



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEONARDO FRANCISCO RAFAEL LEMES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A
DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO POR TS-FF-AAS EM
FARINHA DE LINHAÇA COMBINANDO EXTRAÇÃO
ASSISTIDA POR ULTRASSOM E PRÉ-CONCENTRAÇÃO
POR SOLVENTE SUPRAMOLECULAR**

Londrina
2020

LEONARDO FRANCISCO RAFAEL LEMES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A
DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO POR TS-FF-AAS EM
FARINHA DE LINHAÇA COMBINANDO EXTRAÇÃO
ASSISTIDA POR ULTRASSOM E PRÉ-CONCENTRAÇÃO
POR SOLVENTE SUPRAMOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Lemes, Leonardo Francisco Rafael .

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO POR TS-FF-AAS EM FARINHA DE LINHAÇA COMBINANDO EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E PRÉ-CONCENTRAÇÃO POR SOLVENTE SUPRAMOLECULAR / Leonardo Francisco Rafael Lemes. - Londrina, 2020. 66 f. : il.

Orientador: César Ricardo Teixeira Tarley.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.
Inclui bibliografia.

1. microextração supramolecular - Tese. 2. micelas reversas de ácido dodecanóico-THF - Tese. 3. TS-FF-AAS - Tese. 4. Farinha de Linhaça - Tese. I. Tarley, César Ricardo Teixeira . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

LEONARDO FRANCISCO RAFAEL LEMES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE
CÁDMIO POR TS-FF-AAS EM FARINHA DE LINHAÇA COMBINANDO
EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E PRÉ-
CONCENTRAÇÃO POR SOLVENTE SUPRAMOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Química da Universidade Estadual de Londrina,
como requisito para a obtenção do título de
Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira
Tarley
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Vintor Cinque de Almeida
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 17 de março de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a minha família, aos meus pais José e Vera, a minha irmã Isabelle, aos meus Tios Sebastiana e Pedro, além da minha amada vó Luzia por todo incentivo e palavras de força quando eu mais precisei, além de todo amor incondicional que eles me propõem, Amo Vocês!

Ao Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley pela oportunidade de fazer mestrado, orientação durante esses 2 anos trabalhando juntos, paciência, conselhos tanto na parte profissional como na parte pessoal que me fizeram crescer muito como pessoa. Obrigado Professor!!

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) pelo espaço cedido, onde eu pude me dedicar exclusivamente ao mestrado e me proporcionar um crescimento tanto profissional como pessoal.

A todos os Professores e os demais servidores públicos da UEL, pela amizade e convivência durante esses 2 anos de minha vida.

Agradeço a todos os amigos que esta caminhada me presenteou: Fábio Cajamarca, Leandro Luan, Alexandra Beal, Luana, Tainara, Jhessica, Fernanda Midori, Guilherme Scheel, Lycio e Renan. Obrigado por dividirem comigo todas as angústias e desabafos, além de sempre me incentivarem a continuar e compartilharem todos os conhecimentos comigo, vocês foram muito importantes nessa minha trajetória, muito obrigado.

Agradeço aos meus amigos (irmãos) de infância, que estão comigo praticamente a vida toda: Renan (Paçoca), Sidney (Sidão), Felipe (Guila), Mayara (Mayarão), Fábio (Fabinho), Marcelo (Marcelão), por estarem comigo a minha vida toda, tanto nos dias de vitória como também nos dias de derrota, pela confiança em nossa amizade, por me aguentar até nos dias que estava um porre, por me incentivar a lutar pelos meus sonhos e batalhar pelas minhas conquistas. Vocês foram essenciais para eu chegar até aqui. Muito obrigado, amo vocês!

De coração, muito obrigado a todos!!!

“Às vezes são as pessoas que menos imaginamos, que fazem as coisas que ninguém pode imaginar.”

Alan Mathison Turing

LEMES, Leonardo Francisco Rafael. **Desenvolvimento de método para a determinação de Cádmio por TS-FF-AAS em farinha de linhaça combinando extração assistida por ultrassom e pré-concentração por solvente supramolecular**. 2020. 68 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Alimentos funcionais são alimentos ou ingredientes que produzem efeitos benéficos à saúde, além de suas funções nutricionais básicas, por exemplo, o trigo, o feijão, a aveia, o tomate e a linhaça. Apesar dos benefícios à saúde humana, alguns alimentos funcionais podem conter metais potencialmente tóxicos. A farinha de linhaça é um alimento bastante consumido no Brasil e rico em ácidos graxos essenciais, no entanto, estudos tem reportado a presença de cádmio, muito provavelmente devido a contaminação do solo com agrotóxicos e despejos industriais. Em face de não existir legislação no Brasil quanto ao conteúdo de cádmio neste alimento, constata-se ser fundamental a determinação do referido metal em farinha de linhaça, visando o controle de qualidade. Considerando que o teor de cádmio na farinha de linhaça é da ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$ e por se tratar de uma amostra com elevado conteúdo lipídico, métodos eficientes de preparo de amostras, bem como métodos sensíveis para a detecção de cádmio são necessários. Sendo assim, neste trabalho foi desenvolvido um método analítico para determinação de cádmio em farinha de linhaça por espectrometria de absorção atômica em forno tubular com aerossol térmico (TS-FF-AAS) empregando extração ultrassônica e pré-concentração com solvente supramolecular (SUPRA). Para execução do método, 200 mg de farinha de linhaça são misturadas com 20,0 mL de HNO_3 1,50 mol L^{-1} e mantido em banho ultrassônico por 20 min na frequência ultrassônica de 40 KHz. Após o processo de extração e centrifugação, as variáveis pertinentes a pré-concentração por solvente supramolecular foram avaliadas em um planejamento fatorial fracionário 2^{6-1} com ponto central, com o intuito de analisar os efeitos mais significativos na pré-concentração de cádmio. Para a pré-concentração 10,0 mL do sobrenadante são retirados e submetidos a extração com solvente supramolecular empregando 1,46 % (m/v) de agente complexante dietilditiofosfato de amônio (DDTP) e 4,3 mg mL^{-1} de ácido láurico em tetrahidrofurano (THF). Após a pré-concentração assistida por vortex, a fase rica de ácido láurico contendo o complexo Cd-DDTP é removida, dissolvida com etanol e introduzida num sistema FIA acoplado com TS-FF-AAS. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,35 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, e faixa linear de 0,35 a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Outros parâmetros analíticos do método incluem o fator de pré-concentração (8,72), índice de consumo (1,32 mL), eficiência de pré-concentração (0,87 mL^{-1}) e frequência analítica (13 h^{-1}). A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade intra ($n=10$) e inter dia ($n=2$) e o desvio padrão relativo obtido em dois níveis de concentração variaram de 3,12 a 7,34 %. A exatidão do processo de extração foi realizada por meio da comparação da extração assistida por ultrassom com a digestão ácida assistida por micro-ondas, não havendo diferença significativa entre os dois métodos de extração (teste *t de Student pareado*, 95 % de confiança).

Palavras-chave: Microextração supramolecular. Micelas reversas de ácido dodecanóico-THF. Farinha de Linhaça. TS-FF-AAS. Alimento funcional. Cádmio.

LEMES, Leonardo Francisco Rafael. **Development of method for the determination of cadmium by TS-FF-AAS in flaxseed flour combining ultrasound assisted extraction and supramolecular solvent preconcentration.** 2020. 68 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Functional foods are foods or ingredients that produce health-beneficial effects in addition to their basic nutritional functions, such as wheat, beans, oats, tomatoes, and flaxseed. Despite the benefits to human health, some functional foods may contain potentially toxic metals. Flaxseed is a food widely consumed in Brazil and rich in essential fatty acids, however, studies have reported the presence of cadmium, most likely due to soil contamination with pesticides and industrial dumping. Given that there is no legislation in Brazil regarding the content of cadmium in this food, it is essential to determine the metal in flaxseed flour, aiming at quality control. Considering that the cadmium content in flaxseed meal is of the order of $\mu\text{g kg}^{-1}$ and because it is a high lipid content sample, efficient sample preparation methods as well as sensitive cadmium detection methods are required. Therefore, in this work an analytical method for cadmium determination in line flour was developed by Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry (TS-FF-AAS) employing ultrasonic extraction and supramolecular solvent preconcentration (SUPRA). To perform the method, 200 mg of flaxseed flour are mixed with 20.0 mL of $1.50 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ and kept in an ultrasonic bath for 20 min at a ultrasonic frequency of 40 KHz. After the extraction and centrifugation process, the Variables pertinent to supramolecular solvent preconcentration were evaluated in a fractional factorial design 2^{6-1} with central point, in order to analyze the most significant effects on cadmium preconcentration. For preconcentration 10.0 mL of the supernatant are removed and subjected to supramolecular solvent extraction employing 1.46% (w / v) ammonium diethyl dithiophosphate complexing agent (DDTP) and 4.3 mg lauric acid 4.3 mg in tetrahydrofuran (THF). After vortex assisted preconcentration, the lauric acid rich phase containing the Cd-DDTP complex is removed, dissolved with ethanol and introduced into a TS-FF-AAS coupled FIA system. The detection and quantification limits obtained were $0.10 \mu\text{g L}^{-1}$ and $0.35 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, and linear range of 0.35 to $20.0 \mu\text{g L}^{-1}$. Other analytical parameters of the method include preconcentration factor (8.72), consumption index (1.32 mL), preconcentration efficiency (0.87 mL^{-1}) and analytical frequency (13 h^{-1}). The accuracy of the method was evaluated in terms of intra (n = 10) and inter day (n = 2) repeatability and the relative standard deviation obtained at two concentration levels ranged from 3.12 to 7.34%. The accuracy of the extraction process was performed by comparing ultrasound assisted extraction with microwave assisted acid digestion, with no significant difference between the two extraction methods (paired Student's t-test, 95% confidence).

Key words: Supramolecular solvent extraction. Reverse micelles of dodecanoic acid-THF. Flax Flour. TS-FF-AAS. Functional food. Cadmium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Planta do Linho (<i>Linum usitatissimum</i> L.).....	18
Figura 2	Estrutura de agregados supramoleculares de acordo com o fator de empacotamento (Cpp).....	22
Figura 3	Sistema de análise de injeção em fluxo acoplado ao TS-FF-AAS.....	30
Figura 4	Amostras de farinha de linhaça comercial. Sendo: A) Vitao alimentos (marrom), B) D' Magrinha (dourada), C) K' Life (marrom), D) Vila alimentos (dourada), E) Vitalin alimentos (dourada) e F) Vitalin alimentos (marrom).....	31
Figura 5	Agente complexante dietilditiofosfato de amônio (DDTP)	32
Figura 6	Molécula de Ácido Dodecanoico para formação dos agregados supramoleculares	32
Figura 7	Suporte caseiro utilizado para o mapeamento do banho ultrassônico	34
Figura 8	Percentagem de recuperação de extração em função da concentração de HCl e a posição do banho empregando as condições de 200 mg de farinha de linhaça e tempo de banho de 40 min	39
Figura 9	Percentagem de recuperação de extração em função da concentração de HNO ₃ e a posição do banho empregando as condições de 200 mg de farinha de linhaça e tempo de banho de 40 min	40
Figura 10	Otimização do tempo de extração utilizando ácido nítrico 1,00 mol L ⁻¹	41
Figura 11	Influência da concentração do ácido clorídrico e ácido nítrico para a microextração com solvente supramolecular	42
Figura 12	Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis na pré-concentração de cádmio baseado em solvente supramolecular	46
Figura 13	Superfície de resposta obtida a partir da matriz de Doehlert	49
Figura 14	Curvas analíticas realizadas (a) com a etapa de microextração supramolecular e determinação por TS-FF-AAS (0,35 - 20 µg L ⁻¹), (b) determinação direta por TS-FF-AAS (2,5 - 30 µg L ⁻¹) e (c) determinação direta por FAAS (100 - 1000 µg L ⁻¹)	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Aplicação da técnica extração com radiação ultrassônica	14
Tabela 2	Programa de aquecimento utilizado para o procedimento de digestão ácida por micro-ondas das amostras de linhaça.....	33
Tabela 3	Amostras comerciais de farinha de linhaça e suas respectivas concentrações de cádmio	38
Tabela 4	Fatores, níveis e matriz experimental do Planejamento Fatorial Fracionário 26-1 com ponto central utilizado na otimização para a pré-concentração de cádmio baseado em solvente supramolecular.....	44
Tabela 5	Análise de variância dos dados para a modelagem linear	45
Tabela 6	Fatores, níveis e matriz experimental do Planejamento Doehlert utilizado na otimização para a pré-concentração de cádmio baseado em solvente supramolecular.....	48
Tabela 7	Análise de variância dos dados para a modelagem quadrática	49
Tabela 8	Valores otimizados do método empregando o planejamento fatorial fracionário 26-1.....	50
Tabela 9	Análise de variância para o ajuste do modelo de regressão linear para a relação absorvância e concentração de cádmio.....	52
Tabela 10	Parâmetros analíticos para a determinação de cádmio utilizando o método proposto	53
Tabela 11	Precisão para o método de pré-concentração de íons cádmio à base de solvente supramolecular.....	53
Tabela 12	Parâmetro analítico do método proposto para a pré-concentração de cádmio com outros presentes na literatura utilizando a determinação por TS-FF-AAS.....	54
Tabela 13	Determinação de cádmio em amostras de farinha de linhaça comercial pelo método proposto e comparação por digestão por micro-ondas e determinação direta por TS-FF-AAS	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	LINHAÇA E CONTAMINAÇÃO POR METAIS	18
2.2	SOLVENTES SUPRAMOLECULARES.....	21
2.2.1	Automontagem	21
2.2.2	Coacervação	23
2.2.3	Aplicação Para Determinação De Metais	24
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4	PARTE EXPERIMENTAL	28
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	28
4.2	EQUIPAMENTOS	29
4.3	AMOSTRAS DE FARINHA DE LINHAÇA COMERCIAL	30
4.4	PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E PRÉ- CONCENTRAÇÃO POR SUPRA.....	31
4.5	PROCEDIMENTO DE DIGESTÃO ÁCIDA POR MICRO-ONDAS.....	32
4.6	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM	33
4.7	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO COM SOLVENTE SUPRAMOLECULAR....	33
4.8	MATRIZ DE DOEHLERT	35
4.9	EFEITOS DE ÍONS INTERFERENTES	35
4.10	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO	36
4.11	PROGRAMAS COMPUTACIONAIS.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO NAS FARINHAS DE LINHAÇA APÓS DIGESTÃO ÁCIDA ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS	38

5.2	OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO NÍTRICO E CLORÍDRICO	39
5.3	OTIMIZAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO COM SOLVENTE SUPRAMOLECULAR.....	42
5.3.1	EFEITO DO ÁCIDO NÍTRICO E ÁCIDO CLORÍDRICO.....	42
5.3.2	OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO MÉTODO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO COM SOLVENTE SUPRA	43
5.4	PARÂMETROS ANALÍTICOS	50
5.5	ESTUDOS DE INTERFERENTES.....	55
5.6	DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO EM AMOSTRAS REAIS E EXATIDÃO DO MÉTODO	55
6	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Alimentos funcionais podem ser definidos como alimentos que fornecem nutrientes adicionais aos consumidos diariamente, com a finalidade de complementar a nutrição básica e atuarem na prevenção de doenças crônicas. Entre os alimentos que podem ser considerados funcionais encontra-se a linhaça, que é rica em ácidos graxos essenciais [1,2].

O linho (*Linum usitatissimum* L.) é uma planta pertencente à família das *Linaceae* e sua semente é conhecida popularmente como linhaça. As sementes de linhaça apresentam duas variedades, marrom e dourada [3-5]. A origem da planta do linho é desconhecida, mas acredita-se que seja originária das regiões entre o Sul da Europa e Ásia Central, tendo os primeiros registros cerca de 10.000 anos atrás [6,7].

Em sua composição Físico-Química possui cerca de 30 a 40% de gordura, 20 a 25% de proteína, 20 a 28% de fibra dietética total, 4 a 8% de umidade e 3 a 4% de cinzas, além de vitaminas A, B, D, E e minerais, além de ser rica em ácidos graxos ômega-3, α -linolênico e linoleico. Em seus principais benefícios para a saúde destacam-se a redução do colesterol, prevenção de doenças do coração e a prevenção do câncer [8-11].

O maior produtor mundial de linhaça é o Cazaquistão, com um total de aproximadamente 683.338 toneladas em 2017. O Brasil, no mesmo período, obteve uma produção de 5.953 toneladas, sendo assim o quarto maior produtor do continente americano, ficando atrás apenas do Canadá (555.100 toneladas), Estados Unidos da América (97.590 toneladas) e Argentina (13.575 toneladas) [12].

Por se tratar de um alimento que é bastante consumido no mundo todo, pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de monitorar metais potencialmente tóxicos em sementes de linhaça. Na Finlândia os teores de cádmio em amostras de linhaça foram em média de $610,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ [13]. Na Turquia, Ozkutlu [14] analisou cádmio em amostras de especiarias e ervas e constatou que a linhaça continha a maior quantidade de cádmio em todas as amostras de plantas analisadas ($128 \mu\text{g kg}^{-1}$). No Canadá, Grant e colaboradores [15] avaliaram amostras de linhaça provenientes de diferentes formas de cultivo

e verificaram que as concentrações de cádmio variaram de 200 a quase 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Em ambos os trabalhos os autores verificaram uma variação na concentração de cádmio em diferentes amostras de linhaça. A presença desse elemento e outros metais pode estar associada as formas de cultivo incluindo a aplicação de fertilizantes, o uso indevido de agrotóxicos e despejos industriais [14,16].

O cádmio, pode acarretar uma variedade de doenças em seres humanos e é considerado um metal carcinogênico [17,18]. Uma das doenças mais comuns causada pela exposição ao cádmio é a osteoporose e osteomalácia graves (a doença Itai-Itai) que podem ser caracterizadas por múltiplas fraturas causadas pela substituição do cálcio pelo cádmio na estrutura óssea [19,20].

Todavia, até o presente momento (dezembro de 2019), não há legislação específica para os níveis máximos de cádmio em sementes de linhaça, contudo há legislações nacionais e internacionais que podem ser usadas como parâmetros, como a resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a European Food Safety Authority (EFSA), e a Codex Alimentarius, do programa conjunto das entidades *Food and Agriculture Organization* e *World Health Organization* (FAO/WHO), que estabelece um limite máximo de cádmio em cereais de 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ [21-23].

Devido as baixas concentrações de cádmio em farinha de linhaça, na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$ a determinação deste elemento usualmente tem sido realizada com emprego de técnicas espectroanalíticas com alta detectabilidade, tais como a Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES), a Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) e a Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS) [24-26]. Adicionalmente, devido a farinha de linhaça apresentar elevado conteúdo lipídico e de proteínas, eficientes métodos de preparo de amostras devem ser utilizados para garantir a total mineralização da amostra e, dentre eles, fornos de micro-ondas tem sido os mais empregados [25].

Contudo, técnicas alternativas de preparo de amostras podem ser empregadas com o intuito de tornar o método analítico mais acessível e com custo relativamente mais baixo. A extração assistida por ultrassom é considerada uma alternativa para o pré-tratamento de amostras sólidas, pois a radiação ultrassônica facilita a lixiviação de íons metálicos. A capacidade da

energia ultrassônica em extrair íons metálicos de diferentes matrizes é atribuída ao processo de cavitação, gerando altas temperaturas locais e à ação mecânica entre interfaces sólidas e líquidas. O emprego de banho ultrassônicos, reduz o tempo de análise, o consumo de reagentes, além de fazer uso de ácidos diluídos no preparo de amostras [27,28]. A Tabela 1 reúne algumas aplicações de extração assistida por ultrassom com posterior determinação por técnicas espectroanalíticas.

Tabela 1. Aplicação da técnica extração com radiação ultrassônica.

Amostra	Analitos	Técnica espectroanalítica	Referência
Sangue	Cd	ICP-MS	[29]
Fertilizantes Inorgânicos	Cu, Pb, Cd	FAAS	[30]
Rações de Frango	Cu, Mn, Ni, Zn	FAAS	[31]
Achocolatado em pó	Fe, K, Na	FAAS	[32]
Chorume	Cd, Cu, Pb	ETAAS	[33]
Solo	Ag, As, Pb, Cu, Cd	ICP-OES	[34]
Tecido de Mexilhão	Cd,Pb	ETAAS	[35]
Medicamentos Fitoterápicos	Cd, Cr, Pb	GFAAS	[36]

A Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS) é uma alternativa, em termos de custo de análise, aquisição e simplicidade na execução, para a quantificação de metais comparada com ICP-MS, ICP OES e GFAAS. No entanto, a determinação direta de cádmio em amostras complexas como a linhaça pode se tornar um desafio devido à baixa detectabilidade da técnica para a determinação de metais em níveis traço ($< \mu\text{g L}^{-1}$). A reduzida detectabilidade se deve a baixa eficiência de amostragem do nebulizador pneumático convencional e pelo reduzido tempo de residência dos analitos no caminho óptico (da ordem de ms) [37].

Em face a essa limitação, Gaspár e Berndt [38] propuseram uma nova técnica denominada Espectrometria de Absorção Atômica em Forno Tubular com Aerossol Térmico (TS-FF-AAS), com o intuito de se aumentar a detectabilidade do FAAS, que se baseia na introdução da amostra através de uma capilar metálico em forma de spray térmico para o interior do tubo de níquel

aquecido por uma chama de ar/acetileno que fica posicionado sobre o queimador do FAAS. Com este sistema, há uma eficiência maior de amostragem, pois 100% da amostra é introduzida no atomizador, bem como há um aumento substancial do tempo de residência dos átomos no caminho óptico [39].

Apesar do TS-FF-AAS apresentar poder de detecção muito superior ao FAAS, especialmente para elementos voláteis, tais como cádmio, chumbo, cobre e zinco, a detectabilidade da técnica pode não ser suficiente para análises de amostras como a farinha de linhaça visando a determinação de cádmio. Neste sentido, etapas prévias de pré-concentração da amostra ainda são, em geral, necessárias para viabilizar o emprego da TS-FF-AAS para análise em baixas concentrações.

A literatura reporta o emprego de métodos de pré-concentração de íons metálicos em fase sólida acoplado em fluxo com TS-FF-AAS utilizando nanotubos de carbono, fulereno, carvão ativado e polímero quimicamente impressos como adsorventes [40-43]. Outros métodos de pré-concentração baseados em microextração líquido-líquido por ponto nuvem e com solvente supramolecular (SUPRA) também têm sido desenvolvidos e associados com TS-FF-AAS, porém em menor quantidade [44-46].

Considerando a temática deste trabalho, esta dissertação de Mestrado é pautada no desenvolvimento de um método analítico para determinação de cádmio em farinha de linhaça por TS-FF-AAS combinando extração ultrassônica com posterior etapa de pré-concentração, observa-se que os métodos de microextração líquido-líquido são mais convidativos que àqueles em fase sólida. Esta observação pode ser fundamentada nos seguintes aspectos: 1) A extração ultrassônica requer, usualmente, que ácidos minerais diluídos sejam empregados no processo de extração. Assim, se o extrato obtido fosse submetido à pré-concentração em fase sólida para retenção de cádmio, seria necessário ajustar o pH com álcalis, o que poderia contaminar a amostra ou provocar co-precipitação. No caso de microextração líquido-líquido não é necessário efetuar o ajuste de pH, pois há complexantes disponíveis comercialmente que formam complexos metálicos em meio acentuadamente ácido; 2) A técnica TS-FF-AAS necessita de pequenos volumes de amostra (da ordem de μL). Assim, quando se emprega microextração líquido-líquido, o volume da fase rica (fase contendo o solvente extrator com o analito) é

compatível com o volume de análise no TS-FF-AAS não necessitando, desta forma, que a amostra seja diluída.

Em face destas considerações, a seguir serão apresentadas a fundamentação básica de algumas técnicas de microextração.

A extração em ponto nuvem (CP, *cloud point*) tem sido aplicada em diversas matrizes [47,48] e tem como princípio a extração de analitos em duas fases aquosas, no qual se usa um tensoativo-não iônico em um meio binário água-tensoativo. Em temperaturas acima da CMC (Concentração micelar crítica), a solução contendo o analito e o surfactante turva-se. Com o aumento de temperatura pode-se provocar um fenômeno de desidratação de grupos com propriedades hidrofílicas das moléculas do tensoativo, podendo também elevar o número de agregação e um aumento referente ao tamanho das micelas até que a separação de fases aconteça. O ponto nuvem é conhecido como a condição de temperatura ou presença de sal que promove diminuição da solubilidade da micela. A fase extremamente concentrada em tensoativo, denominada fase rica, encontra-se em equilíbrio com a fase pobre, no qual encontra-se com baixa concentração de moléculas tensoativas [49]. Esta interação entre analito-surfactante ocorre pelas interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas. Suas principais vantagens são o baixo custo com aquisição de solventes, solventes poucos tóxicos e elevado fator de pré-concentração que pode ser obtido a partir dos pequenos volumes iniciais da amostra [48], porém sua principal limitação são os coeficientes de partição relativamente baixos de várias espécies metálicas com quelatos determinados, e para que isso seja contornado é necessário utilizar ligantes altamente hidrofóbicos. Outro aspecto negativo da técnica refere-se ao emprego de banhos termostatizados para atingir o ponto nuvem, além do tempo de aquecimento ser relativamente alto, em alguns casos até 40 minutos [47,50].

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) apresentou-se como um aperfeiçoamento das técnicas de microextração líquido-líquido [51], e se fundamenta basicamente na dispersão de um solvente extrator e um solvente dispersor em uma solução aquosa. Então ocorre a formação de uma solução turva que contém gotículas finas de solvente extrator dispersas na fase aquosa, facilitando a transição do analito presente na amostra para o solvente extrator [52]. A DLLME tem como vantagens a simplicidade de operação, rapidez, baixo

custo, consumo baixo de solventes orgânicos, área de superfície muito grande entre as gotículas finas do solvente de extração, alta recuperação e alto fator de enriquecimento [53]. No entanto, a DLLME apresenta a desvantagem de o solvente extrator ter que ser miscível no solvente dispersor, possuindo baixa solubilidade em água e sua densidade deve ser maior do que da água para proporcionar a correta separação das fases após centrifugação. Porém existe um número limitado de solventes de extração disponíveis com essas características, principalmente que tenha densidade maior do que da água. Os hidrocarbonetos halogenados possuem essas características e são usados na maioria das vezes, porém são solventes tóxicos [51,53].

A busca por técnicas que sejam mais rápidas e utilizem volumes cada vez menores de solventes orgânicos, tem ganhado destaque nos últimos anos. A combinação de uma técnica de extração baseada em coacervação com a DLLME vem sendo utilizada [54-57]. A microextração líquido-líquido dispersiva com base em solvente supramolecular (SM-DLLME ou SUPRA) tem demonstrado ser um método com alto desempenho, preciso e confiável [54]. A extração com solvente SUPRA baseia-se no fenômeno de coacervação e utiliza solventes menos tóxicos que a DLMME e necessita de menor tempo de extração devido à grande área de superfície de contato entre o analito e o solvente de extração. Além disso, o uso de coacervatos baseados em montagem supramolecular fornece uma região de diferentes polaridades para solubilizar o analito em uma ampla faixa de polaridade/carga. O método se fundamenta na formação espontânea de micelas reversas em uma solução de tetrahidrofurano THF/água em uma concentração crítica de agregação e não requer aquecimento, tal como ocorre na extração por ponto nuvem. Em condições ideais, as micelas reversas atuam como um excelente meio para a extração do complexo metálico a partir do meio aquoso [58,59]. A extração SUPRA é considerada uma técnica híbrida entre CP e DLLME, pois utiliza extração baseada na dispersão do solvente extrator, mas faz uso de extratores não tóxicos como os surfactantes.

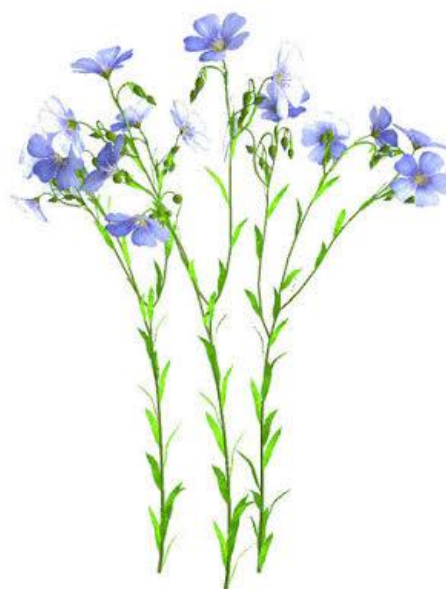
Mediante o exposto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma metodologia combinando a extração assistida por ultrassom para a extração de cádmio de farinha de linhaça com posterior pré-concentração com solvente SUPRA e determinação por TS-FF-AAS acoplado a um sistema FIA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LINHAÇA E CONTAMINAÇÃO POR METAIS

A linhaça (*Linum usitatissimum* L.) é uma planta pertencente à família das *Linaceas*, descrita por apresentar uma altura entre 30 a 130 cm, com talos eretos, folhas estreitas lineares ou lanceoladas, de coloração verde. Do talo principal da planta podem surgir ramificações, onde nascem as folhas, as flores e as cápsulas (onde se encontra a semente da planta) (Figura 1). Da casca da planta é de onde se retira a fibra do linho, matéria-prima para a indústrias têxtil [60].

Figura 1. Planta do linho (*Linum usitatissimum* L.).



A composição química da semente de linhaça dourada e marrom apresenta bastante similaridade. De acordo com Barroso et. al. [61] a linhaça dourada apresenta menor quantidade de fibra dietética total e maiores teores de proteína em relação a semente de coloração marrom, entretanto o óleo extraído da linhaça marrom apresenta um maior teor de tocoferóis, maior capacidade antioxidante e estabilidade oxidativa. O óleo varia entre 30 a 50% do peso da semente de linhaça.

Entre os principais constituintes do grão da linhaça estão os lipídios, as proteínas e os polissacarídeos. Observa-se grande quantidade de ácidos graxos

poli-insaturados da família n-3 (linolênico e di-homo-alfa-linolênico) e em menor quantidade da família n-6 (linoleico, gama-linolênico e eicosadienóico) [62].

Em face a sua composição rica em ácidos graxos essenciais, Cintra et. al. [63] avaliaram os efeitos de dietas ricas em ácidos graxos monoinsaturados (proveniente do amendoim), poli-insaturados (compostas de linhaça ou truta) e em ácidos graxos saturados (como pele de galinha) no perfil lipídico de ratos. A dieta contendo linhaça foi considerada a mais eficiente para diminuir o colesterol total e os níveis de triglicérides. Ocorrendo também uma maior liberação de lipídeos nas fezes dos animais que receberam a ração rica no grão em questão, inclusive, uma menor deposição hepática de gordura se comparando aos outros tratamentos. Os autores concederam os resultados ao grande conteúdo de ácidos graxos n-3, a presença de lignanas e de fibra solúvel na linhaça.

Em relação ao efeito hipocolesterolêmico, a linhaça pode atuar diretamente sobre as paredes de vasos e artérias, prevenindo a aterosclerose. Por fim, o efeito hipocolesterolêmico da linhaça tem importantes implicações terapêuticas em pacientes dislipidêmicos, sendo que estudos em humanos têm mostrado que o consumo de 40 a 50 g/dia de linhaça reduz o colesterol sérico entre 5 a 9% [64,65].

Martins et al. [66] avaliaram os efeitos da linhaça sobre a aterogênese em coelhos submetidos a uma dieta rica em colesterol. Os pesquisadores observaram uma redução significativa dos níveis de triglicérides (aproximadamente 70%) no grupo no qual foi administrado alimentos contendo linhaça. Para Adkins e Kelley [67] o consumo de linhaça, por conter ômega 3, ajuda a reduzir os níveis de triglicérides, e uma das explicações para essa reação é devido à redução de partículas de quilomícrons remanescentes e inibição da síntese e secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-colesterol) pelo fígado. Sendo assim um alimento muito consumido por pessoas que apresentam um nível de colesterol elevado em seu organismo.

Entretanto estudos apontam uma grande capacidade de absorção de metais pela planta do linho em solos possivelmente contaminados, sendo de grande preocupação, uma vez que com a crescente demanda desse tipo de alimento pelo consumidor podem vir a ingerir esses metais possivelmente tóxicos causando malefícios a saúde humana.

Amna et. al. [68] realizaram um estudo com cádmio e cromo, onde a planta do linho foi submetida ao solo com uma concentração dos referidos metais variando de 250 a 500 ppm por 24 dias. As amostras de solo foram submetidas ao processo de homogeneização das partículas (malha de 8 mm), após as amostras foram submetidas a uma temperatura de 121 °C sob uma pressão de 15 psi por 30-40 minutos e a quantificação dos metais foi realizada através da Espectrometria de Absorção Atômica (FAAS). Os resultados apontaram uma faixa de acúmulo de metais possivelmente tóxicos no linho que variou de 90 a 95% para cádmio e 61 a 84% para cromo.

Em outro estudo Angelova et. al. [69] analisaram Pb, Cu, Cd e Zn em linho, cânhamo e algodão em uma região industrialmente poluída, onde as amostras (raízes, caules, folhas, sementes, flores) foram submetidas a mineralização seca e a quantificação dos referidos metais foi realizada por Espectrometria com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP). Os resultados apresentaram que a planta do linho foi a que mais absorveu os metais, principalmente nas raízes. Onde as concentrações de Pb, Cu, Cd e Zn foram de 104,4, 30,5, 8,69 e 211,8 mg kg⁻¹.

Com o aumento da concentração de cádmio no solo devido à possível contaminação oriunda de agrotóxicos e despejos industriais, resultou-se em um maior acúmulo de cádmio principalmente nas raízes da planta do linho [70].

Estudos de acúmulo de metais possivelmente tóxicos em plantas de linho revela-se maiores concentrações principalmente nas raízes. Segundo Baraniecki et al., e Bjelková et. al. [71,72] a maior concentração de cádmio na planta do linho apresentou-se o seguinte gradiente: raízes > parte aérea > cápsula = semente.

Hocking et. al. [73] comparou a distribuição de cádmio em várias plantas, como linhaça, mostarda indiana de canola, duas espécies de tremoço e trigo, e associou os resultados obtidos aos mecanismos fisiológicos de cada planta, onde esses mecanismos que impedem a translocação de cádmio do fruto para a semente são muito menos eficazes na linhaça do que em todas as outras plantas estudadas.

No entanto outros metais foram estudados e apresentaram resultados diferentes aos estudos com cádmio, onde Grabowska et. al. [74] e Baraniecki et al. [75] encontraram as maiores concentrações de Pb e Cu em cápsulas e Zn em sementes. Outro pesquisador, Grzebisz et al. [76] reportou Pb em um gradiente

de concentração diferente, sendo: raiz> broto> semente> cápsula, e em Cu, sendo o gradiente: cápsula> raiz> semente> broto.

Com base nos dados acima mencionados, é notório que a distribuição de metais possivelmente tóxicos é consideravelmente afetada pelas condições experimentais, propriedades dos solos e genótipos utilizados.

2.2 SOLVENTES SUPRAMOLECULARES

Os conjuntos supramoleculares têm sido amplamente utilizados em esquemas analíticos de extração e concentração. Sua capacidade de formar uma fase com regiões de diferentes polaridades, acidez e viscosidades, onde solutos de estruturas muito diferentes podem ser solubilizados [77]. Desde que Watanabe et. al. reportaram a técnica de extração por ponto nuvem, diversos pesquisadores trabalharam na última década para aperfeiçoar as técnicas de extração e pré-concentração de compostos orgânicos hidrofóbicos e complexos metálicos, utilizando conjuntos supramoleculares baseados em entidades polimoleculares que resultam da associação espontânea de um grande número indefinido de componentes em uma fase específica (isto é, micelas, microemulsões, vesículas, etc) [78,79].

No presente momento os aspectos teóricos e práticos das extrações e pré-concentração de compostos orgânicos hidrofóbicos e complexos metálicos que fazem uso de conjuntos supramoleculares já estão bem esclarecidas, sendo uma base promissora para desenvolvimento de novas metodologias analíticas com o intuito de fornecer uma extração seletiva em matrizes específicas [79,80].

2.2.1 Automontagem

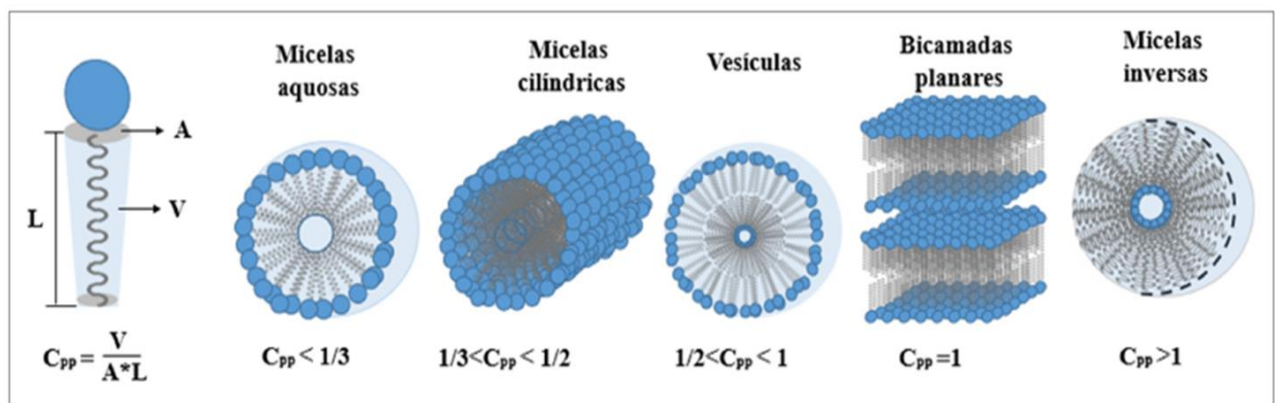
No processo de automontagem, a formação de um solvente supramolecular acontece quando moléculas anfifílicas (tensoativos e ácidos carboxílicos de cadeia longa) se auto-organizam. As moléculas anfifílicas orientam-se por efeito de forças intermoleculares (por exemplo, interações de hidrogênio, interações π - π , força de atração eletrostática, entre outras), de modo que seus grupos polares e apolares diminuem as interações solvatofóbicas com o solvente. Esta etapa resultante do conjunto de forças intermoleculares da origem à formação de agregados moleculares tridimensionais (Figura 2), no qual a morfologia do agregado depende do tamanho relativo do grupo polar hidrofílico

e da cadeia de hidrocarbonetos do anfífilo e, pode ser previsto usando o chamado fator de empacotamento (C_{pp}) [81-84], descrito na equação 1.

$$C_{pp} = \frac{V}{A \times L} \quad (1)$$

Na equação, V é o volume da cadeia hidrofóbica, A é a área da seção transversal da cabeça polar e L é o comprimento aparente da cadeia de hidrocarboneto do monômero de surfactante na micela. Uma vez estimado o valor do fator de empacotamento (C_{pp}), pode-se determinar a estrutura da micela mais favorável utilizando o parâmetro de empacotamento do anfífilo.

Figura 2. Estrutura de agregados supramoleculares de acordo com o fator de empacotamento (C_{pp}). (Adaptado de Medina et al., [81])



Por exemplo, para se prever a formação de micelas aquosas o valor de empacotamento (C_{pp}) é próximo a $1/3$. Da mesma forma, para se prever a formação de micelas cilíndricas o valor de empacotamento deve estar entre $1/3$ e $1/2$. Quando o valor de C_{pp} é próximo a 1 , a forma de empacotamento do agregado supramolecular mais provável é a a bicamada planar. Por outro lado, quando o fator de empacotamento é maior que $1/2$ e menor que 1 , a formação do agregado supramolecular tende a ter a morfologia de uma vesícula. E para valores de fator de empacotamento inferiores a 1 , pode-se prever agregados supramoleculares cuja morfologia se denomina micelas reversas [84].

2.2.2 Coacervação

A coacervação é um fenômeno de separação das fases líquidas, sendo que esse fenômeno só acontece se o sistema apresentar uma concentração mínima de moléculas anfifílicas, a concentração micelar crítica (CMC). Ao atingir a concentração micelar crítica as estruturas tridimensionais se aproximam e se agregam, orientando a formação de gotas de coacervado, que em seguida organizam-se em agregados de maior tamanho (micro e nano-estruturados), tornando-se imiscíveis e dispersos na fase contínua [85].

A formação das gotas de coacervado ocasiona uma mudança de densidade e conseqüentemente uma separação de fases. Alguns agentes de coacervação são frequentemente usados para induzir a coacervação no sistema supramolecular, por exemplo, pelo aumento da temperatura acima do ponto de nuvem, pela adição de co-solvente ou co-tensoativo com grupo polar menor, pela adição de um contra-íon anfifílico ou um eletrólito, ou ainda por mudanças no pH [86].

Entretanto uma estratégia muito útil para induzir a coacervação a partir de surfactantes não iônicos é usar uma mistura de dois solventes miscíveis nos quais os agregados têm uma solubilidade muito diferente. Neste caso, a dessolvatação dos grupos polares, com o conseqüente aumento no tamanho dos agregados, é favorecida pela interação solvente-solvente que compete com a interação solvente-grupos polares. Um exemplo de separação de fases causada por esse mecanismo é aquela originária de micelas reversas de ácidos carboxílicos em tetra-hidrofurano, promovido pela adição de água [87].

No sistema tetrahidrofurano (THF)/água, a própria água atua como efeito indutor, em face que o THF tende a interagir preferencialmente com a água do que em relação a micela reversa de ácido dodecanoico, aumentando assim a sua área superficial e a área extratora, favorecendo o agrupamento das micelas reversas e conseqüentemente favorecendo o fenômeno de coacervação [87-89].

2.2.3 Aplicação para Determinação de Metais

Alguns métodos analíticos baseados na pré-concentração de metais utilizando solvente supramolecular (SUPRA) têm sido reportados na literatura em amostras com diferentes graus de complexidade de suas matrizes, corroborando assim uma alta aplicabilidade do solvente supramolecular para a pré-concentração de metais.

Aydin et. al. [59] propuseram uma metodologia analítica para a determinação e quantificação de cobre em amostras de cabelo utilizando a espectrometria de absorção atômica (FAAS). Primeiramente as amostras de cabelo foram submetidas a digestão ácida por micro-ondas, e para a etapa de pré-concentração de cobre o agente quelante escolhido para a complexação de cobre foi o pirrolidinaditiocarbamato de amônio (APDC) e para a formação dos agregados supramoleculares baseados em micelas reversas foi utilizado 1-decanol disperso em tetrahidrofurano (THF). Os limites de detecção e quantificação para o método proposto foram de 0,11 e 0,34 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o fator de pré-concentração (FP) foi de 60. Salientando uma melhora significativa na detectabilidade do FAAS.

Em um outro trabalho Jafarvand et. al. [54] determinaram cádmio em amostras de vegetais utilizando a espectrometria de absorção atômica (FAAS). As amostras foram submetidas a digestão por via úmida na etapa de preparo de amostras. Assim como Aydin et. al. [59], para a etapa de pré-concentração o agente quelante escolhido para a complexação do analito de interesse foi o pirrolidinaditiocarbamato de amônio (APDC), entretanto para a formação dos agregados supramoleculares baseados em micelas reversas a abordagem foi diferente, onde o surfactante escolhido foi o ácido decanoico disperso em tetrahidrofurano (THF). O limite de detecção para o método proposto foi de 0,22 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o fator de pré-concentração foi de 22.

Shokouhifar et. al. [88] apresentaram uma abordagem diferente dos demais pesquisadores na escolha dos parâmetros (agente quelante, e agente dispersor) para a pré-concentração de prata por espectrometria de absorção atômica (FAAS) em amostras de águas naturais. Para a complexação de prata o agente quelante utilizado nesse trabalho foi a Difeniltiocarbazona e para a formação dos agregados supramoleculares baseados em micelas reversas o surfactante de escolha foi o ácido decanoico disperso em etanol. O limite de

detecção para o método proposto foi de $1,6 \mu\text{g L}^{-1}$ e o fator de pré-concentração (FP) foi de 15.

Amjadi et. al. [89] propuseram uma metodologia para a determinação de As(III) em amostras de água e tecidos de ostras utilizando a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF-FAAS). Para a extração do metal do tecido de ostra, cerca de 250 mg de amostra foi colocado em um bécker com 30 mL de HNO_3 concentrado e 8 mL de HClO_4 concentrado, a mistura foi submetida a aquecimento em banho de óleo por 45 min a 100°C e mais 45 min a 150°C , após a solução foi evaporada até a secura a 200°C . Para a etapa de pré-concentração o agente quelante escolhido foi o O,O- dietilditiofosfato de amônio (DDTP) e para a formação dos agregados supramoleculares baseados em micelas reversas o surfactante de escolha foi o ácido decanoico disperso em tetrahidrofurano (THF). O limite de detecção do método foi de $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ e o fator de pré-concentração (FP) foi de 64.

Observa-se de maneira geral que as metodologias analíticas acabam por utilizar a digestão ácida por micro-ondas para a mineralização das amostras e posterior pré-concentração com solvente supramolecular, entretanto, alguns pesquisadores desenvolveram metodologias alternativas na parte de preparo de amostras, como por exemplo, o emprego de banhos ultrassônicos para a extração de metais. Sendo bem convidativo, pois o banho ultrassônico requer o uso ácidos minerais diluídos para extração de metais, assim sendo compatível com a pré-concentração com solvente supramolecular, pois, não é necessário efetuar o ajuste de pH, pois há complexantes disponíveis comercialmente que formam complexos metálicos em meio acentuadamente ácido.

A partir dessa premissa Beal et. al. [45] propuseram uma nova metodologia que combina extração ultrassônica e pré-concentração com solvente supramolecular (SUPRA) para a determinação de chumbo em material particulado por espectrometria de absorção atômica em forno tubular com aerossol térmico (TS-FF-AAS). Para a extração do metal as condições utilizadas foram $\text{HNO}_3 0,8 \text{ mol L}^{-1}$ e o tempo de sonificação foi de 30 min, a posição utilizada no mapeamento do banho ultrassônico foi a posição central. Para a etapa de pré-concentração o agente quelante escolhido foi o O,O- dietilditiofosfato de amônio (DDTP) e para a formação dos agregados supramoleculares baseados em micelas reversas o surfactante de escolha foi o ácido dodecanoico disperso

em tetrahidrofurano (THF). O limite de detecção e quantificação foi de 3,7 e 11,3 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, e o fator de pré-concentração foi de 18,1.

Recentemente, assim como Beal et. al., Suquila et. al. [44] desenvolveu uma metodologia baseada em extração ultrassônica e pré-concentração com solvente supramolecular, os pesquisadores determinaram cádmio em medicamentos fitoterápicos (*Ginkgo biloba L.*) por espectrometria de absorção atômica em forno tubular com aerossol térmico (TS-FF-AAS). Para a extração do metal as condições utilizadas foram HNO_3 0,10 mol L^{-1} e o tempo de sonificação foi de 20 min, a posição utilizada no mapeamento do banho ultrassônico foi a posição central. A etapa de pré-concentração o agente quelante escolhido foi o O,O- dietilditiofosfato de amônio (DDTP) e para a formação dos agregados supramoleculares baseados em micelas reversas o surfactante de escolha foi o ácido dodecanoico disperso em tetrahidrofurano (THF). O limite de detecção e quantificação foi de 0,11 e 0,36 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, e o fator de pré-concentração foi de 8,92.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia analítica combinando a extração assistida por ultrassom para a extração de cádmio em farinha de linhaça com posterior pré-concentração com solvente SUPRA e determinação por TS-FF-AAS acoplado a um sistema FIA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do ácido (HCl e HNO₃), concentração (0,5, 1,0 e 1,5 mol L⁻¹), tempo do banho ultrassônico (5 a 40 min) e a influência das posições das amostras no banho, no processo de extração ultrassônica.
- Aplicar um planejamento fatorial fracionário 2⁶⁻¹ contendo ponto central para avaliar os efeitos das variáveis pertinentes à pré-concentração com solvente supramolecular.
- Otimizar as variáveis mais significativas utilizando uma Matriz de Doehlert com intuito de obter a otimização final, sendo a concentração de complexante (DDTP) e volume de THF (THF).
- Comparar os métodos de preparo de amostras, a extração por radiação ultrassônica e a digestão ácida assistida por micro-ondas.
- Avaliar a aplicabilidade do método em farinha de linhaça comercial.

4 EXPERIMENTAL

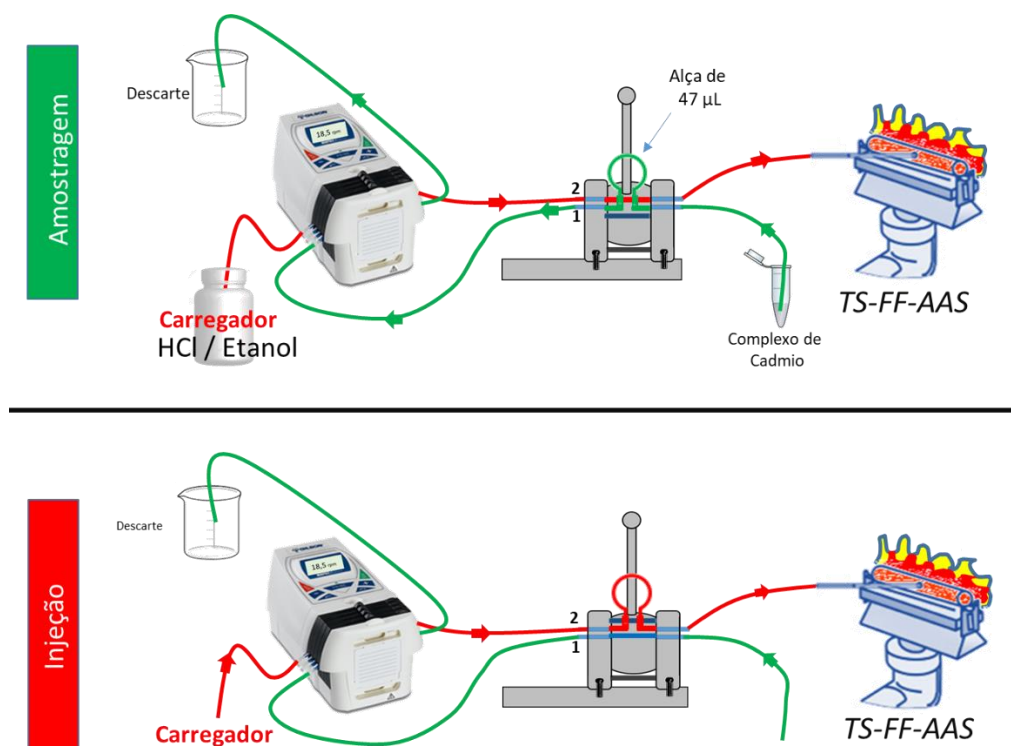
4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções padrão foram preparadas com apropriada diluição da solução estoque com água ultrapura (18.2 M Ω cm) obtida de um sistema de purificação ELGA[®] PURELAB (High Wycombe, Bucks, UK). O sal dietilditiofosfato de amônio (DDTP, 95%), ácido nítrico (HNO₃, \geq 65%), tetrahidrofurano (THF, \geq 99,9%) e ácido dodecanoico (98%) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA). HNO₃ foi duplamente destilado usando o sistema Berghof[®] BSB-939-IR (Eningen, Alemanha). A solução padrão de 1000 mg L⁻¹ de Cd²⁺ foi adquirida via Quimilab[®] (Jacareí, SP, Brasil) e as soluções de trabalho foram devidamente diluídas. Para estudo de interferência, soluções de Pb²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Sr²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺ e Cr³⁺ foram preparados a partir de seus respectivos sais. Nitrato de chumbo (Pb(NO₃)₂, 99%), nitrato de zinco hexa-hidratado (Zn(NO₃)₂. 6H₂O, 98%), nitrato de cobalto (II) hexa-hidratado (Co(NO₃)₂. 6H₂O, 98-102%) foram adquiridos via Vetec[®] (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), nitrato de cobre (II) tri-hidratado (Cu(NO₃)₂. 3H₂O, 98-102%), nitrato de níquel (II) hexa-hidratado (Ni(NO₃)₂. 6H₂O, 99%), nitrato de Ferro (III) nona-hidratado (Fe(NO₃)₃. 9H₂O, 98-101%), nitrato de Cromo (III) nona-hidratado (Cr(NO₃)₃. 9H₂O, 99%), nitrato de Estrôncio (Sr(NO₃)₂, 99%) adquiridos via Sigma-Aldrich[®]. Para evitar qualquer risco de contaminação, toda vidraria foi mantida em solução de ácido nítrico a 10,0% (v/v) por 24h com posterior limpeza com água ultrapura. Ácido clorídrico (HCl, 37,0%) foi adquirido pela Pancreac[®] (Darmstadt, Alemanha) e etanol (EtOH, 99,3%) pela Química Moderna[®] (Barueri, SP, Brasil). Peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 29%, v/v) de Synth[®] (Diadema, SP, Brasil) e HNO₃ foram utilizados para digerir a farinha de Linhaça.

4.2 EQUIPAMENTOS

A determinação de cádmio foi realizada utilizando um espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS) Shimadzu® AA-7000 (Tóquio, Japão), equipado com uma lâmpada de cátodo oco de cádmio como fonte de radiação (comprimento de onda: 228,0 nm; corrente: 8,0 mA) e uma lâmpada de deutério (correção de fundo). A chama foi composta de acetileno (vazão: 1,8 L min⁻¹) e de ar comprimido (15 L min⁻¹). O sistema de espectrometria de absorção atômica com aerossol térmico (TS-FF-AAS) foi composto de um tubo capilar cerâmico (99,7% de Al₂O₃) (Friatec, Mannheim, Alemanha) de 10 cm de comprimento, 0,5 mm de diâmetro interno e 2,0 mm de diâmetro externo, um tubo metálico de liga de Ni Inconel 600 (Houston, TX, EUA) de 10 cm de comprimento, 1,0 cm de diâmetro interno, contendo seis orifícios de 2,0 mm de diâmetro perpendiculares a um orifício de 2,0 mm de diâmetro central para introdução da amostra. O tubo de níquel foi colocado sobre um suporte inoxidável adaptado ao queimador do FAAS. As amostras foram introduzidas no TS-FF-AAS usando um sistema de injeção em fluxo no modo de linha única composto por uma bomba peristáltica Gilson® Miniplus Evolution (Middleton, Wi, EUA), tubos de Tygon® (Courbevoie, França), conectados a tubos de polietileno utilizados para propulsionar soluções de amostra (diâmetro: 0,8 mm), um injetor comutador de acrílico foi usado para transporte da amostra e do eluente, conforme apresentado na figura 3. O volume da alça e o fluxo de introdução da amostra no sistema foram de 47 µL e 0,5 mL min⁻¹, respectivamente. Um oscilador de Vórtex Phoenix Luferco Ltda (Araraquara, SP, Brasil) foi utilizado para auxiliar o procedimento de microextração à base de solvente supramolecular e um banho térmico Marconi® MA127 (Piracicaba, SP, Brasil) para auxiliar na coacervação. Para a extração da farinha de linhaça foi empregado um banho ultrassônico Quimis®-Modelo:Q335D (Diadema, SP, Brasil) (Frequência ultrassônica 40 KHz com capacidade para 2,8 L) e para digestão total da amostra foi utilizado um forno micro-ondas Milestone Inc® Ethos Plus (Sorisole, Itália) e uma centrífuga Quimis® 0222T2 (Diadema, SP, Brasil).

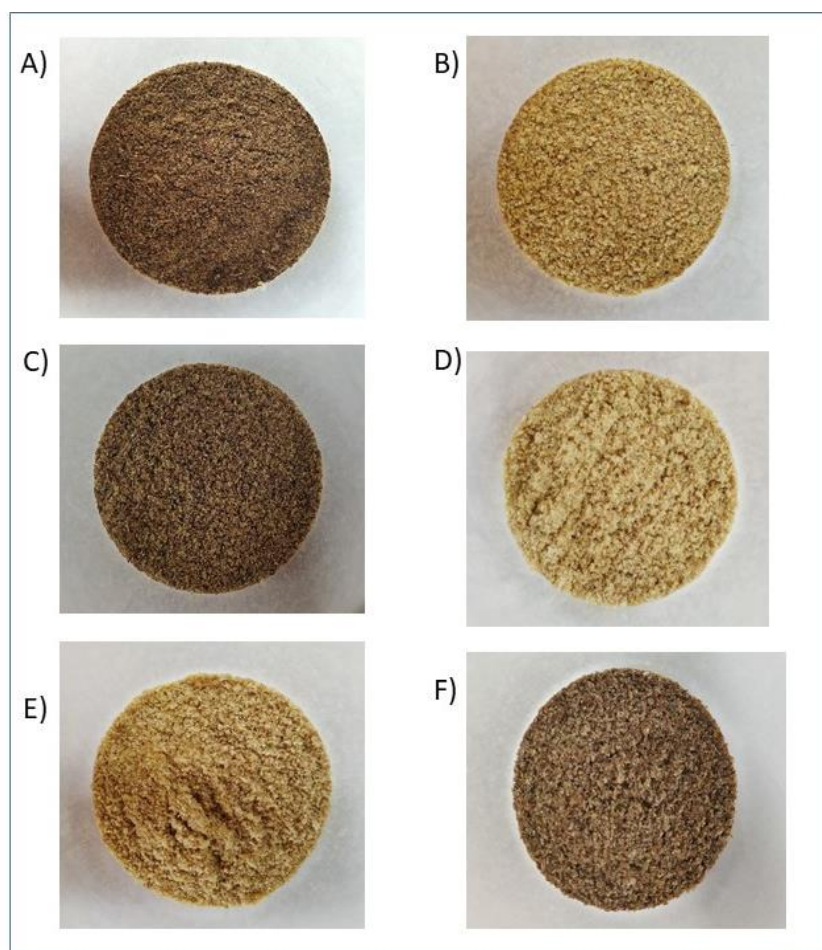
Figura 3. Sistema de análise de injeção em fluxo acoplado ao TS-FF-AAS.



4.3 AMOSTRAS DE FARINHA DE LINHAÇA COMERCIAL

As amostras de farinha de linhaça comercial foram todas adquiridas em supermercados locais na cidade de Londrina (Paraná, Brasil). Foram adquiridas seis amostras de marcas e tipos diferentes de linhaça marrom e linhaça dourada (Figura 4). As amostras foram identificadas com letras, sendo: A) Vitao alimentos (marrom), B) D' Magrinha (dourada), C) K' Life (marrom), D) Vila alimentos (dourada), E) Vitalin alimentos (dourada) e F) Vitalin alimentos (marrom). A linhaça em sua composição Físico-Química possui cerca de 30 a 40% de gordura, 20 a 25% de proteína, 20 a 28% de fibra dietética total, 4 a 8% de umidade e 3 a 4% de cinzas [8-11]. Cabe salientar que as amostras não foram trituradas e suas partículas não foram homogeneizadas. Este procedimento foi adotado com intuito de analisar a amostra da maneira com que é vendida, sem necessitar de pré-tratamentos, tais como limpeza ou moagem.

Figura 4 Amostras de farinha de linhaça comercial. Sendo: A) Vitao alimentos (marrom), B) D' Magrinha (dourada), C) K' Life (marrom), D) Vila alimentos (dourada), E) Vitalin alimentos (dourada) e F) Vitalin alimentos (marrom).



4.4. PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E PRÉ-CONCENTRAÇÃO POR SUPRA SUPRA

Para a análise as amostras foram previamente secas em estufa a 60,0 °C por 24 h e em seguida massas de 200 mg de farinha de linhaça foram pesadas e misturadas com 20,0 mL de HNO_3 1,50 mol L^{-1} e mantido em banho ultrassônico por 20 min na frequência ultrassônica de 40 KHz. Uma bomba peristáltica foi utilizada para a recirculação da água no banho ultrassônico. Após a extração e centrifugação, 10,0 mL do sobrenadante foram retirados e misturado com 400 μL do agente complexante dietilditiofosfato de amônio (DDTP) (Figura 5) 41,6 % m/v e agitado em oscilador Vórtex por 0,5 min para a formação do complexo Cd-DDTP, seguido da adição de 1,09 mL de ácido láurico 45,3 mg mL^{-1} em tetrahidrofurano (THF) (Figura 6) e agitado em oscilador Vórtex

por 1 min. Após agitação a mistura foi submetida ao banho térmico a 60,0 °C por 1 min para não ter formação de micro emulsões, posteriormente, a solução foi então levada ao congelador para facilitar a solidificação da fase rica. Por fim, a fase pobre (fase aquosa) foi descartada e a fase rica foi dissolvida em 250 µL de etanol (1:1 v/v) e introduzida no sistema FIA acoplado com TS-FF-AAS.

Figura 5. Agente complexante dietilditiofosfato de amônio (DDTP).

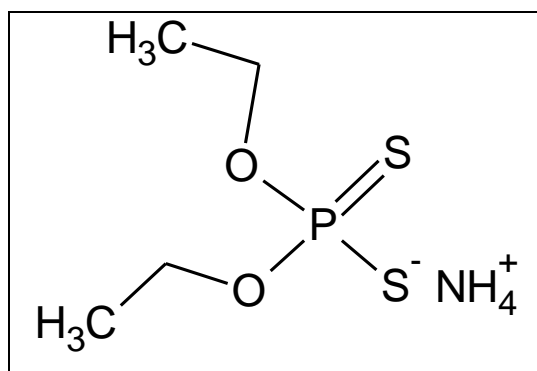
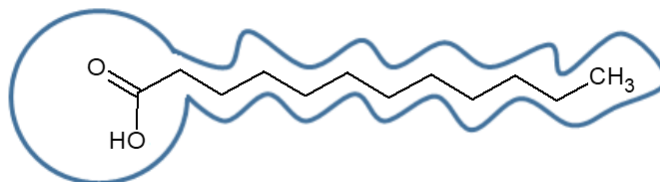


Figura 6. Molécula de Ácido Dodecanoico para formação dos agregados supramoleculares.



4.5 PROCEDIMENTO DE DIGESTÃO ÁCIDA POR MICRO-ONDAS

O método de extração assistido por ultrassom foi comparado estatisticamente (teste *t* de Student *pareado* com 95% de confiança) com o método de digestão assistida por micro-ondas com o intuito de checar a exatidão do método proposto. As amostras foram previamente secas em estufa a 60,0 °C por 24 h e em seguida, massas de 600 mg de farinha de linhaça foram pesadas em frascos Teflon® e mantidas *overnight* com um volume de 10,0 mL de HNO₃ 65,0 % (m/m) e 2,0 mL, de H₂O₂ 29,0 % (v/v) [24]. Posteriormente, a mistura foi submetida a digestão por micro-ondas, Milestone Inc® Ethos Plus. Para a digestão das amostras de farinha de linhaça foram usadas 4 etapas de gradiente

de temperatura. A Tabela 2 reúne as etapas de aquecimento na digestão ácida assistida por micro-ondas.

Tabela 2. Programa de aquecimento utilizado para o procedimento de digestão ácida por micro-ondas das amostras de linhaça.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Potência (W)
1	80	5	750
2	120	2	750
3	190	10	1000
4	190	15	1000

Após a digestão, a solução resultante foi aquecida em chapa de aquecimento até quase a secura e imediatamente dissolvidas em água ultrapura e, então, transferidas para balões volumétricos de 25,0 mL e levados para análise direta no TS-FF-AAS acoplado com sistema FIA.

4.6 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

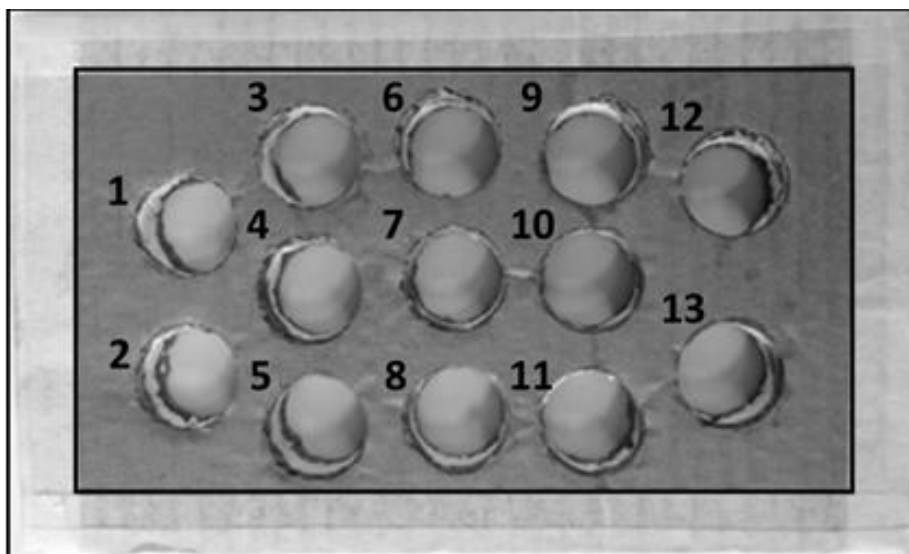
Para otimizar as variáveis que desempenham papel importante na extração ultrassônica, foram investigadas as seguintes variáveis: tipo de ácido (HCl e HNO₃), concentração (0,5, 1,0 e 1,5 mol L⁻¹), tempo de extração ultrassônica (5 a 40 min) e a influência das posições das amostras no banho (Figura 7). Cabe salientar que essa etapa de otimização foi feita de forma univariada, em face de que a etapa de extração assistida por ultrassom tende de ser compatível com a pré-concentração por solvente supramolecular, uma vez que ao se aplicar um planejamento experimental a condição ótima possa comprometer a pré-concentração por solvente supramolecular.

A amostra (E) foi empregada nesta etapa de otimização, pois apresentou elevada concentração de cádmio (709,0±0,30 µg kg⁻¹), a qual foi determinada previamente empregando digestão assistida por micro-ondas e determinação direta no TS-FF-AAS. Assim, para avaliar os efeitos das variáveis pertinentes à extração ultrassônica e garantir a extração quantitativa, as concentrações de cádmio obtidas nos experimentos foram comparadas ao valor de 790,0±0,30 µg kg⁻¹ e os resultados expressos em termos de porcentagem de extração (%).

A amostra (E) foi seca em estufa a 60,0 °C por 24 h e em seguida, 200 mg foram pesadas em tubos Falcon e misturadas com 20,0 mL de HNO₃ ou HCl

nas concentrações especificadas supramencionadas. As amostras foram levadas ao banho ultrassônico Quimis® e acondicionadas nas posições pré-estabelecidas (Figura 7). Uma bomba peristáltica Gilson® Miniplus Evolution foi utilizada para a recirculação da água no banho ultrassônico, e uma centrífuga Quimis® 0222T2 foi utilizada para o processo de separação de fases. Ao término da extração, um volume de 18 mL do sobrenadante foi removido e transferido para balões volumétricos de 25,0 mL.

Figura 7. Suporte caseiro utilizado para o mapeamento do banho ultrassônico.



4.7 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO COM SOLVENTE SUPRAMOLECULAR

Após a otimização das variáveis relativas à extração ultrassônica, um planejamento fatorial fracionário 2^{6-1} contendo ponto central foi utilizado para avaliar os efeitos das variáveis pertinentes à pré-concentração com solvente supramolecular [44].

A influência dos efeitos foi analisada pela ANOVA (Análise de Variância) e os níveis de cada fator estabelecido pelo p-valor foram analisados por meio do gráfico de Pareto com intervalo de confiança ao nível de 95%.

4.8 MATRIZ DE DOEHLERT

A partir da triagem realizada pelo Planejamento Fatorial Fracionário 2^{6-1} com ponto central, empregou-se uma matriz de Doehlert para as variáveis mais significativas com intuito de obter a otimização final, sendo a concentração de complexante (DDTP) e volume de THF (THF). A matriz de Doehlert com duas variáveis contempla uma variável com cinco níveis e outra variável com três níveis [90], sendo a variável concentração de complexante (DDTP) e a variável volume de THF (THF), respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a concentração de cádmio foi mantida em $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando uma solução padrão de cádmio durante os experimentos. O ajuste do modelo quadrático aos dados experimentais foi avaliado pela ANOVA ao nível de confiança de 95% e uma superfície de resposta foi empregada com intuito de avaliar a região de máximo do sistema.

4.9 EFEITO DE ÍONS INTERFERENTES

Sob as condições otimizadas, o efeito de íons comumente existentes em amostras de farinha de linhaça foi avaliado sobre o sinal analítico para cádmio [24]. Para isso, uma solução contendo $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de cádmio na presença de Cr(III), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Sr(II) e Pb(II) em diferentes concentrações, foi submetida a etapa de pré-concentração com SUPRA. O sinal analítico (absorbância) para cádmio nesta solução foi comparado a uma solução contendo apenas cádmio. O limite de tolerância foi definido como a variação do sinal analítico de cádmio de $\pm 10,0\%$.

4.10 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO

Sob condições otimizadas e um volume de pré-concentração de 10,0 mL, o desempenho analítico do método foi avaliado a partir do cálculo dos parâmetros analíticos, tais como fator de pré-concentração, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), eficiência de pré-concentração (EP) e índice de consumo (IC), precisão e exatidão. O coeficiente de determinação (R^2) das curvas analíticas, foi obtido pela razão entre as somas quadráticas predito pelo modelo (SQ_R) e o total (SQ_T), de acordo com a equação 2.

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} \quad (2)$$

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados de acordo com a recomendação da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) [91], em que o $LD=(3 \times Sd/ \alpha)$ e $LQ=(10 \times Sd/ \alpha)$, sendo (Sd) o desvio padrão do branco (n=10) e α = a inclinação da regressão linear, respectivamente, conforme as equações 3 e 4.

$$LOD = \frac{3Sd}{\alpha} \quad (3)$$

$$LOQ = \frac{10Sd}{\alpha} \quad (4)$$

Os parâmetros analíticos como fator de pré-concentração (FP), índice de consumo (IC) e eficiência de pré-concentração (EP) foram obtidos para o método proposto. O FP é definido como a razão entre os coeficientes angulares (α) das regressões lineares do método de microextração supramolecular e da determinação direta por TS-FF-AAS e FAAS, obtido através da equação 5 [92].

$$FP = \frac{\alpha_{pré-concentrando}}{\alpha_{determinação\ direta}} \quad (5)$$

O IC foi obtido por meio da razão entre o volume total (mL) e o FP, enquanto a eficiência de pré-concentração (EP) é definido como a razão entre o fator de pré-concentração e o volume de amostra de acordo com as equações 6 e 7 [93,94].

$$IC = \frac{V_{total}}{FP} \quad (6)$$

$$EP = \frac{FP}{\text{Volume de amostra}} \quad (7)$$

A precisão intradia (n=10) e interdia (n=2) do método foi avaliada em termos de repetibilidade em dois níveis de concentração (0,5 e 16,0 µg L⁻¹). Os desvios padrão relativos (DPR, %) foram calculados entre as réplicas a fim de determinar a precisão do método.

4.11 PROGRAMAS COMPUTACIONAIS

Para os devidos tratamentos estatísticos, os dados experimentais foram processados com o software Statistica® 7.0 (Statistica para Windows 7.0, Statsoft, Tulsa, OK, EUA, 2004). As demais representações gráficas foram feitas utilizando o software Origin® Pro 8 SR0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO NAS FARINHAS DE LINHAÇA APÓS DIGESTÃO ÁCIDA ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

Em face do desenvolvimento do método de extração ultrassônica, fez-necessário, inicialmente, efetuar a determinação de cádmio nas amostras de farinha por TS-FF-AAS após a digestão assistida com micro-ondas, utilizada como técnica de preparo como referência/comparativa. Desta forma, mediante o conhecimento prévio da concentração de cádmio nas amostras foi possível avaliar a eficiência do preparo de amostra com ultrassom. Porém, é oportuno mencionar novamente conforme seção 4.6, que a comparação da extração ultrassônica com o método assistido por micro-ondas, em ambos os casos efetuando a determinação direta de cádmio por TS-FF-AAAS, foi realizada apenas com a amostra E, por apresentar elevado teor de cádmio e não necessitar da etapa de pré-concentração. Por outro lado, para as amostras A, C, D, e F que possuem concentrações muito baixas, a comparação foi efetuada entre o método proposto contemplando a extração ultrassônica, pré-concentração com solvente SUPRA e determinação por TS-FF-AAS, com o método assistido por micro-ondas e determinação direta por TS-FF-AAS. No entanto, cabe salientar que a determinação de cádmio por TS-FF-AAS nas amostras A, C, D e F sem efetuar a etapa de pré-concentração só foi possível devido ao emprego de massas elevadas de amostra (600 mg) digeridas no forno de micro-ondas, conforme descrito na seção 4.5. A Tabela 3 reúne as concentrações de cádmio obtidas para diferentes amostras.

Tabela 3. Amostras comerciais de farinha de linhaça e suas respectivas concentrações de cádmio.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
A	110,0 \pm 0,40
B	<LD*
C	200,0 \pm 0,10
D	260,0 \pm 0,30

E	790,0±0,30
F	280,0±0,20

* LD – Limite de detecção

5.2 OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO NÍTRICO E CLORÍDRICO

As variáveis pertinentes à extração ultrassônica, incluindo o efeito do tempo de extração, concentração do agente extrator (ácido nítrico e ácido clorídrico) e posições do banho ultrassônico foram estudadas a fim de obter os maiores percentuais de extração (%), os quais foram comparados com o resultado obtidos com a digestão ácida da amostra E, em face de sua maior concentração de cádmio. Cabe salientar que todos os tubos foram colocados juntos contemplando as 13 posições do banho ultrassônico em todo o processo de extração, em face que a uma diferença no percentual de extração se a posição do banho fosse avaliada de forma independente.

A Figura 8 reúne os resultados do percentual de extração em função da concentração de HCl e a posição do banho. De acordo com os dados obtidos, constata-se que a porcentagem de extração é maior ao se empregar HCl 1,0 e 1,5 mol L⁻¹. O bom desempenho do HCl na extração é resultado da capacidade extratora/complexante deste ácido e, com o auxílio da radiação ultrassônica, há fragmentação das partículas das farinhas com consequente liberação do conteúdo de íons cádmio [95,96]. Em relação a posição do banho, observa-se, que ao empregar o HCl 0,5 mol L⁻¹ não se obtém porcentagem de extração quantitativas em nenhuma posição do banho ultrassônico, entretanto, ao comparar as concentrações de HCl 1,0 e 1,5 mol L⁻¹, a concentração de 1,5 mol L⁻¹ forneceu eficiência de extração em todas as posições do banho ultrassônico. Quando se emprega a HCl 1,0 mol L⁻¹ a porcentagem de extração não é quantitativa em algumas posições (1,4,7 e 12).

Figura 8. Percentagem de recuperação de extração em função da concentração de HCl e a posição do banho empregando as condições de 200 mg de farinha de linhaça e tempo de banho de 40 min.

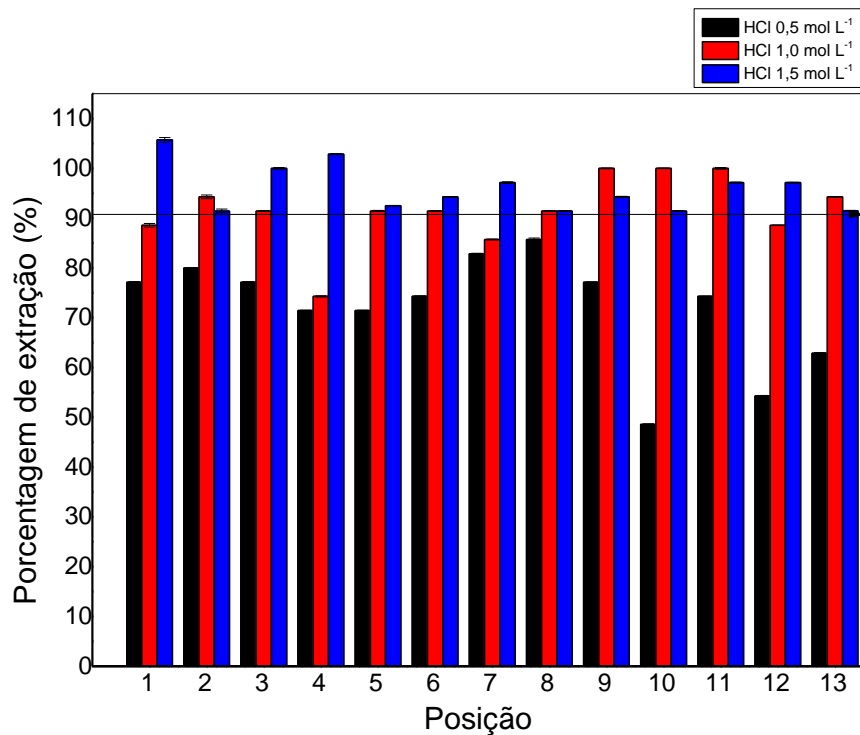
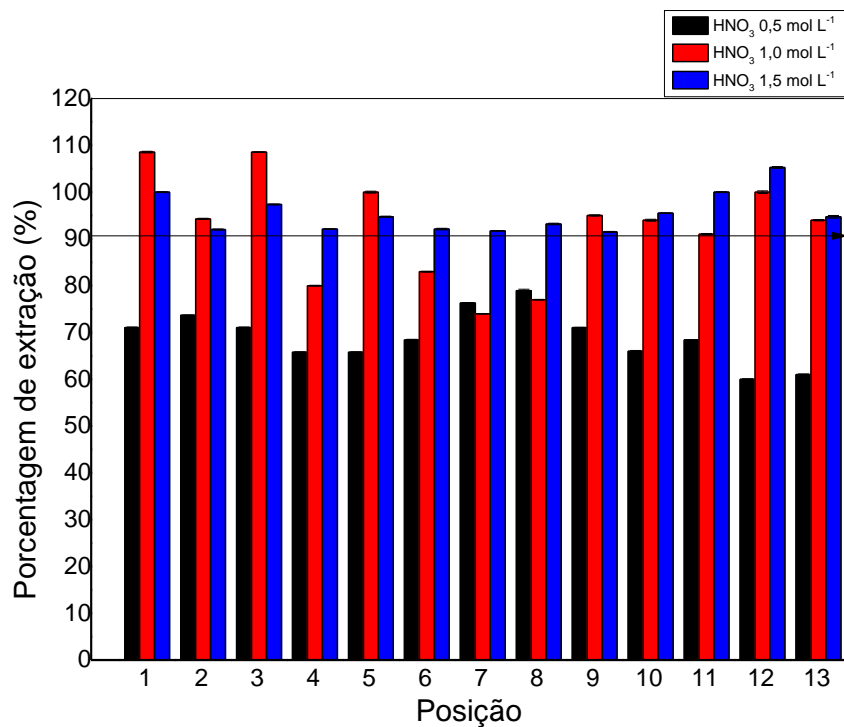


Figura 9. Percentagem de recuperação de extração em função da concentração de HNO₃ e a posição do banho empregando as condições de 200 mg de farinha de linhaça e tempo de banho de 40 min.



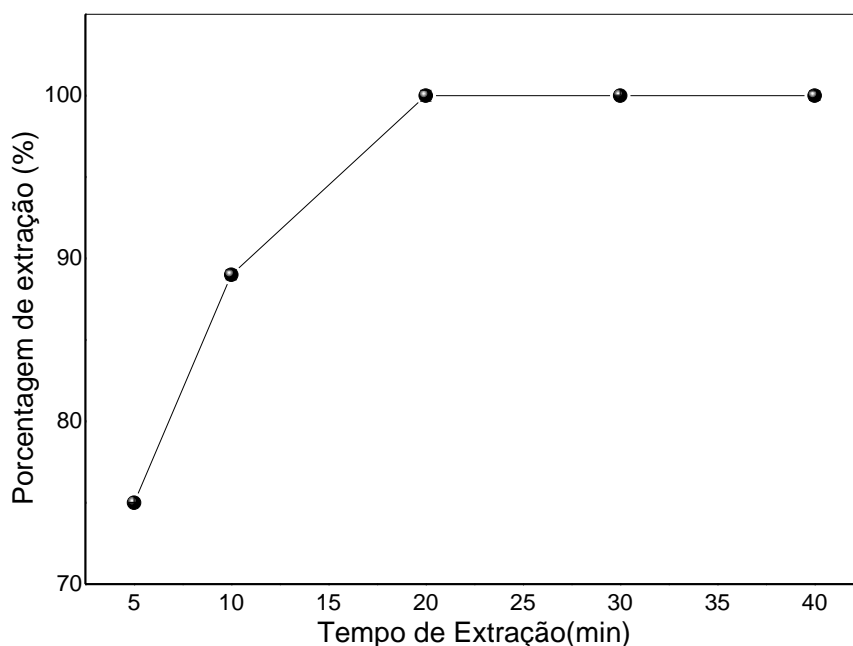
Para o ácido nítrico as mesmas condições foram empregadas, e os resultados obtidos para a otimização a concentração de ácido nítrico estão reunidos na Figura 9.

Como pode-se observar os resultados da extração com ácido nítrico foram similares a extração com ácido clorídrico. O HNO_3 é comumente reportado na literatura [97,98] devido ao fato de sua alta capacidade oxidante, o que favorece a extração do metal da matriz. Na concentração menor de ácido nítrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a extração é ineficiente em qualquer posição do banho, ao passo que o emprego da concentração $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ fornece extrações quantitativas em qualquer posição. Para a concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, as posições centrais não apresentaram porcentagens de extração quantitativas.

Sendo assim, tanto o HCl quanto o HNO_3 na concentração de $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ podem ser empregados para a extração de cádmio na farinha de linhaça em todas as posições do banho ultrassônico. No entanto, optou-se por empregar o HNO_3 por ser um ácido com maior grau de pureza, por não apresentar um caráter complexante como o HCl , o que poderia influenciar na pré-concentração e, pelo fato dos nitratos serem solúveis para a maioria dos íons metálicos.

Após a adoção do HNO_3 $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ como meio extrator no banho ultrassônico, foi avaliada a influência do tempo de extração (Figura 10).

Figura 10. Otimização do tempo de extração utilizando ácido nítrico $1,50 \text{ mol L}^{-1}$.



De acordo com os resultados obtidos, 20 min de banho são suficientes para extração quantitativa de cádmio. Resultados similares são reportados na literatura para extração de íons metálicos em amostras de lodo de esgoto com banho ultrassônico [99].

5.3 OTIMIZAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO COM SOLVENTE SUPRAMOLECULAR

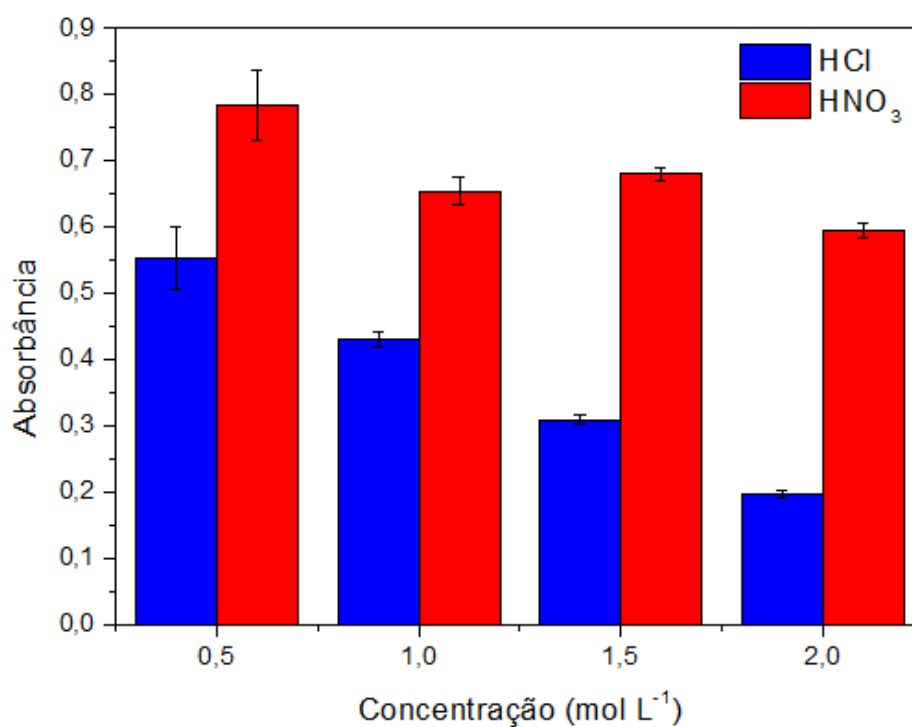
5.3.1 Efeito Do Ácido Nítrico E Ácido Clorídrico

Conforme discutido na seção 5.2, ambos os ácidos HNO_3 e HCl na concentração de $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ podem ser empregados como extrator de cádmio das amostras de farinha de linhaça. Porém, considerando que o extrato obtido é submetido a pré-concentração com solvente SUPRA, o efeito dos ácidos e da concentração no desempenho da pré-concentração deve ser investigado.

Como apresentado na Figura 11, menores valores de absorvância para cádmio após a pré-concentração em meio de HCl foram obtidos, quando comparados com HNO_3 . Ainda, concentrações maiores de HCl depreciam ainda mais o desempenho da pré-concentração. Estes resultados são esperados, pois o HCl possui propriedades complexantes e podem competir com a complexação de cádmio com DDTP e, conseqüentemente, no processo de pré-concentração.

Para o HNO_3 , maiores sinais analíticos de cádmio são obtidos, especialmente para concentrações menores, $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. A acidez em excesso no meio de pré-concentração pode desestabilizar o complexo formado Cd-DDTP . Neste sentido, para a pré-concentração de cádmio usando SUPRA, HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ seria a condição de escolha, mas esta condição é insuficiente para extrair cádmio da amostra de farinha de linhaça, como discutido na seção 5.2. Desta forma, a fim de estabelecer um compromisso entre eficiência de extração ultrassônica e pré-concentração SUPRA, o HNO_3 na concentração de $1,50 \text{ mol L}^{-1}$ foi escolhido como a condição ótima.

Figura 11. Influência da concentração do ácido clorídrico e ácido nítrico para a microextração com solvente supramolecular.



5.3.2 Otimização Multivariada Do Método De Pré-Concentração Com Solvente Supra

A fim de investigar o efeito das variáveis que podem influenciar no desempenho do método de pré-concentração com solvente SUPRA foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{6-1} contendo ponto central. A Tabela 4 apresenta o planejamento contendo os valores codificados e decodificados e as intensidades de sinais (Absorbância). As respostas obtidas da intensidade de sinal (Abs) foram utilizadas para construir as equações das regressões lineares para o modelo proposto e as significâncias estatísticas foram determinadas pela análise de variância (ANOVA). Com intuito de avaliar o modelo linear aos dados experimentais.

Tabela 4. Fatores, níveis e matriz experimental do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{6-1} com ponto central utilizado na otimização para a pré-concentração de cádmio baseado em solvente supramolecular. *

Variáveis	Níveis		
	(-)	0	(+)
Ácido láurico (mg mL ⁻¹)	1,07	2,68	4,3
THF (µL)	400	700	1000
DDTP (% m/v)	0,1	1,05	2
NaCl (% m/v)	0	1	2
Tempo de banho (min)	1	3	5
Vórtex (min)	1	3	5

Ensaio	Ácido láurico (mg mL ⁻¹)	DDTP (% m/v)	NaCl (% m/v)	Tempo do banho (min)	Vórtex (min)	THF (µL)	Absorbância (Altura do pico)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,070
2	1	-1	-1	-1	-1	1	0,329
3	-1	1	-1	-1	-1	1	0,449
4	1	1	-1	-1	-1	-1	0,455
5	-1	-1	1	-1	-1	1	0,046
6	1	-1	1	-1	-1	-1	0,129
7	-1	1	1	-1	-1	-1	0,079
8	1	1	1	-1	-1	1	0,653
9	-1	-1	-1	1	-1	1	0,342
10	1	-1	-1	1	-1	-1	0,071
11	-1	1	-1	1	-1	-1	0,175
12	1	1	-1	1	-1	1	0,608

13	-1	-1	1	1	-1	-1	0,038
14	1	-1	1	1	-1	1	0,184
15	-1	1	1	1	-1	1	0,239
16	1	1	1	1	-1	-1	0,238
17	-1	-1	-1	-1	1	1	0,128
18	1	-1	-1	-1	1	-1	0,281
19	-1	1	-1	-1	1	-1	0,194
20	1	1	-1	-1	1	1	0,623
21	-1	-1	1	-1	1	-1	0,194
22	1	-1	1	-1	1	1	0,135
23	-1	1	1	-1	1	1	0,166
24	1	1	1	-1	1	-1	0,269
25	-1	-1	-1	1	1	-1	0,177
26	1	-1	-1	1	1	1	0,061
27	-1	1	-1	1	1	1	0,403
28	1	1	-1	1	1	-1	0,448
29	-1	-1	1	1	1	1	0,155
30	1	-1	1	1	1	-1	0,104
31	-1	1	1	1	1	-1	0,139
32	1	1	1	1	1	1	0,533
33	0	0	0	0	0	0	0,734
34	0	0	0	0	0	0	0,68
35	0	0	0	0	0	0	0,619

* Concentração de cádmio utilizada foi de $10 \mu\text{g L}^{-1}$

A Tabela 5 fornece a análise de variância (ANOVA), com o intuito de avaliar a qualidade do ajuste dos dados ao modelo linear.

Tabela 5. Análise de variância dos dados para a modelagem linear.

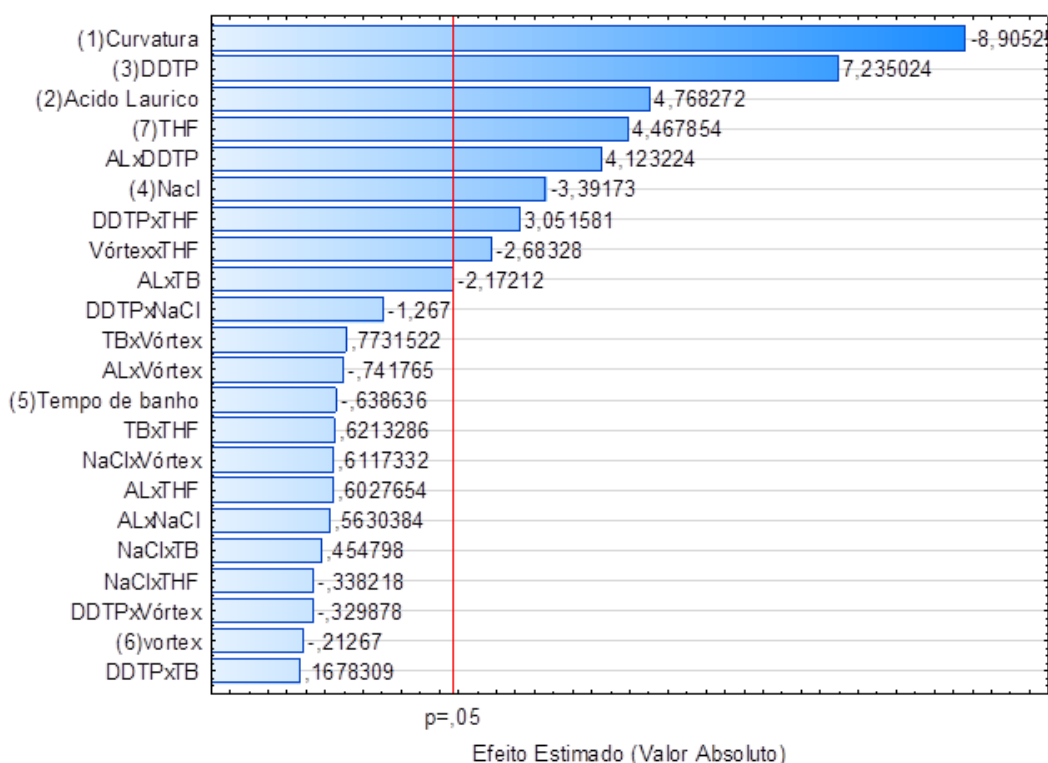
Parâmetros	SQ ^a	GL ^b	MQ ^c	F _{cal}	F _{tab} (95%)
Regressão (SQ _R) ^d	1,4254	22	0,0645		
Resíduo (SQ _{Res}) ^e	0,0746	12	$6,2 \times 10^{-3}$		
Falta de ajuste (SQ _{faj}) ^g	$6,80 \times 10^{-2}$	10	$6,80 \times 10^{-3}$		
Erro puro (SQ _{ep}) ^f	$6,59 \times 10^{-3}$	2	$3,29 \times 10^{-3}$	2,1	19,4 F _(10,2)
Total (SQ _T) ^h	1,50	34	0,044		
R ²	0,950	R	0,975		

^aSoma quadrática; ^bGraus de liberdade; ^c $MQ = SQ/GL$; ^d $SQ_R = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$; ^e $SQ_{res} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2$; ^f $SQ_{ep} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$; ^g $SQ_{faj} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_j} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$; ^h $SQ_T = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$.

De acordo com a ANOVA, o modelo não apresentou falta de ajuste devido ao valor tabelado $F_{10,2}$ (19,4) ser superior aos valores calculados de F (2,1), em um nível de confiança de 95%.

O diagrama de pareto /mostra a distribuição dos efeitos calculados para o modelo linear. A análise dos efeitos principais, de interação e o grau de significância estão apresentados Figura 12.

Figura 12. Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis na pré-concentração de cádmio baseado em solvente supramolecular.



A análise dos efeitos revelam que a curvatura é significativa ao nível de 95%, atribuído a região de máxima absorvância próximo a região central dos experimentos ($\Delta = \bar{y}_v - \bar{y}_c = 0,254 - 0,678 = -0,424$). Note que, com exceção ao tempo de banho e vórtex para $t_{cal} < t_{tab}$ todos os outros efeitos principais são estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Sem dúvida, as variáveis concentração de DDTP (2), concentração de ácido láurico (1) e volume de THF (7) são os fatores mais importantes na pré-concentração com solvente supramolecular, seguido pelo efeito de interação ácido láurico x DDTP. Se

examinarmos o efeito da variável NaCl, constatamos que a mudança do nível inferior para o nível superior produz uma diminuição média do sinal de absorvância, isso se deve ao fato que o efeito “*salting out*”, que em níveis superiores de NaCl promove um aumento da força iônica do meio, reduzindo também o efeito indutor da água no equilíbrio ternário miscela, THF e água, podendo reduzir também a transferência de massa do analito para a fase extratora (ácido láurico) causando um decréscimo na eficiência da extração e, conseqüentemente, no sinal analítico [45,87]. Portanto, os experimentos posteriores foram realizados na ausência de NaCl.

A interação DDTP x ácido láurico em níveis positivos, de acordo com o diagrama de pareto revela que estas variáveis são dependentes entre si. Em outras palavras, maiores sinais analíticos(Absorvância) para cádmio podem ser obtidos com o aumento da concentração de DDTP e de ácido láurico.

As variáveis tempo de banho e vortex não apresentaram influência no processo de pré-concentração e, portanto, foram mantidas em seus níveis inferiores como condições ótimas (1,0 min).

A concentração de ácido láurico em níveis positivos evidencia que quanto maior a concentração do solvente extrator, pode-se obter também maiores fatores de pré-concentração. No entanto, o aumento da concentração de ácido láurico, acima de $4,3 \text{ mg mL}^{-1}$ torna-se inviável devido a baixa solubilidade. Assim, a concentração de $4,3 \text{ mg mL}^{-1}$ foi adotada como ótima.

Quanto a variável mais importante (concentração de DDTP), o aumento da concentração do DDTP de 0,1 para 2,0% (m/v) resultou no aumento médio de 0,202 na intensidade de sinal, o que pode ser explicado pelo deslocamento do equilíbrio para formação do complexo Cd-DDTP, bem como pela natureza do complexo. O DDTP é um complexante que possui átomos de enxofre em sua composição, que atuam como base mole, de acordo com a Teoria de Pearson. Íons cádmio são considerados ácidos mole pela teoria e possuem alta afinidade para formação de complexos com DDTP. O complexo formado possui maior interação com a micela constituída de ácido láurico por meio de forças intermoleculares, se comparado a íons cádmio isolados [100,101], justificando, desta forma, o aumento de sinal analítico com o aumento da concentração de DDTP.

O efeito do volume de THF também é positivo e significativo, que pode ser explicado pela capacidade deste solvente em dispersar as misturas no meio aquoso e, conseqüentemente, aumentando a área extratora [59].

Assim sendo, a otimização final dos fatores DDTP e THF foi realizada por meio de uma matriz de Doehlert em torno das melhores condições, 2,0% (m/v), e 1,0 mL, respectivamente e as outras variáveis foram fixadas nas condições supramencionadas. Os valores codificados das variáveis, os valores reais e as respostas analíticas estão apresentados na Tabela 6.

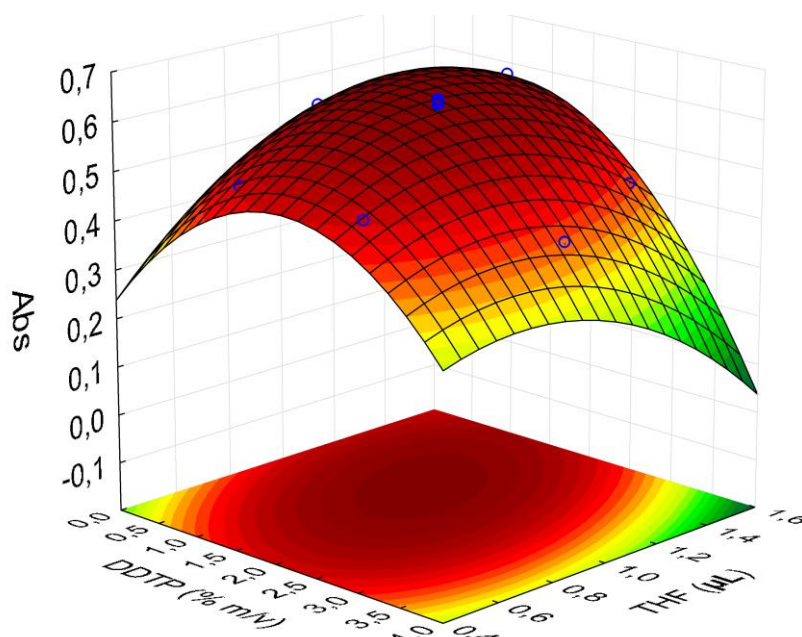
Tabela 6. Fatores, níveis e matriz experimental do Planejamento Doehlert utilizado na otimização para a pré-concentração de cádmio baseado em solvente supramolecular.

Ensaio	Variáveis		
	DDTP (% m/v)	THF (mL)	Absorbância
1	0 (2,0)	0 (1,0)	0,617
1	0 (2,0)	0 (1,0)	0,635
1	0 (2,0)	0 (1,0)	0,620
1	0 (2,0)	0 (1,0)	0,640
1	0 (2,0)	0 (1,0)	0,633
1	0 (2,0)	0 (1,0)	0,643
2	1 (3,5)	0 (1,0)	0,421
3	0,5 (2,75)	0,866 (1,5)	0,433
4	-1 (0,5)	0 (1,0)	0,574
5	-0,5 (1,25)	-0,866 (0,5)	0,508
6	0,5 (2,75)	-0,866 (0,5)	0,507
7	-0,5 (1,25)	0,866 (1,5)	0,600

Os valores entre parênteses são os valores codificados da matriz de Doehlert e os valores ao lado são os níveis estudados na matriz.

A partir da matriz de Doehlert, foi construída uma superfície de resposta (Figura 13) por meio do modelo quadrático (equação 8) e validado pela ANOVA (Tabela 7).

Figura



13.

Superfície de resposta obtida a partir da matriz de Doehlert.

$$y (Abs) = -0,07370 + 0,2951(DDTP) - 0,0593(DDTP)^2 + 0,9163(THF) - 0,3434(THF)^2 - 0,1104(DDTP \times THF) \quad (8)$$

Tabela 7. Análise de variância dos dados para a modelagem quadrática.

Fontes de variação	SQ ^a	GL ^b	MQ ^c	F _{cal}	F _{tab} (95%)
Regressão (SQ _R) ^d	0,07206	5	0,0144		
Resíduo (SQ _{res}) ^e	6x10 ⁻⁴	6	1x10 ⁻⁴		
Falta de ajuste (SQ _{faj}) ^g	4,1x10 ⁻⁵	1	4,1x10 ⁻⁵		
Erro puro (SQ _{ep}) ^f	5,59x10 ⁻⁴	5	1,12x10 ⁻⁴	0,366	6,61 F _(1,5)
Total (SQ _T) ^h	0,07266	11	6,60 x10 ⁻³		
R ²	0,9917		0,9959		

^aSoma quadrática; ^bGraus de liberdade; ^c $MQ = SQ/GL$; ^d $SQ_R = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$; ^e $SQ_{res} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$; ^f $SQ_{ep} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_j} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$; ^g $SQ_{faj} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_j} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$; ^h $SQ_T = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$.

De acordo com a análise de variância (ANOVA) o modelo não apresenta falta de ajuste devido ao valor tabelado $F_{1,5} (6,61)$ ser superior aos valores calculados de $F (0,366)$, em um nível de confiança de 95%.

Após a triagem feita pelo planejamento fracionário e otimização pela matriz de Doehlert os valores otimizados para o método proposto estão apresentados na Tabela 8.

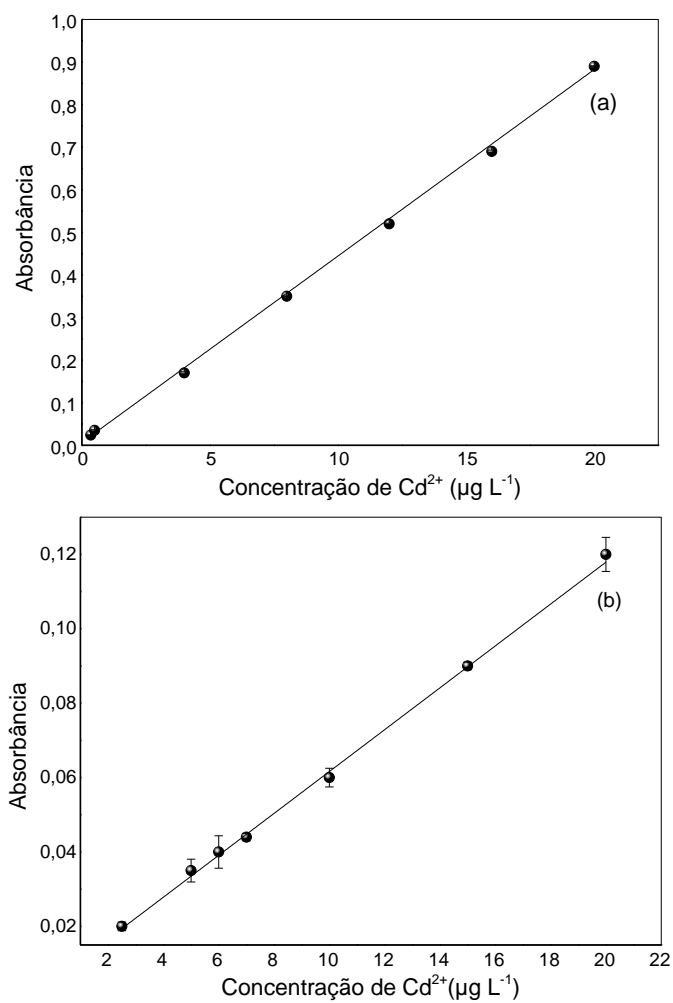
Tabela 8. Valores otimizados do método empregando o planejamento fatorial fracionário 2^{6-1} .

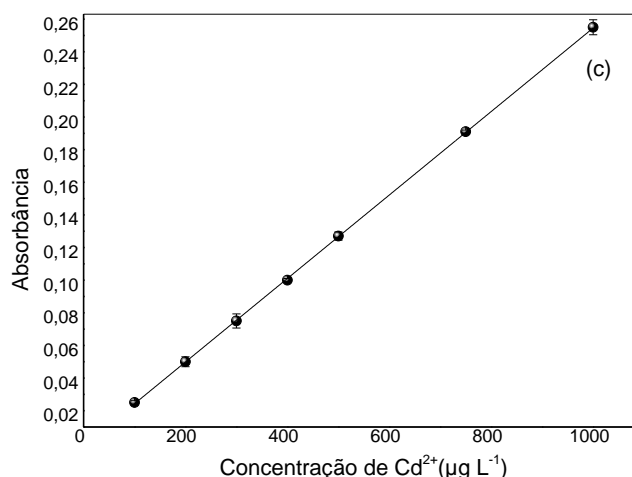
Parâmetro	Valores otimizados
Ácido láurico (mg mL ⁻¹)	4,3
THF (mL)	1,09
DDTP (% m/v)	1,46
Tempo de banho (min)	1
Vórtex (min)	1

5.4 PARÂMETROS ANALÍTICOS

Sob condições otimizadas, a linearidade do método de microextração por solvente supramolecular foi avaliada para cádmio na faixa de concentração de 0,35-20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com a IUPAC [91], conforme a equação 4, onde o valor de LOQ (0,35 $\mu\text{g L}^{-1}$) foi averiguado experimentalmente, e inserido na curva analítica. O modelo da regressão linear foi estatisticamente avaliado por meio da análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de confiança. A Figura 14 mostra as curvas analíticas com e sem a etapa de microextração por solvente supramolecular obtidas por TS-FF-AAS e FAAS.

Figura 14. Curvas analíticas realizadas (a) com a etapa de microextração supramolecular e determinação por TS-FF-AAS ($0,35 - 20 \mu\text{g L}^{-1}$), (b) determinação direta por TS-FF-AAS ($2,5 - 30 \mu\text{g L}^{-1}$) e (c) determinação direta por FAAS ($100 - 1000 \mu\text{g L}^{-1}$).





$$\text{Abs} = 0,0026_{\pm 0,00136} + 0,0436_{\pm 0,00005} \times C_{Cd^{2+}} \quad (\text{a})$$

$$\text{Abs} = 0,005_{\pm 0,0009} + 0,005_{\pm 0,00009} \times C_{Cd^{2+}} \quad (\text{b})$$

$$\text{Abs} = -0,0014_{\pm 0,0004} + 0,0003_{\pm 0,0000008} \times C_{Cd^{2+}} \quad (\text{c})$$

O modelo foi estatisticamente avaliado por meio da análise de variância aplicando a *one-way* ANOVA. O resumo da análise variância do modelo de regressão está apresentado na Tabela 9. Ao nível de 95% de confiança, a razão entre as variâncias das médias quadráticas explicadas pelo modelo (MQ_R) e residual (MQ_{res}), para um $F_{cal} (7023,27) \gg \gg F_{tab} (4,38)$, revelam que o modelo linear parece mesmo o mais indicado para descrever a correlação entre a absorvância em relação a concentração de cádmio contemplando uma faixa de 0,35-20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Aplicando o mesmo modelo estatístico com o intuito de se avaliar o ajuste do modelo, ao nível de 95% de confiança obtêm-se a razão entre as variâncias das médias quadráticas de falta de ajuste (MQ_{faj}) e erro puro (MQ_{ep}), para um $F_{cal} (1,30) < F_{tab} (2,96)$, nos mostram que o modelo não apresentou falta de ajuste.

Tabela 9. Análise de variância para o ajuste do modelo de regressão linear para a relação absorvância e concentração de cádmio.

Fonte de Variação	SQ ^a	GL ^b	MQ ^c	F _{cal}	F _{tab} (95%)
Regressão (SQ _R) ^d	1,99374	1	1,99374	7023,27	4,38
Resíduo (SQ _{res}) ^e	0,00539	19	2,84x10 ⁻⁴		F _(1,19)
Falta de ajuste (SQ _{faj}) ^f	0,00171	5	3,42 x10 ⁻⁴	1,30	2,96
Erro puro (SQ _{ep}) ^g	0,00368	14	2,63 x10 ⁻⁴		F _(5,14)
Total (SQ _T) ^h	1,99913	20	0,09996		
Variação explicada (R ²) ⁱ	0,9973	R	0,9986		
Máxima variação explicável (R _{máx} ²) ^j	0,9982	R _{máx}	0,9991		

R^2 ajustado (R_{aj}^2) ^k	0,9972	R_{aj}	0,9986
--	--------	----------	--------

^aSoma quadrática; ^bGraus de liberdade; ^cValor médio quadrático; ^d $SQ_R = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$; ^e $SQ_{res} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2$; ^f $SQ_{faj} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_j} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$; ^g $SQ_{ep} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$; ^h $SQ_T = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$; ⁱ $R^2 = SQ_R/SQ_T$; ^j $R_{máx}^2 = (SQ_T - SQ_{ep})/SQ_T$; ^k $R_{aj}^2 = [1 - (MQ_{res}/MQ_T)]$.

Um resumo dos parâmetros analíticos do método é apresentado na Tabela 10. Os valores de limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), fator de pré-concentração (FP), índice de consumo (IC) e eficiência de pré-concentração (EP) foram obtidos de acordo com as equações 3, 4, 5, 6 e 7 respectivamente.

Tabela 10. Parâmetros analíticos para a determinação de cádmio utilizando o método proposto.

Parâmetros Analíticos	Valores obtidos
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,35-20,0
Modelo de regressão linear	$Abs = 0,0436[Cd^{2+}] + 0,0026$
R^2	0,9973
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,35
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,10
FP	8,72
FA (h^{-1})	13
IC (mL)	1,32
EP (mL^{-1})	0,87

FA: frequência analítica; IC: índice de consumo; EP: eficiência de pré concentração; FP: fator de pré-concentração

A precisão Intradia e Interdia (repetibilidade) foi avaliada para o método proposto para concentrações de 0,5 e 16,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os valores de precisão inter e intradia estão mostrados na Tabela 11. Os resultados apresentaram desvio padrão relativo (RSD) para $n = 10$ menores que 7,35%, demonstrando a baixa variação entre as medidas e boa concordância com a concentração nominal.

Tabela 11. Precisão para o método de pré-concentração de íons cádmio à base de solvente supramolecular.

Parâmetros		
Concentração Avaliada de cádmio ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,5	16
Intradia ($n = 10$)		
Precisão (RSD,%)	7,34	4,61

Interdia (n =2)

Precisão (RSD,%) 3,12 4,78

Uma comparação entre o método proposto de extração ultrassônica e pré-concentração com solvente supramolecular para a determinação de cádmio e outros métodos de preparo de amostras utilizando TS-FF-AAS, em termos de linearidade, LOQ, volume de amostra e eficiência de pré-concentração é apresentada na Tabela 12. Destaca-se no presente trabalho, o baixo volume de amostra empregado, maior faixa de concentração da curva analítica, ausência de solventes orgânicos como eluente e simplicidade de realização de todo o processo de análise envolvendo o preparo da amostra com ultrassom associado com pré-concentração com solvente SUPRA.

Os métodos em fase sólida reportados e quando aplicados na determinação de cádmio em amostras sólidas, necessitaram de digestão prévia da amostra com micro-ondas. O método baseado na análise direta por TS-FF-AAS de vinho e suco, apesar de não necessitar de preparo de amostra, não apresenta detectabilidade suficiente para determinar cádmio em farinha de linhaça. Em relação ao método que faz uso de CPE para determinação de cádmio em refrigerante, observa-se elevado tempo de análise, cerca de 60 min.

Vale ressaltar também que o método proposto é o único que combina extração assistida por ultrassom e microextração líquido-líquido por solvente supramolecular para a determinação de cádmio em farinha de linhaça, o que torna o método mais simples e com menor custo aquisitivo.

Tabela 12. Parâmetro analíticos do método proposto para a pré-concentração de cádmio com outros presentes na literatura utilizando a determinação por TS-FF-AAS.

Método	Agente quelante	Volume (mL)	EP	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostras	Ref.
Determinação direta	-	0,15	-	5,8	5,8-200,00	Vinhos e suco de uva	[102]
Adsorção em MWCNT-polivinilpiridina	-	26,80	0,73	0,12	0,12-6,00	Águas, chocolate, ervas medicinais e cigarro	[103]

Extração no Ponto Nuvem	PAN	15,00	3,70	0,06	0,1-5,00	Refrigerante	[104]
Extração por HF-SLME	APDC	100,00	0,9	-	0,04-2,00	Águas e materiais biológicos	[105]
Adsorção em Espuma de poliuretano	DDTP	2,00	2,5	0,40	0,40-15,00	Águas, soro fisiológico, fígado bovino e gramínea de centeio	[106]
SUPRAS	DDTP	10,00	0,87	0,35	0,35-20,00	Farinha de linhaça	Este trabalho

EP: eficiência de pré-concentração; LOQ: limite de quantificação; PAN: pyridyl-azo-naphtol; APDC: Ditiocarbamato de amônio e pirrolidina; DDTP: dietilditiofosfato de amônio; MWCNT: Nanotubo de carbono em multicamadas; HF-SLME: Extração de membrana líquida suportada por fibra oca; SUPRAS: Solvente supramolecular.

5.5 ESTUDO DE INTERFERENTES

A teoria de Pearson [101], estabelece que bases moles como átomos de enxofre no complexante DDTP tende a interagir preferencialmente com ácidos moles como cádmio. Além disto, sabe-se que o DDTP forma complexos com metais alcalinos, alcalinos terrosos e também com os elementos Al, Cr, Fe (II), Ga, Ge (IV), Ti, Ta, V, W e Zr [107]. Por outro lado, os íons metálicos Cu (II), Co(II), Fe(III), Mn(II), Ni(II), Pb(II) e Zn(II) formam complexos com o DDTP nas mesmas condições que o cádmio [108,109].

Para avaliar os efeitos dos íons interferentes e determinar a influência de alguns cátions na pré-concentração de cádmio, uma solução contendo 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd (II) e os cátions Cr (III), (5,52 $\mu\text{g L}^{-1}$), Fe (III) (313,00 $\mu\text{g L}^{-1}$), Co (II) (1,44 $\mu\text{g L}^{-1}$), Ni (II) (14,56 $\mu\text{g L}^{-1}$), Cu (II) (92,80 $\mu\text{g L}^{-1}$), Zn (II) (532,80 $\mu\text{g L}^{-1}$), Sr (II) (114,40 $\mu\text{g L}^{-1}$) e Pb (II) (0,32 $\mu\text{g L}^{-1}$) foram preparadas e analisadas pelo método proposto.

Os resultados obtidos foram comparados com o sinal analítico de cádmio na presença e na ausência dos possíveis interferentes. Observou-se similaridade entre os resultados, em que o sinal analítico da solução contendo os íons concomitantes equivale a 95% da solução contendo apenas cádmio. Assim, pode-se inferir que o método apresenta seletividade para determinação de cádmio em amostras de farinha de linhaça.

5.6 DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO EM AMOSTRAS REAIS E EXATIDÃO DO MÉTODO

Para avaliar a exatidão analítica e a aplicabilidade do método proposto, amostras de farinha de linhaça comercial, foram analisadas sob as condições otimizadas e os resultados estão apresentados Tabela 13. Como pode ser observado, os resultados para o método proposto são concordantes (teste *t de student pareado* ao nível de 95% de confiança) com os resultados obtidos empregando digestão assistida por micro-ondas e determinação direta por TS-FF-AAS.

Tabela 13. Determinação de cádmio em amostras de farinha de linhaça comercial pelo método proposto e comparação por digestão por micro-ondas e determinação direta por TS-FF-AAS.

Amostras	Concentração de cádmio ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	Método Proposto ^a	^b Micro-ondas-TS
Linhaça A (Marrom)	120,0 \pm 0,30	110,0 \pm 0,04
Linhaça B (Dourada)	<LD	<LD
Linhaça C (Marrom)	210,0 \pm 0,20	200,0 \pm 0,10
Linhaça D (Dourada)	280,0 \pm 0,20	260,0 \pm 0,30
Linhaça E (Dourada)	760,0 \pm 0,40	790,0 \pm 0,30
Linhaça F (Marrom)	290,0 \pm 0,20	280,0 \pm 0,20

<LD: Abaixo do limite de detecção; ^aResultados expressos como valor médio \pm desvio padrão com base em triplicata (n=3); ^bDigestão ácida por micro-ondas e determinação por TS-FF-AAS.

Como mencionado neste texto, não há valores preconizados por agências reguladoras para o teor de cádmio em farinha de linhaça. Porém, se adotarmos a resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a European Food Safety Authority (EFSA), e a Codex Alimentarius, do programa conjunto das entidades *Food and Agriculture Organization* e *World Health Organization* (FAO/WHO), que estabelece um limite

máximo de cádmio em cereais de $100,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, observa-se que todas as amostras analisadas apresentam concentrações superiores a este valor.

Resultados similares têm sido reportados na literatura quanto ao teor de cádmio em farinha de linhaça, como no trabalho publicado por Ozkutlu, F. [14] que faz uso da digestão ácida assistida por micro-ondas e determinação com Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), cuja concentração obtida de cádmio foi de $120,0 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Tokaloğlu [24] em seu trabalho não determinou cádmio, contudo, metais como Cr, Ni, Cu apresentaram concentrações elevadas sendo $690,0 \pm 0,60 \mu\text{g kg}^{-1}$, $1820,0 \pm 0,07 \mu\text{g g}^{-1}$ e $1160,0 \pm 0,10 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, enfatizando a necessidade de se monitorar esses metais potencialmente tóxicos e alertar sobre o uso indevido de agrotóxicos e seus despejos industriais.

6 CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido, baseado na extração assistida por radiação ultrassônica e pré-concentração com solvente supramolecular (SUPRA) com determinação por TS-FF-AAS mostrou-se eficiente e confiável na quantificação de cádmio em farinha de linhaça.

A extração assistida por radiação ultrassônica mostrou-se eficiente para a extração de metais em amostras complexas como a linhaça, comprovando ser uma ótima alternativa na etapa de preparo de amostras em comparação com o a digestão ácida assistida por micro-ondas, possui vantagens como o baixo custo, frequência analítica e o uso de ácidos diluídos no preparo de amostras. Adicionalmente, o extrato obtido é compatível com o método de pré-concentração por solvente supramolecular, não sendo necessário realizar o ajuste do pH com soluções alcalinas e/ou soluções tampão, eliminando com isso possíveis problemas de contaminação.

Cabe salientar que o uso do complexante DDTP mostrou-se eficaz no tocante a seletividade do método analítico, uma vez que a aplicação deste método se pode ser estendida a diferentes amostras de farinha de linhaça.

A aplicação do método proposto é bastante simples, rápida e ambientalmente amigável por não exigir grandes quantidades de solvente orgânico.

A presença de cádmio em algumas amostras de farinha de linhaça mostrou claramente a importância de investigar as concentrações de cádmio no controle de qualidade das indústrias de alimentos, uma vez que esses alimentos contaminados com metais possivelmente tóxicos acabam por chegar a mesa do consumidor.

REFERÊNCIAS

- [1] Stringheta, P. C., De Oliveira, T. T., Gomes, R. C., Do Amaral, M. P. H., De Carvalho, A. F., Vilela, M. A. P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 43 (2007) 181-194.
- [2] Oomah, B. D. Flaxseed as a functional food source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 81(2001) 889–894.
- [3] Floss, E. L. Linho Cultivo e Utilização. Passo Fundo: Faculdade de Agronomia. Universidade de Passo Fundo, 1983. (Boletim Técnico, nº 3).
- [4] Baldazi, B. et al. As lavouras de inverno: cevada – tremoço – linho – lentilha. **Rio de Janeiro: Globo**, 1988. (Coleção do Agricultor).
- [5] Tomm G. O et al. Indicações para o cultivo de linho no Rio Grande do Sul. **Guarani das Missões: Giovelli**, 2006. 40p.
- [6] Lay, C. L.; Dybing, C. D. Linseed. In: Robbelen, G.; Downey, R. K.; Ashri, A. **Oil Crops of the World**. New York: McGraw-Hill, 1989, p.416-430.
- [7] Allaby, R. G.; Peterson, G. W.; Merriwether, D. A.; Fu, Y. B. Evidence of domestication history of flax (*Linum usitatissimum* L.) from genetic diversity of the sad2 locus. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 112, n. 1, p. 58-65, 2005.
- [8] Coskuner, Y., Karababa, E. Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **J. Food Eng.**, 78 (2007) 1067-1073.
- [9] Oomah, B.D., Mazza, G., Productos de linaza para la prevención de enfermedades. In: Mazza G (Coord). Alimentos funcionales: aspectos bioquímicos y de processado, Zaragoza: Acribia; 2000.
- [10] NEPA.; UNICAMP. Tabela brasileira de composição de alimentos: TACO. 2.ed., NEPA-UNICAMP: Campinas, Brasil, 2006. Disponível em: < <http://www.unicamp.br/nepa/taco> >. Acessado em junho de 2018.
- [11] United States Department of Agriculture USDA. National nutrient database for standard reference. Disponível em: < <https://ndb.nal.usda.gov/ndb> >. Acessado em junho de 2018.
- [12] Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> Acessado em outubro de 2019.
- [13] KYMÄLÄINEN, H. R., SJÖBERG, A. M. Cadmium content of Finnish linseed and estimated consumer intake. **Agricultural and Food Science**, 15 (2006) 3-11.
- [14] Ozkutlu, F. Determination of cadmium and trace elements in some spices cultivated in Turkey. **Asian Journal of Chemistry**, 20 (2008) 1081-1088.

- [15] Grant, C. A., Monreal, M. A., Irvine, R. B., Mohr, R. M., McLaren, D. L., & Khakbazan, M. Preceding crop and phosphorus fertilization affect cadmium and zinc concentration of flaxseed under conventional and reduced tillage. **Plant and Soil**, 333 (2010) 337–350.
- [16] Mekebo, D., S. Chandravanshi, B. Levels of essential and non-essential metals in linseed (*Linum usitatissimum*) cultivated in Ethiopia. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, 28 (2014) 349.
- [17] Waalkes, M. P. Cadmium carcinogenics in review. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 79 (2000) 241-244
- [18] Zhai, Q., Narbad, A., Chen, W. Dietary Strategies for the Treatment of Cadmium and Lead Toxicity. **Nutrients**, 7 (2015) 552–571.
- [19] T. Inaba, E. Kobayashi, Y. Suwazono, M. Uetani, M. Oishi, H. Nakagawa, K. Nogawa, Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai–itai disease, **Toxicology Letters**, 159 (2005) 192–201.
- [20] A. Navas-Acien, M. Tellez-Plaza, E. Guallar, P. Muntner, E. Silbergeld, B. Jaar, V. Weaver, Blood Cadmium and Lead and Chronic Kidney Disease in US Adults: A Joint Analysis, **American Journal Epidemiology**, 170 (2009) 1156–1164.
- [21] Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 42, de 29 de agosto de 2013. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0042_29_08_2013.pdf/c5a17d2d-a415-4330-90db-66b3f35d9fbd > Acessado em: maio de 2019.
- [22] European Food Safety Authority (EFSA). Commission regulation (EC) nº 1881/2006, de 19 de dezembro de 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Disponível em: < <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF> > Acessado em: maio de 2019.
- [23] Food and Agriculture Organization and World Health Organization (FAO/WHO). Codex Alimentarius. General standard for contaminants and toxins in food and feed (codex stan 193-1995). Disponível em: < <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>> Acessado em: maio de 2019.
- [24] Tokalioğlu, Ş. Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by ICP-MS and multivariate analysis. **Food Chemistry**, 134 (2012) 2504–2508.
- [25] Zeiner, M., Juranović Cindrić, I. Review – trace determination of potentially toxic elements in (medicinal) plant materials. **Analytical Methods**, 9 (2017) 1550–1574.
- [26] Oliveira, J. P. S., Silva, F. L. F., Monte, R. J. G., Matos, W. O., & Lopes, G. S. A new approach to mineralization of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) for trace

element analysis by flame atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, 224 (2017) 335–341.

[27] Júnior, D. S., Krug, F. J., Pereira, M. de G., Korn, M. Currents on Ultrasound-Assisted Extraction for Sample Preparation and Spectroscopic Analytes Determination. **Applied Spectroscopy Reviews**, 41(2006) 305–321.

[28] Nascentes, C. C., Korn, M., Arruda, M. A. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. **Microchemical Journal**, 69 (2001) 37–43.

[29] Li, Z., Zhou, L. Rapid and low cost determination of cadmium in whole blood by hydride generation atomic fluorescence spectrometry after ultrasound-assisted sample preparation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 19 (2008) 1347–1354.

[30] Lima, A. F., Richter, E. M., Muñoz, R. A. A. Alternative analytical method for metal determination in inorganic fertilizers based on ultrasound-assisted extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 22 (2011) 1519–1524.

[31] Barros, J. M., Bezerra, M. A., Valasques, G. S., Nascimento Junior, B. B. D., Souza, A. S., Aragão, N. M. D. Multivariate optimization of an ultrasound-assisted extraction procedure for Cu, Mn, Ni and Zn determination in ration to chickens. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, 85 (2013) 891–902.

[32] Ferreira, B. L., Chaves, E. S., Vialich, J., Sauer, E. Ultrasound-assisted extraction from chocolate powder samples for the determination of Fe, K and Na. **Brazilian Journal of Food Technology**, 17 (2014) 236-242.

[33] Lima, E. C., Barbosa Jr., F., Krug, F. J., Silva, M. M., Vale, M. G. R. Comparison of ultrasound-assisted extraction, slurry sampling and microwave-assisted digestion for cadmium, copper and lead determination in biological and sediment samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 15 (2000) 995–1000.

[34] Väisänen, A., Suontamo, R., Silvonen, J., Rintala, J. Ultrasound-assisted extraction in the determination of arsenic, cadmium, copper, lead, and silver in contaminated soil samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 373 (2002) 93–97.

[35] Lavilla, I., Capelo, J. L., Bendicho, C. Determination of cadmium and lead in mussels by electrothermal atomic absorption spectrometry using an ultrasound-assisted extraction method optimized by factorial design. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, 363 (1999) 283–288.

[36] Aghamohammadi, M., Faraji, M., Shahdousti, P., Kalhor, H., Saleh, A. Trace Determination of Lead, Chromium and Cadmium in Herbal Medicines Using Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction Combined with Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Phytochemical Analysis**, 26 (2015) 209–214.

- [37] Nascentes, C. C., Arruda, M. A. Z., Nogueira, A. R. A., Nóbrega, J. A. Direct determination of Cu and Zn in fruit juices and bovine milk by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**. 64 (2004) 912-917.
- [38] Gáspár, A., Berndt, H. Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) — a simple method for trace element determination with microsamples in the µg/l concentration range. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, 55 (2000), 587–597.
- [39] Brancalion, M. L., Sabadini, E., Arruda, M. A. Z. Description of the Thermospray Formed at Low Flow Rate in Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry Based on High-Speed Images. **Analytical Chemistry**, 79 (2007) 6527–6533.
- [40] Tarley, C. R. T., Diniz, K. M., Cajamarca Suquila, F. A., & Segatelli, M. G. Study on the performance of micro-flow injection preconcentration method on-line coupled to thermospray flame furnace AAS using MWCNTs wrapped with polyvinylpyridine nanocomposites as adsorbent. **RSC Advances**, 7 (2017) 19296–19304.
- [41] Pereira, M. G., Pereira-Filho, E. R., Berndt, H., Arruda, M. A. Z. Determination of cadmium and lead at low levels by using preconcentration at fullerene coupled to thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, 59 (2004) 515–521.
- [42] Kudo, M. V. F., De Oliveira, L. L. G., Suquila, F. A. C., De Almeida, F. G., Segatelli, M. G., Lima, E. C., Dias, S. L. P., Tarley, C. R. T. Performance of avocado seed activated carbon as adsorbent for highly sensitive determination of Cd using a flow injection system online coupled to TS-FF-AAS. **J. Braz. Chem. Soc.**, 31 (2020) 100-108.
- [43] Tarley, C. R. T., Corazza, M. Z., de Oliveira, F. M., Somera, B. F., Nascentes, C. C., Segatelli, M. G. On-line micro-solid phase preconcentration of Cd²⁺ coupled to TS-FF-AAS using a novel ion-selective bifunctional hybrid imprinted adsorbent. *Microchemical Journal*, 131 (2017) 57–69.
- [44] Suquila, F. A. C., Scheel, G. L., De Oliveira, F. M., Tarley, C. R. T. Assessment of ultrasound-assisted extraction combined with supramolecular solvent-based microextraction for highly sensitive cadmium determination in medicinal plant sample by TS-FF-AAS. **Microchemical Journal**, 145 (2019) 1071–1077.
- [45] Beal, A., Garcia De Almeida, F., Moreira, C. A. B., Santos, I. M., Curti, S. M. M., Martins, L. D., Tarley, C. R. T. A new analytical method for lead determination in atmospheric particulate matter by a combination of ultrasound-assisted extraction and supramolecular solvent preconcentration. **Analytical Methods**, 10 (2018) 3745–3753.
- [46] Coelho, L. M., Bezerra, M. A., Arruda, M. A. Z., Bruns, R. E., & Ferreira, S. L. C. Determination of Cd, Cu, and Pb after Cloud Point Extraction using

Multielemental Sequential Determination by Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry (TS-FF-AAS). *Separation Science and Technology*, 43 (2008) 815–827.

[47] Bezerra, M. A., Bruns, R. E., Ferreira, S. L. C. Statistical design-principal component analysis optimization of a multiple response procedure using cloud point extraction and simultaneous determination of metals by ICP OES. ***Analytica Chimica Acta***, 580 (2006) 251–257.

[48] Andrade, F.P., Nascentes, C.C., Costa, L.M. Cadmium and lead cloud point preconcentration and determination in tobacco samples by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry, ***J. Braz. Chem. Soc.*** 20 (2009) 1460–1466.

d

[49] Lindemberg, J. N. D., Canselier, P. J. Extração no ponto nuvem de compostos orgânicos homólogos e isômeros. ***Quim. Nova.***, 28 (2005) 426-432.

[50] Bezerra, M. de A., Arruda, M. A. Z., Ferreira, S. L. C. Cloud Point Extraction as a Procedure of Separation and Pre-Concentration for Metal Determination Using Spectroanalytical Techniques: A Review. ***Applied Spectroscopy Reviews***, 40 (2005) 269–299.

[51] Jalbani, N., Soylak, M. Ligandless ultrasonic-assisted and ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction of copper, nickel and lead in different food samples. ***Food Chemistry***, 167 (2015) 433–437.

[52] Silva, A. S., Dores, E. F. G. C., Villa, R. D. A multiclass analytical method for pesticides determination in water using DLLME and GC-MS. ***Rev. Virtual Quim.***, 09 (2017) 548-562.

[53] Kocúrová, L., Balogh, I. S., Šandrejová, J., Andruch, V. Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. ***Microchemical Journal***, 102 (2012) 11–17.

[54] Jafarvand, S., Shemirani, F. Supramolecular-based dispersive liquid–liquid microextraction: determination of cadmium in water and vegetable samples. ***Analytical Methods***, 3 (2011) 1552.

[55] Jafarvand, S., Shemirani, F. Supramolecular-based dispersive liquid–liquid microextraction in high salt concentrations. ***Analytical Methods***, 4 (2012) 1173.

[56] Rezaei, F., Yamini, Y., Moradi, M., Daraei, B. Supramolecular solvent-based hollow fiber liquid phase microextraction of benzodiazepines. ***Analytica Chimica Acta***, 804 (2013) 135–142.

[57] Rastegar, A., Alahabadi, A., Esrafil, A., Rezai, Z., Hosseini-Bandegharai, A., Nazari, S. Application of supramolecular solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction for trace monitoring of lead in food samples. ***Analytical Methods***, 8 (2016) 5533–5539.

[58] Jafarvand, S., Shemirani, F. Supramolecular-based dispersive liquid-liquid microextraction: A novel sample preparation technique utilizes coacervates and reverse micelles. **Journal of Separation Science**, 34 (2011) 455–461.

[59] Aydin, F., Yilmaz, E., Soylak, M. Supramolecular solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction of copper from water and hair samples. **RSC Advances**, 5 (2015) 40422–40428.

[60] Deyholos, M. Bast fiber of flax (*Linum usitatissimum* L.): Biological foundations of its ancient and modern uses. **Israel Journal of Plant Sciences**, 54 (2007) 273–280.

[61] Barroso, A. K N.; Torres, A. G.; Castelo-Branco, V. N.; Ferreira, A.; Finotelli, P. V.; Freitas, S. P. et al. Linhaça marrom e dourada: propriedades químicas e funcionais das sementes e dos óleos prensados a frio. **Ciência Rural, Santa Maria**, 44 (2014) 601-608.

[62] UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. National nutrient database for standard reference. 2008. Disponível em: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>>. Acesso em: 17 janeiro 2020.

[63] Cintra, D. E. C. et al. Liquid profile of rats fed hig-fat diets based on flaxseed, peanut, trout or chicken skin. **Nutrition**, 22, (2006) 197-205.

[64] Bhathena, S. J. et al. Dietary flaxseed meal is more protective than soy protein concentrate against hypertriglyceridemia and steatosis of the liver in an animal model of obesity. **Journal of the American College of Nutrition**, 22 (2003) 157-164.

[65] Lucas, E. A. et al. Flaxseed reduces plasma cholesterol and atherosclerotic lesion formation in ovariectomized Golden Syrian hamsters. **Atherosclerosis**, 173 (2004) 223-229.

[66] Martins, M. L. S. et al. Redução do Marcador Inflamatório TNF- α após Consumo de Semente de Linhaça por Coelhos Hipercolesterolêmicos. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, 31(2018) 114-122.

[67] Adkins, Y.; Kelley, D.S. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 21 (2010) 781-92.

[68] Amna, Alli, N., Masood, S., Mukhtar, T., Kamran, M. A., Rafique, M., Chaudhary, H. J. Differential effects of cadmium and chromium on growth, phytosynthetic activity, and metal uptake of *Linum usitatissimum* in association with *Glomus intraradices*. **Environmental Monitoring and Assessment**, 187(6), 2015.

[69] Angelova, V., Ivanova, R., Delibaltova, V., Ivanov, K. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). **Industrial Crops and Products**, 19 (2004) 197–205.

- [70] Bjelkova, M., E. Tejklova, M. Griga, and V. Gencurova. Uptake and accumulation of cadmium and lead by flax and hemp. (2001) 492-496.
- [71] Baraniecki, P., L. Grabowska, and J. Mankowski. Flax and hemp in areas made derelict by the copper industry. **Natural Fibres**, 39 (1995) 79-85.
- [72] Bjelková, M., Gencurová, V., Griga, M. Accumulation of cadmium by flax and linseed cultivars in field-simulated conditions: A potential for phytoremediation of Cd-contaminated soils. **Industrial Crops and Products**, 33 (2011) 761-774.
- [73] Hocking, P.J., and M.J. McLaughlin. Genotypic variation in cadmium accumulation by seed of linseed, and comparison with seeds of some other crop species. **Aust. J. Agr. Res**, 51 (2000) 427-433.
- [74] Grabowska, L., and P. Baraniecki. Three year results on utilization of soil polluted by copper-producing industry. **Natural Fibres**, (1997) 123-132.
- [75] Baraniecki, P., R. Kozłowski, and L. Grabowska. The INF experience in phytoremediation of heavy metal polluted soil by cultivation of hemp and flax. **Natural Fibres**, (2001) 1-8.
- [76] Grzebisz, W., B. Chudzinski, J.B. Diatta, and P. Barlog. Phytoremediation of soils contaminated by copper smelter activity. Part I – Evaluation of soils contaminated by heavy metals. **Natural Fibres**, (1997) 111-117.
- [77] Rubio, S., Pérez-Bendito, D. Supramolecular assemblies for extracting organic compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 22 (2003) 470–485.
- [78] Watanabe, H.; Tanaka, H. A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid—liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. **Talanta**, 25 (1978) 585-589.
- [79] Ballesteros-Gómez, A., Silicia, M. D., Rubio, S. Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review. **Anal. Chim. Acta**, 677 (2010) 108-130.
- [80] Caballo, C., Sicilia, M. D., Rubio, S. Supramolecular solvents for green chemistry. In: PENA-PEREIRA, F.; TOBISZEWSKI, M. The application of green solvents in separation process. Elsevier: Amsterdam, 2017, pp. 111-137.
- [81] Medina, D. A. V., Cabal, L. F. R., Sartore, D. M., Lima, A. M., Santos-Neto, A. J. Solventes supramoleculares: uma alternativa na microextração em fase líquida para análises cromatográficas. **Scientia Chromatographica**, 9 (2017) 83-100.
- [82] Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J., Ninham, B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. **J. Chem. Soc., Faraday Trans.** 72 (1976) 1525-1568.

- [83] Yazdi, A. S. Surfactant-based extraction methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 30 (2011) 918–929.
- [84] Lombardo, D., Kisilev, M. A., Magazù, S., Calandra, P. Amphiphiles self-assembly: basic concepts and future perspectives of supramolecular approaches. **Adv. Cond. Matter. Phys.**, (2015) 1-22.
- [85] Ezoddin, M., Adlnasab, L., Kaveh, A. A., Karimi, M. A. Ultrasonically formation of supramolecular based ultrasound energy assisted solidification of floating organic drop microextraction for preconcentration of methadone in human plasma and saliva samples prior to gas chromatography–mass spectrometry. **Ultrason. Sonochem.**, 50 (2019) 182-187.
- [86] Gómez, A. M. B. Diseño y aplicación de disolventes y adsorbentes supramoleculares para la extracción de contaminantes en alimentos y muestras ambientales. [s.l.] **Universidad de Córdoba**, 2012c.
- [87] Ruiz, F.J., Rubio, S., Pérez-Bendito, D. Water-Induced Coacervation of Alkyl Carboxylic Acid Reverse Micelles: Phenomenon Description and Potential for the Extraction of Organic Compounds. **Analytical Chemistry**, 79 (2007) 7473–7484.
- [88] Shokouhifar, M., Hoosseini, S. M., Jamali, M. R. Decanoic acid reverse micelle-based coacervates for microextraction of silver in natural waters prior to flame atomic absorption spectrometry determination. **J. Braz. Chem. Soc.**, 27 (2016) 2114-2119.
- [89] Amjadi, M., Manzoori, J. L., Taleb, Z. Reverse micelle coacervate-based extraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for the determination of arsenic in water and oyster tissue samples. **Microchim. Acta**, 169 (2010) 187-193.
- [90] Ferreira, S. L. C., dos Santos, W. N. L., Quintella, C. M., Neto, B. B., Bosquesendra, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. **Talanta**, 63 (2004) 1061-1067.
- [91] Currie, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities adapted from the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) document “Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including Detection and Quantification Capabilities”, which originally appeared in Pure and Applied Chemistry, 67 1699–1723 (1995) © 1995 IUPAC. Republication permission granted by IUPAC. **Analytica Chimica Acta**, 391 (1999) 105–126.
- [92] Souza, J. M. O.; Tarley, C. R. T. Sorbent separation and enrichment method for cobalt ions determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry in water and urine samples using multiwall carbon nanotubes. **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, 89 (2009) 489–502.

- [93] Gorji, S., Biparva, P., Bahram, M., Nematzadeh, G. Rapid and Direct Microextraction of Pesticide Residues from Rice and Vegetable Samples by Supramolecular Solvent in Combination with Chemometrical Data Processing. **Food Analytical Methods**, 12 (2019) 394-408.
- [94] Kashanaki, R., Ebrahimzadeh, H., Moradi, M. Metal–organic framework based micro solid phase extraction coupled with supramolecular solvent microextraction to determine copper in water and food samples. **New Journal of Chemistry**, 42 (2018) 5806–5813.
- [95] López-García, I., Campillo, N., Arnau-Jerez, I., Hernández-Córdoba, M. Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of germanium in soils using ultrasound-assisted leaching. **Analytica Chimica Acta**, 531(2005) 125–129.
- [96] Santos, F. C., Alava-Moreno, F., Lavilla, I., Bendicho, C. Total As in sea-food as determined by transverse heated electrothermal atomic absorption spectrometry-longitudinal Zeeman background correction: Na evaluation of automated ultrasonic slurry sampling, ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion methods. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 15 (2000) 987-994.
- [97] Teixeira, L. S., Vieira, H. P., Windmüller, C. C., Nascentes, C. C. Fast determination of trace elements in organic fertilizers using a cup-horn reactor for ultrasound-assisted extraction and fast sequential flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 119 (2014) 232–239.
- [98] Nascentes, C. C., Korn, M., & Arruda, M. A. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. **Microchemical Journal**, 69 (2001) 37–43.
- [99] Deng, J., Feng, X., Qui, X. Extraction of heavy metal from sewage sludge using ultrasound-assisted nitric acid. **Chemical Engineering Journal**, 152 (2009) 177-182.
- [100] Ramos, J. C., Curtius, A. J., Borges, D. L. G. Diethyldithiophosphate (DDTP): A review on properties, general applications, and use in analytical spectrometry, **Applied Spectroscopy Reviews**, 47 (2012) 583-619.
- [101] Pearson, R. G. Hard and soft acids and bases, HSAB, Part I, **Journal Chemical Education**, 45 (1968) 581-587.
- [102] Shiavo, D., Neira, J. Y., Nóbrega, J. A. Direct determination of Cd, Cu and Pb in wines and grape juices by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 76 (2008) 1113-1118.
- [103] Tarley, C. R. T., Diniz, K. M., Suquila, F. A. C., Segatelli, M. G. Study on the performance of micro-flow injection preconcentration method on-line coupled to thermospray flame furnace AAS using MWCNTs wrapped with

polyvinylpyridine nanocomposites as adsorbent. **RSC Advances**, 7 (2017) 19296-19304.

[104] Rezende, H. C., Nascentes, C. C., Coelho, N. M. M. Cloud point extraction for determination of cadmium in soft drinks by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, 97 (2011) 118-121.

[105] Zeng, C., Hu, Y., Luo, J. Ionic liquid-based hollow fiber supported liquid membrane extraction combined with thermospray flame furnace AAS for the determination of cadmium. **Microchem Acta**. 177 (2012) 53-58.

[106] Tarley, C. R. T., Arruda, M. A. Z. A sensitive method for cadmium determination using an on-line polyurethane foam preconcentration system and thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical Sciences**. 20 (2004) 961-966.

[107] Quináia, S. Preconcentration of lead complexed with O,O-diethyl-dithiophosphate by column solid-phase extraction using different sorbents in a flow injection system coupled to a flame atomic absorption spectrometer. **Talanta**, 54 (2001) 687–696.

[108] Sella, S. M., Ávila, A. K., Campos, R. C. The Determination of Cd, Cu and Pb in Potable Water and Plant Material by Flame-AAS after on-Line Preconcentration of DDTP-NH₄ Metal Complexes on a C18 Column. **Analytical Letters**, 32 (1999) 2091–2104.

[109] Ramos, J. C., Curtius, A. J., Borges, D. L. G. Diethyldithiophosphate (DDTP): A Review on Properties, General Applications, and Use in Analytical Spectrometry. **Applied Spectroscopy Reviews**, 47 (2012) 583–619.