI, L. S. **Dossiê: Os minerais na alimentação. Food Ingredients Brasil**, v. 4, p. 48-58, 2008. Disponível em: <https://revista-fi.com.br/>. Acesso em: 24 Janeiro. 2020.

[24] BAYNES, JOHN W.; DOMINICZAK, Marek H. **Bioquímica médica**. Elsevier Brasil, 2010.

[25] COX, D. W. Disorders of copper transport. **British medical bulletin**, 55(3), 544-555, 1999.

[26] GARCÍA-RODRÍGUEZ, N., ANDRESON, B., MONJE-CASAS, F., ROTHSTEIN, R., & WELLINGER, R. E. **I**mpaired manganese metabolism causes mitotic misregulation. **Journal of Biological Chemistry**, 287(22), 18717-18729, 2012.

[27] MIRIYALA, S., SPASOJEVIC, I., TOVMASYAN, A., SALVEMINI, D., VUJASKOVIC, Z., CLAIR, D. S., & BATINIC-HABERLE, I. Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, 1822(5), 794-814, 2012.

[28] ERIKSON, K. M., THOMPSON, K., ASCHNER, J., & ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity: a focus on the neonate. **Pharmacology & therapeutics**, 113(2), 369-377, 2007.

[29] DAS, A. P., GHOSH, S., MOHANTY, S., & SUKLA, L. B. Consequences of manganese compounds: a review. **Toxicological & Environmental Chemistry**, 96(7), 981-997, 2014.

[30] Iqbal, M., MONAGHAN, T., & REDMOND, J. Manganese toxicity with ephedrone abuse manifesting as parkinsonism: a case report**. Journal of medical case reports**, 6(1), 52, 2012.

[31] CALNE, D. B. et al. Manganism and idiopathic parkinsonism: similarities and differences. **Neurology,** v. 44, n. 9, p. 1583-1586, 1994.

[32] SARAJI, MOHAMMAD; BOROUJENI, MALIHE KHALILI. Recent developments in dispersive liquid–liquid microextraction. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 406, n. 8, p. 2027-2066, 2014.

[33] VIÑAS, P., CAMPILLO, N., LÓPEZ-GARCÍA, I., & HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Dispersive liquid–liquid microextraction in food analysis. A critical review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 406(8), 2067-2099, 2014.

[34] KHANI, ROUHOLLAH; SHEMIRANI, FARZANEH; MAJIDI, BEHROOZ. Combination of dispersive liquid–liquid microextraction and flame atomic absorption spectrometry for preconcentration and determination of copper in water samples. **Desalination**, v. 266, n. 1-3, p. 238-243, 2011.

[35] EL-SHAHAWI, M. S.; AL-SAIDI, H. M. Dispersive liquid-liquid microextraction for chemical speciation and determination of ultra-trace concentrations of metal ions. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 44, p. 12-24, 2013.

[36] RAJABI, M., KAMALABADI, M., JAMALI, M. R., ZOLGHARNEIN, J., & ASANJARANI, N. Application of response surface methodology for optimization of ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction of cadmium from water samples. **Human & experimental toxicology,** 32(6), 620-631, 2013.

[37] KUROWSKA-SUSDORF, A., ZWIERŻDŻYŃSKI, M., BEVANDA, A. M., TALIĆ, S., IVANKOVIĆ, A., & PŁOTKA-WASYLKA, J. Green analytical chemistry: Social dimension and teaching. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, *111*, 185-196, 2019.

[38] DE PINTO, IOHANA PINTO; PEDROSO, M. P. Microextração em gota única (SDME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 3, p. 183-198, 2015.

[39] DJOZAN, DJ; ASSADI, Y. A new porous-layer activated-charcoal-coated fused silica fiber: application for determination of BTEX compounds in water samples using headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography. **Chromatographia**, v. 45, n. 1, p. 183-189, 1997.

[40] JEANNOT, MICHAEL A.; CANTWELL, FREDERICK F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical chemistry,** v. 68, n. 13, p. 2236-2240, 1996.

[41] PEDERSEN-BJERGAARD, STIG; RASMUSSEN, KNUT EINAR. Liquid− liquid− liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2650-2656, 1999.

[42] REZAEE, MOHAMMAD et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1-2, p. 1-9, 2006.

[43] BERIJANI, SANA et al. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection: very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water**. Journal of Chromatography** A, v. 1123, n. 1, p. 1-9, 2006.

[44] SOUZA-SILVA, ÉRICA A. et al. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 224-235, 2015.

[45] SOUZA-SILVA, ÉRICA A.; GIONFRIDDO, EMANUELA; PAWLISZYN, JANUSZ. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 236-248, 2015.

[46] HU, BIN et al. Liquid phase microextraction for the analysis of trace elements and their speciation. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 86, p. 14-30, 2013.

[47] JAIN, ARCHANA; VERMA, KRISHNA K. Recent advances in applications of single-drop microextraction: a review. **Analytica chimica acta**, v. 706, n. 1, p. 37-65, 2011.

[48] S. TANG, T. QI, P.D. ANSAH, J.C. NALOUZEBI FOUEMINA, W. SHEN, C. BASHEER, H.K. LEE, Single-Drop Microextraction, **Trends in Analytical Chemistry (2018), doi**: https:// doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.016.0

[49] LEMOS, VALFREDO AZEVEDO; VIEIRA, UELBER SILVA. Single-drop microextraction for the determination of manganese in seafood and water samples. **Microchimica Acta**, v. 180, n. 5-6, p. 501-507, 2013.

[50] PARK, SUNG TAI et al. Headspace-single drop microextraction with a commercial capillary electrophoresis instrument. **Electrophoresis**, v. 33, n. 19-20, p. 2961-2968, 2012.

[51] LÓPEZ-GARCÍA, IGNACIO; RIVAS, RICARDO E.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, MANUEL. Hollow fiber based liquid-phase microextraction for the determination of mercury traces in water samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 743, p. 69-74, 2012.

[52] VERGEL, CRISTINA et al. HF-LPME as a green alternative for the preconcentration of nickel in natural waters. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 404, n. 3, p. 665-670, 2012.

[53] HU, BIN et al**.** Liquid phase microextraction for the analysis of trace elements and their speciation. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy,** v. 86, p. 14-30, 2013.

[54] HAMIDI, SAMIN; ALIPOUR-GHORBANI, NASTARAN. Liquid-phase microextraction of biomarkers: A review on current methods. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 40, n. 16, p. 853-861, 2017.

[55] SANTOS, ANALÚ PIRES; KORN, MARIA DAS GRAÇAS ANDRADE; LEMOS, VALFREDO AZEVEDO. Methods of liquid phase microextraction for the determination of cadmium in environmental samples. **Environmental monitoring and assessment**, v. 189, n. 9, p. 444, 2017.

[56] PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 565-574, 2003.

[57] AL-SAIDI, H. M.; EMARA, Adel AA. The recent developments in dispersive liquid–liquid microextraction for preconcentration and determination of inorganic analytes. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 6, p. 745-761, 2014.

[58] REZAEE, MOHAMMAD; YAMINI, YADOLLAH; FARAJI, MOHAMMAD. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2342-2357, 2010.

[59] SOYLAK, M.; KIRANARTLIGILLER, E. A simple vortex-assisted dispersive liquid–liquid microextraction system for copper (II) to preconcentration and separation from natural water and table salt samples. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 42, n. 1, p. 175-181, 2017.

[60] GUAN, JIN et al. Simultaneous determination of 12 pharmaceuticals in water samples by ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 408, n. 28, p. 8099-8109, 2016.

[61] YAO, CONG et al. Selective extraction of emerging contaminants from water samples by dispersive liquid–liquid microextraction using functionalized ionic liquids. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 12, p. 1556-1566, 2011.

[62] MANDLATE, JAIME S. et al. Determination of cadmium and lead at sub-ppt level in soft drinks: An efficient combination between dispersive liquid-liquid microextraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food chemistry**, v. 221, p. 907-912, 2017.

[63] WEN, XIAODONG et al. Determination of cadmium and copper in water and food samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with UV–vis spectrophotometry. **Microchemical Journal**, v. 97, n. 2, p. 249-254, 2011.

[64] CHOU, TSO-YING; LIN, SHU-LING; FUH, MING-REN. Determination of phenylurea herbicides in aqueous samples using partitioned dispersive liquid–liquid microextraction. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 493-498, 2009.

[65] SOBHI, HAMID REZA et al. Tandem use of solid-phase extraction and dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of mononitrotoluenes in aquatic environment. **Journal of separation science**, v. 34, n. 9, p. 1035-1040, 2011.

[66] BIDARI, ARAZ et al. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1840-1844, 2011.

[67] SOBHI, HAMID REZA et al. Quantitation of mononitrotoluenes in aquatic environment using dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–flame ionization detection. **Journal of hazardous materials**, v. 175, n. 1-3, p. 279-283, 2010.

[68] MARTINS, MANOEL LEONARDO. et al. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v.4, p.29-45, 2012. Disponível em: <http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/sc.2012.004>Acesso em: 20 Fevereiro de 2020.

[69] CHEN, HAO; CHEN, RUIWEN; LI, SHENGQING. Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 8, p. 1244-1248, 2010.

[70] GUO, LIANG; LEE, HIAN KEE. Low-density solvent based ultrasound-assisted emulsification microextraction and on-column derivatization combined with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1235, p. 1-9, 2012.

[71] TRUJILLO-RODRÍGUEZ, MARÍA J. et al. Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 51, p. 87-106, 2013.

[72] YOUSEFI, SEYED REZA; SHEMIRANI, FARZANEH. Development of a robust ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction against high concentration of salt for preconcentration of trace metals in saline aqueous samples: Application to the determination of Pb and Cd. **Analytica chimica acta**, v. 669, n. 1-2, p. 25-31, 2010.

[73] SEEGER, TASSIA S. et al. Feasibility of dispersive liquid–liquid microextraction for extraction and preconcentration of Cu and Fe in red and white wine and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 105, p. 136-140, 2015.

[74] DAŞBAŞI, TESLIMA et al. A simple dispersive liquid–liquid microextraction method for determination of Ag (I) by flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 28, p. 316-321, 2015.

[75] DUARTE, JAQUELINE DA SILVA; DORES, ELIANA FREIRE GASPAR DE CARVALHO; VILLA, RICARDO 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.

[76] CINELLI, GIUSEPPE et al. Ultrasound-vortex-assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography with a nitrogen–phosphorus detector for simultaneous and rapid determination of organophosphorus pesticides and triazines in wine. **Analytical Methods**, v. 6, n. 3, p. 782-790, 2014.

[77] MELWANKI, MAHAVEER B. et al. Determination of 7-aminoflunitrazepam in urine by dispersive liquid–liquid microextraction with liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 78, n. 2, p. 618-622, 2009.

[78] MEIRA, LUCILIA ALVES. **Desenvolvimento de método analítico baseado na microextração líquidolíquido dispersiva assistida por ultrassom utilizando 5-(4-dimetilaminobenzildeno) rodanina para pré-concentração de cádmio e zinco.** Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQUI), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (Uesb). 2016.

[79] BARRETO, J. A. **Um novo e rápido sistema de pré-concentração em linha automatizado usando duplo reator enovelado para a determinação de chumbo e manganês em amostras de chás por FAAS**. B263. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQUI), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (Uesb). 2016.

[80] SHIBATA, SHOZO; FURUKAWA, MASAMICHI; TOEI, KYOJI. Syntheses and spectrophotometric studies of azo dyes containing m-dimethylaminophenol as analytical reagents. **Analytica Chimica Acta**, v. 66, n. 3, p. 397-409, 1973.

[81] HASHEMI, PAYMAN et al. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Cu (II) Using a Novel Dioxime for Its Highly Sensitive Determination by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 57, n. 1, p. 111-117, 2010.

[82] NAJAFI, NAHID MASHKOURI et al. Speciation and determination of ultra trace amounts of inorganic tellurium in environmental water samples by dispersive liquid–liquid microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 670, n. 1-2, p. 18-23, 2010.

[83] ZHOU, QINGXIANG; ZHAO, NA; XIE, GUOHONG. Determination of lead in environmental waters with dispersive liquid–liquid microextraction prior to atomic fluorescence spectrometry. **Journal of hazardous materials**, v. 189, n. 1-2, p. 48-53, 2011.

[84] MAJIDI, BEHROOZ; SHEMIRANI, FARZANEH. Solvent-based de-emulsification dispersive liquid–liquid microextraction of palladium in environmental samples and determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 93, p. 245-251, 2012.

[85] ANTHEMIDIS, ARISTIDIS N. et al. On-line micro-volume introduction system developed for lower density than water extraction solvent and dispersive liquid–liquid microextraction coupled with flame atomic absorption spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 733, p. 34-37, 2012.

[86] WEN, SHENGPING; ZHU, XIASHI. Speciation analysis of Mn (II)/Mn (VII) in tea samples using flame atomic absorption spectrometry after room temperature ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction. **Food analytical methods**, v. 7, n. 2, p. 291-297, 2014.

[87] LÓPEZ-GARCÍA, IGNACIO et al. Rapid screening of water soluble arsenic species in edible oils using dispersive liquid–liquid microextraction. **Food chemistry**, v. 167, p. 396-401, 2015.

[88] RAJABI, M. et al. Application of response surface methodology for optimization of ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction of cadmium from water samples. **Human & experimental toxicology**, v. 32, n. 6, p. 620-631, 2013.

[89] YOUSEFI, SEYEDEH MAHBOOBEH; SHEMIRANI, FARZANEH. Selective and sensitive speciation analysis of Cr (VI) and Cr (III) in water samples by fiber optic-linear array detection spectrophotometry after ion pair based-surfactant assisted dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of hazardous materials**, v. 254, p. 134-140, 2013.

[90] LEMOS, VALFREDO AZEVEDO; DOS SANTOS VIEIRA, EMANUEL VITOR. Method for the determination of cadmium, lead, nickel, cobalt and copper in seafood after dispersive liquid–liquid micro-extraction. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 11, p. 1872-1878, 2014.

[91] GAUBEUR, IVANISE et al. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with laser-induced breakdown spectrometry and inductively coupled plasma optical emission spectrometry to elemental analysis. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 219-226, 2015.

[92] BAĞDA, ESRA; TUZEN, MUSTAFA. Determination of uranium in water samples with chromogenic reagent 4-(2-thiazolylazo) resorcinol after ionic liquid based dispersive liquid liquid microextraction. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 309, n. 2, p. 453-459, 2016.

[93] JAVEDANI-ASLEH, FARZANEH; EFTEKHARI, MOHAMMAD; CHAMSAZ, MAHMOUD. Determination of total thallium in water and spinach samples by ligandless microextraction using ion pair-based dispersive liquid–liquid microextraction followed by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectroscopy Letters**, v. 49, n. 6, p. 420-425, 2016.

[94] AYDIN, FUNDA; YILMAZ, ERKAN; SOYLAK, MUSTAFA. Supramolecular solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction of copper from water and hair samples. **RSC Advances**, v. 5, n. 50, p. 40422-40428, 2015.

[95] CHANDRASEKARAN, KRISHNAN; KARUNASAGAR, DHERAM. Dispersive liquid–liquid microextraction for simultaneous preconcentration of platinum group elements (Pd, Os, Ir, and Pt) and selected transition elements (Ag, Cd, Ta, and Re) at parts per trillion levels in water and their determination by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, n. 5, p. 1131-1140, 2016.

[96] PENG, GUILONG et al. Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Using Low-Toxic Solvent for the Determination of Heavy Metals in Water Samples by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 1, p. 260-266, 2016.

[97] KARADAŞ, CENNET; KARA, DERYA. Dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop for preconcentration and determination of trace amounts of copper by flame atomic absorption spectrometry. **Food chemistry**, v. 220, p. 242-248, 2017.

[98] MEIRA, LUCÍLIA ALVES; DE SOUZA DIAS, FÁBIO. Application of constrained mixture design and Doehlert matrix in the optimization of dispersive liquid-liquid microextraction assisted by ultrasound for preconcentration and determination of cadmium in sediment and water samples by FAAS. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 56-63, 2017.

[99] MANDLATE, JAIME S. et al. Determination of cadmium and lead at sub-ppt level in soft drinks: An efficient combination between dispersive liquid-liquid microextraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food chemistry**, v. 221, p. 907-912, 2017.

[100] BIATA, N. RAPHAEL et al. Determination of antimony and tin in beverages using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry after ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid phase microextraction. **Food chemistry**, v. 237, p. 904-911, 2017.

[101] ALTUNAY, NAIL; YILDIRIM, EMRE; GÜRKAN, RAMAZAN. Extraction and preconcentration of trace Al and Cr from vegetable samples by vortex-assisted ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction prior to atomic absorption spectrometric determination. **Food chemistry**, v. 245, p. 586-594, 2018.

[102] BORZOEI, MOHAMMAD et al. Optimization of a methodology for determination of iron concentration in aqueous samples using a newly synthesized chelating agent in dispersive liquid-liquid microextraction. **Food chemistry**, v. 264, p. 9-15, 2018.

[103] SOROURADDIN, SAEED MOHAMMAD; FARAJZADEH, MIR ALI; DASTOORI, HOSSEIN. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method based on a ternary deep eutectic solvent as chelating agent and extraction solvent for preconcentration of heavy metals from milk samples. **Talanta,** 208: 120485, 2020.

[104] BARRETO, JEFERSON ALVES, et al. A novel strategy based on in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of nickel in chocolate samples. **Talanta,** 193: 23-28, 2019.

[105] HABIBOLLAHI, MOHAMMAD HOSSEIN, et al. Extraction and determination of heavy metals in soil and vegetables irrigated with treated municipal wastewater using new mode of dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidified deep eutectic solvent followed by GFAAS. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 99.2: 656-665, 2019.

[106] MACHADO, IGNACIO; TISSOT, FLORENCIA. Dispersive liquid-liquid microextraction as a preconcentration alternative to increase ETAAS sensitivity in the analysis of molybdenum in bovine meat and pasture samples. **Talanta**, 212: 120783, 2020.

[107] NOVAES, CLEBER GALVÃO et al. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies de Resposta - Parte II: Variáveis de Mistura. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 2, 2018.

[108] LEARDI, RICCARDO. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Analytica chimica acta**, v. 652, n. 1-2, p. 161-172, 2009.

[109] GORMAN, J. W.; HINMAN, J. E. Simplex lattice designs for multicomponent systems. **Technometrics**, v. 4, n. 4, p. 463-487, 1962.

[110] COSCIONE, ALINE RENÉE; ANDRADE, JOÃO CARLOS DE; MAY, GYDA MARIE. O modelamento estatístico de misturas: experimento tutorial usando voltametria de redissolução anódica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1116-1122, 2005.

[111] NETO, BENÍCIO BARROS; SCARMINIO, IEDA SPACINO; BRUNS, ROY EDWARD. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Bookman Editora, 2010, p. 315.

[112] DAL BELLO, LUIZ HENRIQUE ABREU. **Modelagem em experimentos mistura-processo para otimização de processos industriais**. 2010. Tese de Doutorado. Doctoral Thesis, PUC, Rio de Janeiro.

[113] LEARDI, RICCARDO. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Analytica chimica acta**, v. 652, n. 1-2, p. 161-172, 2009.

[114] NOVAES, C. G., BEZERRA, M. A., DA SILVA, E. G. P., DOS SANTOS, A. M. P., DA SILVA ROMAO, I. L., & NETO, J. H. S. A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). **Microchemical journal**, *128*, 331-346, 2016.

[115] FERREIRA, SÉRGIO LC et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry. **Talanta**, v. 63, n. 4, p. 1061-1067, 2004.

[116] NOVAES, C. G. et al. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta - Parte I: variáveis de processo. **Revista Virtual Quimica**, v. 9, n. 3, p. 1284-1215, 2017.

[117] TEÓFILO, REINALDO F.; FERREIRA, MÁRCIA. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

[118] DE AMARANTE JUNIOR, OZELITO POSSIDÔNIO et al. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq., São Luís**, v. 12, n. 1/2, p. 116-131, 2001.

[119] RIBANI, MARCELO et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

[120] SOUSA, RAFAEL ARROMBA de et al. Classificação de água de coco processada e natural por meio de HCA, PCA e teores de íons metálicos determinados por ICP OES. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 654-656, 2006.

[121] DEME, PRAGNEY et al. LC-MS/MS determination of organophosphorus pesticide residues in coconut water. **Food analytical methods**, v. 6, n. 4, p. 1162-1169, 2013.

[122] FERREIRA, JORDANA ALVES et al. Determination of pesticides in coconut (Cocos nucifera Linn.) water and pulp using modified QuEChERS and LC–MS/MS. **Food chemistry**, v. 213, p. 616-624, 2016.

[123] PAIXÃO, LUCIANE B. et al. Assessment of cadmium and lead in commercial coconut water and industrialized coconut milk employing HR-CS GF AAS. **Food chemistry**, v. 284, p. 259-263, 2019.

[124] YILMAZ, ERKAN; SOYLAK, MUSTAFA. Switchable solvent-based liquid phase microextraction of copper (II): optimization and application to environmental samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, n. 7, p. 1629-1635, 2015.

[125] MARTÍNEZ, DAVID et al. Coupling dispersive liquid-liquid microextraction to inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: An oxymoron? **Talanta**, v. 176, p. 374-381, 2018.

[126] DAŞBAŞI, TESLIMA et al. SPE and determination by FAAS of heavy metals using a new synthesized polymer resin in various water and dried vegetables samples. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 55, n. 3, p. 288-295, 2018.

[127] FONTES, ADRIELLE S. et al. Development of Method Based on Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Air-Assisted for Multi-Element Determination of Cadmium and Manganese in Sugarcane Spirit (Brazilian cachaça) by FAAS. **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 1, p. 222-229, 2020.

[128] MOHADESI, ALIREZA; FALAHNEJAD, MASOUMEH. Ultrasound-assisted emulsification microextraction based on solidification floating organic drop trace amounts of manganese prior to graphite furnace atomic absorption spectrometry determination. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

[128] AYALA-CABRERA, JUAN F. et al. Ionic liquids versus ionic liquid-based surfactants in dispersive liquid–liquid microextraction for determining copper in water by flame atomic absorption spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 96, n. 2, p. 101-118, 2016.