



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

GISSELI SOUZA VALASQUES

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS EMPREGANDO EXTRAÇÃO
INDUZIDA POR QUEBRA DE EMULSÃO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE METAIS E METALÓIDES EM AZEITE
DE DENDÊ**

Salvador- BA

2019

GISSELI SOUZA VALASQUES

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS EMPREGANDO EXTRAÇÃO
INDUZIDA POR QUEBRA DE EMULSÃO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE METAIS E METALÓIDES EM AZEITE
DE DENDÊ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutora em Química Analítica.

Orientadora: **Prof. Dr^a. Ana Maria Pinto dos Santos**
Co-orientador: **Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra**

**Salvador- BA
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Souza Valasques, Gisseli
Estratégias Analíticas Empregando Extração Induzida
Por Quebra de Emulsão Para Quantificação de Metais E
Metalóides Em Azeite De Dendê / Gisseli Souza
Valasques. -- Salvador, 2019.
132 f.

Orientadora: Ana Maria Pinto dos Santos.
Coorientadora: Marcos de Almeida Bezerra.
Tese (Doutorado - Pós graduação em Química -
Doutorado) -- Universidade Federal da Bahia, UFBA,
2019.

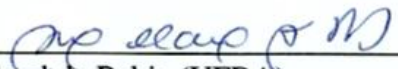
1. Azeite de dendê. 2. emulsificação assistida por
ultrassom. 3. extração induzida por quebra de sulsão.
4. metais. 5. metalóides. I. Pinto dos Santos, Ana
Maria. II. de Almeida Bezerra, Marcos. III. Título.

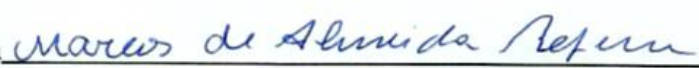
TERMO DE APROVAÇÃO


GISSELI SOUZA VALASQUES

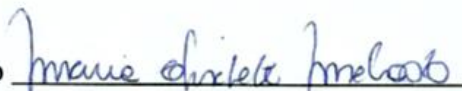
“ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS EMPREGANDO EXTRAÇÃO INDUZIDA POR QUEBRA DE EMULSÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METAIS E METALÓIDES EM AZEITE DE DENDÊ”

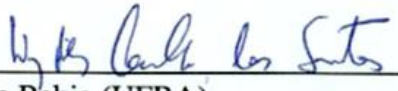
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

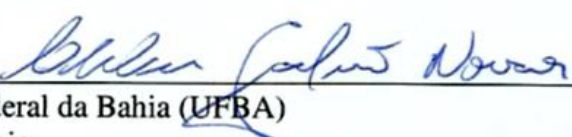
Prof.^a. Dr.^a. Ana Maria Pinto dos Santos 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof. Dr. Sergio Luis Costa Ferreira 
Doutorado em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)
Universidade Federal da Bahia

Prof.^a. Dr.^a. Maria Elisabete Machado 
Doutorado em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Universidade Federal da Bahia

Prof.^a. Dr.^a. Wagna Piler Carvalho dos Santos 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Instituto Federal da Bahia

Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Salvador, 27 de junho de 2019.

DEDICATÓRIA

*Ao meu amado irmão Gildomar Jr, com muito carinho.
A todos que foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por mais esta grande conquista.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Maria agradeço a confiança, orientação, paciência e disponibilidade durante a realização deste trabalho, e acima de tudo, obrigada pelo carinho e compreensão. Minha eterna gratidão.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcos Bezerra, meu pai científico, obrigada por me apresentar à Química Analítica, pois o conhecimento transmitido durante toda minha trajetória científica foi utilizado na elaboração deste trabalho. Obrigada também pelo incentivo, apoio, paciência, dedicação e orientação que juntos foram muito importantes para a conclusão dessa tese.

Ao prof. Dr. Sérgio Luís Costa Ferreira, por todo apoio e carinho, por ser esse ser humano formidável. Sinto-me muito honrada em fazer parte da Família GRPQQ.

Aos meus pais, em especial a minha mãe Suely.

Aos meus irmãos: Júnior, por estar a todo momento comigo me ajudando com palavras de incentivo, a Layla, João e Daiane que torceram muito por mim. Amo vocês!

Ao meu namorado Juscelino Jr, obrigada pelo apoio e carinho e por ter me ajudado sempre que precisei.

Ao grupo de pesquisa em química e quimiometria (GRPQQ), obrigada pelo acolhimento, alegrias e momento de descontração. Em especial aos amigos: Queila, Daniel Levi, Jucelino, Geovane Brandão e Cheilane pela constante ajuda. Vocês foram maravilhosos!

Aos amigos do laboratório de química analítica II da UESB (*campus de Jequié*): Uilliam, Valdinei, Juscélia, Darcy e Hélio. Em especial a Uilliam Mozart obrigada por estar comigo sempre!

À Mirela de Jesus pela ajuda indispensável e pela amizade.

Ao professor Valfredo e Márcio por ter me ajudado sempre que precisei.

À Naiara Maia, minha amiga e colega de turma desde a graduação, obrigada pelas palavras de incentivo e por estar comigo mesmo longe geograficamente.

Às minhas amigas Emanuela, Thais e minha afilhada Laura por todo amor dispensado a mim.

Aos grandes amigos: Douglas, Nai, André Araújo e Débora pelas palavras de incentivo e carinho.

À minha turma sextou, Rosana, Márcio, Jhonys, Gabriela e Poli pelos momentos de descontração e amizade.

À Laís Araújo, Vanessa Santos e Taiana Tarantino do grupo GPQA pela amizade valiosa e companheirismo.

Aos professores do departamento de química do IFBA (*campus de Salvador*), em especial aos professores: Luis Alexandre, Núbia e Wagna.

Ao programa de pós-graduação em química da UFBA.

À Michel, Luciana e Cristiane.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (*CNPq*) pelo apoio financeiro para realização desta tese.

Muito Obrigada!!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

O azeite de dendê é um produto oleoso de grande interesse para a indústria alimentícia, de cosméticos e de biocombustíveis. A presença de metais nessa matriz está relacionada à sua estabilidade oxidativa, ao seu valor nutricional, as possibilidades de contaminação nas diversas etapas de produção, entre outros fatores. Os trabalhos apresentados nesse texto tratam do desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de metais e ametais em amostras de azeite de dendê por técnicas de espectrometria atômica após emulsificação assistida por energia de ultrassom seguida de extração induzida por quebra de emulsão (EIEB) como alternativa simples, rápida e eficiente aos tradicionais processos de decomposição. Nesse contexto, foram realizados os seguintes trabalhos experimentais: (i) desenvolvimento de método para determinação de Ca, Mg, Mn, Fe e Zn em azeite de dendê por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). A otimização desse método foi realizada por planejamento de misturas com restrição e função de desejabilidade. O método apresentou limites de quantificação entre 0,018 e 0,19 mg L⁻¹ e precisão, expressa como repetibilidade (%RSD, N = 10) entre 1,8 e 3,2% para os cinco metais estudados. A exatidão do método foi acessada por aplicação de testes de adição/recuperação dos analitos às amostras (obtendo-se recuperações entre 87 e 113%) e por comparação dos valores de concentração encontrados por EIEB com os valores encontrados por decomposição por via seca, encontrando-se boa concordância entre esses valores. A aplicação do método com base em EIEB em amostras coletadas no Estado da Bahia mostrou que as concentrações (mg L⁻¹) das amostras foram 3,93 a 13,9 (Ca), 0,37 a 2,26 (Mg), < LQ a 0,32 (Mn), 1,77 a 8,57 (Fe) e 0,38 a 2,54 (Zn); (ii) desenvolvimento de método para determinação de As e Se em azeite de dendê por espectrometria de fluorescência atômica acoplada à geração de hidretos (HG-AFS) e Hg por geração de vapor frio (CV-AFS). Planejamento fatorial fracionário de dois níveis (2⁵⁻¹), planejamento Doehlert e função de desejabilidade foram usados no processo de otimização. O método apresentou limites de quantificação de 0,72; 0,12 e 1,5 µg L⁻¹ e precisão expressa como repetibilidade (%RSD, N=10, 5 µg L⁻¹) de 1,7; 2,5 e 3,5% respectivamente para As, Hg e Se. A exatidão do método foi acessada por testes de adição/recuperação (encontrando-se recuperações entre 90 e 128%) e por comparação dos valores de concentração encontrados por decomposição em bombas de Teflon®, mostrando boa concordância. As concentrações (µg L⁻¹) de As, Hg e Se encontradas nas amostras foram 1,28 a 1,58 (As) e 2,39 a 7,96 para o Se. As concentrações do Hg estavam abaixo do LQ nas amostras analisadas; (iii) desenvolvimento de método para determinação de Cd e Pb em azeite de dendê por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS). O método foi otimizado usando-se planejamento Doehlert e função de desejabilidade. O método apresentou limites de quantificação de 0,16 e 0,12 µg L⁻¹ e precisão de 1,8 e 5,4% respectivamente para Cd e Pb. A exatidão foi acessada aplicando-se testes de recuperação/adção e valores de recuperação entre 88,5 e 112% foram obtidos. Quantidades de Cd e Pb respectivamente entre 1,39 e 2,31 e 2,36 e 6,29 µg L⁻¹ foram encontradas nas amostras analisadas.

Palavras-chave: Azeite de dendê, emulsificação assistida por ultrassom, extração induzida por quebra de emulsão, espectrometria atômica, metais, ametais, otimização multivariada

ABSTRACT

Palm oil is an oily product of great interest to the food, cosmetics and biofuel industry. The presence of metals in this matrix is related to its oxidative stability, its nutritional value, the possibilities of contamination in the various stages of production, among other factors. The work presented in this paper deals with the development of analytical methods for the determination of metals and ametals in crude palm oil samples by atomic spectrometry techniques after emulsification assisted by ultrasonic energy followed by extraction induced by emulsion breaking (EIEB) as an alternative, simple, fast and efficient to the traditional processes of decomposition. In this context, the following works were carried out: (i) development of a method for the determination of Ca, Mg, Mn, Fe and Zn in oil crude palm oil by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). The optimization of this method was done by constrained mixtures design and desirability function. The method have present limits of quantification between 0.018 and 0.19 mg L⁻¹ and accuracy, expressed as repeatability (% RSD, N = 10) between 1.8 and 3.2% for the five metals studied. The accuracy of the method was achieved by applying addition/recovery tests of the analytes to the samples (obtaining recoveries between 87 and 113%) and by comparing the concentration values found by EIEB with the values found by dry decomposition, finding good agreement between these values. The application of the EIEB method in samples collected in the State of Bahia (Brazil) showed that the concentrations (mg L⁻¹) of the samples were 3.93 to 13.9 (Ca), 0.37 to 2.26 (Mg), < LQ to 0.32 (Mn), 1.77 to 8.57 (Fe) and 0.38 to 2.54 (Zn); (ii) development of a method for the determination of As and Se in crude palm oil by atomic fluorescence spectrometry coupled to the hydrides generation (HG-AFS) and Hg by cold vapor generation (CV-AFS). Two-level fractional factorial design (2⁵⁻¹), Doehlert design and desirability function were used in the optimization process. The method presented limits of quantification of 0.72; 0.12 and 1.5 µg L⁻¹ and accuracy expressed as repeatability (% RSD, N = 10, 5 µg L⁻¹) of 1.7; 2.5 and 3.5% respectively for As, Hg and Se. The accuracy of the method was reached by addition / recovery tests (recoveries between 90 and 128%) and by comparison of the concentration values found by decomposition in Teflon[®] bombs, showing good agreement. The concentrations (µg L⁻¹) of As, Hg and Se found in the samples were 1.28 to 1.58 (As) and 2.39 to 7.96 (Se). Concentrations of Hg were below LQ in the analyzed samples; (iii) development of a method for determination of Cd and Pb in crude palm oil by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). The method was optimized using Doehlert design and desirability function. The method have presented quantification limits of 0.16 and 0.12 µg L⁻¹ and accuracy of 1.8 and 5.4% respectively for Cd and Pb. Accuracy was accessed by applying recovery/addition tests and values between 88.5 and 112% were obtained. Quantities of Cd and Pb respectively between 1.39 and 2.31 and 2.36 and 6.29 µg L⁻¹ were found in the analyzed samples.

Keywords: Crude palm oil, ultrasonic assisted emulsification, extraction induced by emulsion breaking, atomic spectrometry, metals, ametals, multivariate optimization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Produção mundial de óleos vegetais em 2011.	6
Figura 1.2 – (a) Palmeira de dendê (dendezeiro) e (b) Aspectos de seu fruto maduro destacando-se um corte longitudinal mostrando a espessura da polpa e o interior do caroço.	6
Figura 2.1 – Representação esquemática de dois sistemas emulsionados mais comuns (a) uma emulsão formada por óleo disperso em água como uma fase contínua (emulsão O/A) e (b) uma emulsão formada por gotas de água dispersas em óleo) .	17
Figura 2.2 – Estruturas moleculares típicas das quatro classes de surfactantes: (a) surfactante aniônico; (b) surfactante anfótero; (c) surfactante catiônico e (d) surfactante não iônico	21
Figura 2.3 – Fenômenos que contribuem para a desestabilização de emulsões comuns, levando a separação de fases (quebra da emulsão).....	26
Figura 2.4 – Amostra em diferentes momentos durante uma extração induzida por quebra de emulsão: (a) amostra (fase apolar com as espécies inorgânicas) em contato com a solução extratora (fase polar); (b) formação da emulsão por dispersão da fase apolar na forma de pequenas gotas na fase contínua e transferência de metais na grande área de interface; (c) espécies inorgânicas transferidas para a fase de extração após a quebra da emulsão.	29
Figura 3.1 – Composição experimental da região de mistura delimitada por restrições baixas e altas estabelecidas para cada componente, de acordo com a Tabela 3.2a	39
Figura 3.2 – Amostras no cadinho (a) antes (digestão na mufla) e (b) depois do tratamento com solução ácida na placa de aquecimento.	42
Figura 3.3 – Aspectos dos extratos após quebra da emulsão segundo os experimentos que compõem o planejamento de misturas.....	43
Figura 3.4 – Superfície de resposta obtida após montagem de modelos quadráticos para (a) turbidância expressa como $-\log T$ e (b) desejabilidade geral.	45
Figura 3.5 – Avaliação do tempo de sonicação (min) e efeito da temperatura de quebra.....	47
Figura 3.6 – (a) Evolução das medições turbidimétrica e (b) absorvância de metais. Condições de trabalho: volume de amostra: 6,0 mL; Volume de HNO ₃ : 2,5 mL; 10% de volume de Triton X-114: 1,5 mL; tempo de ultrassom: 30 min; tempo de quebra da emulsão: 30 min.....	48

Figura 3.7 – Estudos do tempo de quebra em condições ótimas usando uma temperatura de ruptura de 80 e 90 °C. Condições de trabalho: volume de amostra: 6,0 mL; Volume de HNO ₃ : 2,5 mL; 10% de volume de Triton X-114: 1,5 mL; tempo de energia ultrassônica: 30 min.	49
Figura 4.1 – Gráfico de Pareto tendo-se como resposta a desejabilidade global para o estudo de variáveis envolvidas na extração induzida por quebra de emulsão dos elementos As, Se e Hg e determinação por espectrometria de fluorescência atômica.	65
Figura 4.2 – Gráficos de valores preditos versus resíduos para (a) modelo linear e (b) modelo quadrático ajustados à desejabilidade global adotada como resposta. ..	67
Figura 4.3 – Gráficos de valores observados versus valores preditos para (a) modelo linear e (b) modelo quadrático ajustados à desejabilidade global adotada como resposta.	67
Figura 4.4 – Perfis de desejabilidade individuais para os três elementos estudados e perfil de desejabilidade global	69
Figura 4.5 – Superfícies de respostas obtidas ajustando-se um modelo quadrático à desejabilidade global.....	69
Figura 4.6 – Curvas analíticas obtidas para os elementos As e Se por espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG-AFS) e Hg por espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV-AFS).	70
Figura 5.1 – Curvas de pirólise e atomização para o Cd adicionado ao extrato da quebra de emulsão do azeite de dendê para uma concentração final de 5 µg L ⁻¹ . Para a construção da curva de pirólise a temperatura de atomização foi fixada em 1600 °C e para a construção das curvas de atomização, a temperatura de pirólise foi fixa em 500 °C (curva sem modificador), 700°C (usando-se modificador Pd/Mg) e 550°C (usando-se modificador permanente de W).	83
Figura 5.2 – Curvas de pirólise e atomização para o Pb adicionado ao extrato da quebra de emulsão do azeite de dendê para uma concentração final de 5 µg L ⁻¹ . Para a construção da curva de pirólise a temperatura de atomização foi fixada em 1600 °C e para a construção das curvas de atomização, a temperatura de pirólise foi fixa em 400 °C (curva sem modificador) e 900 °C (curva com modificador Pd/Mg).	84
Figura 5.3 – Gráficos obtidos pelo ajuste de modelos matemáticos à desejabilidade global obtida dos dados da Tabela 5.2. Gráficos de valores observados versus valores	

preditos para (a) o modelo quadrático e (c) modelo linear e gráficos de valores preditos versus resíduos para (b) modelo quadrático e (d) modelo linear. 88

Figura 5.4 – Duas superfícies de resposta parciais obtidas pelo ajuste de um modelo matemático quadrático à resposta obtida (desejabilidade global) combinando-se os dados obtidos para o Cd e para o Pb após aplicação do planejamento Dohelert na otimização da EIEB. 89

Figura 5.5 – Curvas analíticas preparadas em diferentes meios para o estudo do efeito de matriz na determinação de (a) Cd e (b) Pb. 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Operações de refino do óleo de palma e correspondentes impurezas que são removidas.....	10
Tabela 1.2 – Teores de alguns elementos químicos em azeite de dendê segundo cinco artigos recentemente publicados.....	14
Tabela 2.1 – Alguns métodos analíticos para determinação de elementos traço baseados na extração induzida por quebra de emulsão	31
Tabela 3.1 – Condições operacionais utilizadas na determinação de Ca, Mg, Mn, Fe e Zn por espectrometria de absorção atômica com chama.	37
Tabela 3.2 – (a) Limitações baixas e altas para componentes de mistura e (b) Matriz experimental aplicada para a otimização da extração induzida pela quebra de emulsão a partir de amostras de óleo de palma.	40
Tabela 3.3 – Matriz de mistura restrita aplicada para otimização de componentes da mistura (mL) e respostas como turbidância (-log T) e sinal analítico corrigido (absorvância. mL ⁻¹) para os metais estudados.....	44
Tabela 3.4 – Comparação entre duas estratégias de calibração, LD (mg L ⁻¹), LQ (mg L ⁻¹) e repetibilidade (% RSD) para o método desenvolvido, baseado na extração induzida pela quebra da emulsão.....	51
Tabela 3.5 – Concentrações (mg L ⁻¹), quantidades adicionadas e recuperações de metais aumentaram em amostras de óleo de palma usando extração induzida por quebra de emulsão.	53
Tabela 3.6 – Concentrações (mg L ⁻¹) de Ca, Mg, Mn, Fe e Zn encontradas nas amostras de óleo de palma analisadas, utilizando extração induzida por quebra de emulsão e digestão por via seca.	55
Tabela 4.1 – Parâmetros operacionais do HG-AFS para a determinação de As, Se e Hg.	60
Tabela 4.2 – Planejamento fatorial fracionário de dois níveis (2 ⁵⁻¹) para o estudo preliminar de variáveis que afetam a extração por quebra de emulsão: (a) Variáveis e níveis (b) matriz experimental e resultados.	64
Tabela 4.3 – Planejamento Doehlert para otimização de variáveis que afetam a extração por quebra de emulsão.....	66

Tabela 4.4 – Testes de adição/recuperação ($\mu\text{g L}^{-1}$) para avaliação da exatidão do método para determinação do As, Hg e Se por espectrometria de absorção atômica acoplada às técnicas de geração de vapor (Hg e CV).....	72
Tabela 4.5 – Resultados para a determinação de As, Hg e Se ($\mu\text{g L}^{-1}$) em amostras de azeite de dendê por HG-AFS após extração induzida por quebra de emulsão....	73
Tabela 5.1 – Programa de temperatura do forno de grafite para a determinação de Cd e Pb na fase aquosa obtida após extração por quebra de emulsão.....	79
Tabela 5.2 – Planejamento Doehlert e respostas (absorbâncias) para a otimização da extração induzida por quebra de emulsão do Cd e do Pb em amostras de azeite de dendê.....	86
Tabela 5.3 – Parâmetros que descrevem as curvas analíticas no estudo do efeito de matriz do extrato da EIEB para determinação de Cd e Pb.	91
Tabela 5.4 – Características analíticas do método desenvolvido para a determinação de Cd e Pb em amostras de azeite de dendê após extração assistida por quebra de emulsão.	92
Tabela 5.5 – Aplicação do método desenvolvida com base na EIEB na determinação de Cd em amostras de azeite de dendê por GF AAS e teste da adição/recuperação.	94
Tabela 5.6 – Aplicação do método desenvolvida com base na EIEB na determinação de Pb em amostras de azeite de dendê por GFAAS e teste da adição/recuperação	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O	Emulsão de água em óleo
O/A	Emulsão de óleo em água
CG FID	Cromatografia a gás com detector de ionização de chama (do inglês <i>Chromatography gas with flame ionization detector</i>)
CG MS	Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (do inglês <i>Gas chromatography coupled to mass spectrometer</i>)
CV- AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Vapor Frio (do inglês <i>Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry</i>)
CPO	Azeite de dendê cru (Crude Palm Oil)
EIEB	Extração Induzida por Quebra de Emulsão (do inglês <i>Extraction Induced by Emulsion-break</i>)
ETAAS	Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica (do inglês <i>Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i>)
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (do inglês <i>Flame atomic absorption spectrometry</i>)
FIA	Análise por Injeção em Fluxo (do inglês <i>Flow injection analysis</i>)
FI-ETAAS	Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica por Injeção em Fluxo (do inglês <i>Flow Injection Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i>)
FS-FAAS	Espectrometria de absorção atômica em chama sequencial rápida (do inglês <i>Fast sequential flame atomic absorption spectrometry</i>)
GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>)
HG AFS	Espectrometria absorção atômica com geração de Hidretos (do inglês <i>Hydride generation atomic fluorescence spectrometry</i>)
HLB	Balanço Hidrofílico-Lipofílico (do inglês <i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High performance liquid chromatography</i>)

ICP MS	Espectrometria de emissão Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
ICP OES	Espectrometria de emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>)
SIA	Análise por Injeção Sequencial (do inglês <i>Sequential Injection Analysis</i>)
SI-ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado com injeção sequencial do inglês (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with Sequential Injection</i>)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO GERAL:.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	3
PARTE I.....	4
FUNDAMENTOS.....	4
CAPÍTULO I.....	5
O AZEITE DE DENDÊ.....	5
1.1 GENERALIDADES.....	5
1.1.1 O azeite de dendê na culinária baiana.....	8
1.1.2 Processamento e refino.....	9
CAPÍTULO II.....	15
EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR QUEBRA DE EMULSÃO.....	15
2.1 INTRODUÇÃO.....	15
2.2 CARACTERÍSTICAS DOS SISTEMAS EMULSIFICADOS.....	16
2.3 O PROCESSO DE EMULSIFICAÇÃO.....	18
2.3.1 Processos físicos que promovem o emulsionamento.....	18
2.4 SURFACTANTES NO PREPARO DE EMULSÕES.....	20
2.5 SELEÇÃO DE SURFACTANTES PARA PREPARO DE EMULSÃO.....	22
2.6 ESTABILIDADE DOS SISTEMAS EMULSIFICADOS E A QUEBRA DE EMULSÕES.....	25
2.7 MÉTODOS COM BASE EM EXTRAÇÃO POR DESESTABILIZAÇÃO DE SISTEMAS EMULSIFICADOS.....	28
PARTE II.....	34
TRABALHOS EXPERIMENTAIS DESENVOLVIDOS.....	34
CAPÍTULO III.....	35

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO COM BASE NA EXTRAÇÃO INDUZIDA POR QUEBRA DE EMULSÃO PARA DETERMINAÇÃO DE Ca, Mg, Mn, Fe E Zn EM AZEITE DE DENDÊ POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA	35
3.1 INTRODUÇÃO	35
3.2 PARTE EXPERIMENTAL	37
3.2.1 Instrumentação	37
3.2.2 Amostras.....	38
3.2.3 Reagentes e soluções.....	38
3.2.4 Otimização da extração de emulsão	38
3.2.5 Procedimento de calcinação e solubilização da amostra	41
3.2.6 Procedimento geral para extração induzida por quebra de emulsão após otimização.....	42
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.3.1 Nebulização e eficiência de transporte.....	47
3.3.2 Tempo de extração	47
3.3.3 Influência da temperatura e tempo de quebra	48
3.3.4 Características analíticas do procedimento desenvolvido	49
3.3.5 Aplicação do método desenvolvido e avaliação da exatidão	51
3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
CAPÍTULO IV	57
MÉTODO BASEADO EM EXTRAÇÃO INDUZIDA POR QUEBRA DE EMULSÃO PARA DETERMINAÇÃO DE As, Se E Hg EM AZEITE DE DENDÊ POR TÉCNICAS DE GERAÇÃO DE VAPOR ACOPLADAS A ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA ATÔMICA.....	57
4.1 INTRODUÇÃO	57
4.2 EXPERIMENTAL.....	59
4.2.1 Instrumentação	59
4.2.2 Reagentes e amostras	61
4.2.3 Coleta das amostras	61
4.2.4 Otimização da extração induzida por quebra de emulsão	62
4.2.5 Procedimento geral para realizar a extração por quebra de emulsão.....	62
4.2.6 Determinação de As, Se e Hg por HG-AFS	63

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.3.1 Otimização da extração induzida por quebra de emulsão	63
4.3.2 Características analíticas do método.....	69
4.3.3 Aplicação do método desenvolvido	73
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
CAPÍTULO V.....	76
<i>DETERMINAÇÃO DE Cd E Pb EM AZEITE DE DENDÊ POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA APÓS EXTRAÇÃO INDUZIDA POR QUEBRA DE EMULSÃO.....</i>	76
5.1 INTRODUÇÃO	76
5.2 EXPERIMENTAL.....	78
5.2.1 Instrumentação	78
5.2.2 Soluções, reagentes e amostras	79
5.2.3 Construção de curvas de pirólise e atomização	80
5.2.4 Otimização da extração induzida por quebra de emulsão	81
5.2.5 Procedimento da extração induzida por quebra de emulsão após otimização	81
5.2.6 Procedimento para decomposição das amostras usando-se bombas de teflon.....	82
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.3.1 Estudo das curvas de pirólise e atomização	82
5.3.2 Otimização multivariada.....	85
5.3.3 Estudo do efeito de matriz.....	89
5.3.4 Características analíticas do método.....	91
5.3.5 Avaliação da exatidão e aplicação da metodologia às amostras de azeite de dendê.....	93
5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	97
REFERÊNCIAS	99

INTRODUÇÃO

O óleo de palma cru extraído do mesocarpo do fruto da palmeira oleaginosa (*Elaeis guineensis*) é conhecido como azeite de dendê. A palma ou dendezeiro é a planta que apresenta a maior produtividade por área cultivada, rendendo dez vezes mais que o óleo de soja [1,2,3]. Os óleos vegetais são importantes componentes nutricionais da dieta humana, oferecendo energia, ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis como A, D, E e K [4]. O óleo de palma tem larga utilização na indústria alimentícia, podendo ser utilizado como gordura para panificação, produção de margarinas, biscoitos, frituras, sorvetes, chocolates, etc. Pode ainda ser utilizado nas indústrias saboeira e oleoquímica, fazendo parte da composição de tintas, vernizes, sabões e sabonetes. O óleo de palma por apresentar uma alta produtividade, pode ser empregado na produção de biodiesel [5,6].

A quantificação de elementos químicos em amostra de alimentos ricos em gorduras, proteínas e açúcares é um dos desafios da química analítica devido à complexidade da matriz. Embora existam abundantemente na literatura métodos oficiais para a determinação de metais em alimentos, eles requerem tratamento com base na decomposição da amostra. Essa decomposição requer condições bastante energéticas, tempo para que o processo seja realizado com eficiência e equipamentos como muflas, bombas e placas de aquecimento, além de utilizar ácidos concentrados que, a depender do equipamento que será utilizado na análise, não são desejáveis nesse processo. Adicionalmente, a alta carga de substâncias orgânicas de difícil ataque como os óleos e gorduras, limita bastante a massa que pode ser empregada prejudicando a sensibilidade na determinação do elemento.

Concomitantemente vem crescendo o interesse dos químicos analíticos em amostras de alimentos cujos procedimentos para análise ainda se baseiam em procedimentos demorados e ineficientes e que também não se encontram normas estabelecidas para os teores de metais e ametais permitidos visando a segurança alimentar. Existe um interesse de determinar elementos que apresenta dualidade: desejáveis até certa concentração, por serem essenciais, entretanto indesejáveis a partir de um certo nível devido a sua toxicidade. Há fatores que podem corroborar com aumento desses elementos na amostra devido ao solo em que foi estabelecida a

plantação, maquinário para a produção e processamento, como também a armazenagem desse material [2,7]

Devido a complexidade da constituição orgânica da amostra analisada nesse trabalho, foi proposto o procedimento de extração induzida por quebra de emulsão (EIEB). Essa metodologia se baseia na formação de uma emulsão e sua posterior quebra utilizando alta temperatura para acelerar essa separação.

Esta metodologia foi usada para determinar elementos químicos em amostras de azeite de dendê usando diferentes técnicas de espectrometria atômica: a espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS), com forno de grafite (G F AAS) e a fluorescência atômica acoplada à geração de hidretos (HG-AFS).

Nesse processo, as análises são menos suscetíveis à efeito de matriz e ainda permite a calibração usando padrões aquosos, além da simplicidade e baixo custo operacional. Este procedimento apresenta-se como principal vantagem a eliminação da matriz orgânica (óleo) da amostra, obtendo um único extrato aquoso límpido, que é mais adequado para análise espectrométrica.

Os textos aqui apresentados foram divididos em duas partes. Na primeira, foram realizadas revisões bibliográficas sobre os temas que guiaram a realização dessa tese: as características, composição e importância do azeite de dendê e a extração por quebra de emulsão, tratadas no primeiro e segundo capítulos, respectivamente. Na segunda parte serão apresentados três trabalhos experimentais que foram desenvolvidos durante o curso de doutorado com base na determinação de elementos em amostras de azeite de dendê após extração por quebra de emulsão. Dessa forma, o capítulo III aborda estudos sobre o desenvolvimento de metodologia para determinação de metais usando espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS), o capítulo IV trata do desenvolvimento de metodologia para determinação de As, Se e Hg usando espectrometria de fluorescência atômica acoplado à geração de hidretos (HG-AFS) e, por fim, o capítulo V traz os estudos sobre o desenvolvimento de metodologia para determinação de Pb e Cd usando espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS).

Os trabalhos apresentados nos três últimos capítulos foram escritos no formato de artigos científicos, prontos para submissão em periódicos de bom índice de impacto.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Desenvolver métodos analíticos com base na emulsificação assistida por energia de ultrassom e extração induzida por quebra de emulsão para determinação de elementos químicos em amostras de azeite de dendê empregando diferentes técnicas espectroanalíticas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Desenvolver e validar procedimento analítico de preparo de amostra, empregando extração induzida por quebra de emulsão, para determinação de Ca, Fe, Mg, Mn, e Zn por F AAS em amostras de azeite de dendê;
- Desenvolver e validar procedimento analítico empregando ondas ultrassônicas e o método de extração induzida por quebra de emulsão, tendo em vista à determinação de As, Hg e Se por HG AFS em amostras de azeite de dendê;
- Desenvolver e validar procedimento analítico de preparo de amostra, empregando extração induzida por quebra de emulsão e utilizando ondas ultrassônicas, para a determinação de Cd e Pb por GF AAS em diferentes amostras de azeite de dendê;
- Utilizar o planejamento Doehlert e superfície de resposta para otimizar variáveis pertinentes ao método de extração induzida por quebra de emulsão;
- Avaliar as concentrações dos elementos em amostras de azeite de dendê, visando a contribuição para tabela de composição de alimentos.

PARTE I
FUNDAMENTOS

CAPÍTULO I

O AZEITE DE DENDÊ

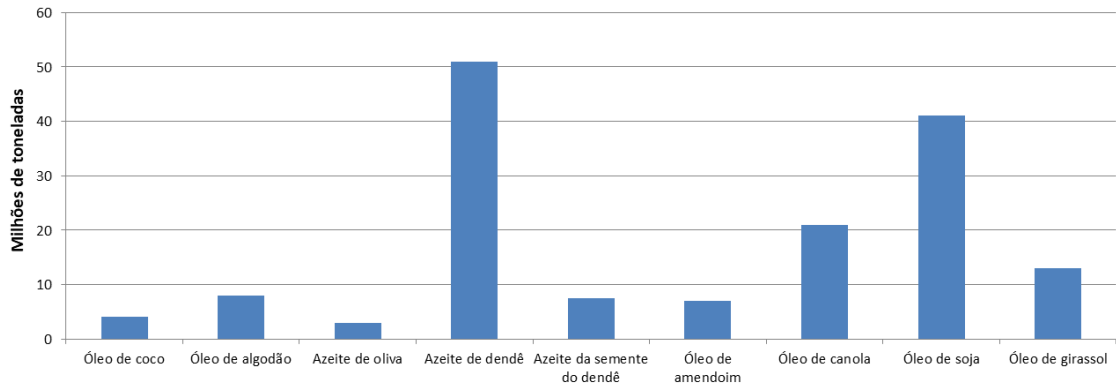
1.1 GENERALIDADES

Os óleos e gorduras são essenciais à nutrição humana por apresentarem funções importantes como a constituição de tecidos, a produção de hormônios e o fornecimento de energia. A caracterização da composição nutricional desses alimentos ajuda as ciências nutricionais a estabelecer recomendações de dietas, oferecendo informações mais exatas sobre os benefícios e restrições em relação ao consumo desses produtos. Além disso, o monitoramento de substâncias que indicam ou contribuem para a degradação desses produtos e a geração de informações sobre a presença de substâncias químicas podem contribuir para a segurança alimentar da população [8,9,10,11].

O óleo de palma, mais conhecido no Brasil como azeite de dendê é um dos óleos mais produzidos e consumidos no mundo. Sua produção mundial ultrapassou 50 milhões de toneladas em 2011 (Figura 1.1). O azeite de dendê é um óleo comestível que é extraído do mesocarpo, a parte externa do fruto que crescem em cachos de uma palmeira chamada dendenzeiro (Figura 1.2), uma planta tropical monoica com inflorescências machos e fêmeas de desenvolvimento hermafrodita na parte axial das folhas [12]. No Brasil denomina-se azeite o produto oleoso obtido a partir de prensagem de alguma parte de um vegetal, sem utilização de solventes para extração [13]. É uma matéria prima com grande potencial de utilização na fabricação de muitos produtos.

O azeite de dendê apresenta características diferentes dos demais óleos. Isto se deve ao fato de possuir na sua estrutura proporções iguais de ácidos graxos saturados e insaturados. O ácido palmítico por ser saturado confere maior estabilidade oxidativa e térmica ao óleo, tendo ainda na sua estrutura os ácidos com menor proporção, tais como o linoleico e traços de linolênico que são os mais sensíveis à oxidação [14].

Figura 1.1 – Produção mundial de óleos vegetais em 2011.



Fonte: [12].

Figura 1.2 – (a) Palmeira de dendê (dendzeiro) e (b) Aspectos de seu fruto maduro destacando-se um corte longitudinal mostrando a espessura da polpa e o interior do caroço.



Fonte: [15,16]

O azeite de dendê utilizado na nutrição humana fornece precursores de vitamina A no organismo que irão gerá-la através da ação enzimática. Por apresentar na sua constituição vários carotenoides, benefícios podem ser associados ao consumo periódico desse azeite evitando doenças como o câncer, as cardiovasculares, a catarata e também apresentar participação no fortalecimento do sistema imunológico, diminuindo o risco de desenvolvimento de Alzheimer e de Parkinson [17]. No entanto,

o abuso no consumo pode contribuir para a obesidade, devido ao seu alto valor calórico.

O dendezeiro (*Elaeis guineensis*) é originário do golfo de Guiné, no continente africano e foi trazido para o Brasil junto com o comércio de escravos. As primeiras palmeiras adaptaram-se facilmente ao solo brasileiro devido ao clima similar de sua região de origem, sendo registrados os primeiros plantios nos Estados do Rio de Janeiro e Bahia. No cenário atual, a Amazônia é território onde se concentra a maior produção em grande escala no Brasil [18].

A Malásia e Indonésia são responsáveis por maior parte da produção mundial do óleo de palma (atingindo perto de 85%) na atualidade [19]. Vale ressaltar que o dendezeiro é a oleaginosa mais produtiva em termos de valor econômico. É mais competitiva no mercado mundial do que o óleo de soja [20]. O Brasil produz aproximadamente 300 mil toneladas, no entanto a produção não consegue suprir a demanda interna que é de 500 mil toneladas por ano, e o país continua importando esse produto. Isso se deve ao fato de: sua produção ser 10% a mais que qualquer outra oleaginosa, quando bem orientada e seguindo os critérios ambientais e sociais exigidos pelas leis brasileiras e pelos critérios internacionais e de sustentabilidade. Sua cultura pode ter uma grande importância na redução da pobreza nas regiões de produção. No Brasil, apenas permite-se o cultivo do dendezeiro visando à preservação ambiental. O cultivo do dendezeiro pode ajudar no sequestro de carbono, que, a depender do tipo de manejo, pode ter uma forte contribuição nos problemas relacionados as mudanças climáticas [21,22,23,24,25].

Atualmente 90% da produção desse azeite são destinadas para indústria alimentícia servindo de matéria prima na fabricação de margarinas, sorvetes, biscoitos, chocolates, recheios e também como substituto de óleo de cozinha e manteiga de cacau. Além disso, o azeite é excelente para se utilizar nas frituras, pois mantém suas propriedades mesmo em altas temperaturas. Um fator muito interessante no azeite de dendê são os conservantes naturais presentes, o que aumenta a vida útil do produto e possui maior rendimento em comparação aos outros tipos de óleos e não possui gorduras trans e não provém de organismos geneticamente modificados [26,21].

Um produto que é também de grande aplicação na indústria é o Palmiste, um óleo vegetal derivado da amêndoa do fruto da palma. O óleo de palmiste em temperatura ambiente é semissólido, mais saturado que o azeite de dendê, se

assemelhando ao óleo de coco. O óleo de palmiste bruto apresenta características muito diferentes de azeite dendê. Ele possui características físicas específicas e de interesse muito grande para indústria de cosméticos que o utiliza na fabricação de sabonetes ou substituto de manteiga de cacau e na produção de biodiesel para motores de combustão interna. O óleo de palmiste possui alta estabilidade oxidativa devido ao fato de apresentar baixo grau de insaturações em seus ácidos graxos [21,27,28].

1.1.1 O azeite de dendê na culinária baiana

A culinária baiana apresenta contribuições das culturas africana, portuguesa e indígena (essa última em menor proporção comparada às outras regiões do Brasil). Destaca-se nesse contexto a grande influência africana que trouxe o gosto por temperos fortes, especialmente o azeite de dendê e as pimentas. As comidas típicas baianas devem muito sua difusão, tradição e preservação à forte associação entre culinária e religião. Muitas comidas são, por exemplo, oferendas aos orixás e fazem parte de rituais e datas festivas que, através do sincretismo religioso, mantém seu consumo como tradição e permanece na memória afetiva da população [29,30].

O azeite de dendê é um ingrediente fundamental na culinária típica baiana devido ao seu sabor característico e predominante. Ele é tão importante no preparo de pratos tradicionais que os alimentos produzidos com o seu uso são normalmente chamados de “comidas de azeite”. Dentre as comidas pode-se citar o abará, o acarajé, o xinxim de galinha, o caruru, o vatapá, o bobó de camarão, a farofa amarela, as moquecas, a casquinha de siri, etc. que são iguarias ricas em sabor, gorduras e calorias. Essas duas últimas características dão, para quem tem paladar e sistema digestivo mais sensível, a fama da culinária baiana ser muito pesada [29,31].

Alguns municípios abaixo da Baía de Todos os Santos são os que possuem a melhor condição climática na Bahia para o cultivo do dendezeiro, além da privilegiada posição geográfica que facilita o escoamento da produção para as praças consumidoras. Essa região é conhecida como Costa do Dendê e abrange os seguintes municípios: Cairú, Camamu, Igrapiúna, Itacaré, Ituberá, Jaguaribe, Nazaré das Farinhas, Nilo Peçanha, Taperoá e Ubaitaba [32,33].

1.1.2 Processamento e refino

Na forma bruta, o azeite de dendê apenas é consumido na África e no Brasil, em geral para o preparo das comidas típicas, o que favorece a conservação de grande parte dos nutrientes (carotenóides, vitaminas, fitoesteróis, etc) originais do fruto. O azeite bruto também é chamado de azeite cru e é identificado pelo acrônimo CPO (Crude Palm Oil). No entanto, o azeite cru também apresenta substâncias indesejáveis tais como os ácidos graxos livres, os fosfolípidios (que formam gomas) e os produtos de oxidação de lipídios, que contribuem para a rápida degradação do produto e alteração de suas propriedades organolépticas. Essas impurezas são removidas durante o refino e por isso, o azeite destinado à indústria (ou seja, grande parte da produção mundial) deve passar por esse processo [34].

As operações básicas associadas à obtenção, processamento e refino do óleo de palma incluem basicamente a esterilização dos frutos, o descascamento/descaroçamento, a extração do óleo, a neutralização e a clarificação. A esterilização do fruto é feita por aquecimento e absorção de umidade com o objetivo de inativar as enzimas lipolíticas no mesocarpo da fruta [35]. Os dois principais procedimentos de extração são a prensagem mecânica e a extração por solvente. A faixa de eficiência de extração de óleo de 75 a 90% é relatada para prensas mecânicas. O mesocarpo dos frutos do dendezeiro contém entre 56 a 70% de óleo comestível quando completamente amadurecido. Este óleo pode ser extraído usando diferentes moinhos, classificados com base em seu rendimento e grau de complexidade, que vão dos pequenos moinhos tradicionais até os de escala industrial [12,36,37].

Há os métodos de extração baseados em processos úmidos e em processos secos. No processo por via úmida, água é usada para extrair o óleo dos frutos moídos do dendezeiro. Água quente ou seu vapor é usado para lixiviar o óleo por ruptura das células do fruto. O tratamento com água quente também hidrolisa gomas, resinas e algum amido presente, bem como proteínas coaguladas. Gomas e resinas são responsáveis pela formação de espumas durante o processo de fritura. Os produtos hidrolisados e coagulados são removidos durante a etapa de clarificação do óleo [38].

Nos métodos por via seca, uma prensa hidráulica ou uma prensa de parafuso ou centrifugação deve ser usada. Durante a prensagem, o azeite cru é drenado das fibras do mesocarpo, deixando para trás materiais fibrosos que ainda podem reter de 5 a

6% do óleo que não consegue ser extraído. No entanto, a fim de evitar quebrar os caroços do fruto e extrair o palmiste nessa etapa, a pressão é geralmente reduzida e a retenção do óleo nas fibras aumenta para 10-12% diminuindo o rendimento da extração. O azeite cru extraído deve ser purificado mais adiante por centrifugação e desumificado. A desumificação a vácuo tem sido sugerida como alternativa para evitar degradação do óleo e perda de suas qualidades. O óleo seco é então resfriado e bombeado para os tanques de estocagem [39].

Na etapa seguinte, o óleo é tratado com hidróxido ou carbonato de sódio para reduzir o teor de ácidos graxos livres e remover os fosfolipídios e outros lipídios polares. Essa operação é frequentemente definida como refino alcalino. Porém, esse refino não consegue remover sozinho todas as substâncias indesejáveis do óleo de palma. Outros procedimentos podem ser necessários como a degomagem, a neutralização, o branqueamento e a desodorização [40]. Essas etapas são descritas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Operações de refino do óleo de palma e correspondentes impurezas que são removidas.

<i>Operação de refino</i>	<i>Procedimento</i>	<i>Impurezas removidas</i>
<i>Degomagem</i>	Tratamento com solução aquosa de ácido fosfórico a quente	Fosfolipídios e outros lipídios polares
<i>Neutralização</i>	Tratamento com solução de hidróxido ou carbonato de sódio	Ácidos graxos livres, fosfolipídios residuais e metais
<i>Branqueamento</i>	Agitação com carvão ativo ou argila específica para a função	Pigmentos, surfactantes residuais e fosfolipídios
<i>Desodorização</i>	Destilação a vapor em alta temperatura e pressão reduzida	Produtos voláteis da oxidação e contaminantes provenientes do processo de beneficiamento do fruto

Fonte: [12]

O azeite de dendê contém componentes minoritários que apresentam benefícios nutricionais. Esses micronutrientes incluem carotenoides, tocoferóis, esteróides, fosfolipídios, glicerolipídios e esqualeno. Carotenoides, tocoferóis e tocotrienóis mantêm a estabilidade e a qualidade do óleo de palma e também agem como

antioxidantes biológicos. Os tocoferóis e tocotrienóis agem como agentes anticâncer e anti-inflamatórios e também controlam a arteriosclerose e diminuem o colesterol. Os carotenoides são precursores da vitamina A. A vitamina A é necessária para manutenção da saúde da visão, para o crescimento, para diferenciação celular entre outras funções fisiológicas. CPO contém entre 500-700 ppm de carotenoides e portanto é naturalmente rico nesses compostos, pois eles são responsáveis pela sua coloração vermelho alaranjada [41].

Outros componentes minoritários do óleo de palma são os esteróis, álcoois alifáticos de cadeia longa e hidrocarbonetos que são encontrados nas frações não saponificáveis. De forma similar aos outros óleos comestíveis, o teor de colesterol no azeite de dendê é negligenciável. O azeite submetido ao refino tem diminuído os teores de fitoesteróis, cetonas, ceras e metil ésteres do produto final. Possui também baixos níveis de compostos fenólicos, mas, mesmo em pequenas quantidades, eles são responsáveis pelo escurecimento do azeite depois do processo de fritura [42,12].

1.1.4 Metais em óleos comestíveis

Menos de trinta entre os mais de noventa elementos químicos de ocorrência natural são essenciais para a composição e manutenção do metabolismo do ser humano. A maioria dos elementos da matéria viva tem um número atômico relativamente baixo. Somente dois (Mo e I) possuem números atômicos maiores que o selênio. Os macroelementos são essenciais para a vida e saúde humana. Eles são componentes estruturais das células e dos tecidos e são requeridos em uma quantidade de vários gramas por dia. Os quatro elementos químicos mais abundantes nos organismos vivos, em termos de percentagem do total de número de átomos são hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e carbono, que juntos constituem mais de 99% das massas das células. Além desses, o organismo necessita também em grande quantidade, dos seguintes elementos: Na, P, S, Cl, K e Ca. Para os microelementos, as quantidades necessárias para o funcionamento do metabolismo são muito menores. Para humanos, alguns miligramas de Fe, Cu e Zn são suficientes, e quantidades ainda menores dos demais elementos são necessárias [43].

A carência e a toxicidade de um elemento químico para os seres vivos também dependerão das quantidades ingeridas. Assim, um mesmo elemento pode ser considerado benéfico até certa faixa de concentração. Ultrapassando-se essa faixa, o elemento apresentará propriedades tóxicas. Há ainda os elementos que não possuem função no organismo e sua presença apresentará efeitos tóxicos, mesmo em baixíssimas concentrações (Ex: Cd, Pb e Hg). São várias as funções dos metais no organismo, como por exemplo: crescimentos e restauração dos tecidos, regulação do metabolismo através das proteínas, vitaminas e minerais, liberação de energia pelos lipídios e carboidratos, além de proporcionar equilíbrio osmótico e controle do volume de transporte entre os compartimentos intracelular e extracelular através da água e eletrólitos [44].

Existe um grande interesse na determinação de metais em óleos comestíveis. Isso deve ao fato do papel metabólico dos metais e das possibilidades de adulteração, detecção e caracterização de óleos. Os óleos e gorduras são importantes componentes da dieta do ser humano juntamente com as proteínas e carboidratos [45,46,47].

Um dos critérios de qualidade mais importantes de óleos vegetais é o seu teor de metais. A presença de metais em óleos se deve a fatores endógenos, conectados

com o metabolismo da planta e fatores exógenos devido à contaminação durante a técnica de produção e de coleta [48]. A presença de metais em óleos refinados é indesejável porque os metais podem promover a degradação oxidativa do óleo e diminuir sua validade. Metais em níveis traços são conhecidos por ter efeitos adversos no sabor, na cor e odor. Cobre e ferro, em particular, reduzem grandemente a estabilidade oxidativa do óleo, bem como os metais de transição catalisam a decomposição de hidro peróxidos, aldeídos, cetonas e ésteres. Estes compostos podem desenvolver efeitos indesejáveis no sistema digestivo [49]. A Tabela 1.2 apresenta as concentrações de alguns elementos químicos em óleo de palma de acordo com alguns trabalhos recentemente publicados.

Tabela 1.2 – Teores de alguns elementos químicos em azeite de dendê segundo cinco artigos recentemente publicados.

<i>Elemento</i>	<i>Concentração ou faixa de concentração (mg kg⁻¹)</i>				
<i>Al</i>	1,935	-	-	-	-
<i>As</i>	-	0,0010 - 0,0025	-	-	-
				193,9 -	
<i>Ca</i>	-	-	-	8077,9	145 - 686
<i>Cd</i>	0,022	0,025 - 0,065	-	-	0,024 - 0,089
			< 0,001 -		
<i>Co</i>	-	-	0,064	-	-
<i>Cr</i>	2,332	0,021 - 0,033	-	-	0,101 - 0,298
			< 0,001 -		
<i>Cu</i>	0,078	-	0,246	29,7 - 463,0	0,56 - 2,09
			15,084 -		
<i>Fe</i>	11,37	-	33,994	115,2 - 415,9	65 - 232
<i>Hg</i>	-	0,010 - 0,055	-	-	-
<i>K</i>	-	-	-	-	77 - 165
<i>Mg</i>	-	-	-	20,7 - 7090,1	69 - 192
<i>Mn</i>	-	-	0,243 - 1,113	-	6,55 - 12,05
<i>Na</i>	-	-	-	-	115 - 533
			< 0,001 -		
<i>Ni</i>	-	0,043 - 0,068	0,789	-	0,15 - 0,81
<i>Pb</i>	0,178	0,023 - 0,038	-	1,7 - 16,0	0,024 - 0,067
<i>Zn</i>	-	-	0,451 - 1,610	-	3,6 - 14,6
<i>Ref.</i>	[50]	[51]	[52]	[53]	[54]

CAPÍTULO II

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR QUEBRA DE EMULSÃO

2.1 INTRODUÇÃO

Dispersões são sistemas polifásicos nos quais uma fase fragmentada na forma de gotículas, partículas ou gás (denominada de fase dispersa) se encontra dentro de outra (a fase contínua). Diversos tipos de sistemas dispersos existem e recebem nomes diferentes dependendo do tamanho da fase dispersa e do estado físico. Desta forma, as dispersões de um gás em um líquido são chamadas de espumas; as de partículas sólidas finamente divididas em um líquido, de suspensões; e as dispersões de um líquido imiscível em outro líquido são denominadas emulsões [55]

Quando dois líquidos imiscíveis são postos em um mesmo recipiente e agitados ambas as fases tendem, mesmo que por um breve período de tempo, a se dispersarem uma na outra por meio da formação de gotículas. A depender do tamanho destas gotículas, da estabilidade termodinâmica, da interface formada, do aspecto micro e macroscópico e da metodologia de obtenção, as emulsões podem ser classificadas como emulsões comuns (ou simplesmente emulsões) e microemulsões. Enquanto as microemulsões são termodinamicamente estáveis, as emulsões tendem a se separar em suas fases imiscíveis após um período de tempo que pode ser de segundos a vários meses. Desta forma, quando a agitação cessa, os conteúdos das gotas se juntam (coalescem) e os dois líquidos são separados novamente. Este processo de separação é espontâneo, mas a estabilidade das emulsões pode ser aumentada por adição de um surfactante

Surfactantes são substâncias fundamentais na formação e promoção da estabilidade das emulsões e microemulsões. São substâncias orgânicas anfipáticas, ou seja, possuem uma região apolar hidrofóbica (uma longa cadeia hidrocarbônica) e outra polar hidrofílica (grupo polar ou com carga) na sua estrutura. Esta característica

atribui aos surfactantes propriedades específicas como a formação de ambientes organizados, ação nas interfaces (ex: ar/água, água/sólido, água/solvente apolar) e modificação de propriedades físicas (tensão superficial, densidade, viscosidade, condutividade, etc) e químicas (propriedades reacionais) de soluções que podem ser bastante úteis no desenvolvimento de métodos analíticos mais versáteis e com boas características analíticas [56].

Particularmente, o uso de sistemas emulsificados em química analítica pode trazer uma série de vantagens tais como: oferecer uma alternativa de tratamento de amostras líquidas com alto teor de substâncias orgânicas, como óleos, alimentos gordurosos e combustíveis, eliminando a etapa de digestão; a estabilização e conservação de amostras para um armazenamento e análise mais cômoda e eficiente, evitando perdas por precipitação e volatilização; permitir a introdução direta de amostras em equipamentos que, em condições normais, não toleram alta carga de substâncias orgânicas, ex: a espectrometria de absorção atômica AAS, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS); permitir o uso de padrões de espécies inorgânicas aquosos no lugar dos padrões em meio orgânico em processos de estabelecimento de curvas analíticas compatíveis com as amostras; extrair substâncias de uma fase mais complexa para outra mais simples promovendo um contato mais eficiente entre uma matriz com alta carga orgânica e uma fase extratora aquosa [57].

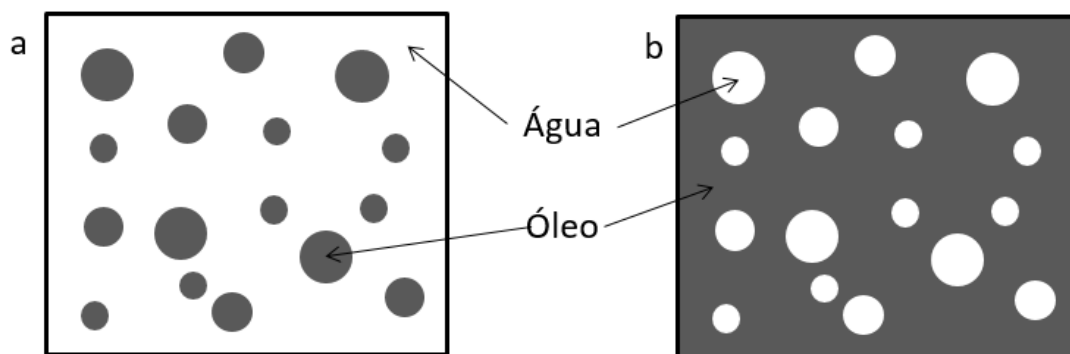
2.2 CARACTERÍSTICAS DOS SISTEMAS EMULSIFICADOS

O conhecimento básico sobre as emulsões (envolvendo as suas condições de formação, sua caracterização, manutenção da estabilidade, o comportamento frente às modificações físico-químicas, etc.) e suas aplicações nos mais diversos ramos de atividades tecnológicas já está bem estabelecido como pode ser observado em artigos de revisão [57,58] e livros sobre o assunto [55,56,59]. No entanto, segundo Burguera e Burguera (2012) [57] ainda há alguma confusão em relação à definição de termos e aos procedimentos de preparo de emulsões para algumas aplicações específicas em química analítica. Isto acontece principalmente porque o conhecimento na área se

estabelece de forma empírica e sem uma maior preocupação com a sua sistematização.

As emulsões mais comuns podem ser obtidas como óleo em água (O/A), quando gotas de óleo são dispersas em água como fase contínua, ou como água em óleo (A/O), quando gotas de água estão dispersas em óleo (Figura 2.1). Surfactantes (também denominados tensoativos ou emulsificadores) são os agentes mais utilizados na obtenção de emulsões estáveis e são frequentemente usados em estratégias analíticas que requerem dispersões que não se separem em seus componentes por um longo período de tempo [57].

Figura 2.1 – Representação esquemática de dois sistemas emulsionados mais comuns (a) uma emulsão formada por óleo disperso em água como uma fase contínua (emulsão O/A) e (b) uma emulsão formada por gotas de água dispersas em óleo)



As emulsões comuns (ou simplesmente emulsões) são sistemas de aspecto leitoso constituídas de gotículas de tamanhos entre 0,5 e 50 μm . O aspecto leitoso é consequência do efeito Tyndall que se manifesta por causa do espalhamento da luz provocado pelas gotas cuja ordem de grandeza propicia esse fenômeno. As emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, não se formam espontaneamente e mostram tendência a se separar em seus componentes imiscíveis com o tempo [57].

As emulsões O/A são as mais aplicadas em química analítica devido as suas características (baixa viscosidade, baixa carga de compostos orgânicos, facilidade de calibração com padrões aquosos, estabilidade adequada, etc) que as tornam compatíveis com a maioria das técnicas espectrométricas que trabalham com solução aquosa. A formação da emulsão é um processo considerado simples, uma vez que não é necessária a destruição da matriz ou uso de solvente orgânico oferecendo vantagens como a utilização de padrões aquosos inorgânicos para a construção de

curvas analíticas, possibilitando, assim, menores custos das análises. Quando a amostra é emulsionada adequadamente, a amostra se torna compatível com a maioria das instrumentações analíticas e há ainda a vantagem de se eliminar a perda de analito por volatilização ou precipitação durante o seu preparo [60].

2.3 O PROCESSO DE EMULSIFICAÇÃO

Os fatores que podem influenciar na eficiência de um processo de preparo de uma emulsão ou micro emulsão podem ser divididos em três classes: (a) Variáveis de formulação que se referem à natureza dos agentes emulsificantes e das fases aquosa e orgânica que compõem a emulsão, impactando nas características físico-químicas do sistema obtido a partir de uma dada formulação, como o balanço hidrofílico-lipofílico, a solubilidade entre as fases e sua compatibilidade; (b) Variáveis de proporção que se referem à proporção relativa às quantidades de água e óleo e dos agentes emulsificantes (surfactante e co-surfactante) adotadas na geração da emulsão; e (c) Variáveis de método que se referem aos procedimentos (que definem, por exemplo, modo, tempo e intensidade de agitação, temperatura, etc) e equipamentos (aquecedor, agitador, dosador, etc) adotados no processo de emulsificação [55, 61, 62].

2.3.1 Processos físicos que promovem o emulsionamento

Com as condições de formulação e proporção definidas é necessário realizar o processo de dispersão de uma fase em outra para a formação da emulsão. A emulsificação pode ser promovida por processos como: inversão de gravidade no sistema, agitação, aplicação de fluxo laminar e fluxo turbulento entre as fases, cisalhamento ou cavitação provocada por energia de ultrassom [55,58].

Quando um frasco contendo duas fases imiscíveis é invertido verticalmente elas trocam de posição. A fase mais densa atravessa a menos densa, pois tende a responder com maior intensidade às variações de gravidade. Ao atravessar a fase menos densa, a fase mais densa se divide em gotas que deixam um rastro de gotas menores em seu percurso [55, 63].

Na agitação, além de várias sequências intensas de inversão de gravidade, tem-se também a presença de forças que atuam em vários sentidos além da vertical. Estas forças são responsáveis por choques das fases nas paredes do recipiente aumentando a eficiência da emulsificação. A depender do vigor da agitação, os tamanhos das gotas dispersadas podem variar muito [55,63,64].

O cisalhamento consiste na aplicação de uma força que provoque o deslizamento rápido de camadas delgadas de um líquido em outro líquido. Esta força pode ser aplicada, como exemplo, por uma hélice ligada a um rotor. As gotas são formadas quando estas camadas (e também as gotas maiores) se alongam e se dividem em gotículas [55,15]

Outra forma de provocar cisalhamento é quando uma fase é introduzida em outra por um orifício ou dentro de um tubo e a fase mais viscosa tende a adquirir um formato alargado (cilíndrico) envolvido pela outra fase menos viscosa. Quando este cilindro se alonga sob baixa turbulência (ou seja, um fluxo laminar), sua tendência é se dividir em gotas de diâmetros semelhantes. Quanto maior for a velocidade do fluxo laminar, menor será o diâmetro das gotas. Se ao invés de laminar, o fluxo for turbulento, as camadas do líquido que escorregavam entre si, passam a se misturar gerando gotas de tamanhos diferentes [55, 15]

O uso de energia de ultrassom na promoção da emulsificação (também chamada emulsificação acústica) torna o processo bastante eficiente e rápido. Os ultrassons são ondas mecânicas que se propagam em meios materiais, com velocidade que varia desde centenas de metros por segundo no ar até milhares de metros por segundo em sólidos, com ciclos contínuos de compressão e rarefação a frequências maiores que as ondas audíveis para o ser humano. Os ultrassons são classificados de acordo com os intervalos de frequência e podem ser divididos em ultrassom de alta potência (20-100 KHz) e ultrassom para uso medicinal (na magnitude de MHz) [65].

A alta eficiência na emulsificação acústica é atribuída ao fenômeno da cavitação. Cavitação é o processo de nucleação, crescimento e colapso de bolhas transientes em líquidos expostos a ondas de ultrassom de baixa frequência (< 1 MHz). O processo de cavitação é importante não só pela formação das bolhas, mas também devido aos fenômenos que ocorrem quando a bolha entra em colapso [66]. As ondas ultrassônicas se propagam através de um líquido em ciclos alternados de compressão e expansão. Em alguns momentos, a onda acústica desenvolve uma pressão

suficientemente alta para poder vencer as forças intermoleculares num ponto do líquido, criando uma cavidade para a qual gases e vapores presentes no líquido podem se difundir durante a etapa de expansão. Na etapa de compressão, os gases e vapores não retornam completamente para o líquido, resultando em aumento efetivo do tamanho da cavidade durante os ciclos seguintes de compressão e expansão até que seja atingido seu diâmetro crítico, entrando em violento colapso. O colapso das bolhas transientes provoca a liberação de grande quantidade de energia, gerando temperaturas locais instantâneas (5200 K) e pressões muito elevadas (cerca de 2000 atm). As bolhas formadas têm dimensões muito pequenas em relação ao volume total do líquido, produzindo calor que é rapidamente dissipado sem alterações apreciáveis às condições do sistema [67,68].

A aplicação de ultrassom para melhorar etapas em química analítica tem sido extensivamente demonstrada. Um dos usos do ultrassom é facilitar a formação de emulsão e aperfeiçoar o contato entre as duas fases imiscíveis [69,70,71]. A emulsificação assistida por ultrassom foi inicialmente desenvolvida pelos pesquisadores Wood e Loomis em 1927 [72]. A primeira patente concedida nessa linha de emulsificação assistida por ultrassom foi em 1944 na Suíça. Várias aplicações são encontradas na literatura, mostrando a influência dessa energia sobre os desenvolvimentos de processos de extração, homogeneização, emulsificação, entre outras [67]. A partir disso, cresceu o interesse em investigar os mecanismos do processo emulsionado utilizando ultrassom e explorar vantagens como o custo baixo, procedimento realizado a pressão atmosférica, pequena probabilidade de ocorrer contaminação e perda de substâncias voláteis e menores tempos de aplicação do procedimento [73].

2.4 SURFACTANTES NO PREPARO DE EMULSÕES

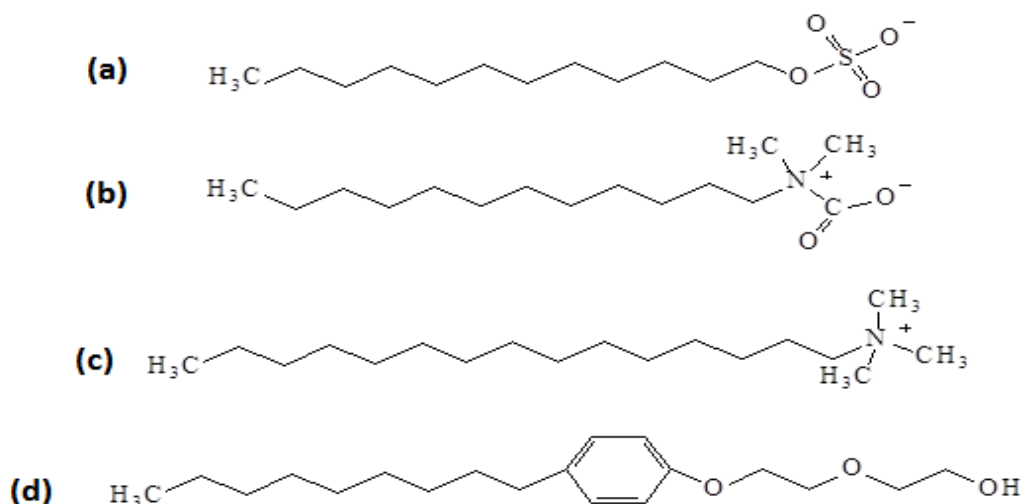
A palavra surfactante originou-se da contração da seguinte expressão em inglês: “surface-active agent”. Sendo assim, um surfactante (também chamado tensoativo) é uma substância que abaixa a tensão superficial do meio no qual é dissolvido, ou a tensão interfacial entre outras fases (ar/água, óleo/água ou sólido/líquido [74,56, 75].

Estruturalmente, os surfactantes são substâncias orgânicas anfipáticas, ou seja, suas moléculas apresentam uma longa cadeia hidrocarbonada, hidrofóbica, e

um pequeno grupo carregado ou polar hidrofílico. Um surfactante típico possui a estrutura R-X, onde R é uma cadeia, geralmente linear, que pode variar de 8 a 18 átomos de carbono e X é o grupo cabeça polar ou iônico. A classificação dos surfactantes baseia-se na natureza de X. Sendo assim, os surfactantes podem pertencer a uma das quatro categorias seguintes: não iônicos, catiônicos, aniônicos e anfóteros [56,76].

Os surfactantes iônicos se dissociam em água resultando no monômero do surfactante, ânion ou cátion, e seu respectivo contra-íon. Os aniônicos são geralmente sais de metais alcalinos ou alcalinos terrosos de ácidos carboxílico, sulfúrico e fosfórico. Os catiônicos contêm normalmente o grupo nitrogênio quaternário. O comportamento dos surfactantes anfóteros irá depender do pH da solução e da sua estrutura, prevalecendo a espécie iônica, catiônica ou neutra. Os não iônicos são derivados do polioxietileno ou polioxipropileno e não se ionizam em solução aquosa devido ao seu grupo hidrofílico ser do tipo não ionizável como os álcoois, fenóis, éteres ou amidas [77]. A Figura 2.2 mostra exemplos destes quatro tipos de surfactantes. As moléculas dos surfactantes apresentam a propriedade de auto-associação em solventes aquosos ou apolares, formando diferentes estruturas organizadas entre as quais se destacam as micelas normais, as micelas reversas e as microemulsões [78]. A formação dessas estruturas depende do solvente utilizado e das condições experimentais.

Figura 2.2 – Estruturas moleculares típicas das quatro classes de surfactantes: (a) surfactante aniônico; (b) surfactante anfótero; (c) surfactante catiônico e (d) surfactante não iônico



O uso de surfactantes cria barreiras físicas mais eficientes no sentido de proteger a gotícula da coalescência garantindo a estabilidade da emulsão. Para que um surfactante tenha essa propriedade, ele deve reduzir a tensão interfacial entre o óleo e a água de forma a permitir a criação de novas superfícies sem a utilização de muita energia, além de apresentar rápida difusão às novas interfaces criadas. Esta última propriedade é essencial, pois, se as novas superfícies criadas não forem rapidamente ocupadas por camadas de surfactantes, ocorrerá a coalescência das gotículas logo depois de sua formação [79].

A gotícula dispersa que tem sua superfície totalmente ocupada por surfactantes possui características bem diferentes da gotícula sem ele. Caso o surfactante usado tenha carga, as gotículas de óleo adquirem superfícies carregadas. Essas cargas atraem moléculas de água e contra íons de carga oposta da solução aquosa, gerando uma dupla camada elétrica em volta de cada gotícula. Como gotículas iguais vizinhas vão apresentar cargas eletrostáticas de mesmo sinal nas suas superfícies, ocorre a repulsão entre elas impedindo que se aproximem umas das outras, reduzindo a possibilidade de coalescência e aumentando sua estabilidade. Os surfactantes não iônicos, por não possuírem cargas, formam gotículas que não apresentam dupla camada elétrica. Neste caso, a estabilização das emulsões ocorre por impedimento estérico de suas moléculas, que apresentam partes polares geralmente muito longas [55,56].

Surfactantes de baixa massa molar são mais eficientes na criação de emulsões, mesmo que estas não sejam muito estáveis. Para se obter emulsões mais estáveis, usam-se surfactantes com massas maiores, pois estes tendem a apresentar mobilidade mais baixa. Uma mistura de surfactantes de alta e baixa massa molar pode resultar em formulações mais eficientes tanto no processo de emulsão quanto na sua estabilização [80].

2.5 SELEÇÃO DE SURFACTANTES PARA PREPARO DE EMULSÃO

A escolha do surfactante ou dos surfactantes que formarão uma emulsão tem como principais objetivos promover sua fácil formação e sua estabilidade. Historicamente, a escolha desse surfactante sempre foi um problema para os químicos e a formação das emulsões baseava-se em formulações empíricas, com

base em experimentos de tentativa e erro e pouca teorização sobre os resultados obtidos. Atualmente, embora a experimentação tenha grande importância nestes estudos, há maiores esforços no sentido de se entender e prever o comportamento de determinado surfactante na estabilidade das emulsões e de se construir um conjunto de conhecimentos teóricos para auxílio nesta escolha [81].

A escolha do surfactante para compor uma emulsão para aplicação específica depende de diversos fatores relacionados entre si tais como: o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), a temperatura de inversão de fase, parâmetros de solubilidade e geometria das moléculas. No entanto, outros fatores também são importantes nesta escolha, tais como o custo do processo de emulsão, a proteção ao meio ambiente e os objetivos finais da emulsão obtida [55, 82].

Sabe-se empiricamente que surfactantes mais solúveis em água tendem a proporcionar emulsões O/A mais estáveis e que surfactantes mais solúveis em óleo são mais indicados para formação de emulsões A/O. No cálculo do balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) de um surfactante leva-se em consideração as características hidrofílicas e lipofílicas de uma molécula em solução que ajuda na previsão de seu comportamento em solução, como, por exemplo, na formação de emulsões [57]. O HLB de um surfactante não iônico pode ser determinado por relações matemáticas simples. Para álcoois graxos, alquilfenóis ou outras bases etoxiladas, o HLB pode ser expresso como:

$$\text{HLB} = \frac{\text{MM}_h}{\text{MM}_t} \times 20$$

onde MM_h é a massa molar da parte hidrofílica do surfactante e MM_t é a massa molar total da molécula. A solubilidade do surfactante dependerá do HLB calculado. Quanto maior o HLB, mais solúvel em água é o surfactante e este valor pode ser utilizado como primeiro parâmetro a ser avaliado na seleção de um surfactante para obtenção de uma emulsão mais estável [55]

Como em outras áreas de aplicação, os surfactantes não iônicos são os mais amplamente usados em processos de emulsificação. Este grupo de surfactantes sintéticos consiste de ésteres complexos e éster-éter derivados dos álcoois poli hidrofílico, óxidos alquilenos, ácidos graxos e álcoois graxos. A porção hidrofílica dessas moléculas compreende grupos hidroxila livres e unidades de óxido de etileno.

A parte lipofílica apresenta uma longa cadeia hidrocarbônica característica de ácidos graxos e de alcoóis graxos. Estes surfactantes são caracterizados como compostos neutros e são estáveis por uma longa faixa de valores de pH, não são relativamente afetados por altas concentrações de eletrólitos, são estáveis ao calor e não aumentam a viscosidade do sistema. Como não apresenta propriedade espumante, esta classe de surfactante evita a distribuição heterogênea das gotas de óleo na emulsão final. Os surfactantes da série Triton X são os mais usados para o preparo de emulsões por sua fácil produção e baixo custo [57, 58].

Apesar de serem menos usuais, surfactantes catiônicos, tais como o brometo de N-cetilpiridina (CPB) [83], o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) [76], e o surfactante aniônico dodecil sulfato sódico (SDS) [84] também vem sendo usado para obtenção de emulsões na química analítica. Um forte motivo para o uso tão restrito desses surfactantes é que suas propriedades são fortemente afetadas por mudanças de pH. Quando um ácido é adicionado a uma emulsão estabilizada com um surfactante iônico por exemplo, a forma não ionizada do surfactante predomina o balanço hidrofílico-lipofílico é alterado desestabilizando as emulsões. Além disso, modificações na carga do grupo hidrofílico do surfactante pode inviabilizar o seu uso como agente emulsificante para uma aplicação em circunstâncias específicas [85].

Para propósitos analíticos, outros fatores devem ser considerados. O surfactante deve: (1) ser usado em concentrações que não causem alto sinal de fundo durante as medidas espectrométricas e (2) apresentar baixa contaminação para o analito a ser determinado. Medidas do nível de contaminação causada por metais devem ser os primeiros experimentos a serem feitos para permitir a escolha de um surfactante que minimize o branco. Leggli *et al.* [86] demonstraram que alguns metais em níveis consideráveis podem ser encontrados em surfactantes não-iônicos. Quantidades consideráveis de sódio em Tween 80 e Triton X-114, e grandes quantidades de potássio em Triton X-100, por exemplo, foram encontrados tornando esses surfactantes inapropriados em metodologias para a determinação destes metais [87].

2.6 ESTABILIDADE DOS SISTEMAS EMULSIFICADOS E A QUEBRA DE EMULSÕES

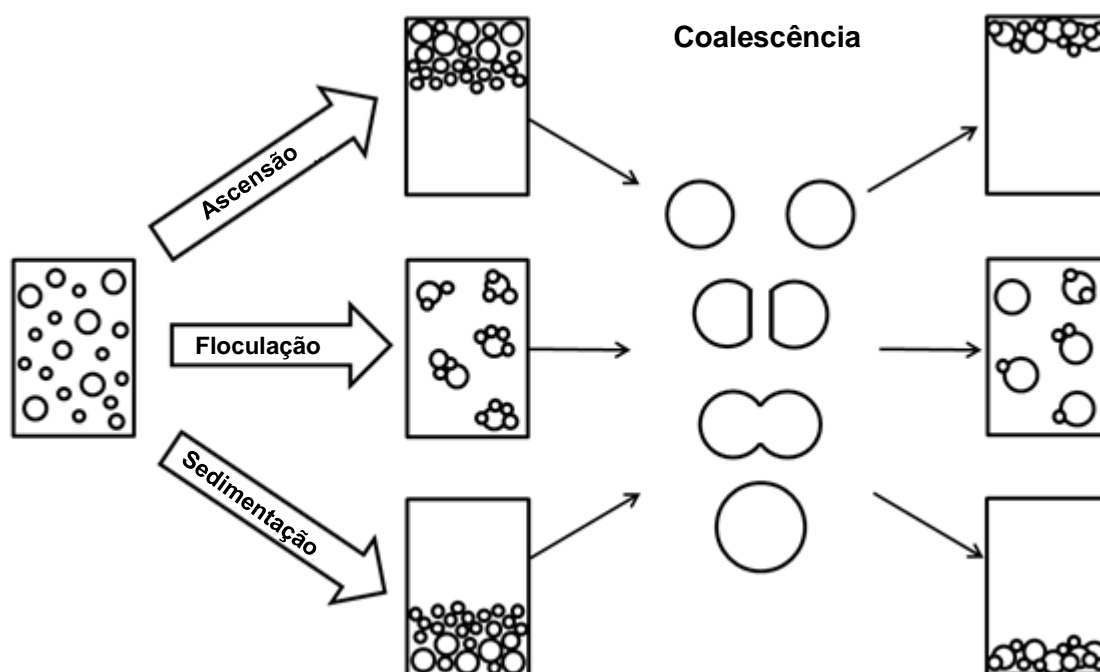
A estabilidade de sistema emulsificados é medida pelo tempo contado a partir de sua formação até o início da separação das fases que o compõe. Desta forma, o termo “quebra de emulsão” foi adotado para designar este fenômeno de desestabilização de uma emulsão resultando na separação de seus componentes [55].

Vários mecanismos podem contribuir com a quebra de uma emulsão comum. Entre eles, pode-se citar a sedimentação, a ascensão (creaming), a floculação e a coalescência. Os três primeiros fenômenos referem-se à agregação de gotículas sem a união em gotas maiores. A ascensão é mais comum que a sedimentação, pois a grande maioria das emulsões é do tipo óleo em água e o óleo tende a ser o fluido de menor densidade [88].

As gotículas podem também se agregar em flocos dentro da fase contínua sem migrar para o topo ou para o fundo do recipiente, ocorrendo o fenômeno da floculação. A sedimentação, a ascensão e a floculação são fenômenos facilmente reversíveis pela aplicação de agitação moderada. Estes fenômenos são primordiais para iniciar a ocorrência da coalescência. A coalescência é o processo no qual as gotículas se unem para a formação de gotas maiores (Figura 2.3). Ela pode ser um fenômeno irreversível e provocar a separação dos componentes da emulsão [55].

Em um processo de quebra de uma emulsão O/A, a gotícula de óleo tenderá a subir em direção à gotícula vizinha que já se encontra na parte superior do sistema. O processo em que a densidade da fase dispersa é maior que a da fase contínua é semelhante, porém no sentido inverso, pois se inicia com a sedimentação. As gotículas, ao se aproximarem, formam uma bolsa de fase contínua entre elas que deforma a esfericidade da gota (uma situação energeticamente desfavorável e instável). Posteriormente, o líquido entre as gotículas se ajusta na forma de uma película delgada. Em seguida, ocorre a lenta drenagem dessa película até que os conteúdos das duas gotículas que comunicam em um determinado ponto. A partir daí, rapidamente se inicia o processo de coalescência fazendo com que as duas gotas se juntem em uma única [66, 69].

Figura 2.3 – Fenômenos que contribuem para a desestabilização de emulsões comuns, levando a separação de fases (quebra da emulsão).



Fonte: Adaptado de Daltin [55].

Das etapas descritas, aquelas em que se é possível influenciar para que se tenha o aumento do tempo de estabilidade de uma emulsão são a velocidade de ascensão (ou sedimentação) e a velocidade de drenagem da película delgada. Uma emulsão mais estável pode ser obtida quando se retarda a velocidade de ascensão (ou sedimentação). Esta velocidade pode ser diminuída: reduzindo-se o tamanho das gotículas; reduzindo-se as diferenças entre as densidades das fases interna e contínua; e aumentando-se a viscosidade da fase externa. Adequando-se estes fatores, se estará dificultando a migração e agregação das gotículas dispersas, que são condições que iniciam a quebra da emulsão [55, 56].

A drenagem da película delgada de fase contínua entre as gotículas também deve ser retardada para garantir uma emulsão mais estável. Quando duas gotículas de óleo estabilizadas em água por um surfactante se aproximam, trazem consigo também suas respectivas camadas elétricas. Caso o surfactante utilizado na formulação da emulsão seja aniônico, os íons da dupla camada serão cátions livres e solvatados em solução, mas interagindo eletrostaticamente com a superfície da

gotícula. Com a aproximação das gotículas, a drenagem da camada delgada formada também implica na remoção destes cátions tendo que vencer a atração eletrostática para que isto ocorra [55, 56, 69].

A força contrária à drenagem do filme líquido é chamada de potencial de contrafluxo. Assim, quanto maior o potencial de contrafluxo, mais lenta será a drenagem da camada delgada. Desta forma, quanto maior for o número de moléculas de surfactante iônico na superfície da gotícula, maior será sua proteção contra a coalescência e maior será a estabilidade da emulsão. Geralmente, a mistura de surfactantes iônicos e não iônicos dá mais estabilidade à emulsão, pois este último atenua a repulsão entre as cargas de duas moléculas vizinhas na superfície aumentando a densidade de cargas [55,64].

No caso das microemulsões, por serem sistemas mais estáveis por mais tempo do que as emulsões, podem ser consideradas como uma só fase visível nos diagramas de fase de Winsor. A depender do HBL do surfactante usado na obtenção da microemulsão, ele poderá apresentar uma solubilidade maior ou menor em solvente polar. Sendo sua solubilidade maior em água, essa microemulsão poderá ser desestabilizada por diluição em meio aquoso formando duas fases [55, 63].

A presença de metais e metaloides em amostras como os óleos comestíveis, alimentos gordurosos, óleos lubrificantes e combustíveis tem origem na matéria-prima, no processo de produção, transporte e armazenagem desses produtos. Além disso, essas espécies químicas podem ser adicionadas com a intenção de melhorar características específicas do produto final. A determinação do teor de macro e microelementos nesses produtos é importante devido à necessidade constante de avaliar o teor nutritivo e tóxico das amostras alimentícias, e no caso dos combustíveis, determinar sua contribuição na emissão de elementos potencialmente tóxicos em termos de impacto para o ambiente e para saúde humana quando são queimados nos motores. Adicionalmente, a presença de alguns metais está associada com a estabilidade de alguns produtos e, conseqüentemente, sua degradação, reduzindo seu tempo de prateleira ou envenenamento de catalisadores e corrosão na indústria de petróleo [57,58,59].

Nos próximos subtópicos serão comentados métodos analíticos com base na formação de emulsões comuns e microemulsões, além de métodos com base em extração induzida pela desestabilização de sistemas emulsificados.

2.7 MÉTODOS COM BASE EM EXTRAÇÃO POR DESESTABILIZAÇÃO DE SISTEMAS EMULSIFICADOS

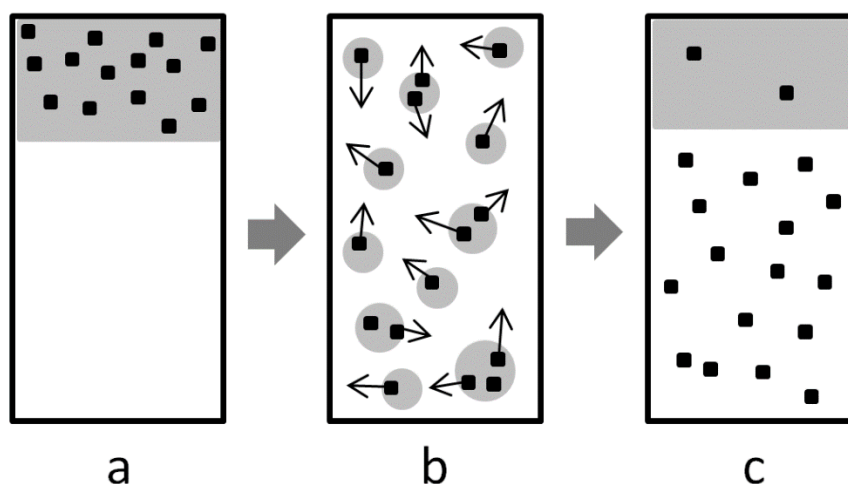
A quebra de emulsão é um fenômeno descrito como a separação das fases imiscíveis, que compõem a emulsão, retornando-se ao sistema inicial de duas fases líquidas nitidamente separadas. A quebra de emulsão tende a ocorrer naturalmente, porém, isto pode acontecer de forma muito lenta a depender de fatores como sua constituição, pressão e temperatura [89].

Quando se deseja quebrar uma emulsão, a centrifugação ou aumento de temperatura são, geralmente, os recursos mais simples e utilizados para esse propósito.

Na formação de uma emulsão, a área superficial ou interfacial entre a fase dispersa e a contínua aumenta muito e as propriedades da interface são importantes na determinação da facilidade da formação da emulsão e de sua estabilidade. Nesta interface, ocorrem fenômenos de troca de substâncias entre as fases, favorecidas não apenas pelo aumento da área de contato, mas também pelas forças de interação dependentes da natureza desta substância tais como polaridade [85].

O fenômeno da formação e da quebra de emulsão vem sendo utilizada como procedimento em química analítica para o melhoramento dos parâmetros de méritos de um método para determinação de metais. A extração induzida por quebra de emulsão (EIEB) como estratégia na separação e/ou pré - concentração de metais foi proposta por Cassella et al 2017. [90], na determinação de metais traços em amostras de diesel por ET AAS, as amostras foram emulsificadas com Triton X-114 em meio de HNO_3 por agitação vigorosa. Quando a amostra é dispersa em gotículas, há um aumento muito grande da área de contato entre amostra e solução aquosa extratora facilitando a transferência dos metais para essa última (Figura 2.4). Posteriormente, as emulsões são quebradas por aquecimento e a fase aquosa, com o(s) analito(s), foi submetida à quantificação.

Figura 2.4 – Amostra em diferentes momentos durante uma extração induzida por quebra de emulsão: (a) amostra (fase apolar com as espécies inorgânicas) em contato com a solução extratora (fase polar); (b) formação da emulsão por dispersão da fase apolar na forma de pequenas gotas na fase contínua e transferência de metais na grande área de interface; (c) espécies inorgânicas transferidas para a fase de extração após a quebra da emulsão.



A EIEB oferece vantagens quando aplicada na análise de amostras de alto teor de compostos orgânicos tais como: transferência quantitativa dos analitos de uma fase complexa para uma fase aquosa mais fácil de analisar que a original; evita etapas de digestão de amostras que consomem muito tempo; demanda reagentes de baixo custo para sua aplicação e oferece simplicidade e facilidade operacional na extração [63]. Em comparação à análise das matrizes emulsificadas, a fase aquosa obtida após a quebra da emulsão apresenta uma matriz bem mais simples de ser analisada, facilitando a sua introdução nos equipamentos de espectrometria óptica e a calibração.

A quebra de emulsão pode ser sumarizada por quatro fenômenos que podem acontecer simultaneamente ou sequencialmente. Os processos usuais envolvidos, já apresentados anteriormente são: ascensão, sedimentação, floculação, coalescência e separação das fases [91]. O tempo para ocorrer a separação de fases pode variar de segundos a longos períodos de tempo, e depende, sobretudo, de fatores como por exemplo, a natureza do surfactante, a temperatura, a agitação, o tamanho das gotas, o modo de preparo das emulsões e a ação gravitacional [92]. A elevação de temperatura é um artifício muito usado para promover a quebra da emulsão. A temperatura de quebra depende da composição da emulsão e temperaturas entre 70 e 90 °C têm sido usadas para esse propósito.

Recentemente, o mesmo grupo de Cassella propôs uma nova vertente desse tipo de extração usando agora a formação e quebra de microemulsão [90] Nesse trabalho, a nova técnica foi empregada para extração de Hg em amostras de gasolina e sua posterior determinação por CV AAS. A microemulsão foi formada misturando-se a amostra (gasolina) com *n*-propanol e HCl. Em uma segunda etapa, a microemulsão foi desestabilizada pela adição de água (300 µL), obtendo-se: a fase superior, contendo o resíduo de gasolina e a fase inferior contendo o analito extraído em de contendo água, *n*-propanol e etanol, este último originário da amostra de gasolina.

A Tabela 2.1 mostra algumas características de métodos analíticos que utilizaram a extração induzida por quebra de emulsão como procedimento de extração ou separação de analitos. Analisando-se os trabalhos já publicados usando-se a extração induzida por quebra de emulsão constata-se que: as matrizes mais analisadas são oleosas propícias à formação da emulsão O/A, pois a fase extratora deve ser aquosa, mais compatível com as técnicas analíticas atômicas; as técnicas analíticas mais utilizadas são as relacionadas com a espectrometria de absorção atômica, como F AAS e ET AAS. Trabalhos com técnicas como CV AAS, ICP OES e ICP-MS também são encontrados na maioria dos procedimentos. Agitação manual predomina no fornecimento de energia para emulsificação. Em menor escala, tem-se a agitação mecânica por vortex ou mixer horizontal. O Triton X-114 é o surfactante mais usados em processos de obtenção de emulsões e o HNO₃ está frequentemente presente na etapa de emulsificação. Quanto a calibração, é feita em sua grande maioria, por padronização externa devido às características da fase extratora, embora raras aplicações se utilize padronização interna. Além disso, o uso de um sistema por injeção em fluxo para introdução da fase extratora é também bastante utilizado.

Tabela 2.1 – Alguns métodos analíticos para determinação de elementos traço baseados na extração induzida por quebra de emulsão

<i>Amostra</i>	<i>Analito</i>	<i>Técnica de detecção</i>	<i>Preparação da emulsão</i>	<i>Energia para emulsificação</i>	<i>Procedimento para quebra da emulsão</i>	<i>LD</i>	<i>Ref.</i>
<i>Óleos comestíveis</i>	Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn	ICP OES	Amostra + Triton X-114 in HNO ₃ 10% v/v	Agitação manual	Aquecimento a 80 °C	NR	[93]
<i>Óleos comestíveis</i>	Zn	Injeção em fluxo FAAS	Amostra + Triton X-100 or Triton X-114 in HNO ₃ 10% v/v	Agitação Vortex	Aquecimento a 80°C	1,0 µg L ⁻¹	[94]
<i>Óleos comestíveis</i>	Cr, Mn	ETAAS	Amostra + HNO ₃ + Triton X-114	Agitação manual	Aquecimento a 90°C	219 and 120 ng L ⁻¹	[95]
<i>Óleos comestíveis</i>	Mg, Mn, Fe, Zn, Ag, Ba, Pb, Cr	ICP-MS	Amostra + HNO ₃ + Triton X-114	Agitação manual	Centrifugação por 12 min a 6800 rcf	0,004 – 0.271 µg L ⁻¹	[96]
<i>Óleos comestíveis</i>	Cd	Flow injection FAAS	Amostra + Triton X-114 in HNO ₃	Agitação vortex	Aquecimento a 80 °C	1,55 µg L ⁻¹	[97]
<i>Omega-3 suplemento dietéticos (óleo de peixe)</i>	Cd	TS-FF-AAS	Amostra + HNO ₃ + Triton X-114	Agitação manual	Aquecimento a 88 °C	2,5 ng g ⁻¹	[98]

<i>Diesel</i>	Al, Cu, Mn, Ni, Sn, V	ICP-MS	Amostra + Triton X-114 in HNO ₃ 10% v/v	Agitação misturador rolos	em de	Centrifugação por 60 min a 3200 rpm	26–88 ng L ⁻¹	[99]
<i>Diesel</i>	Cu, Fe, Ni, Pb	ETAAS	Amostra + Triton X-114 in HNO ₃ 10% v/v	Agitação manual		Aquecimento a 80 °C	114 to 294 ng L ⁻¹	[100]
<i>Diesel</i>	Zn	FI-FAAS	Amostra+ Triton X-100 in HNO ₃ 15% v/v	Agitação manual		Aquecimento a 90 °C	1,2 μg L ⁻¹	[101]
<i>Combustível de avião</i>	Cu, Fe, Mn, Zn	ICP-MS	Amostra + HNO ₃ + Triton X-100 or Triton X-114	Agitação manual + misturador mecânico		Centrifugação a 5000 rpm até a quebra da emulsão	0,028 – 0.116 μg L ⁻¹	[102]
<i>Óleo cru</i>	Ba, Ca, Mg, Na	ICP OES	Amostra + xylene + Triton X-100 in HNO ₃ 10% v/v	Aquecimento + mistura por Vortex + banho ultrassônico		Aquecimento a 80 °C + centrifugação a 4000 rpm	0,12 to 5,8 μg L ⁻¹	[103]
<i>Óleo lubrificante</i>	Cu, Fe, Mn	FAAS	Amostra + Toluene + Triton X-114 in HNO ₃	Agitação misturador rolos	em de	Centrifugação a 3500 rpm	2,9 e 77 ng/g	[104]
<i>Óleo lubrificante usado</i>	Mg, Cr, Ni, Cu, Pb	ICP-MS	Amostra + tolueno + Triton X-114 solução ácida	Agitação manual + agitação misturador rolos		Centrifugação por 10 min a 6000rpm	0,009 to 0,126 μg L ⁻¹	[105]

<i>Amostras de óleos</i>	Total Hg	CV-AAS	Amostra + Triton X-100 in HNO ₃ 15% v/v	Agitação misturador horizontal	Aquecimento a 80 °C	1,9 µg L ⁻¹	[106]
<i>Biodiesel</i>	Ca, Mg	FS-FAAS	Amostra + Triton X-114 + HNO ₃	Agitação manual	Aquecimento a 90 °C	47 e 13 µg L ⁻¹	[107]
<i>Biodiesel</i>	Cu, Mn, Ni	ETAAS	Amostra + HNO ₃ + Triton X-100	Agitação manual	Aquecimento a 90 °C	1,0 µg L ⁻¹	[108]

LD, limite de detecção; NR, não relatado no artigo; FS-FAAS, multielementar sequencial rápido FAAS, ICP OES, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado; ET, atomização eletrotérmica; CV, geração de vapor frio; GFAAS, espectrometria de absorção atômica em forno de grafite; FAAS, espectrometria de absorção atômica com chama; AFS, espectrometria de fluorescência atômica; ETAAS, espectrometria de absorção atômica eletrotérmica;

PARTE II

TRABALHOS EXPERIMENTAIS DESENVOLVIDOS

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO COM BASE NA EXTRAÇÃO INDUZIDA POR QUEBRA DE EMULSÃO PARA DETERMINAÇÃO DE Ca, Mg, Mn, Fe E Zn EM AZEITE DE DENDÊ POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA

3.1 INTRODUÇÃO

O azeite de dendê é extraído da polpa da espécie *Ealeis quineensis*. Este óleo tem cor amarela avermelhada e pode apresentar consistência sólida à temperatura ambiente, devido ao alto teor de ácidos graxos saturados. O azeite de dendê consiste principalmente em glicerídeos. Os triglicerídeos são os principais componentes, com pequenas quantidades de diglicerídios e monoglicerídios. Também consiste em sua estrutura ácidos graxos livres, sem ácidos graxos trans [109].

As características físicas e químicas do azeite de dendê cru e refinado foram amplamente estudadas, devido ao grande interesse industrial. É amplamente utilizado para a fabricação de margarina, devido à sua consistência, além de não ficar rançoso, sendo excelente como óleo de cozinha e no preparo de alimentos fritos; também é usado na produção de óleo vegetal, adequado para fazer pães, bolos, tortas, biscoitos, cremes, etc. Um uso importante do óleo de palma é como matéria-prima na fabricação de sabões e detergente. Também pode ser usado na composição de combustível para motores a diesel [110].

A presença de metais em óleos vegetais comestíveis pode ser derivada da composição natural do solo em que o plantio é estabelecido, poluição ambiental e contaminação, que podem ocorrer durante os processos de extração e conservação. A concentração de oligoelementos é um critério importante para a garantia de qualidade na determinação de sabor, meia-vida e taxa de deterioração. Em geral, certos fatores, como a presença de oxigênio e metais traços, exposição à luz e temperatura de armazenamento devem ser controlados, de modo a diminuir a

oxidação do óleo [111]. Existem muitos registros que mostram que os oligoelementos, como Fe, Cu, Mn e Ni, afetam o sabor e a estabilidade oxidativa dos óleos, com efeitos catalíticos no mecanismo de auto-oxidação [112].

Alimentos com alto teor de gordura, como azeite de dendê, são difíceis de digerir, uma vez que apresentam uma estrutura orgânica complexa, bem como altas concentrações de componentes oleosos [111]. A técnica de quebra de emulsão é uma alternativa muito promissora para este tipo de amostras.

Quando dois líquidos imiscíveis são colocados em contato, há uma tendência para que eles se dispersem um ao outro como glóbulos (ou gotículas) de extensões finitas, quando a ação de uma força mecânica é observada. No entanto, quando a agitação cessa, os dois líquidos tendem a se separar. As emulsões são sistemas que permanecem dispersos um ao outro por um período razoável (alguns segundos a vários anos). Os agentes emulsionantes, como surfactantes, são usados para atrasar a separação [113].

A fase dispersa em uma emulsão é chamada fase interna e a fase contínua é a fase externa. Eles são comumente referidos como sistemas de óleo em água (O / A), onde a fase externa é a água, que é a fase contínua [55, 56]. Na formação de uma emulsão ou superfície interfacial, a área entre a fase contínua e dispersa aumenta amplamente e as propriedades da interface são importantes para determinar a facilidade de emulsificação e estabilidade. Emulsões são sistemas de aparência leitosa de gotículas com tamanhos entre 0,5 e 50 μm . Eles são sistemas termodinamicamente instáveis e mostram uma tendência para separar em seus componentes imiscíveis ao longo do tempo. As emulsões O/A são as mais aplicadas em química analítica devido a algumas características como baixa viscosidade, baixo carregamento de composto orgânico, facilidade de calibração com padrões aquosos, estabilidade adequada, etc., que tornam elas compatíveis com a maioria das técnicas espectrométricas usando soluções aquosas. Não é apenas este fenômeno de troca de interface de substâncias entre fases favorecidas pelo aumento da área de contato, mas também por forças de interação dependentes da natureza dessa substância (polar ou não polar) [94, 114].

Este estudo propõe a aplicação de extração induzida por quebra de emulsão para a determinação de Ca, Fe, Mg, Mn e Zn a partir de amostras de azeite de dendê por espectrometria de absorção atômica com chama. O método desenvolvido é simples, rápido, eficiente e resulta em um passo de pré-concentração devido à

transferência quantitativa de metais para um pequeno volume de fase aquosa, que é mais fácil de manusear.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 Instrumentação

A determinação dos metais (Ca, Mg, Mn, Fe e Zn) na fase aquosa obtida a partir da extração induzida por ruptura de emulsão, bem como na solução obtida após digestão / dissolução de cinzas secas, foi realizada utilizando um Analista Perkin Elmer Espectrômetro de absorção atômica com chama - FAAS equipado com uma lâmpada de deutério para a correção de fundo.

As lâmpadas de cátodo oco para cálcio, magnésio, manganês, ferro e zinco foram utilizadas de acordo com as recomendações do fabricante (Tabela 3.1). A altura do queimador (13,5 mm) também foi utilizada com valores convencionais. A chama consistiu em acetileno (taxa de fluxo 2,0 L.min⁻¹) e ar (taxa de fluxo 13,5 L min⁻¹). A taxa de fluxo utilizada para a nebulização foi de 5,0 mL min⁻¹.

Tabela 3.1 – Condições operacionais utilizadas na determinação de Ca, Mg, Mn, Fe e Zn por espectrometria de absorção atômica com chama.

<i>Parâmetros</i>	<i>Fe</i>	<i>Mn</i>	<i>Zn</i>	<i>Ca</i>	<i>Mg</i>
<i>Comprimento de onda (nm)</i>	248,33	279,48	213,86	422,67	285,21
<i>Corrente da lâmpada (mA)</i>	30	15	15	20	20
<i>Largura da fenda (nm)</i>	1,35	0,60	1,80	0,60	1,05

Um banho ultrassônico da marca Cristofoli (Campo Mourão, Brasil) foi utilizado para a formação de emulsões. O equipamento do banho de ultrassom foi preenchido com cerca de 3,0 L de água e um tubo de centrífuga de vidro um por minuto foi colocado, com a ajuda de um suporte, no centro do banho para realizar a extração.

A calcinação das amostras foram realizadas em um forno de mufla EDGCON 3P (Equipamentos EDG, São Carlos, Brasil). Uma chapa aquecedora Tecnal (modelo

TE 0851, Piracicaba, Brasil) foi utilizada para solubilização de cinzas com HNO_3 e H_2O_2 .

3.2.2 Amostras

O estudo visando a determinação de Ca, Fe, Mg, Mn e Zn foi realizado em amostras de azeite de dendê adquiridas em estabelecimentos comerciais localizados nas cidades de Jequié e Salvador, produzidos em diferentes regiões da Bahia, entre os anos de 2014 a 2016. Os azeites de dendê usado foram cedidos gentilmente por baianas de acarajé nas cidades de Jequié e Salvador.

3.2.3 Reagentes e soluções

Os reagentes químicos utilizados foram de maior pureza disponível e de grau. A água ultrapura foi obtida do sistema de purificação Purelab Classic® (Elga, High Wycombe, Reino Unido). As vidrarias utilizadas foram mantidas em ácido nítrico diluído pelo menos durante a noite, e posteriormente lavada com água ultrapura. Foram preparadas soluções de tensoativo Triton X-114 a 10% (m / v) (Sigma-Aldrich, Milwaukee, EUA) em água desionizada de alta pureza.

Soluções convencionais de ácido nítrico, ácido sulfúrico e padrão (1000 mg L^{-1}) de Ca, Mg, Mn, Fe e Zn foram adquiridas da Merck (Darmstadt, Alemanha). As soluções padrão de trabalho destes metais foram preparadas diariamente por diluição da solução padrão. As soluções de ácido nítrico e ácido clorídrico foram preparadas por diluição direta com água desionizada a partir das soluções concentradas.

3.2.4 Otimização da extração de emulsão

As proporções entre amostras e reagentes ($10\% \text{ mm}^{-1}$ de solução de surfactante e ácido nítrico concentrado) para extração induzida por quebra de emulsão foram otimizadas usando um planejamento de mistura com restrições [115]. O uso de restrições é justificado, uma vez que a presença de três componentes é sempre necessária para a formação da emulsão e posterior extração.

A Tabela 3.2a apresenta restrições baixas e altas estabelecidas para cada componente e a Figura 3.1 mostra esta região. A Tabela 3.2b apresenta a matriz experimental para o planejamento. A proporção de cada componente em cada experimento é estabelecida pela matriz do planejamento da mistura utilizada.

Figura 3.1 – Composição experimental da região de mistura delimitada por restrições baixas e altas estabelecidas para cada componente, de acordo com a Tabela 3.2a

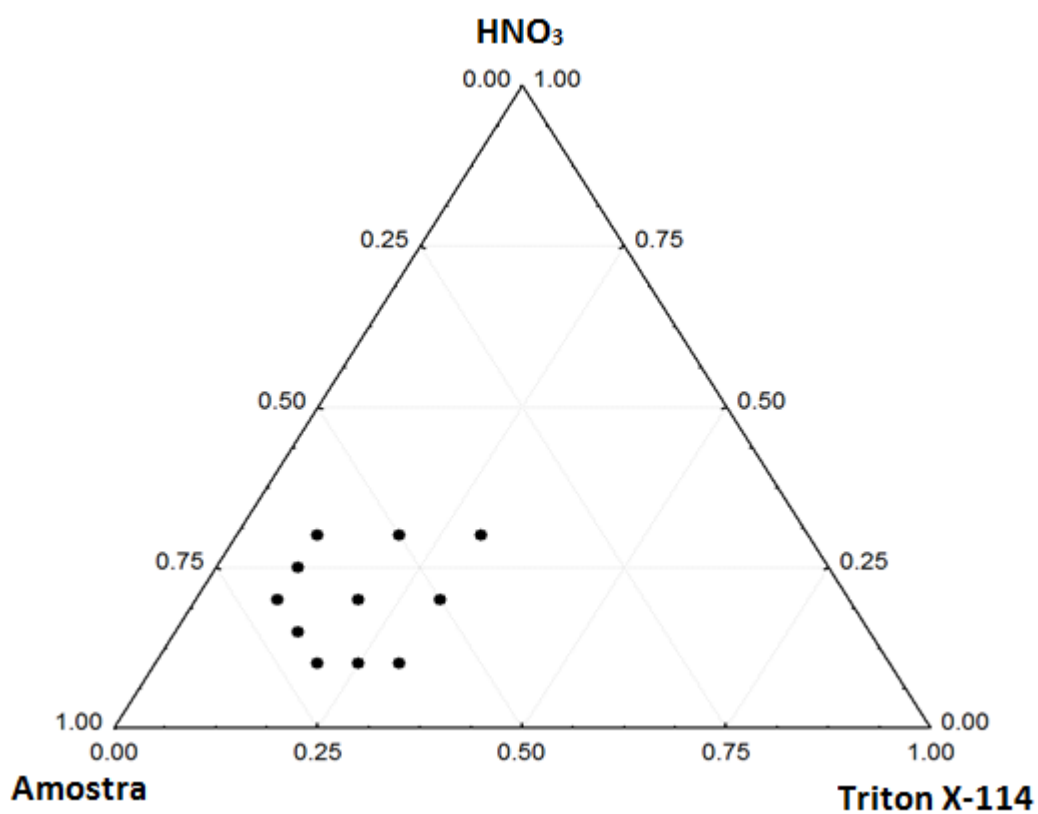


Tabela 3.2 – (a) Limitações baixas e altas para componentes de mistura e (b) Matriz experimental aplicada para a otimização da extração induzida pela quebra de emulsão a partir de amostras de óleo de palma.

<i>(a) Restrições</i>			
<i>Variáveis de misturas</i>	<i>Restrições inferiores</i>	<i>Restrições superiores</i>	
<i>Volume da amostra</i>	4	7	
<i>Volume HNO₃</i>	1	3	
<i>Volume de Triton X-114 10%</i>	1	3	
<i>(b) Matriz Experimental</i>			
<i>Exp.</i>	<i>Amostra (mL)</i>	<i>Triton X-114 (mL)</i>	<i>HNO₃ (mL)</i>
1	7	1	2
2	7	2	1
3	6	3	1
4	6	1	3
5	4	3	3
6	7	1,5	1,5
7	6,5	1	2,5
8	5	3	2
9	6,5	2,5	1
10	5	2	3
11	6	2	2

A proporção de cada componente em cada experimento é estabelecida pela matriz de planejamento da mistura utilizada. Nesta etapa, as variáveis do método, como o tempo de extração e a temperatura, foram fixadas em 12 min e 80 °C. Após a otimização da proporção, essas variáveis foram otimizadas por experimentos univariados em um segundo passo.

Para permitir a otimização simultânea das cinco respostas obtidas (absorvância de metal), foi utilizada uma abordagem multi-resposta. Baseia-se em funções de desejabilidade aplicadas na otimização de várias respostas [116].

A abordagem consiste em converter cada resposta y_i em uma função de desejabilidade individual d_i , que varia dentro do intervalo de $0 \leq d_i \leq 1$. Se a resposta for desejada, $d_i = 1$ e se a resposta não estiver dentro da região aceitável, $d = 0$. Assim,

os níveis de fator são escolhidos para maximizar a desejabilidade geral dada pela expressão:

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde m é o número de variáveis de resposta (neste caso, 5). Se o valor alvo T for um máximo, d_i será:

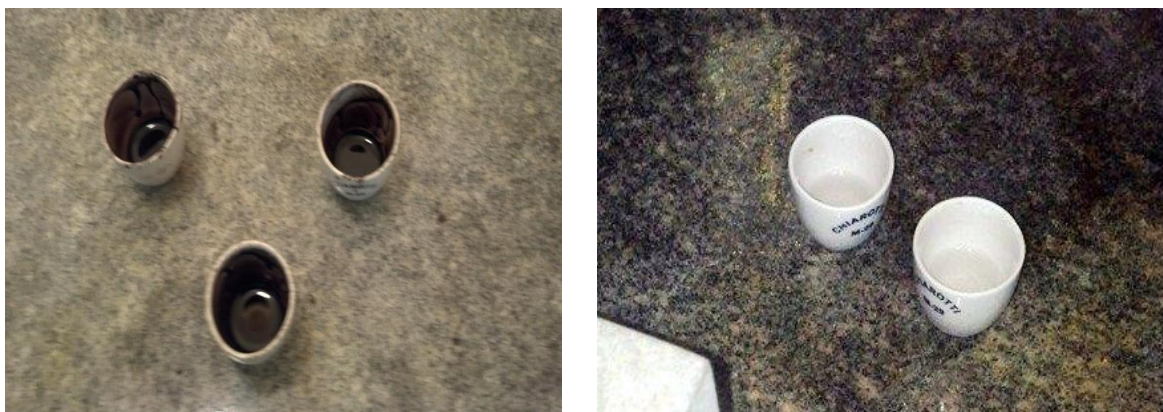
$$d = \begin{cases} 0 & \text{if } y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L} \right)^s & \text{if } L \leq y \leq T \\ 1 & \text{if } y > T \end{cases} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde L é o valor aceitável mais baixo para a resposta, e s é o peso (quando igual a 1 = função de desejabilidade linear). Neste estudo, os valores de L foram os sinais analíticos encontradas em um conjunto de experimentos para cada metal e os valores de T foram os maiores sinais analíticos para cada metal. O software utilizado no tratamento dos dados foi Statistic 7.0

3.2.5 Procedimento de calcinação e solubilização da amostra

O procedimento adotado foi adaptado da ASTM, 2009. As triplicados de cada amostra com um volume de aproximadamente 0,3 mL de amostra de óleo de palma foram colocados em um cadinho de porcelana e levados ao forno a 150 °C por uma hora e depois a 300 °C por duas horas. O cadinho foi removido do forno, arrefecido até à temperatura ambiente e a amostra foi adicionada 1 mL de H₂SO₄ e levada de volta ao forno a 300 °C durante duas horas. Depois do cadinho arrefecido, foi retirado, com as cinzas restantes, a uma placa quente e 2,0 mL de HNO₃ concentrado foi adicionado e aquecidos a 100 °C com a adição de gotas de peróxido de hidrogênio até o clareamento (Figura 3.2). Após o resfriamento, o resíduo final foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi completado com água ultrapura. Um ensaio do branco foi realizado da mesma forma que as amostras de interesse. A determinação dos elementos foi realizada usando um espectrômetro de absorção atômica de chama F AAS.

Figura 3.2 – Amostras no cadinho (a) antes (digestão na mufla) e (b) depois do tratamento com solução ácida na placa de aquecimento.



3.2.6 Procedimento geral para extração induzida por quebra de emulsão após otimização

A extração dos metais estudados a partir de amostras de óleo de palma foi realizada utilizando o procedimento EIEB desenvolvido em duas etapas: (1) emulsificação: 6,0 mL da amostra de azeite de dendê foi colocado em um tubo cônico de 50 mL de capacidade. Em seguida, adiciona-se 2,5 mL de solução de ácido nítrico concentrado, o tubo é agitado manualmente e, posteriormente, também foi adicionado 1,5 mL de surfactante Triton X-114 a 10% (v/v). Essa mistura foi submetida à energia ultrassônica por 30 min para formar a emulsão. (2) quebra de emulsão. Após a formação da emulsão, o tubo de vidro foi transferido para um banho de água quente manter a 90°C em tempo suficiente (cerca de 30 min) para promover a separação de fases. A fase aquosa, contendo os analitos extraídos, foi coletada com o auxílio de uma pipeta automática e armazenada em frasco de polietileno e seu volume completado para 10,0 mL com água ultrapura) até a determinação pelo F AAS.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A otimização do método analítico proposto neste estudo foi realizada por metodologia multivariada, empregando um planejamento de mistura. Dois tipos de respostas foram avaliados: turbidância, expresso como $-\log T$ (onde T é a transmitância) e o conjunto de sinais de absorção para os metais estudados. Estes sinais de absorção foram agrupados em uma resposta única usando uma função de desejabilidade. Medidas turbidimétricas permitem avaliar a eficiência da quebra de emulsão, uma vez que se pode considerar que a dispersão da radiação é proporcional à quantidade de emulsão que permanece na solução aquosa. Assim, quanto menor o sinal turbidimétrico, melhor a eficiência de quebra da emulsão estudada. Para otimizar as proporções da amostra, soluções ácidas e surfactantes foram usadas no planejamento de mistura com restrição. As respostas para cada condição experimental são apresentadas na Tabela 3.3. Os aspectos dos extratos após a aplicação da metodologia é mostrado na Figura 3.3.

Figura 3.3 – Aspectos dos extratos após quebra da emulsão segundo os experimentos que compõem o planejamento de misturas.

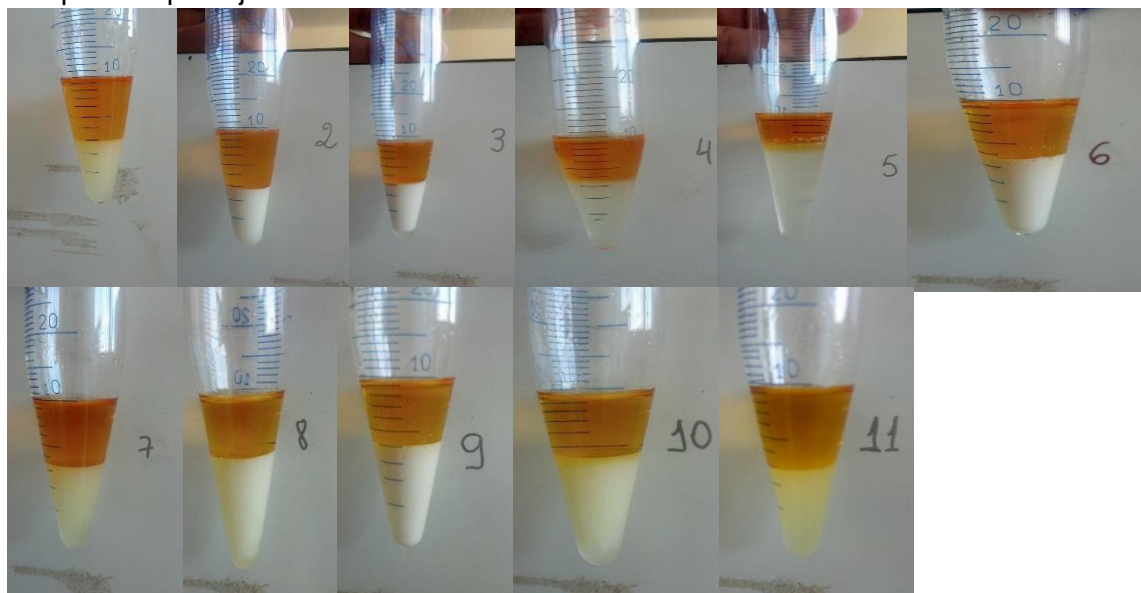


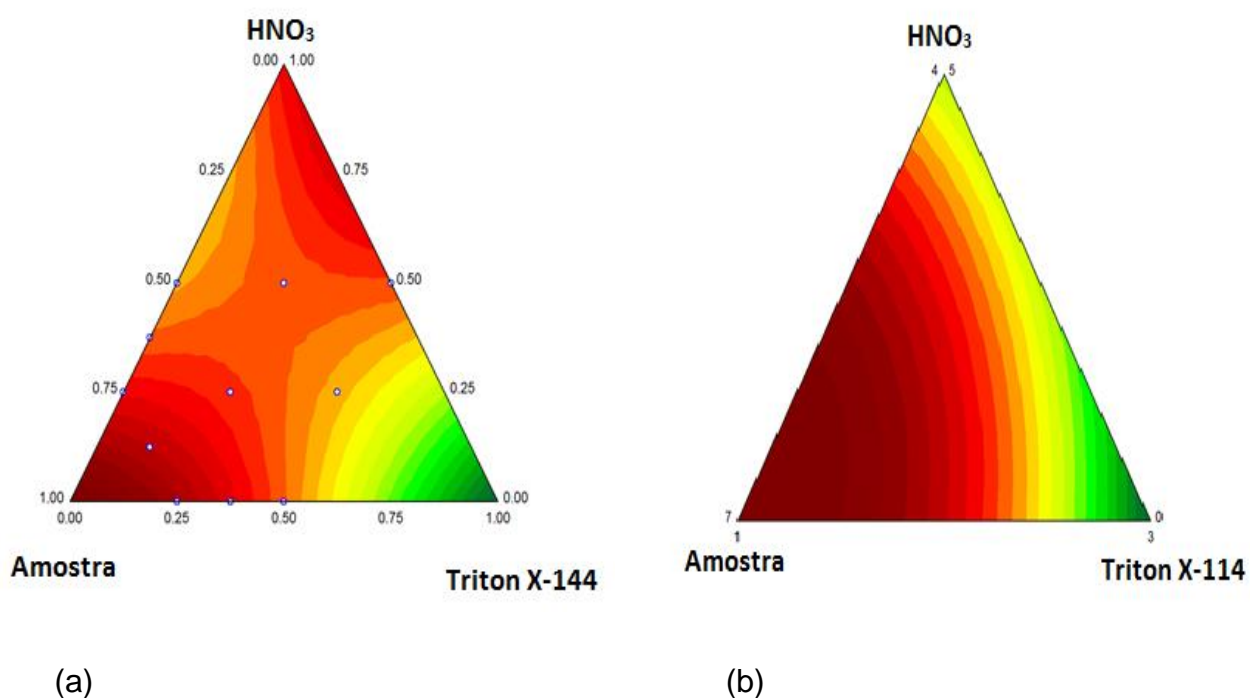
Tabela 3.3 – Matriz de mistura restrita aplicada para otimização de componentes da mistura (mL) e respostas como turbidância (-log T) e sinal analítico corrigido (absorvância. mL⁻¹) para os metais estudados.

Exp	Amostra	Triton X-114	HNO ₃	Turbidez	Respostas				
					Mn	Fe	Zn	Mg	Ca
1	7	1	2	2,36 / 2,24	0,00417 / 0,00467	0,0415 / 0,0395	0,00817 / 0,00617	0,117 / 0,119	0,0212 / 0,0225
2	7	2	1	30,2 / 30,5	0,0140 / 0,0148	0,0527 / 0,0535	0,0538 / 0,0530	0,147 / 0,148	0,0400 / 0,0412
3	6	3	1	0,854 / 0,852	0,00733 / 0,00701	0,0383 / 0,0403	0,0267 / 0,0278	0,118 / 0,119	0,0330 / 0,0302
4	6	1	3	0,0813 / 0,0824	0,0115 / 0,0118	0,0643 / 0,0653	0,0592 / 0,0531	0,157 / 0,156	0,0527 / 0,531
5	4	3	3	0,790 / 0,810	0,00517 / 0,00583	0,0290 / 0,0295	0,104 / 0,102	0,0950 / 0,0962	0,0263 / 0,0247
6	7	1,5	1,5	29,9 / 29,5	0,0118 / 0,0123	0,0580 / 0,0587	0,0473 / 0,0463	0,140 / 0,138	0,0390 / 0,0398
7	6,5	1	2,5	0,110 / 0,112	0,0123 / 0,0126	0,104 / 0,138	0,0622 / 0,0612	0,152 / 0,151	0,0587 / 0,0528
8	5	3	2	0,942 / 0,943	0,00700 / 0,00650	0,0365 / 0,0353	0,0282 / 0,0265	0,0930 / 0,0918	0,0220 / 0,0187
9	6,5	2,5	1	3,98 / 3,95	0,0300 / 0,0308	0,106 / 0,107	0,0402 / 0,0412	0,137 / 0,139	0,0423 / 0,0473
10	5	2	3	0,889 / 0,885	0,00950 / 0,00967	0,0412 / 0,0408	0,00933 / 0,0108	0,116 / 0,115	0,0292 / 0,0287
11	6	2	2	0,808 / 0,811	0,0143 / 0,0148	0,0315 / 0,0303	0,0163 / 0,0155	0,132 / 0,131	0,0406 / 0,0401

T: transmitância

Equações lineares, quadráticas, cúbicas especiais e cúbicas completas foram ajustadas aos dados gerados pela deseabilidade turbidimétrica e global obtida a partir de medidas de absorção atômica. Enquanto todos os modelos mostraram falta de ajuste, notou-se que o modelo quadrático é o modelo mais simples que explica melhor o comportamento do conjunto de dados. Usando o modelo quadrático, é possível obter as duas superfícies de resposta mostradas na Figura 3.4a e 3.4b.

Figura 3.4 – Superfície de resposta obtida após montagem de modelos quadráticos para (a) turbidância expressa como $-\log T$ e (b) deseabilidade geral.



A Figura 3.4 também mostra o perfil de deseabilidade global (obtido das absorbâncias) para os metais estudados. A superfície da Figura 3.4a indica que os sinais turbidimétricos são menores na região entre os pontos 4 e 7. Levando em conta a conveniência geral, o tratamento dos dados indica as seguintes coordenadas como pontos ótimos: 6,5 mL (amostra); 2,5 mL (ácido nítrico) e 1,0 mL (solução de surfactante a 10%). No entanto, sob estas condições experimentais, uma ligeira turbidez é ainda observada, mostrando uma quebra de emulsão não eficiente. Por superposição de superfície, observou-se que existe uma região onde os dois ótimos (turbidez mínima e deseabilidade geral máxima) se cruzam. Este ponto é

caracterizado pelas seguintes condições experimentais: 6,0 mL (amostra), 1,5 mL (solução de surfactante) e 2,5 mL (ácido nítrico). Nestas condições, observa-se uma eficiente quebra de emulsão, sem perda de sinais analíticos. Estas condições permitem obter a máxima absorvância dos metais após a realização de experimentos verificados nessas condições experimentais. Assim, foram escolhidos como proporções ótimas para realizar os próximos estudos (nebulização e transporte eficientes, tempo de extração, influência da temperatura e tempo na quebra da emulsão) e as características analíticas foram avaliadas, com base nessas proporções ótimas.

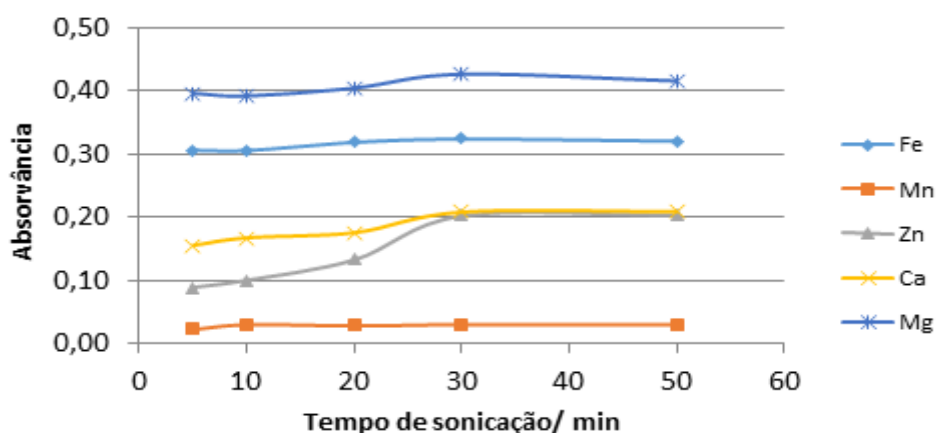
3.3.1 Nebulização e eficiência de transporte

Os surfactantes diminuem a tensão superficial do meio e facilitam o processo de nebulização e transporte dos analitos para a chama e esse fenômeno pode aumentar o sinal analítico. No entanto, experimentos realizados com a adição de solução padrão na fase aquosa obtida após a quebra da emulsão mostram que a quantidade de tensoativo restante não altera o sinal analítico obtido em relação ao padrão aquoso.

3.3.2 Tempo de extração

A transferência de metal do óleo para a fase aquosa pode exigir diferentes tempos de extração, de acordo com a matriz da amostra. A amostra foi submetida à energia ultrassônica de 5 a 50 minutos, com o objetivo de avaliar o tempo de sonicação que proporciona as melhores extrações. Neste experimento, foram utilizadas as condições ótimas encontradas no planejamento de mistura. Os resultados destes estudos podem ser observados na Figura 3.5. A temperatura de 90 °C foi considerada para quebra de emulsão. Observou-se que a eficiência da extração aumentou com o aumento do tempo de sonicação, principalmente para o Zn (Figura 3.5). Após 30 min, a extração máxima é observada para todos os cinco metais estudados. Um tempo de sonicação de 30 min foi então escolhido para realizar o procedimento de extração.

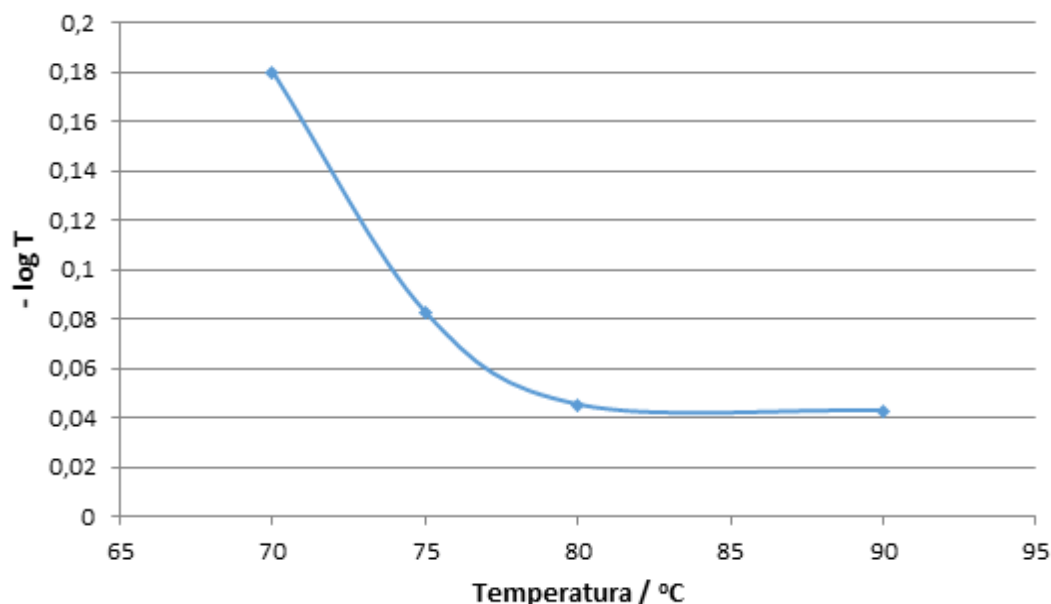
Figura 3.5 – Avaliação do tempo de sonicação (min) e efeito da temperatura de quebra.



3.3.3 Influência da temperatura e tempo de quebra

A temperatura do banho de água utilizada para quebra de emulsão variou de 70 a 90 °C. Observou-se que, a partir de uma temperatura de 80 °C, é possível quebrar eficientemente as emulsões (Figura 3.6a, 3.6b). Isto é evidenciado por uma baixa turbidez na fase aquosa. Sobre a extração dos metais estudados, observou-se que, a partir de 80 °C, o sinal normalizado é estabilizado. Outra observação foi em relação ao tempo para quebra de emulsão. À medida que a temperatura é aumentada, observou-se que a quebra ocorre em menor tempo. (Figura 3.7). Portanto, 90 °C foi escolhida como a temperatura ótima, uma vez que permite boa eficiência de extração, melhor tempo de processamento e maior confiança operacional, além de não funcionar nas condições limites, como acontece quando a quebra é realizada a 80 °C.

Figura 3.6 – (a) Evolução das medições turbidimétrica e (b) absorvância de metais. Condições de trabalho: volume de amostra: 6,0 mL; Volume de HNO₃: 2,5 mL; 10% de volume de Triton X-114: 1,5 mL; tempo de ultrassom: 30 min; tempo de quebra da emulsão: 30 min.



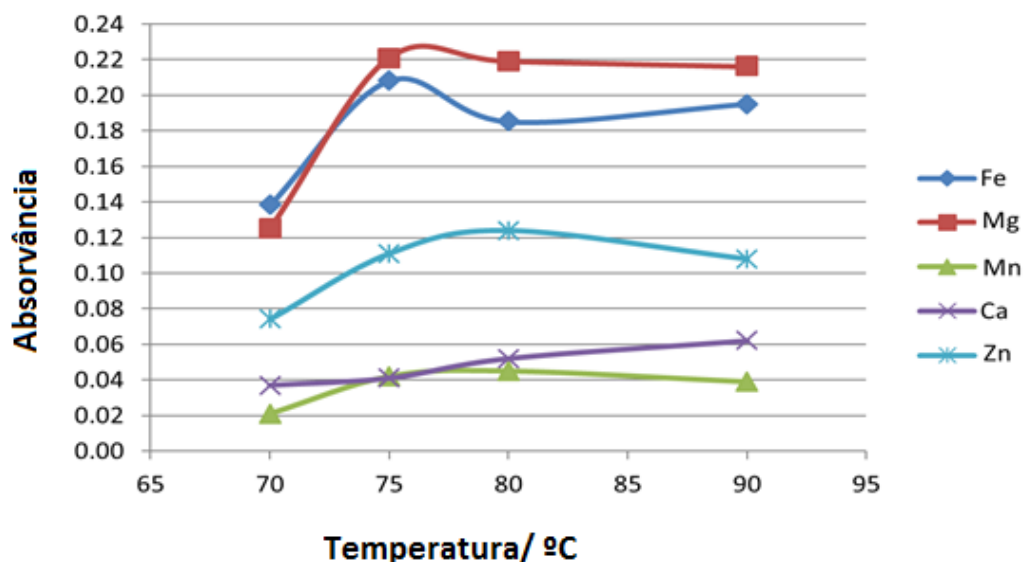
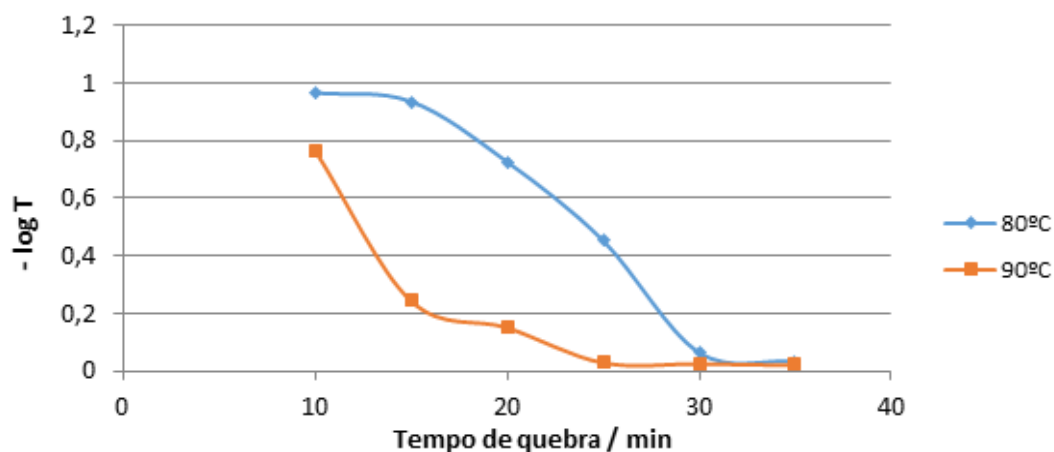


Figura 3.7 – Estudos do tempo de quebra em condições ótimas usando uma temperatura de ruptura de 80 e 90 °C. Condições de trabalho: volume de amostra: 6,0 mL; Volume de HNO₃: 2,5 mL; 10% de volume de Triton X-114: 1,5 mL; tempo de energia ultrassônica: 30 min.



3.3.4 Características analíticas do procedimento desenvolvido

As características analíticas obtidas para o método desenvolvido com base na extração induzida pela quebra da emulsão foram obtidas após a otimização e estão apresentadas na Tabela 3.4. Curvas analíticas (com base no padrão externo e adição padrão) foram comparadas, a fim de avaliar o efeito de matriz. Os intervalos de confiança das vertentes foram avaliados em nível de confiança de 95%, utilizando teste de paralelismo ($t = 2,31$ para $N = 12$ e $fd = 8$) e verificou-se que não há diferenças entre os declives dos dois tipos de curvas

analíticas para Ca ($t = 0,098$), Mg ($t = 2,2$), Mn ($t = 0,80$), Fe ($t = 0,25$) e Zn ($t = 0,29$). Assim, a padronização externa foi escolhida para determinação de metais devido à sua simplicidade e comodidade.

Como pode ser observado pelos LD e LQ obtidos, o método proposto é capaz de determinar baixas concentrações dos metais estudados em comparação com outros trabalhos publicados que utilizam extração induzida por quebra de emulsão. Bakircioglu et al. [94] obtiveram LD de $0,010 \text{ mg L}^{-1}$ para a determinação do Zn, utilizando injeção em fluxo acoplada ao F AAS. Este valor é muito semelhante ao obtido neste trabalho. Em outras pesquisas Robaina, Brum e Cassella [95] determinaram Mn com LD de $0,12 \text{ mg L}^{-1}$ usando ETAAS e He et al [20] determinaram Mg, Mn, Fe e Zn (entre outros) por ICP-MS com respectivamente LD de $0,093$, $0,052$, $0,271$ e $0,177 \text{ ng L}^{-1}$. Estes dois últimos trabalhos apresentam LD inferiores ao método proposto. No entanto, eles utilizam técnicas analíticas que possuem menores LD quando comparadas à F AAS que demandam instrumentos de mais alto custo.

Precisão, expressa como repetibilidade, foi avaliada como desvio padrão relativo percentual (% RSD), por determinação de dez medidas replicadas de soluções de $0,5$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ para cada metal estudado. Curvas analíticas (variando de $0,1$ a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$) foram obtidas com soluções padrão aquosas de cada metal em meios de surfactante e ácido nítrico usando uma chama atômica espectrômetro de absorção.

Tabela 3.4 – Comparação entre duas estratégias de calibração, LD (mg L^{-1}), LQ (mg L^{-1}) e repetibilidade (% RSD) para o método desenvolvido, baseado na extração induzida pela quebra da emulsão.

<i>Metal</i>	<i>Estratégia de calibração</i>	<i>Curva analíticas</i>	<i>LD</i>	<i>LQ</i>	<i>Repetibilidade (%RSD)</i>
<i>Ca</i>	Padrão externo	$A = 0,035 C_{Ca} + 0,001$ $R^2 = 0,9990$	0,057	0,19	2,5
	Adição de padrão	$A = 0,033 C_{Ca} + 0,223$ $R^2 = 0,9992$			
<i>Mg</i>	Padrão externo	$A = 1,042 C_{Mg} + 0,022$ $R^2 = 0,9960$	0,054	0,18	2,2
	Adição de padrão	$A = 0,957 C_{Mg} + 0,312$ $R^2 = 0,9971$			
<i>Mn</i>	Padrão Externo	$A = 0,173 C_{Mn} + 0,004$ $R^2 = 0,9990$	0,012	0,039	1,8
	Adição de padrão	$A = 0,181 C_{Mn} + 0,025$ $R^2 = 0,9985$			
<i>Fe</i>	Padrão externo	$A = 0,048 C_{Fe} + 0,003$ $R^2 = 0,9980$	0,042	0,14	3,2
	Adição de padrão	$A = 0,045 C_{Fe} + 0,142$ $R^2 = 0,9991$			
<i>Zn</i>	Padrão externo	$A = 0,118 C_{Zn} - 0,001$ $R^2 = 0,9991$	0,017	0,058	2,8
	Adição de padrão	$A = 0,110 C_{Zn} - 0,028$ $R^2 = 0,9988$			

3.3.5 Aplicação do método desenvolvido e avaliação da exatidão

A metodologia baseada na extração induzida por quebra de emulsão foi utilizada para a determinação de Ca, Mg, Mn, Fe e Zn em amostras de óleo de palma coletadas em um supermercado de Jequié e Salvador (Bahia, Brasil). Os resultados estão apresentados na Tabela 3.5. Como não há materiais de

referência certificados disponíveis para óleo de palma, a exatidão do método desenvolvido foi avaliada: (a) por teste de adição / recuperação, no qual os cinco metais estudados são misturados aos padrões aquosos e orgânicos nas amostras e extraídos utilizando o método analítico desenvolvido, e (b) por um método alternativo e consolidado, decomposição em mufla e com posterior solubilização em HNO_3 sob aquecimento. O método proposto apresenta uma boa exatidão. Recuperações de metais adicionados foram significativas e valores entre 87 e 113% foram obtidos. Utilizando outra amostra de óleo de palma, aplicou-se o teste t pareado (nível de confiança de 95%) para comparar as concentrações de metais encontradas pelo método proposto e os resultados encontrados pelo método de incineração em mufla (Tabela 3.6). De acordo com os resultados, não foi possível observar diferença significativa entre os dados gerados pelos dois métodos. Os valores de t encontrados para Ca, Mg, Mn, Fe e Zn foram de -1,30, -0,38, 0,65, -1,42 e 4,12 respectivamente. Todos os valores estão abaixo do valor tabelado (4,30), indicando que, as concentrações dos analitos obtidas empregando ambos os métodos não são estatisticamente diferentes.

Tabela 3.5 – Concentrações (mg L⁻¹), quantidades adicionadas e recuperações de metais aumentaram em amostras de óleo de palma usando extração induzida por quebra de emulsão.

Amostra	Ca			Mg			Mn		
	Antes da adição	Depois da adição ¹	Recuperação (%)	Antes da adição	Depois da adição ²	Recuperação (%)	Antes da adição	Depois da adição ³	Recuperação (%)
1	5,95 ± 1,3	11,2 ± 1,1	105	0,72 ± 0,18	0,98 ± 0,08	87	0,11 ± 0,01	0,25 ± 0,07	93
2	5,14 ± 1,1	9,93 ± 0,61	96	0,74 ± 0,02	1,03 ± 0,04	97	<LQ	0,16 ± 0,07	107
3	5,19 ± 0,47	9,84 ± 0,46	93	0,37 ± 0,01	0,66 ± 0,05	97	0,15 ± 0,01	0,32 ± 0,01	113
4	6,52 ± 1,00	11,6 ± 0,71	102	1,94 ± 0,01	2,26 ± 0,07	107	0,17 ± 0,07	0,33 ± 0,02	107
5	13,9 ± 0,99	18,8 ± 0,22	98	2,24 ± 0,07	2,56 ± 0,06	107	0,32 ± 0,02	0,45 ± 0,01	87
6	3,93 ± 0,98	8,85 ± 1,20	98	0,55 ± 0,06	0,84 ± 0,02	97	0,13 ± 0,01	0,29 ± 0,02	107
7	9,87 ± 0,30	15,28 ± 0,84	108	1,49 ± 0,04	1,77 ± 0,08	93	0,25 ± 0,04	0,39 ± 0,05	93
8 ⁶	7,15 ± 0,14	12,01 ± 0,51	97	0,54 ± 0,05	0,81 ± 0,05	90	0,21 ± 0,04	0,34 ± 0,03	87

Continuação da Tabela 3.5

Amostra	Fe			Zn		
	Antes da Adição	Depois da Adição ⁴	Recuperação (%)	Antes da Adição	Depois da adição ⁵	Recuperação (%)
1	1,77 ± 0,02	4,88 ± 0,32	104	0,38 ± 0,09	0,67 ± 0,07	97
2	3,97 ± 0,41	6,72 ± 0,08	92	0,52 ± 0,19	0,83 ± 0,04	103
3	3,94 ± 0,69	6,82 ± 0,21	96	0,71 ± 0,02	1,05 ± 0,06	113
4	5,97 ± 0,09	8,69 ± 0,33	91	1,14 ± 0,01	1,42 ± 0,05	93
5	8,57 ± 0,06	11,8 ± 0,78	108	2,54 ± 0,22	2,80 ± 0,24	87
6	6,98 ± 0,32	9,57 ± 0,06	86	0,94 ± 0,08	1,22 ± 0,13	93
7	7,86 ± 0,36	10,87 ± 0,71	100	1,78 ± 0,25	2,05 ± 0,21	90
8 ⁶	2,62 ± 0,08	5,54 ± 0,51	97	0,58 ± 0,11	0,86 ± 0,15	93

¹Ca adicionado: 5,0 mg L⁻¹; ²Mg adicionado: 0,30 mg L⁻¹; ³Mn adicionado: 0,15 mg L⁻¹; ⁴Fe adicionado: 3,0 mg L⁻¹ e ⁵Zn adicionados: 0,30 mg L⁻¹; ⁶Adição do padrão à base de óleo.

Tabela 3.6 – Concentrações (mg L^{-1}) de Ca, Mg, Mn, Fe e Zn encontradas nas amostras de óleo de palma analisadas, utilizando extração induzida por quebra de emulsão e digestão por via seca.

<i>Metal</i>	<i>Método</i>	<i>Método de</i>	<i>T calculado</i>
	<i>EIEB</i>	<i>incineração</i>	
Ca	4,87 ± 0,23	5,11 ± 0,09	-1,30
Mg	1,19 ± 0,52	1,28 ± 0,12	-0,38
Mn	0,61 ± 0,15	0,58 ± 0,07	0,65
Fe	7,95 ± 0,22	8,04 ± 0,11	-1,42
Zn	2,47 ± 0,26	2,01 ± 0,11	4,12

t crítico (N=3): 4,30; EIEB: Extração induzida por quebra de emulsão (*extraction induced by emulsion breaking*)

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de planejamento de misturas com restrições e estudos adicionais de variáveis de processo permitiram o desenvolvimento eficiente de um método confiável para a determinação de Ca, Mg, Mn, Fe e Zn a partir de óleo de palma baseado na emulsificação ultrassônica e extração induzida por quebra de emulsão. O método proposto apresenta várias vantagens em relação aos métodos de digestão decomposição ácida e mineração, como simplicidade, uso de padrões aquosos para calibração e baixas possibilidades de perdas de analito e contaminação. Também contribui para a economia de reagentes químicos, uma vez que evita o uso de grandes volumes de ácidos oxidantes, peróxido de hidrogênio e solventes orgânicos. A determinação dos analitos estudados a partir de amostras de óleo de palma foi realizada com sucesso, mostrando que o método desenvolvido apresenta características analíticas adequadas que permitem sua aplicação em amostras oleosas.

CAPÍTULO IV

MÉTODO BASEADO EM EXTRAÇÃO INDUZIDA POR QUEBRA DE EMULSÃO PARA DETERMINAÇÃO DE As, Se E Hg EM AZEITE DE DENDÊ POR TÉCNICAS DE GERAÇÃO DE VAPOR ACOPLADAS A ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA ATÔMICA

4.1 INTRODUÇÃO

Óleos comestíveis são constituídos por lipídios que desempenham um importante papel na nutrição humana por atuarem na constituição de tecidos, na produção de hormônios, na absorção de vitaminas e no fornecimento de energia ao corpo [117]. O azeite de dendê bruto é extraído do mesocarpo das frutas do dendenzeiro (*Elaeis guineenses*), uma planta originária do golfo de Guiné, no continente africano. É uma fonte rica em carotenoides, vitamina E, coenzima Q10 (ubiquinona) e esteróis. A indústria alimentícia utiliza cerca de 90% da produção mundial enquanto o montante restante é destinado à fabricação de sabões, cosméticos, lubrificantes, pasta de dentes e biodiesel [118]. O azeite bruto é aquele extraído por prensagem, não passando por processos de refino industrial, sendo bastante usado nas culinárias de algumas regiões do Brasil e de alguns países do continente africano [119].

O desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis e eficazes na avaliação da qualidade química de óleos é de grande interesse para as ciências da nutrição e para a indústria de alimentos. Apesar de metais e ametais serem componentes minoritários em óleos, eles podem afetar tanto a qualidade nutricional quanto suas propriedades sensoriais além poderem se constituir em fator de contaminação e toxicidade [120]. Selênio é um nutriente essencial para o ser humano e deve ser ingerido em quantidades adequadas na alimentação. A sua ingestão segura não deve ultrapassar 400 µg/dia, pois seu excesso também é perigoso para a saúde [121]. Arsênio apresenta efeitos tóxicos e

carcinogênicos e mercúrio, por sua vez, é neurotóxico. Ambos os metais são prejudiciais aos seres vivos, mesmo em pequenas quantidades devido às suas propriedades cumulativas no organismo e sua biomagnificação ao longo da cadeia alimentar. Portanto, devem ser monitorados principalmente em alimentos para garantir a saúde e a segurança da população [122,123].

Técnicas analíticas modernas baseadas em espectrometria atômica tais como a espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) ou com forno de grafite (GF AAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e a espectrometria de fluorescência atômica (AFS) [120] são aplicadas com sucesso na análise elementar de amostras de óleos comestíveis. Para contornar as dificuldades causadas pela matriz oleosa em relação a essas técnicas, a estratégia mais comumente adotada é a mineralização da amostra [124]. Contudo, as técnicas de decomposição podem apresentar as seguintes desvantagens: contaminação ou perdas do analito por volatilização (principalmente se for empregado sistemas abertos), aumento do limite de detecção devido à necessidade de diluição para diminuir a acidez do digerido obtido, longo tempo de aplicação do procedimento, perdas do analito por impregnação no recipiente, etc [125]. Por essa razão, métodos de tratamento de amostras, tais como a emulsificação [126, 127], a extração por ácido diluído [125], a microextração líquido-líquido [128], a extração em fase sólida [129], etc vêm sendo propostos como alternativas eficientes aos métodos de decomposição.

Uma abordagem interessante para o tratamento de amostras oleosas visando a determinação de metais e ametais é a extração induzida por quebra de emulsão (EIEB) [114]. Essa extração requer a formação de uma emulsão com a amostra oleosa usando-se agitação manual [93], por vórtex [94] ou por energia de ultrassom [130]. Como a emulsão se constitui de uma grande quantidade de gotículas dispersas na fase aquosa contínua, com uma grande área de contato, isso favorece a transferência dos metais e ametais da amostra para a fase aquosa. Em seguida, a emulsão é quebrada e as fases se separam novamente ocorrendo a extração dos íons para a fase aquosa. A principal vantagem dessa estratégia é permitir lidar com um extrato aquoso ao invés da matriz oleosa

original que apresenta um alto grau de complexidade e dificuldades na análise [100].

O trabalho teve como objetivo realizar a emulsificação utilizando a energia de ultrassom seguida por extração assistida por quebra de emulsão para a determinação de As e Se em amostras de azeite de dendê empregando espectrometria de fluorescência atômica acoplada com geração de hidretos (HG-AFS) e Hg por espectrometria de fluorescência atômica acoplada à geração de vapor frio (CV-AFS). O método de extração foi otimizado utilizando-se metodologia multivariada (planejamento fatorial fracionário de dois níveis, planejamento Doehlert e função de desejabilidade) [131,132].

4.2 EXPERIMENTAL

4.2.1 Instrumentação

Para as medidas da intensidade de fluorescência do As, Se e Hg, foi usado um espectrômetro de fluorescência atômica, AFS (Modelo Lumina 3300, Aurora Biomedic Inc, Canadá) acoplado a gerador de hidretos (HG) ou vapor frio (CV) e separador gás-líquido de quartzo. Argônio (White Martins) foi usado como gás carreador e a chama foi mantida por uma reação de geração de H₂ paralela à reação de geração dos hidretos do HCl com o NaBH₄. Uma lâmpada de cátodo oco de alta intensidade (Aurora, Aurora Biomedic Inc, Canadá) foi usada como fonte de excitação dos analitos. As condições experimentais de operação do espectrômetro são dadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Parâmetros operacionais do HG-AFS para a determinação de As, Se e Hg.

Parâmetro	As	Se	Hg
Corrente da lâmpada (mA)	80	100	30
Alta voltagem de PMT (V)	400	420	360
Altura de observação do atomizador (mm)	8	8	8
Pressão do argônio (psi)	30	30	30
Razão de fluxo do carreador (mL min ⁻¹)	400	400	300
Razão de fluxo do gás de proteção (mL min ⁻¹)	800	800	800
Potência aplicada ao DBD (W)	12	12	12
Tempo de leitura (s)	6	6	6
Razão de fluxo do NaBH ₄ (mL min ⁻¹)	1.4	4.0	1.4
Razão de fluxo de amostragem (mL min ⁻¹)	4.5	4.0	4.0
Comprimento de onda de excitação e emissão (nm)	189,0	196,0	253,7

Banho de ultrassom Cristofoli (Campo Mourão, Brasil) foi usado pra a formação da emulsão. O equipamento de banho de ultrassom foi preenchido com cerca de 3 litros de água deionizada e os tubos de centrífuga de vidro de fundo cônico foram submetidos à sonicação com auxílio de garra e suporte.

4.2.2 Reagentes e amostras

Todos os reagentes usados foram de grau analítico. Água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação Purelab Classic® (Elga, High Wycombe, UK). As vidrarias usadas foram mantidas em ácido nítrico diluído (5%, v/v) por no mínimo 12 horas durante a noite e, subsequentemente, enxaguadas com água ultrapura. Solução de surfactante Triton X-114 10% (m/v) (Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA) foi preparada com água deionizada ultrapura. Ácido nítrico e clorídrico concentrados e soluções padrão (1000 mg L⁻¹) de As, Se e Hg foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). As soluções padrão de trabalho foram preparadas diariamente por diluição da solução estoque. Soluções diluídas de ácido nítrico e clorídrico foram preparados por diluição direta com água deionizada das soluções concentradas.

O agente redutor usado foi uma solução de tetraborato de sódio 2,2% estabilizada com hidróxido de sódio 0,5 % (m/v). Essa solução foi preparada diariamente usando-se reagentes de grau analítico (Merck, Darmstald, Germany) e filtrado com uma membrana de celulose de 0,45 µm. Uma solução de iodeto de potássio 10% (m/v) em ácido ascórbico 2% (m/v) foi preparada por dissolução dos reagentes em água ultrapura. Todo recipiente de polietileno usado foi enxaguado com água deionizada e solução de Extran®, descontaminada com solução de ácido nítrico 10% (v/v) por 12 horas e seco em ambiente livre de poeira antes do uso.

4.2.3 Coleta das amostras

As amostras de azeite de dendê de diferentes marcas foram adquiridas nos supermercados das cidades de Jequié e Salvador. As amostras foram armazenadas no laboratório à temperatura ambiente e digeridas no momento de realizar as extrações.

4.2.4 Otimização da extração induzida por quebra de emulsão

A otimização do método baseado na extração por quebra de emulsão dos elementos As, Se e Hg foi realizada mediante técnicas de planejamento multivariado. O planejamento fatorial fracionário de dois níveis (2^{5-1}) foi usado para realizar um estudo preliminar das seguintes variáveis: tipo de ácido (clorídrico ou nítrico) e sua concentração, tempo de sonicação, temperatura de quebra da emulsão e concentração do surfactante. Os níveis estudados e suas combinações são apresentados na Tabela 4.2. O planejamento Doehlert para três variáveis foi aplicado para a localização das coordenadas do ponto ótimo. Nessa etapa, as variáveis quantitativas que apresentaram efeitos significativos (concentração do HCl, temperatura de quebra e tempo de sonicação) foram selecionadas para otimização. A Tabela 4.3, apresenta o planejamento Doehlert usado nessa otimização. Para ambos planejamentos, os experimentos foram realizados em duplicata para a avaliação do erro experimental. Para a otimização, as amostras foram adicionadas com soluções padrões de As, Hg e Se para uma concentração final de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ antes da extração.

A função de desejabilidade visando a maximização das respostas foi aplicada para a otimização simultânea da extração dos três elementos.

4.2.5 Procedimento geral para realizar a extração por quebra de emulsão

Foram transferidos 6,0 mL da amostra de azeite de dendê (previamente homogeneizada por agitação) para tubo de centrífuga de vidro de fundo cônico. Adicionou-se 2,5 mL da solução de HCl $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ e agita-se antes de adicionar 1,5 mL de uma solução de Triton X-114 2%. Agitou-se novamente antes de levar ao banho de ultrassom por 40 min. Após esse período, a emulsão formada foi levada ao banho-maria a uma temperatura de $90 \text{ }^\circ\text{C}$ para a promoção da quebra da emulsão. Após a separação das fases, a fase aquosa foi transferida com auxílio de uma pipeta Pasteur para um recipiente de polipropileno e armazenada sob refrigeração antes da determinação.

4.2.6 Determinação de As, Se e Hg por HG-AFS

Para a determinação dos analitos, 1,0 mL da fase aquosa obtida no processo de quebra de emulsão foi transferida para um tubo tipo Falcon. Para As e Hg, foi adicionado 1,67 mL de HCl 6,0 mol L⁻¹ antes da diluição com água ultrapura até o volume de 10,0 mL. Para a determinação do Se, foi realizado a redução antes da etapa de geração de hidreto usando-se 2,0 mL uma solução de KI (10% m/v) em ácido ascórbico (2% m/v), adicionado 2,0 mL da solução de HCl 6,0 mol L⁻¹ e espera de 30 min antes da diluição para 10,0 mL com água ultrapura. As soluções obtidas foram submetidas à geração da estibina com NaBH₄ 2% (m/v) e HCl 6,0 mol L⁻¹ para subsequente determinação por espectrometria de fluorescência atômica (HG-AFS).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Otimização da extração induzida por quebra de emulsão

A eficiência da extração induzida por quebra de emulsão (EIEB) pode ser influenciada por diversas variáveis. Antes de partir para uma forma de otimização mais específica, um planejamento fatorial fracionário de dois níveis (2⁵⁻¹) foi aplicado para avaliar a significância das cinco variáveis mais comuns envolvidas no processo de extração dos elementos estudados. Os planejamentos fatoriais fracionários são empregados quando existem um grande número de variáveis e se deseja diminuir o número de experimentos a ser realizado sem haver perda da capacidade de avaliação dessa ferramenta multivariada. As variáveis estudadas foram: o tipo de ácido (TA) a concentração do ácido (CA), o tempo de sonicação (TS), a temperatura de quebra da solução (TQ) e a concentração do surfactante Triton X-114 (CS). O tipo de ácido (HNO₃ ou HCl) foi a única variável qualitativa estudada nesse planejamento. Os níveis altos (+) e baixos (-) para cada variável são apresentados na Tabela 4.2a e 4.2b com as combinações dos níveis das variáveis e as respostas obtidas (intensidade de emissão de fluorescência). Nessa matriz experimental, os efeitos principais estão confundidos com as interações de quarta ordem. Como a probabilidade dos efeitos de quarta ordem serem significantes é muito pequena, um possível efeito

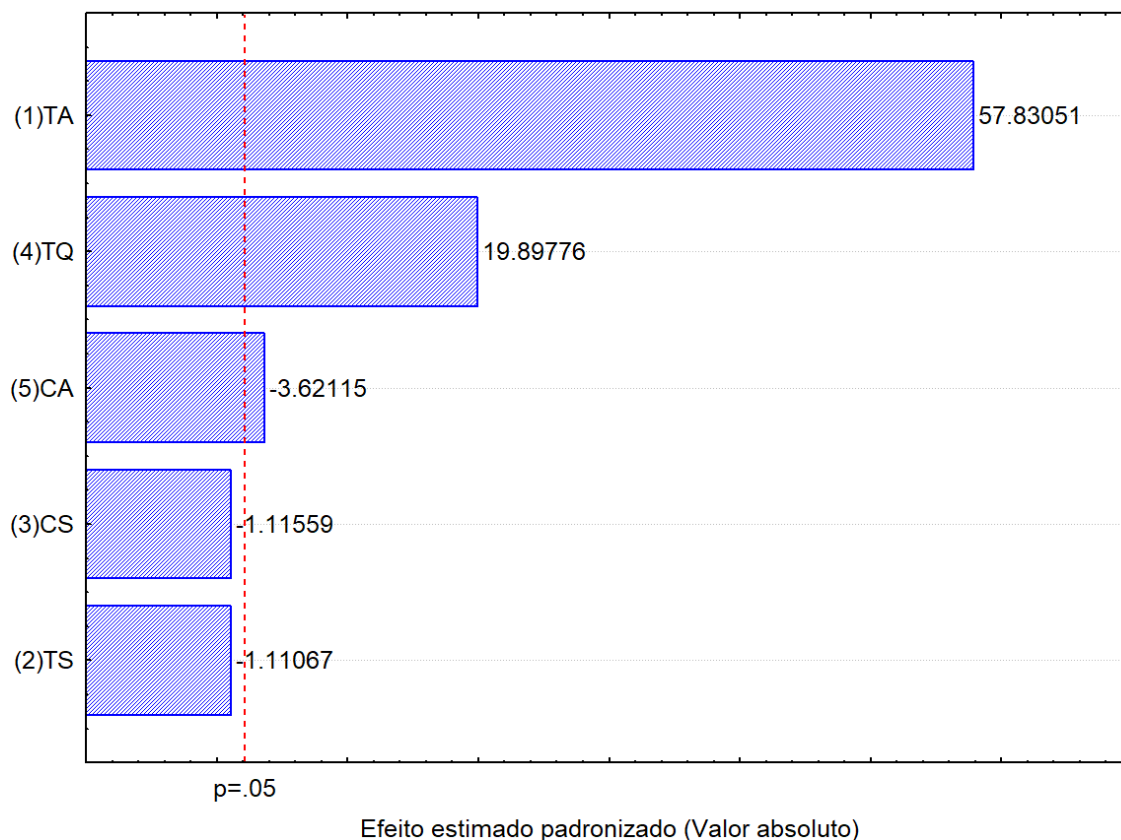
significante é atribuído ao efeito principal e não à interação. O gráfico de Pareto apresentado na Figura 4.2 mostra que três variáveis (tipo de ácido, temperatura de quebra e concentração do ácido) apresentaram efeitos significativos.

Tabela 4.2 – Planejamento fatorial fracionário de dois níveis (2^{5-1}) para o estudo preliminar de variáveis que afetam a extração por quebra de emulsão: (a) Variáveis e níveis (b) matriz experimental e resultados.

(a)								
<i>Variável</i>	<i>Nível baixo (-1)</i>			<i>Nível alto (+1)</i>				
TA	HNO ₃			HCl				
TS (min)	20			40				
CA (mol L ⁻¹)	1,0			5,0				
TQ (°C)	80			95				
CS (% m/v)	2,0			8,0				

(b)								
<i>Exp.</i>	<i>TA</i>	<i>TS</i>	<i>CS</i>	<i>TQ</i>	<i>CA</i>	<i>Intensidade de emissão</i>		
						<i>Se</i>	<i>Hg</i>	<i>As</i>
1	-1	-1	-1	-1	1	2403,6	3370,8	3884,4
						2400,2	3388,0	3851,8
2	1	-1	-1	-1	-1	4237,8	4081,2	7080,2
						4328,2	4109,2	6732,4
3	-1	1	-1	-1	-1	3102,1	3555,4	4691,6
						3050,0	3584,8	4716,2
4	1	1	-1	-1	1	4819,0	4136,4	6454,0
						4939,8	4130,6	6494,2
5	-1	-1	1	-1	-1	4236,0	3402,0	3657,8
						4245,8	3420,0	3558,1
6	1	-1	1	-1	1	5271,0	4700,4	5604,6
						5215,4	4744,0	5858,0
7	-1	1	1	-1	1	4644,8	3629,8	3491,2
						4775,2	3692,8	3514,2
8	1	1	1	-1	-1	5278,8	4574,6	5755,8
						5323,2	4586,2	5500,2
9	-1	-1	-1	1	-1	5017,2	3718,0	4082,0
						5012,8	3710,1	4498,4
10	1	-1	-1	1	1	4953,2	5396,1	6610,1
						4996,8	5419,6	6654,2
11	-1	1	-1	1	1	4575,2	3689,8	4652,0
						4672,2	3725,4	4785,1
12	1	1	-1	1	-1	5189,0	4528,8	6568,2
						5164,8	4532,2	6478,2
13	-1	-1	1	1	1	4691,2	3938,6	3848,6
						4671,4	3746,2	3767,2
14	1	-1	1	1	-1	5125,8	4906,0	6790,0
						5202,0	5066,6	7164,2
15	-1	1	1	1	-1	4712,8	4044,2	3990,4
						4709,2	4037,8	3976,2
16	1	1	1	1	1	4959,8	4678,0	5404,4
						4895,4	4714,8	5464,1

Figura 4.1 – Gráfico de Pareto tendo-se como resposta a desejabilidade global para o estudo de variáveis envolvidas na extração induzida por quebra de emulsão dos elementos As, Se e Hg e determinação por espectrometria de fluorescência atômica.



A variável qualitativa (tipo de ácido) mostrou-se altamente significativa para os processos de extração e determinação. O valor positivo de seu efeito indica que as melhores extrações ocorrem quando se usa solução de ácido clorídrico ao invés de solução de ácido nítrico. Este fato provavelmente ocorre devido ao HNO_3 oxidar o NaBH_4 diminuindo a eficiência da geração de hidreto. O HCl foi o ácido escolhido para a realização da extração. Em seguida, as três variáveis mais significativas, excluindo-se o tipo de ácido, foram selecionadas para a aplicação do planejamento Doehlert objetivando a localização mais acurada do ponto ótimo.

Para a aplicação do planejamento Doehlert, a concentração de HCl e a temperatura de quebra foram estudados em cinco níveis e o tempo de sonicação, em três níveis. A matriz experimental resultante da combinação dos níveis das variáveis e as respostas são apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Planejamento Doehlert para otimização de variáveis que afetam a extração por quebra de emulsão

<i>[HCl]</i> (mol L ⁻¹)	<i>Temperatura</i> <i>de quebra</i> (°C)	<i>Tempo de</i> <i>sonicação</i> (min)	<i>Intensidade de emissão</i>		
			<i>Se</i>	<i>As</i>	<i>Hg</i>
4	95	30	2901,6	3206,6	1737,6
			2983,4	3248,2	1533,5
3	90	20	2895,3	4347,0	1526,1
			2887,3	4324,2	1504,0
3	90	40	3345,8	3899,8	885,42
			3488,6	4038,4	888,56
5	90	20	3716,2	4102,8	939,78
			3709,1	4140,4	932,47
5	90	40	3287,4	4442,8	1455,9
			3367,0	4538,8	1474,3
2	85	30	3089,2	4195,8	1072,8
			3058,4	4364,4	1404,7
4	85	30	3105,8	4225,8	1320,0
			3152,6	4153,2	1319,2
6	85	30	3117,2	4307,4	1435,8
			3087,0	4392,4	1544,8
3	80	20	1937,6	3115,2	1238,8
			1937,3	3139,8	1333,4
3	80	40	2300,3	3260,9	1469,1
			2348,1	3199,5	1240,1
5	80	20	2093,6	3251,6	911,62
			2101,9	3257,3	918,83
5	80	40	2389,8	3289,1	1697,7
			2374,2	3277,1	1678,4
4	75	30	2039,8	2632,0	872,13
			2024,6	2762,4	806,62

A Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar a qualidade das funções matemáticas ajustadas usando-se um nível de confiança de 95%. Embora o modelo linear ($p = 0,0008 < 0,05$) e o modelo quadrático ($p = 0,02225$)

$< 0,05$) tenham apresentado falta de ajuste o último apresenta resíduos bem menores que o modelo linear e foi usado para indicar as condições ótimas. A superioridade do modelo quadrático em relação ao linear também pode ser comprovada analisando-se os gráficos de resíduos e os gráficos de valores observados versus valores preditos. Os gráficos de resíduos da Figura 4.3 mostram que os resíduos deixados pelo modelo quadrático são menores e se aproxima mais de uma distribuição normal quando comparado com os resíduos deixados pelo modelo linear. Os gráficos da Figura 4.4 mostram que há uma melhor correlação entre os valores observados e preditos quando se utiliza o modelo quadrático.

Figura 4.3 – Gráficos de valores preditos versus resíduos para (a) modelo linear e (b) modelo quadrático ajustados à desejabilidade global adotada como resposta.

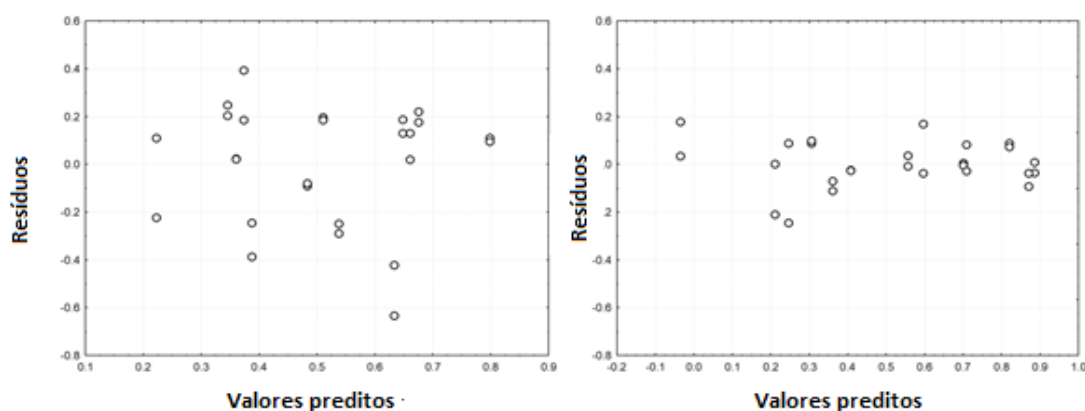
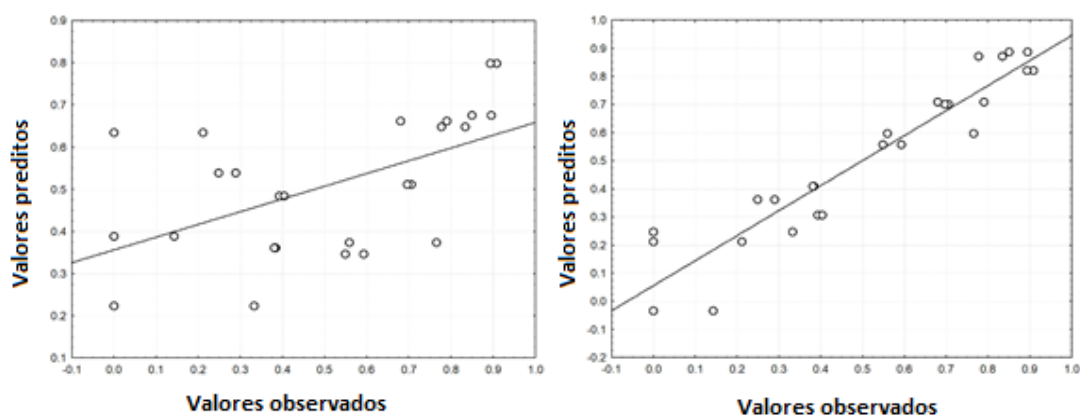


Figura 4.4 – Gráficos de valores observados versus valores preditos para (a) modelo linear e (b) modelo quadrático ajustados à desejabilidade global adotada como resposta.



Dessa forma, a função matemática quadrática foi escolhida para a descrição do comportamento da desejabilidade global e predições sobre os valores ótimos nos quais as maiores extrações dos três elementos seja possível. A equação que descreve a superfície de resposta é apresentada a seguir e os perfis de desejabilidade individuais e geral na Figura 4.5. Os termos destacados em negrito não são estatisticamente significativos no nível de confiança de 95% e podem ser descartados sem prejuízo na modelagem. Adicionalmente, a Figura 4.6 apresenta três representações dessa superfície obtidas fixando-se uma terceira variável no valor do ponto central.

$$\begin{aligned}
 DG = & - 39,5 (\pm 3,06) - \mathbf{0,206 (\pm 0,200)} C_{\text{HCl}} + \mathbf{0,00550 (\pm 0,00948)} C_{\text{HCl}}^2 + 0,8380 \\
 & (\pm 0,0654) TQ - 0,0044 (\pm 0,000380) TQ^2 + 0,2236 (\pm 0,0227) TS - 0,00180 \\
 & (\pm 0,000205) TS^2 - \mathbf{0,000600 (\pm 0,00219)} C_{\text{HCl}} TQ + 0,00870 (\pm 0,00109) C_{\text{HCl}} TS \\
 & - 0,0017 TQ TS
 \end{aligned}$$

Os valores ótimos obtidos pela análise da superfície obtida foram os seguintes: concentração de HCl de 6,0 mol/L, Temperatura de quebra da emulsão de 90 °C e tempo de sonicação de 40 min.

Figura 4.5 – Perfis de desejabilidade individuais para os três elementos estudados e perfil de desejabilidade global

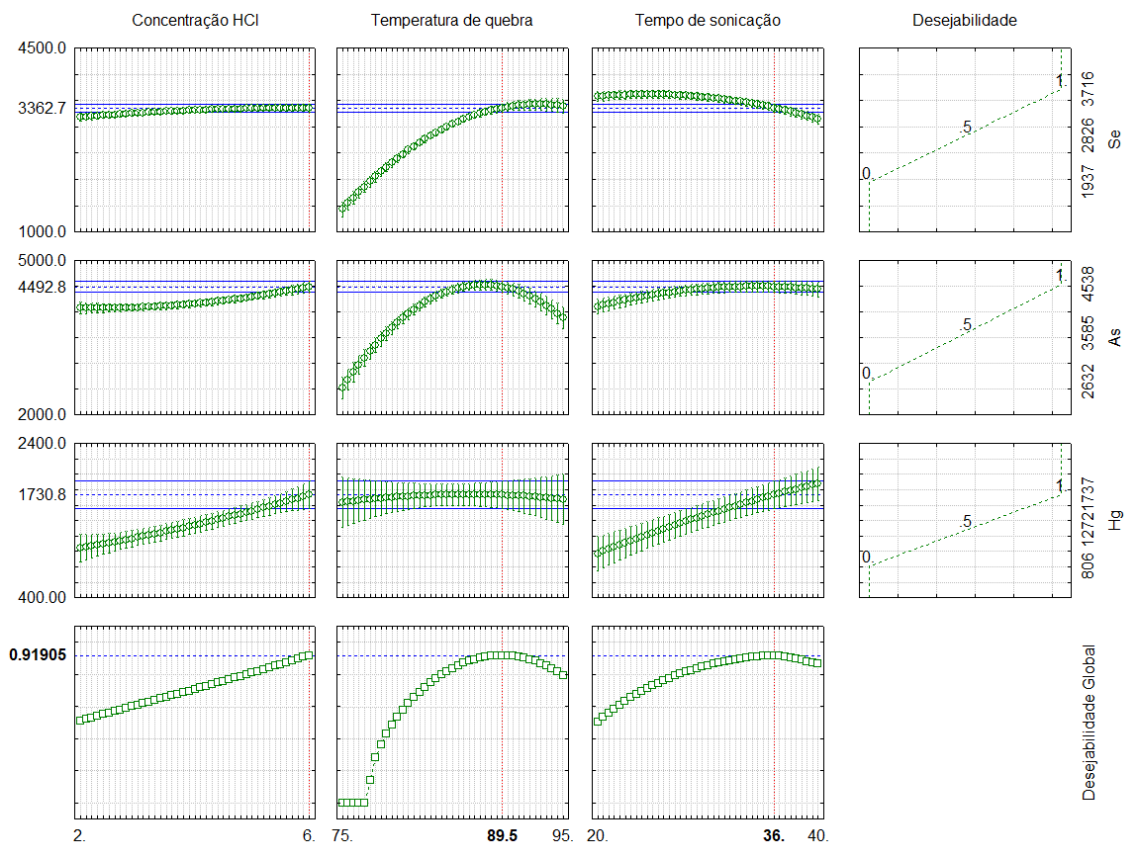
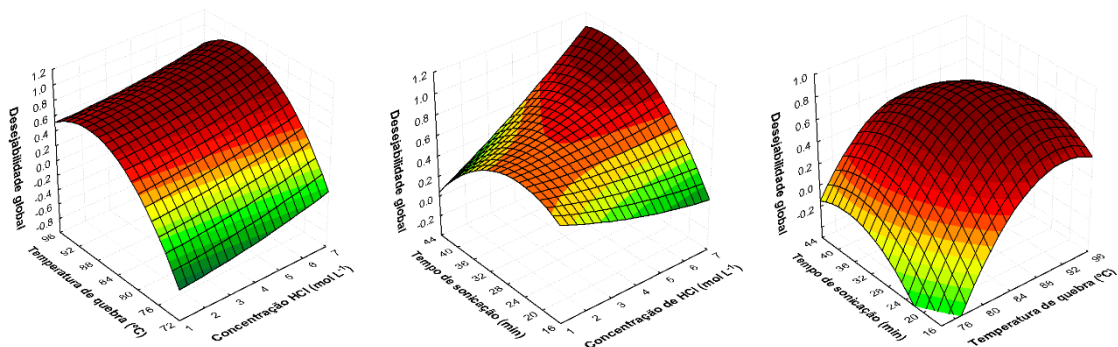


Figura 4.6 – Superfícies de respostas obtidas ajustando-se um modelo quadrático à desejabilidade global.



4.3.2 Características analíticas do método

As características analíticas do método foram estabelecidas usando-se as condições ótimas encontradas pela aplicação e avaliação dos planejamentos

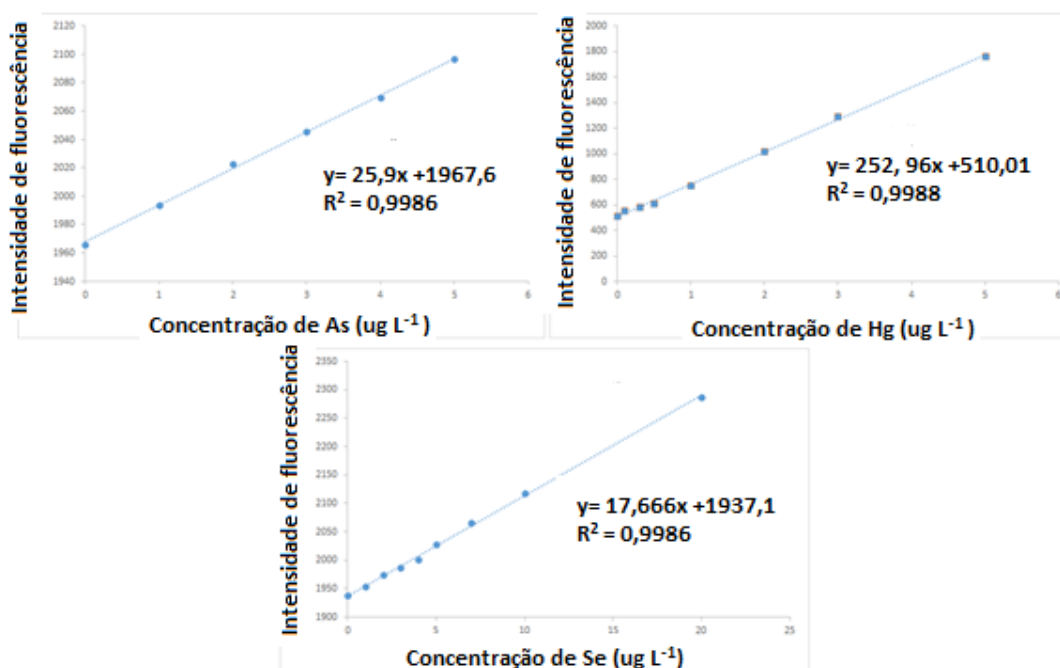
multivariados. As curvas analíticas foram preparadas de forma a simular a solução obtida pela diluição da amostra, com HCl (6,0 mol L⁻¹) e Triton X-114 (2%). Para os elementos As, Hg e Se, as soluções padrões para a construção da curva estavam entre as concentrações de 1,0 a 5,0; 0,10 a 5,0 e 1,0 a 20,0 µg L⁻¹ respectivamente. As curvas analíticas são apresentadas na Figura 4.7. Os coeficientes de determinação (R²) obtidos entre 0,9986 e 0,9988.

Os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) foram calculados com base no desvio padrão de dez medidas da solução do branco, de acordo com a seguinte expressão:

$$LD = \frac{3s}{m} \quad \text{e} \quad LQ = \frac{10s}{m}$$

Em que s é o desvio padrão amostral para as medidas do branco e m é o coeficiente angular da equação que descreve a curva analítica para o elemento em consideração.

Figura 4.7 – Curvas analíticas obtidas para os elementos As e Se por espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG-AFS) e Hg por espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV-AFS).



Para o procedimento proposto, os LD foram 0,22; 0,036 e 0,46 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os LQ foram 0,72; 0,12 e 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os elementos As, Hg e Se, respectivamente. A precisão foi avaliada na forma de repetibilidade usando-se dez medidas para cada elemento nas concentrações de 2,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e expressa na forma de desvio padrão relativo (%RSD). Os desvios padrões relativos encontrados foram 0,92 e 1,7; 2,2 e 2,5; e 3,7 e 3,5% para os elementos As, Hg e Se, respectivamente, nas duas concentrações estudadas.

A exatidão foi avaliada por testes de adição/recuperação dos analitos estudados nas amostras de azeite de dendê. Os resultados são apresentados na Tabela 4.4. Recuperações entre 90 e 111, 99,5 e 108 e 95,3 e 128% para As, Hg e Se, respectivamente, mostraram que o método de extração com base na quebra de emulsão possui exatidão satisfatória para determinação de As, Hg e Se em quantidades traço em amostras de azeite de dendê.

Tabela 4.4 – Testes de adição/recuperação ($\mu\text{g L}^{-1}$) para avaliação da exatidão do método para determinação do As, Hg e Se por espectrometria de absorção atômica acoplada às técnicas de geração de vapor (Hg e CV).

Amostra	As			Hg			Se		
	<i>Encontrado</i>	<i>Adicionado</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Encontrado</i>	<i>Adicionado</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Encontrado</i>	<i>Adicionado</i>	<i>Recuperação (%)</i>
1	1,28	0	-	<LQ	0	-	6,41	0	-
	2,34	1	106	2,09	2,0	105	9,27	3,0	95,3
2	1,58	0	-	<LQ	0	-	4,64	0	-
	2,53	1	95	2,15	2,0	108	8,05	3,0	114
3	1,52	0	-	<LQ	0	-	2,39	0	-
	2,42	1	90	1,99	2,0	99,5	5,27	3,0	96
4	1,46	0	-	<LQ	0	-	7,96	0	-
	2,57	1	111	2,16	2,0	108	11,8	3,0	128

4.3.3 Aplicação do método desenvolvido

O procedimento desenvolvido foi empregado para a determinação de arsênio, mercúrio e selênio em amostras de azeite de dendê comercializados nas cidades de Jequié e Salvador. Os resultados são apresentados na Tabela 4.5. As concentrações de mercúrio estão abaixo do limite de quantificação em todas as amostras.

Tabela 4.5 – Resultados para a determinação de As, Hg e Se ($\mu\text{g L}^{-1}$) em amostras de azeite de dendê por HG-AFS após extração induzida por quebra de emulsão.

Amostra	As	Hg	Se
1	1,27 \pm 0,25	<LQ	5,56 \pm 0,056
2	<LQ	<LQ	3,45 \pm 0,47
3	<LQ	<LQ	3,01 \pm 0,23
4	0,751 \pm 0,074	<LQ	<LQ
5	0,742 \pm 0,14	<LQ	5,46 \pm 1,6
6	<LQ	<LQ	7,12 \pm 0,17
7	1,24 \pm 0,13	<LQ	3,92 \pm 0,36
8	1,16 \pm 0,12	<LQ	5,24 \pm 0,097
9	1,21 \pm 0,23	<LQ	3,09 \pm 0,22
10	1,07 \pm 0,045	<LQ	4,18 \pm 0,14
11	1,19 \pm 0,21	<LQ	3,24 \pm 0,14
12*	0,98 \pm 0,039	<LQ	15,27 \pm 3,1
13*	1,04 \pm 0,074	<LQ	12,84 \pm 3,6

*azeite de dendê adquirido de tabuleiros de baianas após o processo de fritura

Segundo a legislação brasileira, a RDC nº42, de 29 de agosto de 2013 reporta a quantidade máxima de tolerância estabelecida para o metal Arsênio é de 0,1 mg Kg⁻¹ em amostras oleosas [133]. Para os metais Hg e Se não existem ainda regulamentações ou portaria para a quantidade máxima permitida para amostras oleosas. Encontra-se na portaria nº 33 de 1998 da Anvisa uma recomendação diária de selênio em $\mu\text{g dia}^{-1}$. A ingestão excedente desse elemento pode ocorrer a selenose, a quantidade recomendada é de 55 $\mu\text{g dia}^{-1}$ para homens e mulheres adultos. Para lactante e mulheres grávidas esse valor é um pouco maior vai de 60 a 70 $\mu\text{g dia}^{-1}$. Os Estados Unidos estabeleceu um limite máximo de 400 $\mu\text{g dia}^{-1}$ para uma pessoa adulta [134,135].

A principal fonte de contaminação de mercúrio no ser humano é através da alimentação. Esse metal é potencialmente tóxico e altamente perigoso, uma vez que é acumulativo no organismo e toda as formas do mercúrio são absorvidos no organismo. A legislação brasileira mediante o decreto nº 55871 de 1965, estabelece o valor máximo de $0,010 \text{ mg kg}^{-1}$ como limite máximo de ingestão [136].

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método analítico desenvolvido com base na extração induzida por quebra de emulsão após a promoção da emulsificação assistida por energia de ultrassom mostrou ser rápido, fácil de aplicar, confiável e eficiente na extração e determinação de arsênio, mercúrio e selênio em amostras de azeite de dendê por espectrometria de fluorescência atômica acoplado à geração de hidretos. Usando-se abordagens multivariadas foi possível selecionar e otimizar as variáveis envolvidas na extração dos três elementos estudados de forma a estabelecer as melhores características analíticas para o método desenvolvido.

A extração induzida por quebra de emulsão se constitui em um tratamento da amostra alternativo à digestão, que no caso de matrizes oleosas são de difícil ataque e decomposição. A associação a extração com a geração de hidreto ou vapor frio e determinação por AFS se mostrou viável e simples de se aplicar possibilitando uma detecção sensível, exata e confiável de As, Se e Hg em amostras de azeite de dendê.

CAPÍTULO V

DETERMINAÇÃO DE Cd E Pb EM AZEITE DE DENDÊ POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA APÓS EXTRAÇÃO INDUZIDA POR QUEBRA DE EMULSÃO

5.1 INTRODUÇÃO

Os óleos comestíveis, como o azeite de dendê, são alimentos compostos em sua maior parte por lipídios apresentando-se líquido à temperatura ambiente. O azeite de dendê corresponde atualmente a cerca de 32% da produção mundial de óleos e são usados como matéria prima na produção de diversos produtos alimentícios, cosméticos, biocombustíveis, entre outros [137]. A qualidade desses óleos é afetada pela presença de metais, mesmo em quantidades traço tendo forte influência na degradação do flavor e da estabilidade oxidativa [112].

A determinação de metais tóxicos tais como Cd e Pb em alimentos é uma demanda atual da sociedade devido ao crescimento da preocupação com a qualidade e com a segurança alimentar. Cádmio e chumbo são metais tóxicos e acumulativos no organismo sem função biológica conhecida. Prejudicam o metabolismo celular e causam efeitos deletérios a saúde humana [138,139,140]. A difusão desses elementos no ambiente e, conseqüentemente, nos alimentos se origina de atividades antropogênicas como as emissões industriais, a aplicação de fertilizantes minerais nos solos, emissões veiculares devido à queima de combustíveis fósseis, etc [141].

Cádmio se acumula principalmente no fígado e nos rins. Esforços tem sido feito para a redução de sua utilização como matéria prima na produção de pigmentos, plásticos e baterias. O acúmulo desse metal no corpo humano aumenta os riscos de câncer, doenças cardiovasculares e osteoporose [142,143]. Chumbo se acumula no esqueleto, principalmente na medula óssea.

É neurotóxico e causa alterações no comportamento e retarda o desenvolvimento mental e intelectual. Esse metal também interfere no metabolismo do cálcio e da vitamina D, afeta a formação da hemoglobina e causa anemia [144,145,138].

A determinação de metais traço como o Cd e o Pb em amostras de óleos comestíveis por técnicas de espectrometria atômica tem sido uma tarefa de difícil realização devido às baixas concentrações desses analitos e à complexidade da matriz altamente viscosa e com alto teor em substâncias orgânicas apolares de difícil ataque e decomposição [139,146]. Dessa forma, os procedimentos que envolvem emulsificação da amostra para sua introdução direta no equipamento se mostram bastante atrativos por permitir uma análise mais simples e rápida sem a perda da confiabilidade nos resultados gerados [147]. Surfactantes são muito usados para aumentar a estabilidade das emulsões formadas. Os procedimentos de emulsificação oferecem as seguintes vantagens no tratamento de amostras de óleos comestíveis: simplificação do tratamento, redução da carga de matéria orgânicas e ácidos inorgânicos fortes introduzidas no atomizador, melhorias no limite de detecção e, conseqüentemente, na exatidão e precisão, aumento da frequência analítica, estabilização da amostra, permitindo seu armazenamento por longos períodos e permite o uso de padrões inorgânicos para calibração [58,148].

Visando simplificar ainda mais a matriz introduzida no atomizador para a determinação elementar, recentemente foi proposto o procedimento de extração induzida por quebra de emulsão (EIEB) [100]. Nesse procedimento, a emulsão formada com a amostra oleosa deve ser desfeita por aquecimento ou centrifugação. A transferência quantitativa dos analitos de uma fase oleosa complexa para uma fase aquosa além de trazer todas as vantagens dos processos de emulsificação, praticamente elimina a introdução de substância orgânica no atomizador minimizando bastante algum possível efeito de matriz [114].

Empregando-se GF AAS como técnica analítica, EIEB já foi aplicada para determinação de Cr e Mn em óleos comestíveis [149], Cu, Fe, Ni e Pb em amostras de diesel, e Cu, Mn e Ni em amostras de biodiesel [150]. Nesse trabalho, um procedimento usando extração induzida por quebra de emulsão foi desenvolvido para extração de cádmio e chumbo em amostras de azeite de

dendê visando sua determinação por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.

5.2 EXPERIMENTAL

5.2.1 Instrumentação

As medidas de absorção atômica foram realizadas usando um espectrômetro de absorção atômica modelo AAnalyst 400, equipado com corretor de fundo com lâmpada de arco de deutério, forno de grafite HGA 900 (com plataforma integrada e recobertos com grafite pirolítico) como atomizador, lâmpadas de cátodo oco e amostrador automático AS 800 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Todas as medidas foram realizadas no comprimento de onda de maior sensibilidade indicado pelo equipamento para cada elemento: 228,80 nm (Cd) e 283,31 nm (Pb). Gás argônio de alta pureza (99,99%, Itaox, Brasil) foi usado para a purga e proteção dos tubos. O programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação de Cd e Pb são apresentados na Tabela 5.1. Em todos os experimentos o autoamostrador transferiu 20 microlitros da amostra ou da solução padrão para o tubo de grafite e 5,0 microlitros de modificador quando este último foi usado.

Um banho de ultrassom Cristofoli (Campo Mourão, Brazil), 42 KHz, 170 W, foi usado para promover a formação da emulsão. Também foi utilizado um banho de aquecimento Fisatom, modelo 550 (São Paulo, Brasil) com temperatura controlada por termostato capilar (± 2 °C) com faixa de controle de 50 a 120°C para quebrar as emulsões. A digestão total das amostras foi realizada em bombas de decomposição de Teflon® inseridas em invólucro de aço (Parr Instrument Company, Moline, USA). Uma estufa (Quimis, Modelo Q317 M-12, Diadema, São Paulo, Brasil) foi utilizada para aquecimento do sistema formado pelas bombas de teflon e pelo invólucro de aço.

Tabela 5.1 – Programa de temperatura do forno de grafite para a determinação de Cd e Pb na fase aquosa obtida após extração por quebra de emulsão.

<i>Etapas</i>	<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Rampa</i> (°C/s)	<i>Patamar</i> (s)	<i>Razão de fluxo do Ar</i> (mL/min)
Secagem 1	100	5	20	250
Secagem 2	140	15	15	250
Pirólise (Cd)	Sob estudo*	10	20	250
	Sob estudo* (Pb)	10	20	250
Atomização (Cd)	Sob estudo**	PTA***	5	0
	Sob estudo** (Pb)	PTA***	5	0
Limpeza	2600 (Cd)	1	5	250
	2600 (Pb)	1	5	250

*As temperaturas de pirólise após a otimização foram até 700 °C (Cd) e até 900 °C (Pb);

As temperaturas de atomização após a otimização foram de 1500 °C (Cd) e 1900 °C (Pb); *PTA: potência total durante a atomização.

5.2.2 Soluções, reagentes e amostras

Todos os reagentes usados nesse trabalho foram de grau de pureza analítica. Água ultrapura foi obtida usando um sistema de purificação Purelab modelo Classic (Elga, High Wycombe, UK). Todas as vidrarias foram imersas em solução de HNO₃ a 5% (v/v) para descontaminação por 12h e depois lavadas com água deionizada e secas em ambiente livre de poeira. As soluções de cádmio e chumbo foram preparadas a partir de diluições apropriadas dos padrões comerciais (Merck, Kenilworth, NJ, USA) com concentrações de 1000 mg L⁻¹ em solução de HNO₃ 1% (v/v). Solução de nitrato de paládio e nitrato de magnésio 1000 mg L⁻¹ (Merck, Kenilworth, NJ, USA) foram usadas como modificadores químicos para estabilizar o analito na etapa de pirólise permitindo usar uma maior temperatura. As proporções de Pd/Mg adotadas foram 5:3 (v/v).

Tubos de grafite com plataformas integradas foram revestidos com 250 μg do modificador permanente de W conforme o programa de temperatura adaptado dos estudos de Lima et al. (1998) [151] e Freschi et al. (2006)[152], em que cinco injeções de 50 μL da solução de 1000 mg L^{-1} do modificador de W foram introduzidos na superfície da plataforma com o auxílio do autoamostrador do equipamento.

Soluções de surfactante Triton X-114 (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) de 2 a 10% (v/v) foram preparadas a partir da diluição do surfactante em água ultrapura e solubilização com auxílio do banho de ultrassom.

Todas as amostras analisadas nesse trabalho foram adquiridas no comércio das cidades de Jequié e Salvador. As amostras foram levadas ao laboratório e armazenadas a temperatura ambiente e foram preparadas somente no momento da análise.

5.2.3 Construção de curvas de pirólise e atomização

O comportamento térmico do Cd e do Pb na fase extratora obtida da extração induzida por quebra de emulsão foi avaliado através das curvas de pirólise e atomização nas seguintes condições: (i) sem o uso de modificador, (ii) com o uso do modificador Pd/Mg e (iii) com o uso do modificador permanente W impregnado na parte interna do tubo (apenas para o Cd). Para a construção das curvas, usou-se o extrato obtido da quebra da emulsão formada com o azeite de dendê com adição dos metais para uma concentração final de 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para a construção das curvas de pirólise tanto para o Cd quanto para o Pb, adotou-se uma temperatura de atomização de 1600 $^{\circ}\text{C}$. Para a construção das curvas de atomização para o Cd e para o Pb (veja as Figuras 5.1 e 5.2), adotou-se a temperatura de pirólise ótima encontrada em cada caso, respectivamente. Todas as medidas feitas foram baseadas em absorvância integrada.

5.2.4 Otimização da extração induzida por quebra de emulsão

A otimização da extração induzida por quebra de emulsão dos metais Cd e Pb em amostras de azeite de dendê foi realizada por técnicas multivariadas (planejamento Doehlert e função de desejabilidade). As variáveis estudadas foram, de acordo com a literatura [153], as que mais influenciam no processo de extração: concentração da solução de Triton X-114 (2 a 8% v v⁻¹), a concentração da solução de HNO₃ (0,5 a 2,5 mol L⁻¹) e o tempo de sonicação (10 a 20 min). Uma amostra na qual foi adicionada os metais estudados para uma concentração final de 20,0 µg L⁻¹ foi utilizada em todos os ensaios de otimização. A função de desejabilidade foi aplicada com o objetivo de encontrar as melhores condições para a extração simultânea dos dois metais. Os experimentos realizados são apresentados na Tabela 5.2. Para todos os experimentos, as emulsões formadas foram quebradas a uma temperatura de 90 °C e uma alíquota de 20 µL do extrato coletado foi introduzido no forno de grafite para a determinação. As análises estatísticas foram realizadas empregando o software Statistica 7.0 (tendo-se sempre um nível de confiança de 95%).

5.2.5 Procedimento da extração induzida por quebra de emulsão após otimização

Após a otimização, a emulsificação assistida por energia de ultrassom e a extração por indução por quebra de emulsão visando a determinação de Cd e Pb nas amostras de azeite de dendê foi realizada da seguinte forma: 5,0 mL da amostra de azeite de dendê foi transferida para um tubo de fundo cônico de vidro de 50 mL de capacidade. Em seguida, foi adicionado 0,8 mL de ácido nítrico 2,0 mol L⁻¹ e 2,2 mL do surfactante Triton X-114 4,4% (v v⁻¹). A mistura foi agitada manualmente de forma vigorosa e submetida à sonicação por 18 min para formar a emulsão. Após a obtenção da emulsão, o tubo de vidro foi transferido para um banho-maria à temperatura de 90 °C por 30 min para promover a quebra da emulsão e separação das fases aquosa (com os analitos) e oleosa. A fase aquosa foi coletada e transferida para um recipiente e armazenada em refrigerador até o momento da determinação dos metais por GF AAS.

5.2.6 Procedimento para decomposição das amostras usando-se bombas de teflon

Uma alíquota de 100 mg de uma amostra de azeite de dendê foi transferida para uma bomba de Teflon® e, em seguida, adicionou-se 2,0 mL de HNO₃ concentrado e 0,5 mL de H₂O₂ 30% v v⁻¹. A bomba foi inserida em um invólucro de aço e levada a aquecimento em estufa à 120 °C por 12 horas. Após resfriamento completo, a bomba foi aberta, o digerido obtido foi diluído à 5,0 mL em balão volumétrico e levado para determinação de Cd e Pb por GF AAS.

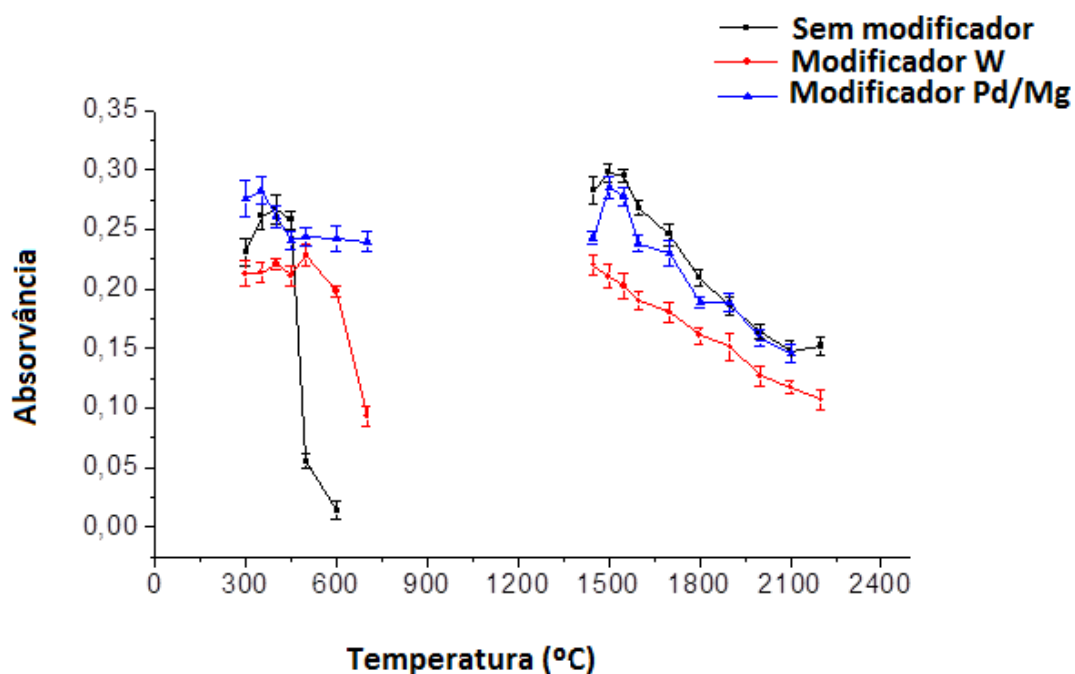
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Estudo das curvas de pirólise e atomização

Para o desenvolvimento de um método usando espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) necessita-se, em primeiro lugar, realizar a otimização da programação de temperatura. As programações de temperatura em GF AAS englobam geralmente quatro etapas: a secagem, a pirólise, a atomização e a limpeza. As duas etapas que são geralmente mais críticas na obtenção de um sinal analítico são a pirólise e a atomização. Dessa forma, curvas de pirólise e atomização para o Cd e o Pb foram feitas visando estudar o comportamento térmico desses analitos na ausência e na presença de modificadores.

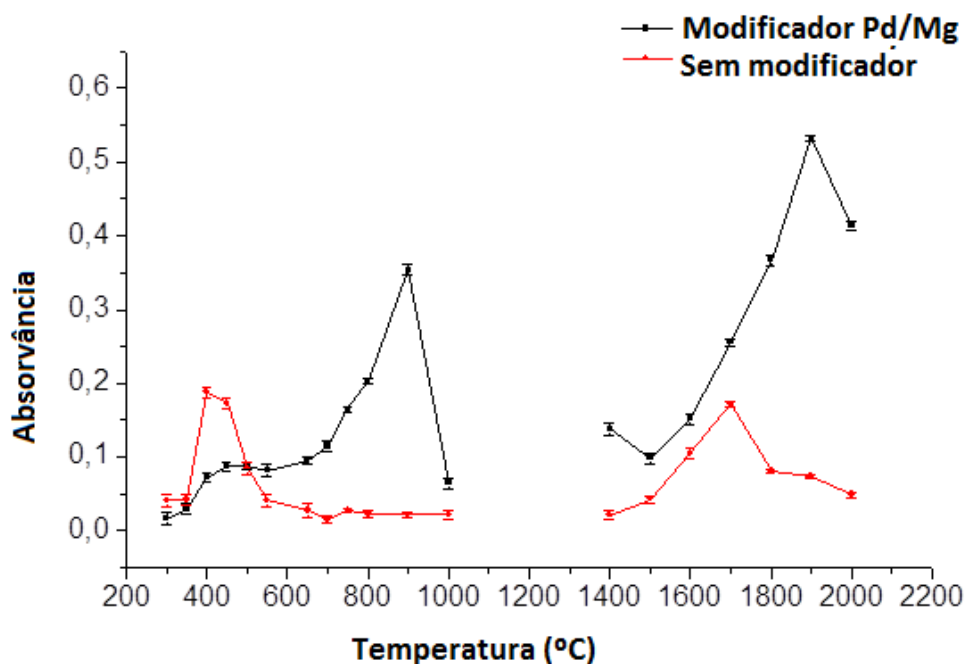
Na Figura 5.1 são apresentadas as curvas de pirólise e atomização para o Cd adicionado ao extrato da quebra de emulsão de uma amostra de azeite de dendê. Nota-se que, realizando-se a pirólise sem modificador o sinal começa a diminuir drasticamente a partir de 400 °C. Usando-se o modificador Pd/Mg, o sinal permaneceu constante até pelo menos 700 °C e usando o modificador permanente de W o sinal começa a cair em 550 °C. Para as curvas de atomização nota-se que, fixando-se a pirólise na temperatura de 400, 700 e 550 °C para as curvas sem modificador, com modificador Pd/Mg e com modificador permanente de W, o sinal atinge uma magnitude ótima em 1500 °C e começa a decrescer paulatinamente a partir desse ponto.

Figura 5.1 – Curvas de pirólise e atomização para o Cd adicionado ao extrato da quebra de emulsão do azeite de dendê para uma concentração final de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Para a construção da curva de pirólise a temperatura de atomização foi fixada em $1600 \text{ }^\circ\text{C}$ e para a construção das curvas de atomização, a temperatura de pirólise foi fixa em $500 \text{ }^\circ\text{C}$ (curva sem modificador), 700°C (usando-se modificador Pd/Mg) e 550°C (usando-se modificador permanente de W).



Na Figura 5.2 são apresentadas as curvas de pirólise e atomização para o Pb. Nesse caso, há uma grande perda do analito quando as temperaturas de pirólise são maiores que $400 \text{ }^\circ\text{C}$ ao não se utilizar o modificador Pd/Mg. Na presença do modificador foi possível atingir temperaturas próximas de $900 \text{ }^\circ\text{C}$ sem que haja perda de chumbo. Para a atomização, a presença do modificador mais uma vez mostrou-se importante. Sem modificador, o sinal vai aumentando até $1700 \text{ }^\circ\text{C}$ e a partir desse ponto começa a cair. Com o modificador Pd/Mg, a temperatura de atomização que permitiu obter o maior sinal foi $1900 \text{ }^\circ\text{C}$.

Figura 5.2 – Curvas de pirólise e atomização para o Pb adicionado ao extrato da quebra de emulsão do azeite de dendê para uma concentração final de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Para a construção da curva de pirólise a temperatura de atomização foi fixada em $1600 \text{ }^\circ\text{C}$ e para a construção das curvas de atomização, a temperatura de pirólise foi fixa em $400 \text{ }^\circ\text{C}$ (curva sem modificador) e $900 \text{ }^\circ\text{C}$ (curva com modificador Pd/Mg).



Esses resultados mostram que é possível que o modificador usado estabilize grande parte do teor de Cd e de Pb dentro do forno de grafite sem que os mesmos sejam perdidos por volatilização durante a etapa de pirólise. Conseqüentemente, pode-se usar temperaturas de pirólise maiores do que aquelas que são possíveis usar sem modificador. Essa alta temperatura contribuiu para que ocorresse uma queima mais eficiente do extrato obtido após a EIEB que, apesar de ser menos carregada em termos de compostos orgânicos, ainda possui resquícios da matriz oleosa original e do surfactante. Dessa forma, o uso do modificador Pd/Mg é recomendado para um bom desempenho na determinação desses dois metais.

As temperaturas escolhidas como ótimas respectivamente para a pirólise e para atomização são 700 e $1500 \text{ }^\circ\text{C}$ para o Cd e 900 e $1900 \text{ }^\circ\text{C}$ para o Pb usando o modificador Pd/Mg.

5.3.2 Otimização multivariada

Variáveis que, segundo a literatura, apresentam grande influência na extração induzida por quebra de emulsão foram otimizadas usando uma matriz de Doehlert para três variáveis (Tabela 5.2). A função de desejabilidade foi aplicada para possibilitar a otimização simultânea da extração dos dois metais. Nessa abordagem, os dois conjuntos de dados (sinais do Cd e do Pb) são transformados em escalas adimensionais (desejabilidade individuais) que variam de 0 a 1 segundo uma função matemática específica, que nesse caso, visou a maximização do sinal analítico. Estas funções podem ser facilmente encontradas em artigos de revisão sobre o assunto. Assim, quanto mais próximo de 1 for a resposta obtida, mais se estará maximizando a resposta. Em seguida estas respostas devem ser combinadas para se obter a desejabilidade global (D) calculando-se a seguinte média geométrica:

$$D = \sqrt{d_{Cd} d_{Pb}}$$

Dessa forma, otimizando-se D, estaremos otimizando simultaneamente as extrações de Cd e Pb usando-se a EIEB, serão otimizados.

A Tabela 5.2 apresenta a matriz de planejamento Doehlert para a otimização de três variáveis estudadas (a concentração do Triton X-114, a concentração de HNO₃ e o tempo de sonicação) e as respostas em termos de sinal de absorvância para os dois metais.

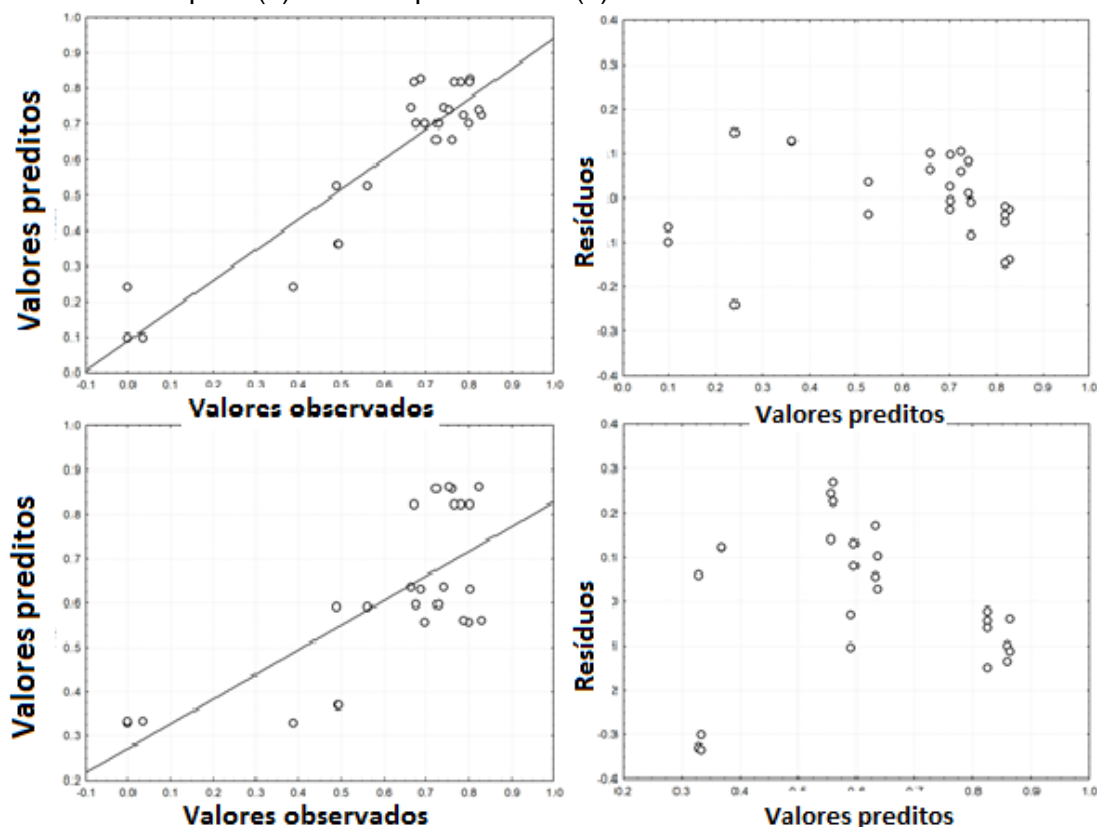
Tabela 5.2 – Planejamento Doehlert e respostas (absorbâncias) para a otimização da extração induzida por quebra de emulsão do Cd e do Pb em amostras de azeite de dendê.

<i>Exp</i>	<i>Conc X-114 (%v/v)</i>	<i>Triton [HNO₃] (mol L⁻¹)</i>	<i>Tempo sonicação (min)</i>	<i>Absorvância do Pb</i>	<i>Absorvância do Cd</i>
1	10	1,5	15	0,225	0,989
				0,286	1,004
2	8	1,0	10	0,351	0,792
				0,343	0,847
3	8	1,0	20	0,354	0,766
				0,407	0,724
4	8	2,0	10	0,430	0,640
				0,417	0,620
5	8	2,0	20	0,523	0,878
				0,485	0,773
6	6	0,5	15	0,516	0,681
				0,585	0,744
7	6	1,5	15	0,557	0,668
				0,563	0,576
8	6	2,5	15	0,587	0,787
				0,572	0,740
9	4	1,0	10	0,583	0,643
				0,581	0,534
10	4	1,0	20	0,603	0,642
				0,583	0,617
11	4	2,0	20	0,596	0,687
				0,621	0,679
12	4	2,0	20	0,580	0,688
				0,607	0,512
13	2	1,5	15	0,629	0,702
				0,595	0,643

Para descrever o comportamento dos dados obtidos pela aplicação do planejamento Doehlert, verificou-se aos dados da Tabela 5.2 uma função linear e uma função quadrática. Os modelos ajustados podem ser avaliados aplicando-se o teste de falta de ajuste com auxílio de parâmetros obtidos de uma Análise de Variância (ANOVA). Tanto o modelo linear ($p = 0,00018 < 0,05$), quanto o modelo quadrático ($p = 0,005193 < 0,05$) apresentaram falta de ajuste para um nível de confiança de 95%. Outra forma de avaliar a qualidade do ajuste é usando-se os gráficos (i) de valores observados versus valores preditos e (ii) de valores preditos versus resíduos. Esses gráficos são apresentados na Figura 5.3.

Nota-se que, apesar de também apresentar falta de ajuste, o modelo quadrático (gráficos 5.3a e 5.3b) consegue descrever melhor o comportamento dos dados do que o modelo linear (gráficos 5.3c e 5.3d). O gráfico 5.3a mostra uma correlação entre os valores observados e os valores preditos melhor que a apresentada no gráfico 5.3c. Os resíduos deixados pelo modelo quadrático (gráfico 5.3b) também são menores e mostram uma maior tendência a seguir uma distribuição gaussiana do que os resíduos deixados pelo modelo linear (gráficos 5.3d). Assim, o modelo quadrático foi escolhido para indicar os valores ótimos, ou seja, as condições experimentais que permitem a maior extração dos metais e, conseqüentemente, os maiores sinais de absorvância.

Figura 5.3 – Gráficos obtidos pelo ajuste de modelos matemáticos à desejabilidade global obtida dos dados da Tabela 5.2. Gráficos de valores observados versus valores preditos para (a) o modelo quadrático e (c) modelo linear e gráficos de valores preditos versus resíduos para (b) modelo quadrático e (d) modelo linear.

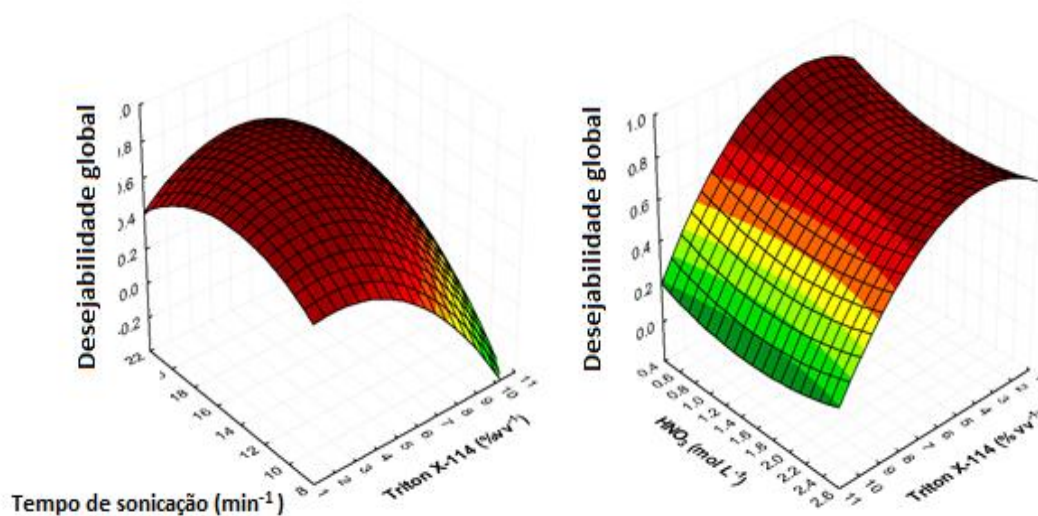


O modelo quadrático ajustado à desejabilidade global gerou uma superfície de resposta descrita pela seguinte equação:

$$\begin{aligned}
 DG = & 0,983 (\pm 0,645) - 0,00530 (\pm 0,0726) (TX) - 0,0131 (\pm 0,00477) (TX)^2 - 0,962 \\
 & (\pm 0,359) (CA) + 0,0756 (\pm 0,0763) (CA)^2 + 0,0653 (\pm 0,0571) (TS) - 0,00478 \\
 & (\pm 0,00174) (TS)^2 + 0,00383 (\pm 0,0263) (TX)(CA) + 0,00631 (\pm 0,00263) (TX)(TS) \\
 & + 0,0441 (\pm 0,0105) (CA)(TS)
 \end{aligned}$$

Como apenas pode-se representar três dimensões no gráfico e uma delas está reservada para a resposta, pode-se visualizar três superfícies parciais combinando-se as três variáveis duas a duas. Duas dessas superfícies de respostas parciais geradas por essa equação são mostradas na Figura 5.4.

Figura 5.4 – Duas superfícies de resposta parciais obtidas pelo ajuste de um modelo matemático quadrático à resposta obtida (desejabilidade global) combinando-se os dados obtidos para o Cd e para o Pb após aplicação do planejamento Dohelert na otimização da EIEB.

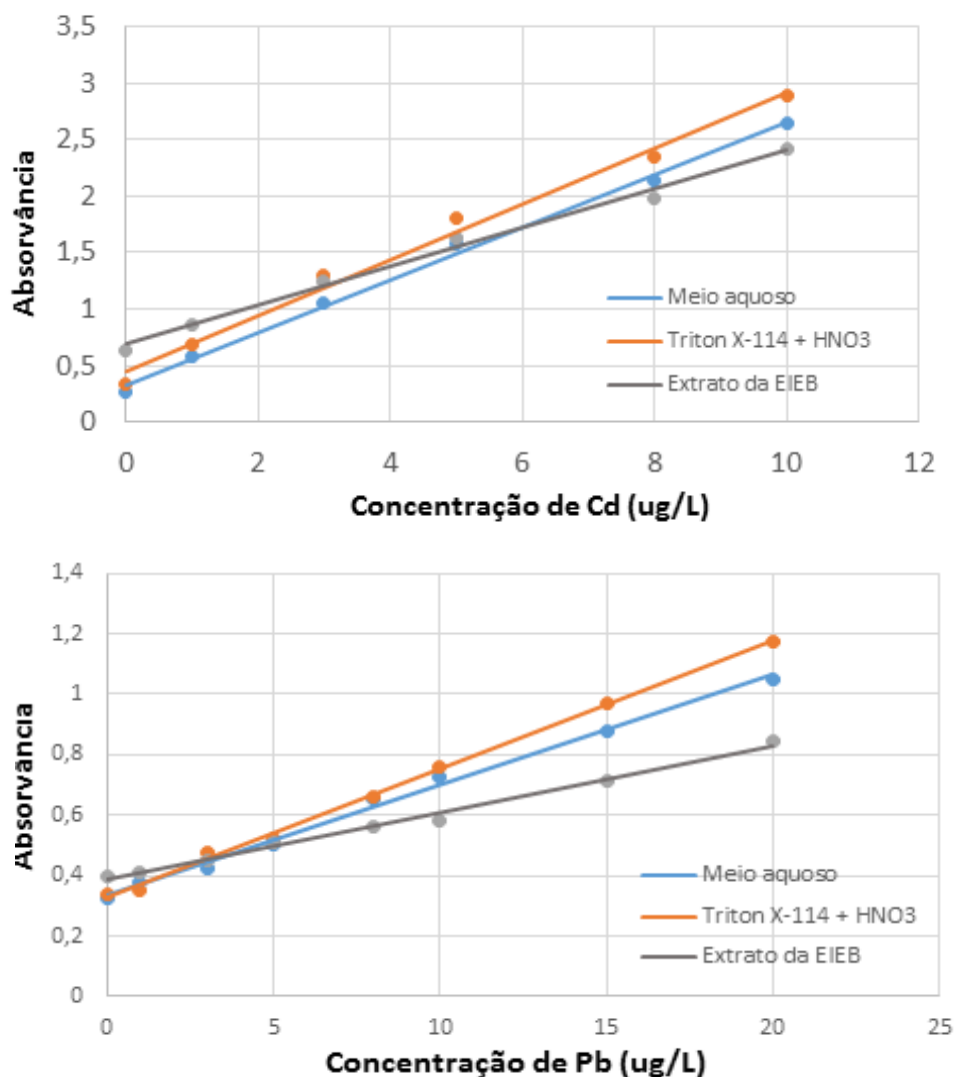


Analisando-se as superfícies parciais pode-se observar que as maiores respostas são obtidas quando se tem as seguintes condições experimentais: concentração do surfactante Triton X-114 de 4,4%, concentração da solução de HNO₃ de 2,0 mol L⁻¹ e tempo de sonicação de 18 min.

5.3.3 Estudo do efeito de matriz

O extrato obtido após a aplicação da extração induzida por quebra de emulsão possui características únicas que podem causar efeito de matriz. Para avaliar se o extrato (obtido usando-se as condições ótimas) apresenta efeito de matriz na determinação do Cd e do Pb, foram construídas curvas analíticas nos seguintes meios: (i) aquoso, (ii) Triton X-114 10% (v v⁻¹) e HNO₃ 2,0 mol L⁻¹ e (iii) extrato da EIEB obtida do azeite de dendê. Essas curvas analíticas são apresentadas na Figura 5.5 e seus parâmetros são apresentados na Tabela 5.3.

Figura 5.5 – Curvas analíticas preparadas em diferentes meios para o estudo do efeito de matriz na determinação de (a) Cd e (b) Pb.



Para avaliar os meios e estratégias de calibração, adotou-se como critério considerar não haver efeito de matriz quando existir intersecção entre os intervalos de inclinação (NC = 95%) entre as curvas analíticas. Observando-se os intervalos de confiança da inclinação das curvas analíticas para o Cd e do Pb, nota-se que o extrato obtido da EIEB se difere dos outros dois meios e, portanto, recomenda-se usar a técnica de calibração por adição padrão para uma determinação exata desses metais.

Tabela 5.3 – Parâmetros que descrevem as curvas analíticas no estudo do efeito de matriz do extrato da EIEB para determinação de Cd e Pb.

<i>Metal</i>	<i>Meio</i>	<i>Estratégia de calibração</i>	<i>Curva analítica</i>	<i>R²</i>	<i>I.C. da inclinação**</i>	
Cd	Aquoso	Padronização externa	$A = 0,2331$ $C_{Cd} + 0,3286$	0,9963	0,2134	a 0,2529
	Triton X-114 10% + HNO ₃ 2 mol L ⁻¹	Padronização externa	$A = 0,2472$ $C_{Cd} + 0,4492$	0,9898	0,2123	a 0,2820
	Extrato EIEB*	da Adição-padrão	$A = 0,1711$ $C_{Cd} + 0,6932$	0,9928	0,1509	a 0,1914
Pb	Aquoso	Padronização externa	$A = 0,03646$ $C_{Pb} + 0,3347$	0,9954	0,03398	a 0,03894
	Triton X-114 10% + HNO ₃ 2 mol L ⁻¹	Padronização externa	$A = 0,04237$ $C_{Pb} + 0,3294$	0,9977	0,04036	a 0,04438
	Extrato EIEB*	da Adição-padrão	$A = 0,02207$ $C_{Pb} + 0,3869$	0,9916	0,02004	a 0,02409

*realizada nas condições ótimas; **usando-se um nível de confiança de 95% IC. Intervalo de confiança

5.3.4 Características analíticas do método

As características analíticas do método desenvolvido para determinação de Cd e Pb foram avaliadas para a validação do método. Assim, limites de detecção (critério 3σ) e quantificação (critério 10σ), precisão (repetibilidade) e sensibilidade foram estabelecidos nas condições encontradas como ótimas. Estas características são apresentadas na Tabela 5.4. Nota-se pelos LQ obtidos que o método possui capacidade de determinar os metais estudados nas amostras de azeite de dendê, como será mostrado mais adiante.

Tabela 5.4 – Características analíticas do método desenvolvido para a determinação de Cd e Pb em amostras de azeite de dendê após extração assistida por quebra de emulsão.

<i>Metal</i>	<i>Cd</i>	<i>Pb</i>
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,048	0,037
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,16	0,12
Repetibilidade (%RSD)	2,8 ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) e 1,8 (105 $\mu\text{g L}^{-1}$)	2,9 ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) e 5,4 (105 $\mu\text{g L}^{-1}$)
Sensibilidade analítica ($\text{Abs}/\mu\text{g L}^{-1}$)	0,171	0,0220

A determinação de metais tóxicos como Cd e Pb em alimentos, é uma preocupação constante, uma vez que esses metais podem provocar danos irreversíveis aos seres humanos. No entanto, existem poucas regulamentações para limites máximos permitidos desses metais por órgão reguladores nesses tipos de amostras na legislação brasileira. Há uma regulamentação para o Cd de $1,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ e para Pb de $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ a RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. [133,133].

Yang e colaboradores avaliaram a concentração de metais tóxicos como Cd e Pb em sementes oleaginosas. Os autores desenvolveram um procedimento de extração usando os complexantes $\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, $\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$, $(\text{NH}_4)_2\text{EDTA}$ em diferentes concentrações, temperatura e pH na determinação por ICP OES, obtiveram valores abaixo do recomendado ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$) após sucessivas extrações [154] Ansari et al. determinaram Cd, Pb e Zn em diferentes marcas de óleo de girassol utilizando o método de digestão ácida e determinação por absorção atômica obtendo os seguintes limites de detecção $0,327$, $3,38$, $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para Cd, Pb e Zn, respectivamente, com valores altos de recuperação [155]. Dugo et al determinaram os metais Cd, Cu, Pb e Zn em amostras de amendoim comercial usando decapagem potenciométrica derivada (dPSA), girassol, óleos de soja, milho, arroz, uva e avelã, um tempo de eletrólise de 120s foi usado para análise dos óleos vegetais, onde obteve maiores limites de detecção $0,9$; $0,7$; $0,5$; $0,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ [156]. Canário et. al. utilizaram um atomizador de filtro aquecido transversal (THFA) para a determinação direta de Cd e Pb em óleos comestíveis, usando o espectrômetro de absorção atômica em amostras de azeitona, abacate, semente de uva, girassol, salada e óleo de cozinha. A

determinação foi realizada diretamente utilizando n-heptano para a diluição dessas amostras. Foi utilizado um padrão orgânico-metálico, Conostan S-21 para a calibração. O resultado das determinações foram utilizados a calibração externa e o método de adição do analito. Os limites de detecção para o Cd e Pb foram: $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$, valores estimados utilizando os dados relativos as amostras de azeite 2 e ao óleo de salada, derivados dos dados 2,8 para a azeitona e óleos vegetais $0,9 - 3 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cd e $6 - 8 \mu\text{g L}^{-1}$ para Pb. Os limites de detecção dos metais em estudos estavam bem abaixo da concentração do recomendado pelo Departamento de Saúde da África do sul, onde é permitido ma concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cd e $300 \mu\text{g L}^{-1}$ para Pb [157].

5.3.5 Avaliação da exatidão e aplicação da metodologia às amostras de azeite de dendê

A exatidão do método proposto foi avaliada realizando-se testes de adição/recuperação (testes spike) e comparação dos resultados com aqueles gerados por um método alternativo (apenas para o Pb) que foi a decomposição por via úmida em bomba de teflon. A verificação da exatidão do método usando-se material de referência certificado (CRM) não pode ser aplicado, visto que não há esses tipos de materiais disponíveis para metais em óleos comestíveis.

As Tabelas 5.5 e 5.6 mostram as concentrações encontradas e os resultados obtidos do teste de adição/recuperação para seis amostras de azeite de dendê aplicando-se o método desenvolvido.

Tabela 5.5 – Aplicação do método desenvolvida com base na EIEB na determinação de Cd em amostras de azeite de dendê por GF AAS e teste da adição/recuperação.

<i>Amostra</i>	<i>Concentração adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Concentração encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Recuperação (%)</i>
1	0	$1,87 \pm 0,094$	-
	5	$7,14 \pm 0,21$	105
2	0	$2,31 \pm 0,39$	-
	5	$7,91 \pm 0,31$	112
3	0	$1,73 \pm 0,16$	-
	5	$7,11 \pm 1,20$	108
4	0	$1,81 \pm 0,09$	-
	5	$6,24 \pm 1,20$	88,5
5	0	$1,40 \pm 0,23$	-
	5	$6,31 \pm 2,10$	98,2
6	0	$1,39 \pm 0,24$	-
	5	$6,79 \pm 0,76$	108

Observando-se a Tabela 5.5, verifica-se que os teores de Cd nas seis amostras de azeite de dendê analisadas variaram entre 1,39 e 2,31 $\mu\text{g L}^{-1}$. Recuperações entre 88,5 e 112% da concentração de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd adicionado mostraram que o método apresenta exatidão adequada para a determinação confiável do metal nessa matriz.

Os resultados apresentados na Tabela 5.6 mostram que as concentrações de Pb nas seis amostras de azeite de dendê analisadas ficaram na faixa de 2,36 a 6,29 $\mu\text{g L}^{-1}$. Adicionalmente, foram obtidas recuperações entre 99,0 e 112% do Pb adicionado para a realização desse teste. Esses valores mostram que o método apresenta exatidão adequada para a determinação de chumbo em azeite de dendê.

Tabela 5.6 – Aplicação do método desenvolvida com base na EIEB na determinação de Pb em amostras de azeite de dendê por GFAAS e teste da adição/recuperação

<i>Amostra</i>	<i>Concentração adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Concentração encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Recuperação (%)</i>
1	0	$6,29 \pm 0,18$	-
	5	$11,5 \pm 1,8$	105
2	0	$3,68 \pm 0,44$	-
	5	$8,75 \pm 0,72$	101
3	0	$4,98 \pm 0,14$	-
	5	$9,93 \pm 0,18$	99,0
4	0	$3,79 \pm 0,62$	-
	5	$9,24 \pm 1,50$	109
5	0	$2,36 \pm 0,14$	-
	5	$7,97 \pm 0,19$	112
6	0	$4,33 \pm 0,50$	-
	5	$9,47 \pm 0,028$	103

Para o chumbo, a exatidão ainda foi avaliada em uma amostra de azeite de dendê (amostra 2) aplicando-se um método de decomposição adotado como padrão, a decomposição em bomba de teflon. A determinação também foi realizada por GF AAS e esse valor foi considerado como verdadeiro para efeitos de considerações estatísticas. O valor de Pb encontrado foi $4,04 \pm 0,22 \mu\text{g L}^{-1}$. Comparando-se o valor obtido na EIEB ($3,68 \pm 0,44 \mu\text{g L}^{-1}$) e aplicando-se o teste t (NC = 95%), considera-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre os dois valores ($t_{\text{calc}} = 2,004 < t_{\text{crit}} = 2,776$).

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método desenvolvido apresentou características analíticas adequadas para a determinação de Cd e Pb por GF AAS em azeite de dendê após emulsificação assistida por energia de ultrassom e extração induzida por quebra de emulsão. A aplicação de matriz de Doehlert possibilitou a otimização do método de forma rápida e eficiente. O uso do modificador Pd/Mg foi imprescindível na obtenção de uma temperatura de pirólise mais alta e eficiente para a queima dos resquícios da matriz original e do surfactante que ainda se encontram no extrato obtido da EIEB. Foi constatado efeito de matriz para os dois metais estudados quando se comparou as inclinações das curvas analíticas. Portanto, determinações exatas demandam a construção de curvas analíticas por adição padrão no extrato obtido após o procedimento de extração. A aplicação do método em seis amostras de azeite de dendê revelou que o Cd e o Pb, variaram, respectivamente de 1,39 a 2,31 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de 2,36 a 6,29 $\mu\text{g L}^{-1}$.

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Os métodos desenvolvidos viabilizaram a determinação de espécies químicas em amostras de azeite de dendê comercializados no Estado da Bahia utilizando a emulsificação assistida por energia de ultrassom seguida de extração induzida por quebra de emulsão (EIEB) empregando espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) e espectrometria de fluorescência atômica acoplada às técnicas de geração de vapor químicos (HG-AFS e CV-AFS).

Métodos multivariados de otimização, tais como, planejamento fatorial fracionário de dois níveis, planejamento Doehlert e função de desejabilidade possibilitaram o estudo das condições experimentais que geraram as melhores respostas e, conseqüentemente, as melhores características analíticas para os métodos analíticos desenvolvidos.

O extrato obtido da quebra de emulsão é uma matriz bem menos complexa que a original, evita procedimentos em condições mais severas de decomposição que muitas vezes (para amostras oleosas) não se mostram tão eficientes e reprodutíveis. A matriz obtida por EIEB não apresentam problemas na introdução nos equipamentos e permitem utilizar padrões metálicos aquosos na calibração.

A determinação de Ca, Mg, Mn, Fe e Zn utilizando o planejamento de misturas com restrições mostrou ser muito interessante, uma vez que permitiu otimizar as proporções dos reagentes afim de obter uma maior facilidade de quebra da emulsão. O procedimento avaliado apresentou boa exatidão e precisão, evidenciadas por percentuais quantitativos de recuperação e pelos desvios padrão relativo e foram alcançados baixos LD e LQ.

A utilização da fluorescência atômica com geração de hidreto apresenta uma boa alternativa na determinação de As, Se e Hg associada a extração induzida por quebra de emulsão, pois apresentou facilidade de manuseio, alta

sensibilidade, ampla faixa linear e, comparado a outras técnicas, apresenta baixo custo. Aliada ao planejamento fatorial fracionário de 2 níveis e o planejamento Doehlert apresentou velocidade de análise, uma vez que apresentou um número menor de experimentos.

O planejamento Doehlert em função da desejabilidade permitiu encontrar as melhores condições para a determinação de Cd e Pb, com um número reduzido de experimentos, diminuindo custo e análise. O uso do modificador Pd/Mg apresentou uma ótima alternativa na determinação dos analitos nas amostras de azeite de dendê, promovendo um bom sinal durante as análises.

A possibilidade do uso da técnica de calibração externa com padrões aquosos na determinação de As, Ca, Cd, Hg, Mg, Mn, Se, Fe, Pb e Zn nas amostras de azeite de dendê proporcionou uma maior simplicidade ao procedimento estabelecido, tornando-o apropriado para determinação por diferentes técnicas utilizadas nesses trabalhos.

Como perspectivas é sugerido a investigação de novas abordagens na extração induzida por quebra de emulsão, como o uso de reagentes complexantes de metais na melhoria da extração permitindo tempos menores de execução do procedimento, o acoplamento da EIEB com a extração no ponto nuvem ou a extração em fase sólida para aumentar o fator de enriquecimento dos analitos, a aplicação das metodologias desenvolvidas na análise de amostras de azeite de dendê de várias procedências e também comparar os níveis dos elementos estudados antes e depois do preparo de frituras como o acarajé, entre outros usos.

REFERÊNCIAS

- [1] Felzenszwalb, I.; Mazzei, J. L. C.; Feitosa, S.; Aiub, C. A. F.; Almeida, D. T.; Toxicological assessment of crude palm oil (*Elaeis guineensis* Jacq.) used in deep frying of akara (cowpea paste finger food). **Grasas Aceites**, 65,1-8, 2014.
- [2] Almeida, D.T.; Nunes, I.L.; Conde, P. L.; RosA, R. P. S.; Rogerio, W. F.; Machado, E. R.. A quality assessment of crude palm oil marketed in Bahia, Brazil. **Grasas Aceites**, 64,384–394, 2013.
- [3] Mba, O. I.; Dumontn, M-J.; Ngadi, M. Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry – A review. **Food Bioscience**, 10, 26 – 41, 2015.
- [4] Kalinka, K. Cultura de palma é a nossa promessa agrícola para Amazônia. Manaus: amigos da Terra – Amazôniabrasileira, 2002.
- [5] Rist, L., Feintrenie, L., Levang, P. The livelihood impacts of oil palm: smallholders in Indonesia. **Biodiversity and Conservation**, 19 -1009,1024, 2010.
- [6] Wicke, B.; Sikkema, R.; Dornburg, V.; Faaij, A. Exploring land use changes and the role of palm oil production in Indonesia and Malaysia. **Land Use Policy**. 28:193-206, 2011.
- [7] Sambanthamurthi, R.; Sundram, K.; Tan, Y. A. Chemistry and biochemistry of palm oil. **Progress in Lipid Research**, 39, 6, 507-558, 2000.
- [8] Indelicato, S., Bongiorno, D., Pitonzo, R., Di Stefano, V., Avellone, G., Triacylglycerols in edible oils: Determination, characterization, quantitation, chemometric approach and evaluation of adulterations, **Journal of Chromatography A**, 1515,1-16, 2017.
- [9] Majchrzak, T., Wojnowski, W., Dymerski, T., Gębicki, J., Namieśnik, J., Electronic noses in classification and quality control of *edible oils*: A review, **Food Chemistry**, 246, 192-201, 2018.
- [10] Spatari, C., De Luca, M., Ioele, G., Ragno, G.: A critical evaluation of the analytical techniques in the photodegradation monitoring of edible oils, **LWT - Food Science and Technology**, 76A,147-155, 2017.

-
- [11] Fan, L., N. A. Eskin, M.,: The use of antioxidants in the preservation of edible oils, **Handbook of Antioxidants for Food Preservation**, 373-388, 2015.
- [12] Mba, O.I.; Dumont, M.J.; Ngadi, M. Palm oil: processing, characterization and utilization in the food industry – A review, **Food bioscience**, 10, 26 – 41, 2015.
- [13] INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia 2010, Relatório sobre análise de gordura e colesterol azeite de oliva e de dendê. Diretoria de Qualidade, Brasil.
- [14] CONDEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO). Codex Standard for named vegetable oils. Disponível em <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/home/en/> acessado em 29 março de 2018, às 18:30h.
- [15] Aprenda a Plantar. Disponível em: <https://aprenderaplantar.com.br/frutas/como-plantar-dende/> acessado em 14 de agosto de 2019.
- [16] INDESCO - Instituto desenvolvimento social e cultural Omidewá. Disponível em http://omidewa.com.br/public_html/arquivos/751 acessado 14 de agosto de 2019
- [17] C, Maitê S., Preservação dos componentes minoritários e desacidificação dos óleos de palma e farelo de arroz por resina aniônica forte – Tese de Doutorado, Unicamp, 2015.
- [18] Almeida, D.T.D., Nunes, I.L., Conde, P.L., Rosa, R.P.S., Rogério, W.F., Machado, E.R. A quality assessment of crude palm oil marketed in Bahia, Brazil. **Grasas y Aceites**, 64(4), 387–394,2013.
- [19] Yasin,M, H, M., Mamat, R. G., Najafi, Ali, O. M., Ali, M. H.: Potentials of palm oil as new feedstock oil for a global alternative fuel: A review, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 79, 1034-1049, 2017.
- [20] Masani, M. Y. A., Izawati, A. M. D., Rasid, O. A., Parveez, G. K. A.,Biotechnology of oil palm: Current status of oil palm genetic transformation, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 15, 335-347, 2018.
- [21] Associação Brasileira de Produtores de Óleo de Palma. <http://www.abrapalma.org/pt/a-palma-no-brasil-e-no-mundo/> acessado em 29 de marco de 2018, às 17:30h.

-
- [22] Saswattecha, K., Kroeze, C., Jawjit, M., Hein, L.,: Options to reduce environmental impacts of palm oil production in Thailand, **Journal of Cleaner Production**, 137,370-393, 2016.
- [23] Meijide, A., Röhl, A., Fan, Y., Herbst, M., Knohl, K.,: Controls of water and energy fluxes in oil palm plantations: Environmental variables and oil palm age, **Agricultural and Forest Meteorology**, 239, 71-85, 2017.
- [24] Oosterveer, P., Promoting sustainable palm oil: viewed from a global networks and flows perspective, **Journal of Cleaner Production**, 107, 1-8, 2014.
- [25] Silalertruksa, T., Gheewala, S.H., Pongpat, P., Kaenchan, P., Mungkung, R., Environmental sustainability of oil palm cultivation in different regions of Thailand: Greenhouse gases and water use impact, **Journal of Cleaner Production**, 167, 1009-1019, 2017.
- [26] Corley, R.H.V. How much palm oil do we need? **Environmental Science & Policy**, 12 134-139, 2009.
- [27] Basiron, Y. Palm Oil. In: SHAHIDI, F. (Ed.). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 6. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., v. 2, cap. 8, p.333-429, 2005.
- [28] Ferreira, D, C: *Azeite De Dendê Microencapsulado: Uma Alternativa Para Preservação De Compostos Bioativos – Dissertação de Mestrado*, UFBA, 2015.
- [29] Lody, R. *Dendê símbolo e sabor*. São Paulo. Ed. SENAC, 2009 Lody, R. *Dendê: bom de comer, de ver e de significar a matriz africana no Brasil*. In: —. *Dendê: símbolo e sabor da Bahia*. São Paulo: Editora SENAC, p.9-24, 2009.
- [30] Mesquita, A.S., *Do azeite de dendê de Ogum ao palm oil commodity: uma oportunidade que a Bahia não pode perder*, **Bahia Agrícola** (Brasil). v. 5(1) p. 22-27
- [31] Curvelo FM. 2010. *Uma Imersão no Tabuleiro da Baiana: O Estudo do Óleo de Palma Bruto (*Elaeis guineensis*)*. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal da Bahia, Brasil, 13-103, 2002.
- [32] SUDETUR, *Roteiros Ecoturísticos da Bahia – Costa do Dendê*. Secretaria da Cultura e Turismo/Superintendência de desenvolvimento do turismo. Coleção Selo Turismo 2, Salvador.

-
- [33] Silva, I.R.; Diagnostico geo-ambiental como subsídio para o desenvolvimento turístico sustentável da costa do Dendê, Bahia, Brazil
- [34] Oi-Ming Lai, Chin-Ping Tan, Casimir C. Akoh (Orgs), Palm Oil: production, processing, characterization, and uses, AOCS press, 2012
- [35] Mohd Omar, A. K.,Tengku Norsalwani, T. L.,Asmah, M.S., Badrulhisham, Z. Y.,Nik Norulaini, N. A.,; Implementation of the supercritical carbon dioxide technology in oil palm fresh fruits bunch sterilization: A review, **Journal of CO₂ Utilization**, 25, 205-215, 2018.
- [36] Owolarafe, O.K., Faborode, M.O., Ajibola, O.O. Comparative evaluation of the digester–screw press and a hand-operated hydraulic press for palm fruit processing. **Journal of Food Engineering**, 52(3),249–255, 2002.
- [37] Poku, K. Small-scale palm oil processing in Africa. FAO agricultural services bulletin, Rome Italy: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 148, 56, 2002.
- [38] Obibuzor, J.U., Okogbenin, E.A., Abigor, R.D. Oil recovery from palm fruits and palm kernel. In O.M. Lai, C.P. Tan, C.C. Akoh (Eds.), Palm oil: Production, processing, characterization and uses Urbana, Illinois, USA: AOCS Press, pp.299–328, 2012.
- [39] Corley, R.H.V., Tinker, P.B. The products of the oil palm and their extraction. In R.H.V. Corley, P.B. Tinker (Eds.). The oil palm (4th ed.). Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. pp. 445–466, 2003.
- [40] Gonçalves, C.B., Rodrigues, C. E. C., Marcon, E. C., Meirelles, A. J. A.,: Deacidification of palm oil by solvent extraction, **Separation and Purification Technology**, 160, 106-111, 2016.
- [41] Nor Aini, I., Hasmadi, M., Mamot, S., Radzuan, J.: Palm oil and sunflower oil: Effect of blend composition and stirrer types during fractionation on the yield and physicochemical properties of the oleins. **Journal of Food Lipids**, 12, 48–61, 2005.
- [42] Akinyeyea RO, Adeyeye EI, Fasakina O, Agboolaa A. Physico-chemical properties and anti-nutritional factors of palm fruit products (*Elaeis Guineensis*

Jacq.) from Ekiti State Nigeria. **Electronic Journal Environmental Agricultural Food Chemistry**, 10, 2190-2198, 2011.

[43] Nelson, David L.; Cox, Michael, *Princípios de Bioquímica de Lehninger - 6^a Ed.* 2014

[44] Giugliano, R; *fundamentos da nutrição*, Brasília,: universa, 2000.

[45] Dugo G, La Pera L, La Torre GL, Giuffrida D.: Determination of Cd(II), Cu(II), Pb(II), and Zn(II) content in commercial vegetable oils using derivative potentiometric stripping analysis. **Food Chemistry**, 87, 639–645, 2004.

[46] Coco, F.L, Ceccon, L., Ciraolo, L., Novelli V.: Determination of cadmium (II) and zinc (II) in olive oils by derivative potentiometric stripping analysis. **Food Control**, 14, 55–59, 2003.

[47] Hart, A.D., Oboh, C.A., Barimalaa, I.S., Sokari, T.G., *Afr. J.*: Estimation of Iron, Copper and Zinc in Some Vegetables Commonly Consumed in Amassoma, Niger Delta, Nigeria, **Food Nutrition**, 13, 742-745, 2005.

[48] Allen, L.B., P.H. Siitonen, H.C. Thompson, *J. Am.*: Determination of copper, lead, and nickel in edible oils by plasma and furnace atomic spectroscopies Oil, **Chemical Society**, 75, 477, 2008

[49] Sahan, Y. F., Basoglu, Trace metals in olive oil, V International Symposium on Olive Growing, 719-723, 2008.

[50] Asemave, K., Ubwa, S.T., Anhwange, B. A., Gbaamende, A. G.: Comparative Evaluation of Some Metals in Palm Oil, Groundnut Oil and Soybean Oil from Nigeria, **International Journal of Modern Chemistry**, 1(1): 28-35, 2012.

[51] Adepoju-Bello AA, Osagiede AS, Oguntibeju OO, Evaluation of the Concentration of Some Toxic Metals in Dietary Red Palm Oil, **Journal of Bioanalysis & Biomedicine**, 4, 092-095, 2012.

[52] Aigberua, A. O., Ovuru, K. F., Izah, S. C., Evaluation of Selected Heavy Metals in Palm Oil Sold in Some Markets in Yenagoa Metropolis, Bayelsa State, Nigeria, **EC Nutrition**, 11.6, 244-252, 2017.

[53] Szydłowska-Czerniak A., Trokowski K, Karlovits G., Szlyk E,: Spectroscopic determination of metals palm oils from different stages of the

technological process, **Journal Agricultural Food Chemistry**, 61, 2276-2283, 2013.

[54] Nnorom, I.C., Alagbaoso, J.E., Amaechi, U.H., Kanu, C., Ewuzie, U., Determination of Beneficial and Toxic Metals in Fresh Palm Oil (*Elaeis guineensis* Jacq.) from South-Eastern Nigeria: Estimation of Dietary Intake Benefits and Risks, **Journal of Scientific Research & Reports**, 3 (16): 2216-2226, 2014

[55] Daltin, D.: Tensoativos: Química, propriedades e aplicações. Ed Blucher: São Paulo, Brazil, 2011

[56] Meyers, D.: Surfaces, interfaces and colloids: Principles and applications. VCH Publishers: New York, USA, 1991.

[57] Burguera, J.L. and Burguera, M.: Analytical applications of emulsions and microemulsions. **Talanta**, 96: 1- 20, 2012.

[58] Viana, C., Bohrer, D., Carvalho, L.M., Nascimento, P.C., Rosa, M.B.: Emulsified systems for metal determination by spectrometric methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 53: 49-59, 2014.

[59] Suslick, K.S.: Applications of ultrasound to materials chemistry. **MRS Bulletin**: 29-34, 1995.

[60] Lisboa, T.M. Clasen, D.C. Vellar, S.C.D. Orestes, Q.E. Saint Pierre, D. Ribeiro, S.A. and Vieira, A.M.: An easy and fast procedure for the determination of Ca, Cu, Fe, Mn, Mg, Na, K and Si in biodiesel by ICP OES using emulsification as sample preparation strategy. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, 25: 143-151, 2014.

[61] Peshkovsky, A.S. Peshkovsky, S.L. and Bystryak, S.: Scalable high-power ultrasonic technology for the production of translucent nanoemulsions. **Chemical Engineering and Processing**, 69: 77–82, 2013.

[62] Brum, D.M.: Extração induzida por quebra de emulsão: uma nova estratégia para determinação de metais traços em amostras de óleo. *Ph.D. Thesis* – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, Brazil, 2011.

-
- [63] Salager, J.L.: Formulation concepts for the emulsion maker. In: Pharmaceutical Emulsions and Suspensions, Nielloud, F., Marti-Mestres, G. Marcel Dekker: New York, USA, pp. 20-54, 2000.
- [64] Suslick, K.S.: Applications of ultrasound to materials chemistry. MRS Bulletin: 29-34, 1995.
- [65] Korn, M.A., Andrade, M.V.A.S.: Procedimentos analíticos assistidos por ultrassom. **Analytica**, 3 (2): 34-39, 2003.
- [66] Webster, E.: Cavitation. In: Ultrasonics. Webster, E. Imperial College Press: London, UK, pp. 2-3, 1963.
- [67] Castro, L.M.D. and Capote, P.F.: Lesser known ultrasound-assisted heterogeneous sample-preparation procedures. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 26 (2): 154-162, 2007.
- [68] Suslick, K.S.: Applications of ultrasound to materials chemistry. MRS Bulletin: 29-34, 1995.
- [69] Mason, T.J. and Lorimer, J. P., Sonochemistry: Theory, Applications and Uses of Ultrasound in Chemistry. Ellis Horwood: Chichester, UK, pp. 4, 1988.
- [70] Borges, S.S., Korn, M. Geração sonoquímica de oxidantes em solução aquosa saturada de tetracloreto de carbono. **Química Nova**, 25 (4): 558-562, 2001.
- [71] Martines, M.A.U. Davolos, M.R. and Junior, M..J.: O efeito do ultrassom na química. **Química Nova**, 23: 251-256, 2000.
- [72] WOOD, W. LOOMIS, A.L. The physical and biological effects of highfrequency sound waves of great intensity, **Philosophical Magazine Journal of Science**, 44, 417-436, 1927.
- [73] Luque, G.J.L. and Castro, M.D.L.: Ultrasound: a powerful tool for leaching. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 22 (1): 41-47, 2003.
- [74] Bezerra, M. A.; Ferreira, S.L.C.; Extração em ponto nuvem: princípios e aplicações em química analítica. Ed. Edições UESB: Vitória da Conquista, 2006.
- [75] Pelizzetti, E. and Pramauro, E.: Analytical applications of organized molecular assemblies. **Analytica Chimica Acta**, 169: 1-29, 1985.

-
- [76] Santos, D.S. Teixeira, A.P. Barbosa, J.T.P. Ferreira, S.L.C. Korn, M.G.A. and Teixeira, L.S.G.: Use of Cetyltrimethylammonium bromide as surfactant for the determination of copper and chromium in gasoline emulsions by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, 62: 1072-1077, 2007.
- [77] Maniasso, N.: Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, 24: 87-93, 2001.
- [78] Sanz, M. A. Campa, M.R.F. Gonzalez, E.B., Fernandez, S. M.L.: Organised surfactant assemblies in analytical atomic spectrometry. **Spectrochimica Acta B**, 54: 251-287, 1999.
- [79] Aulton, M.: Delineamento de formas farmacêuticas. 2nd ed. Artmed: Porto Alegre, Brazil, 2005.
- [80] Thompson, J.: A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos. Artmed: Porto Alegre, Brazil, 2006.
- [81] Somasundaran, P. Wines, T.H. Mehta, S.C. Gartin, N. and Farinato, R. Surfactants in Personal Care Products and Decorative Cosmetics. 3rd ed. CRC Press: Florida, USA, 2006.
- [82] Sinko, P.J.: Martin: físico-farmácia e ciências farmacêuticas. 5th ed. Artmed: Porto Alegre, Brazil, 2008.
- [83] Santos, D. S. S., Teixeira, A. P., Korn, M. G. A., and Teixeira, L. S. G. Determination of Mo and V in multiphase gasoline emulsions by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, 61: 592–595, 2006.
- [84] Lavilla, I., Cabaleiro, N., Costas, M., la Calle, I., and Bendicho, C. Ultrasound-assisted emulsification of cosmetic samples prior to elemental analysis by different atomic spectrometric techniques. **Talanta** 80: 109–116. 2009.
- [85] Myers, D.: Surfactant Science and Technology. 3rd ed. Wiley-Interscience: New Jersey, USA, 2006.
- [86] Leggli, C. V. S., Bohrer, D., Nascimento, P. C., Carvalho, L. M., and Garcia, S. C. Determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc,

and iron in emulsified egg samples by flame atomic absorption spectrometry.

Talanta, 80: 1282–1286, 2012.

[87] Vicentino, P.O. Brum, D.M., Cassella, R.J.: Development of a method for total Hg determination in oil samples by cold vapor atomic absorption spectrometry after its extraction induced by emulsion breaking. **Talanta**, 132: 733-738, 2015.

[88] Allen, L.V.: The Art, Science, and Technology of Pharmaceutical compounding. American Pharmaceutical Association: Washington, USA, 1998.

[89] Sousa, P.F.: Nova Alternativa na quebra de emulsões de Petróleo – Sistemas Microemulsionados. *Master Thesis – Programa de Pós-Graduação em Química*, Universidade Federal do Rio Grande do Norte: Natal, Brazil, 1993.

[90] Vicentino, P. O., Cassella, R. J. Novel extraction induced by microemulsion breaking: A model study for Hg extraction from Brazilian gasoline. **Talanta** 162: 249–255, 2017.

[91] Angle, W.C.: Chemical Demulsification of sable Crude oil and Betume Emulsions in Petroleum Recovery. In: *Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology*, Sjoblom, J. Marcel Dekker: Trondheim, Norway, 2004.

[92] Shaw, J.D.: *Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies*. Edgard Blucher: São Paulo, Brazil, 1975

[93] Bakircioglu, D. Kurtulus, Y.B. and Yurtsever, S.: Comparison of extraction induced by emulsion breaking, ultrasonic extraction and wet digestion procedures for determination of metals in edible oil samples in Turkey using ICP-OES. **Food Chemistry**, 138: 770-775, 2013.

[94] Bakircioglu, D. Topraksever, N. and Kurtulus, Y.B.: Determination of zinc in edible oils by flow injection FAAS after extraction induced by emulsion breaking procedure. **Food Chemistry**, 151: 219-224, 2014.

[95] Robaina, N.F. Brum, D.M., Cassella, R.J.: Application of the extraction induced by emulsion breaking for the determination of chromium and manganese in edible oils by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 99: 104-112, 2012.

-
- [96] He, Y.M. Chen, J.J. Zhou, Y. Wang, X.J. and Liu, X.Y.: Extraction induced by emulsion breaking for trace multi-element determination in edible vegetable oils by ICP-MS. **Analytical Methods**, 6: 5105-5111, 2014.
- [97] Bakircioglu, D. Topraksever, N., Kurtulus, Y.B.: Separation/Preconcentration System Based on Emulsion-Induced Breaking Procedure for Determination of Cadmium in Edible Oil Samples by Flow Injection-Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Food Analytical Methods**, 8: 2178, 2015.
- [98] Corazza, M.Z., Tarley, C.R.T.: Development and feasibility of emulsion breaking method for the extraction of cadmium from omega-3 dietary supplements and determination by flow injection TS-FF-AAS. **Microchemical Journal**, 27: 145-151, 2016.
- [99] Cassella, R.J. Brum, D.M. Robaina, N.F. Rocha, A.A. and Lima, C.F.: Extraction induced by emulsion breaking for metals determination in diesel oil by ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 27: 364-370, 2012.
- [100] Cassella, R.J. Brum, D.M. Paula, C.E.R., Lima, C.F.: Extraction induced by emulsion breaking: a novel strategy for the trace metals determination in diesel oil samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 25: 1704-1711, 2010.
- [101] Cassela, R.J. Brum, D.M. Lima, C.F. Caldas, L.F. S., De Pala, C.E.R.: Multivariate optimization of the determination of zinc in diesel oil employing a novel extraction strategy based on emulsion breaking. **Analytica Chimica Acta**, 690: 79-85, 2011.
- [102] He, Y.M. Ling, Z.X. Zhou, Y.; Ahmad, F., Zhao, F.F.: Application of extraction induced by emulsion breaking for trace multi - element determination in jet fuel by inductively coupled plasma – mass spectrometry. **Spectroscopy Letters**, 49: 37-43, 2016.
- [103] Trevelin, A.M. Marotto, R.E.S. De Castro, E.V.R. Brandão, G.P. Cassela, R.J., Carneiro, M.T.W.D.: Extraction induced by emulsion breaking for determination of Ba, Ca, Mg and Na in crude oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Microchemical Journal**, 124: 338-343, 2016.

-
- [104] Caldas, L.F.S. Brum, D.M. Paula, C.E.R. and Cassella, R.J.: Application of the extraction induced by emulsion breaking for the determination of Cu, Fe and Mn in used lubricating oils by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 110: 21-27, 2013.
- [105] He, Y.M. Zhao, F.F. Zhou, Y. Ahmad, F. and Ling, Z.X.: Extraction induced by emulsion breaking as a tool for simultaneous multi-element determination in used lubricating oils by ICP-MS. **Analytical Methods**, 7: 4493-4501, 2015.
- [106] Vicentino, P.O. Brum, D.M., Cassella, R.J.: Development of a method for total Hg determination in oil samples by cold vapor atomic absorption spectrometry after its extraction induced by emulsion breaking. **Talanta**, 132: 733-738, 2015.
- [107] Pereira, F.M. Brum, D.M. Lepri, F.G., Cassella, R.J.: Extraction induced by emulsion breaking as a tool for Ca and Mg determination in biodiesel by fast sequential flame atomic absorption spectrometry (FS-FAAS) using Co as internal standard. **Microchemical Journal**, 117: 172-177, 2014.
- [108] Pereira, F.M. Zimpeck, R.C. Brum, D.M. and Cassella, R.J.: Novel extraction induced by emulsion breaking as a tool for the determination of trace concentrations of Cu, Mn and Ni in biodiesel by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 117: 32-38, 2013.
- [109] Akpanabiatu, M. I., Ekpa, O. D., Mauro, A., Rizzo, R.; Nutrient composition of Nigerian palm kernel from the dura and tenera varieties of the oil palm (*Elaeis guineensis*). **Food Chemistry**, 72(2), 173-177, 2001.
- [110] Hameed, B. H., Lai, L. F., & Chin, L. H.; Production of biodiesel from palm oil (*Elaeis guineensis*) using heterogeneous catalyst: An optimized process. **Fuel Processing Technology**, 90(4), 606-610.2009.
- [111] Cabrera-Vique, C., Bouzas, P. R., & Oliveras-Lopez, M. J.; Determination of trace elements in extra virgin olive oils: A pilot study on the geographical characterisation. **Food Chemistry**, 134(1), 434-439. 2012.
- [112] Choe, E., & Min, D. B.; Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 169-186. 2006.

-
- [113] Rosen, M. J., & Kunjappu, J. T. *Surfactants and Interfacial Phenomena*: Wiley. 2012.
- [114] Valasques, G. S.; Santos, A. M. P.; Teixeira, L. S. G.; Cerqueira, U. M. F. M.; Souza, V. S.; Bezerra, M. A.; Applications of emulsified systems in elemental analysis, **Applied Spectroscopy Reviews**,52, 1-25, 2017.
- [115] Bezerra, M. A., Castro, J. T., Macêdo, R. C., & da Silva, D. G.: Use of constrained mixture design for optimization of method for determination of zinc and manganese in tea leaves employing slurry sampling. **Analytica Chimica Acta**, 670(1-2), 33-38, 2010.
- [116] Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, 76(5), 965-977, 2008
- [117] Kara, D., Fisher, A., Hill, S.,: Detergentless ultrasound-assisted extraction of trace elements from edible oils using lipase as an extractant, **Talanta** 144, 219–225, 2015.
- [118] Mba, O. I., Dumont, M.J., Ngadi, M., Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry – A review, **Food Bioscience** 10, 26-41, 2015.
- [119] Almeida, D.T.D., Nunes, I.L., Conde, P.L., Rosa, R.P.S., Rogério, W.F., Machado, E.R.: A quality assessment of crude palm oil marketed in Bahia, Brazil. **Grasas y Aceites**, 64 (4) 387–394, 2013.
- [120] García, I. L., Martínez, Y. V., Córdoba, M.H.,: Determination of cadmium and lead in edible oils by electrothermal atomic absorption spectrometry after reverse dispersive liquid–liquid microextraction, **Talanta**, 124, 106–110, 2014.
- [121] Wang, Y., Xie, J., Wu, Y., Hu, X.,Yang, C.,Xu, Q.,: Determination of trace amounts of Se(IV) by hydride generation atomic fluorescence spectrometry after solid-phase extraction using magnetic multi-walled carbon nanotubes, **Talanta**, 112, 123-128, 2013.
- [122] Moreno, M, J., Lominchar, M.A., Sierra, M.J.,Millán, R., Doimeadios, R. C. R. M.,: Fast method for the simultaneous determination of monomethylmercury and inorganic mercury in rice and aquatic plants, **Talanta**,176, 102-107, 2018.

-
- [123] Karadjova, I. B., Lampugnani, L., Tsalev, D. L.: Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of arsenic in essential lavender and rose oils, **Talanta**, 65, 1015-1021, 2005.
- [124] Bakkali, K., Martos, N. R., Souhail, B., Ballesteros, E.: Determination of Heavy Metal Content in Vegetables and Oils From Spain and Morocco by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, **Analytical Letters**, 45, 907–919, 2012.
- [125] De Leonardis, A., Macciola, V., De Felice, M.: Copper and iron determination in edible vegetable oils by graphite furnace atomic absorption spectrometry after extraction with diluted nitric acid, **International Journal of food science technology**, 35, 371-375, 2000.
- [126] Murillo, M., Benzo, Z., Marcano, E., Gomez, C., Garaboto, A., Marin, C.: Determination of copper, iron and nickel in edible oils using emulsified solutions by ICP-AES, **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, 14, 815-820, 1999.
- [127] Nunes, L. S., Barbosa, J.T.P., Fernandes, A. P., Lemos, V. A., Santos, W. N. L., Korn, M. G. A., Teixeira, L. S.G.: Multi-element determination of Cu, Fe, Ni and Zn content in vegetable oils samples by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry and microemulsion sample preparation, **Food Chemistry**, 780-783, 2011.
- [128] Karimi, M., Dadfarnia, S., Mohammad, A. H.S., Tamaddon, F., Azadi, D.: Deep eutectic liquid organic salt as a new solvent for liquid-phase microextraction and its application in ligandless extraction and preconcentration of lead and cadmium in edible oils, **Talanta**, 144, 648-654, 2015.
- [129] Bati, B., Cesur, H.: Determination of Copper in Edible Oils by Atomic Absorption Spectrometry after Lead Piperazinedithiocarbamate Solid-Phase Extraction and Potassium Cyanide Back-Extraction, **Analytical Sciences**, 1273-1274, 2002.
- [130] Valasques, G. S., Dos Santos, A. M. P., Da Silva, D. G., Alves, J. P., Bezerra, M. A.: Use of Constrained Mixture Design in the Optimization of a Method Based on Extraction Induced by Emulsion Breaking for the Determination of Ca, Mg, Mn, Fe and Zn from Palm Oil by Flame Atomic

Absorption Spectrometry, **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, in press, 29, 2189-2196, 2018

[131] Novaes, C.G. ; Yamaki, R. T. ; Paula, V. F. Júnior, B.B.N. ; Barreto, J. A. ; Valasques, G.S. ; Bezerra, M. A.: Optimization of Analytical Methods Using Response Surface Methodology - Part I: Process Variables. **Revista Virtual de Química**, 9,1184-1215, 2017.

[132] Novaes, C.G. ; Yamaki, R. T. ; Paula, V. F. ; Júnior, B.B.N. ; Barreto, J. A. ; Valasques, G.S. ; Bezerra, M. A.: Optimization of Analytical Methods Using Response Surface Methodology - Part II: Mixture variables, **Revista Virtual de Química**, 10 (2), 393-420, 2018.

[133] **ANVISA**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. Disponível em:< www.anvisa.gov.br/legis> Acessado em: 27 de julho 2019.

[134] Food and Nutrition Board – USA Institute of Medicine. Dietary References Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. Washington: National Academy Press, 2000.

[135] VIARO, R. S., VIARO, M. S., FLECK, J. Importância bioquímica do selênio para o organismo humano, *Ciências Biológicas e da Saúde*, 2,17-21, Santa Maria, 2001.

[136] BRAZIL.Decreto No. 55871. 1965. Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos.

[137] ABRAPALMA, Associação Brasileira de Produtores de Óleo de Palma, disponível em <http://www.abrapalma.org/pt/a-palma-no-brasil-e-no-mundo/> acessado em 19 de dezembro de 2018.

[138] Jurowski, K., Krośniak, M., Fołta, M., Cole, M., Piekoszewski, W.,: The toxicological analysis of lead and cadmium in prescription food for special medical purposes and modified milk products for newborns and infants available in Polish pharmacies, **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 51,73-78, 2019.

-
- [139] Oymak, T., Tokaliođlu, S., Ylmas, V., Kartal, S., Aydin, D., Determination of lead and cadmium in food samples by the coprecipitation method, **Food chemistry**, 113,1314-1317, 2019.
- [140] Viñas,P., Pardo-Martinez, M., Hernandez-Cordoba, M.,: Rapid determination of selenium, lead and cadmium in baby food samples using electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry atomization. **Analytica Chimica Acta**, 412, 121–130, 2000.
- [141] Gama, E. M., da Silva, L. A.,Lemos, V. A.,: Preconcentration system for cadmium and lead determination in environmental samples using polyurethane foam/Me-BTANC. **Journal of Hazardous Materials**, 136, 757–762, 2006.
- [142] Y. Zang, Cadmium: Toxicology, Encyclopedia of Food and Health, 550-555, 2016.
- [143] Gunnar F. Nordberg, Historical perspectives on cadmium toxicology, Toxicology and Applied Pharmacology, 238, Issue 3, 192-200, 2009.
- [144] Memon, S. Q., Hasany, S. M., Bhangar, M. I., & Khuhawar, M. Y. Enrichment of Pb(II) ions using phthalic acid functionalized XAD-16 resin as a sorbent. **Journal of Colloid and Interface Science**, 291, 84–91, 2005.
- [145] Geęca, I.,Korolczuk,M.,: Anodic stripping voltammetry following double deposition and stripping steps: Application of a new approach in the course of lead ion determination, **Talanta**, 171, 321-326, 2017.
- [146] Tokay, F., Bagdat, S., Extraction of nickel from edible oils with a complexing agent prior to determination by FAAS, **Food Chemistry**, 197, 445-449, 2016.
- [147] Burguera, J. L.,Burguera, M. Pretreatment of oily sample for analysis by flow injection-spectrometric methods. **Talanta**, 83(3): 691–699, 2011.
- [148] Burguera, J. L.,Burguera, M. Analytical applications of emulsions and microemulsions. **Talanta** 96: 1–20, 2012.
- [149] Robaina, N. F., Brum, D. M., and Cassella, R. J.: Application of the extraction induced by emulsion breaking for the determination of chromium and manganese in edible oils by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 99: 104–112,2012.

-
- [150] Pereira, F. M., Zimpeck, R. C., Brum, D. M., and Cassella, R. J. (2013) Novel extraction induced by emulsion breaking as a tool for the determination of trace concentrations of Cu, Mn and Ni in biodiesel by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta** 117: 32–38, 2013.
- [151] Lima, E. C.; Krug, F. J.; Jackson, K. W., Evaluation of tungsten – rhoumium coating on an integrated platform as a permanent chemical modifier for cadmium, llead, and selenium determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, 53, 1791-1804, 1998.
- [152] FRESCHI, G. P. G.; DAKUZAKU, C. S.; GOMES NETO, J. A.; MORAES, M., Espectrometria de absorção atômica multielementar simultânea com atomização eletrotérmica em forno de grafite - uma revisão da técnica e aplicações. **Eclética Química**. [online].,25,213-226, 2000.
- [153] Ferreira, S.L C., Introdução ás técnicas de planejamento de experimentos: Vento este, Salvador, 2015.
- [154] Yang, Y., Li, H., Peng, L., Chem, Z., Zeng, Q.: Assessment of Pb and Cd in seed oils and meals and methodology of their Extraction. **Food Chemistry** 197, 482–488, 2016.
- [155] Ansari, R., Kazi, G,T., Jamali, K,M., Arain, B. M., Wagan, D. M., Jalbani, N., Afridi, I,H., Shah, Q.A., ariation in accumulation of heavy metals in different verities of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique, **Food Chemistry**,115, 318–323, 2009.
- [156] Dugo, G., La Pera, L., La Torre, L.G., Giuffrida, D., Determination of Cd(II), Cu(II), Pb(II), and Zn(II) content in commercial vegetable oils using derivative potentiometric stripping analysis, **Food Chemistry**. 87 (2004) 639–645, 2004.
- [157] Canário, M. C., Katskov., Direct determination of Cd and Pb in edible oils by atomic absorption spectrometry with transverse heated filter atomizer, **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, 20, 1386 – 1388, 2005.