

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Jader Rodrigo Kappaun da Silveira

DETERMINAÇÃO DE COBRE EM CERVEJA POR ESPECTROMETRIA
DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA APÓS MICROEXTRAÇÃO
LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA

Santa Maria, RS
2022

Jader Rodrigo Kappaun da Silveira

DETERMINAÇÃO DE COBRE EM CERVEJA POR ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA APÓS MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-
LÍQUIDO DISPERSIVA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte

Santa Maria, RS
2022

FICHA CATALÓGRÁFICA

Jader Rodrigo Kappaun da Silveira

**DETERMINAÇÃO DE COBRE EM CERVEJA POR ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA APÓS MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-
LÍQUIDO DISPERSIVA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em 21 de setembro de 2022.

**Fábio Andrei Duarte, Doutor (UFSM)
(Presidente/Orientador)**

Éder Lisandro de Moraes Flores, Doutor (UTFPR)

Francisco Cunha da Rosa, Doutor (IFRS - Campus Feliz)

Santa Maria, RS
2022

DECLARAÇÃO

A pesquisa descrita nesta dissertação foi totalmente elaborada por mim, e as informações retiradas da literatura estão devidamente referenciadas. Esta dissertação (ou parte dela) não foi apresentada anteriormente para obtenção de qualquer outro grau.

Santa Maria, RS, 21 de setembro de 2022.

Jader Rodrigo Kappaun da Silveira

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Química, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte, pela orientação, paciência, exemplo profissional e compreensão com o prolongamento do tempo de mestrado. Aos membros da banca da defesa Éder Lisandro de Moraes Flores e Francisco Cunha da Rosa pelas contribuições.

A todos os demais professores que de alguma forma estiveram presentes nos diversos espaços de convivência da UFSM, representados aqui pelos professores Érico M. M. Flores, Paola A. Mello, Cezar A. Bizzi, Valderi L. Dressler, Rodrigo C. Bolzan e Edson I. Muller, por todos os ensinamentos compartilhados que possibilitaram crescimento pessoal e profissional.

Aos qualificados colegas pesquisadores do LAQIA/CEPETRO, que com muita responsabilidade e comprometimento estão envolvidos com a organização da rotina dos laboratórios, em especial, ao amigo Samuel R. Waechter, pelo acolhimento, companhia, ensinamentos e também a Letícia C. Brudi, pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus familiares, Douglas de Jesus, Luciene Ferrari, Marli Terezinha Kappaun e João Pedro Kappaun pelo carinho e apoio em todas as situações e compreensão ao longo deste processo.

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE COBRE EM CERVEJA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA APÓS MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA

AUTOR: Jader Rodrigo Kappaun da Silveira

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte

Neste trabalho foi desenvolvido um método de preparo de amostras empregando a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para a extração e pré-concentração de Cu em cerveja, seguido da determinação por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS). Diferente da DLLME convencional, onde é feita a mistura entre um solvente dispersor e um solvente extrator, foi feita a injeção apenas do solvente extrator na cerveja. Para a otimização da DLLME visando a extração de Cu, foram avaliados alguns parâmetros como tipo de solvente extrator e seu volume, volume de amostra, pH, concentração do dietilditiocarbamato de sódio como complexante e a viabilidade do ultrassom na dispersão. Após a otimização das condições da DLLME, a curva de calibração externa foi linear entre 5 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu, com limite de quantificação de 9,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. A exatidão do método proposto foi avaliada para 3 amostras e os resultados foram comparados com os obtidos após decomposição assistida por micro-ondas e posterior determinação de Cu por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. O método foi aplicado para 7 amostras de cerveja e a concentração de Cu variou entre 20,6 e 58,8 $\mu\text{g L}^{-1}$. A exatidão também foi avaliada utilizando ensaio de recuperação, variando entre 92 e 116%, com desvio padrão relativo entre 3 e 16%. O método de extração e pré-concentração de Cu em cerveja por DLLME e quantificação por F AAS mostrou-se adequado em termos de linearidade, exatidão e precisão, apresentando como aspectos positivos a rapidez, simplicidade de operação e baixo consumo de reagentes.

Palavras-chave: DLLME. Cobre. Cerveja. F AAS. Preparo de amostras.

ABSTRACT

DETERMINATION OF COPPER IN BEER BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY AFTER DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION

AUTHOR: Jader Rodrigo Kappaun da Silveira

ADVISOR: Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte

In this work, a sample preparation method was developed using the dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) for the Cu extraction and pre-concentration in beer, followed by the determination by flame atomic absorption spectrometry (F AAS). Unlike the conventional DLLME, where a dispersive solvent and an extraction solvent are mixed, only the extracting solvent was injected into the beer. For the DLLME optimization for Cu extraction, some parameters such as type of extracting solvent and its volume, sample volume, pH, concentration of sodium diethyldithiocarbamate as a complexing agent and the viability of ultrasound in the dispersion were evaluated. After optimization, the external calibration curve was linear between 5 and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu, with a limit of quantification of 9,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Accuracy was evaluated for 3 samples and the results were compared with those obtained after microwave-assisted sample digestion and subsequent Cu determination by inductively coupled plasma mass spectrometry and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. The method was applied to 7 beer samples and the Cu concentration ranged from 20,6 and 58,8 $\mu\text{g L}^{-1}$. Accuracy was also evaluated by analyte spike, which ranged from 92 to 116%, with relative standard deviation from 3 to 16%. The proposed method for the Cu extraction and pre-concentration from beer by DLLME and quantification by F AAS proved to be suitable in terms of linearity, accuracy and precision, presenting as positive aspects the speed, simplicity of operation and low reagents consumption.

Keywords: DLLME. Copper. Beer. F AAS. Sample preparation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Etapas envolvidas no procedimento de DLLME41
- Figura 2 - Efeito sobre a formação da fase sedimentada utilizando a combinação de solventes extratores (100 μL) e dispersores (500 μL). Condições: 10 mL de cerveja, 3 min de centrifugação a 3000 rpm47
- Figura 3 - Efeito do tipo de solvente extrator sobre a formação da fase sedimentada. Condições: 10 mL de cerveja, 500 μL de solvente extrator, 3 min de centrifugação a 3000 rpm48
- Figura 4 - Perfil do sinal de absorbância para Cu em cada um dos solventes extratores. Condições: 5 mL de cerveja, 500 μL de DDTC 2% (m/v), 100 μL de solvente extrator, 3 min de centrifugação a 3000 rpm e 2 etapas de lavagem49
- Figura 5 - Avaliação do tipo de solvente para extração de Cu na amostra (cinza escuro) e no branco (cinza claro). Condições na amostra: 5 mL de cerveja, 500 μL de DDTC 2% (m/v), 100 μL de solvente extrator, 3 min de centrifugação a 3000 rpm e 2 etapas de lavagem. Condições no branco: 5 mL água ultrapura, 500 μL de DDTC 2% (m/v), 100 μL de solvente extrator, 3 min de centrifugação a 3000 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5).....51
- Figura 6 - Avaliação do volume de CCl_4 como solvente para extração de Cu. Condições: 5 mL de cerveja, 500 μL de DDTC 2% (m/v), 3 min de centrifugação a 3000 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5).....52
- Figura 7 - Efeito do uso de US na DLLME para extração de Cu. Condições: 5 mL de cerveja, 500 μL de DDTC 2% (m/v), 100 μL de solvente extrator (CCl_4), 3 min de centrifugação a 3000 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5).....54
- Figura 8 - Avaliação do US na DLLME e aspecto da fase sedimentada, após etapas de centrifugação e lavagem. Condições: 5 mL de cerveja, 500 μL de DDTC 2% (m/v), 100 μL de CCl_4 55
- Figura 9 - Efeito da variação do volume de amostra para extração de Cu. Condições: 500 μL de DDTC 2% (m/v), 100 μL de CCl_4 , 3 min de centrifugação a 3000

rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5)	56
Figura 10 - Efeito do pH da amostra para extração de Cu. Condições: 5 mL de cerveja, 500 µL de DDTC 2% (m/v), 100 µL de solvente extrator (CCl ₄), 3 min de centrifugação a 3000 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5).....	57
Figura 11 - Efeito da concentração do DDTC como complexante para extração de Cu. Condições: 5 mL de cerveja, 500 µL de DDTC, 100 µL de solvente extrator (CCl ₄), 3 min de centrifugação a 3000 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5).....	59
Figura 12 - Curva de calibração externa	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições operacionais dos equipamentos de ICP-OES e ICP-MS para a determinação de Cu e cerveja após MAD	37
Tabela 2 - Soluções combinadas de solventes extratores e dispersores	42
Tabela 3 - Condições selecionadas para a extração de Cu por DLLME.....	60
Tabela 4 - Valores de LOD e LOQ para MAD/ICP-MS, MAD/ICP-OES e DLLME/F AAS .	62
Tabela 5 - Determinações de Cu por ICP-OES e ICP-MS após MAD (n=3) e por F AAS após DLLME (n=5). Resultados expressam a média de Cu em $\mu\text{g L}^{-1}$ \pm desvio padrão	63
Tabela 6 - Aplicação do método DLLME/F AAS em diferentes amostras de cerveja. Resultados expressam a média de Cu em $\mu\text{g L}^{-1}$ \pm desvio padrão (n=5)	63
Tabela 7 - Ensaio de recuperação para Cu nas amostras de cerveja empregando o método proposto DLLME/F AAS.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise da variância, do inglês <i>analysis of variance</i>
BG	Sinal de fundo, do inglês <i>background</i>
DDTC	Dietilditiocarbamato de sódio
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>
EUA	Estados Unidos da América, do inglês <i>United States of America - USA</i>
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês <i>flame atomic absorption spectrometry</i>
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês <i>graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente, do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês <i>liquid-liquid extraction</i>
LMT	Limites máximos tolerados
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i>
MAD	Digestão assistida por micro-ondas, do inglês <i>microwave-assisted digestion</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas, do inglês <i>microwave-induced plasma optical emission spectrometry</i>
PAN	1-(2-piridilazo)-2-naftol
pH	Potencial hidrogeniônico
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i>
SD	Desvio padrão, do inglês <i>standard deviation</i>
US	Ultrassom, do inglês <i>ultrasound</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	CERVEJA: HISTÓRIA, PRODUÇÃO E CONSUMO.....	18
2.2	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CERVEJA	19
2.2.1	Metais presentes na cerveja	21
2.3	PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO ELEMENTAR.....	24
2.3.1	Microextração líquido-líquido dispersiva	27
2.4	TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO ELEMENTAR EM CERVEJAS.....	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1	INSTRUMENTAÇÃO	36
3.2	REAGENTES	38
3.3	LIMPEZA E DESCONTAMINAÇÃO DOS MATERIAIS UTILIZADOS	39
3.4	AMOSTRAS	39
3.5	MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE cobre EM cerveja	40
3.5.1	Decomposição de cerveja por MAD	40
3.5.2	Otimização da DLLME para extração de Cu em cerveja	41
3.5.2.1	Procedimento geral da DLLME para extração, pré-concentração e determinação de Cu por F AAS.....	41
3.5.2.2	Avaliação da formação da fase sedimentada	42
3.5.2.3	Avaliação do solvente extrator.....	43
3.5.2.4	Avaliação do volume solvente extrator	43
3.5.2.5	Avaliação do uso de US na DLLME.....	43
3.5.2.6	Avaliação do volume de amostra.....	43
3.5.2.7	Avaliação do pH.....	44
3.5.2.8	Avaliação da concentração do complexante	44
3.5.3	Determinação de Cu por F AAS	44
3.5.3.1	Curva de calibração e linearidade	44
3.5.3.2	Limite de detecção e limite de quantificação	45
3.5.3.3	Exatidão e precisão	45
4	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	46
4.1	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA DLLME	46

4.1.1	Avaliação da fase sedimentada e determinação por F AAS	46
4.1.2	Avaliação do tipo de solvente extrator	50
4.1.3	Avaliação do volume de solvente extrator	52
4.1.4	Avaliação do US na DLLME	53
4.1.5	Avaliação do volume de amostra	56
4.1.6	Avaliação do pH da amostra.....	57
4.1.7	Concentração do complexante.....	58
4.1.8	Resumo das condições avaliadas para a extração de Cu em cerveja por DLLME	60
4.2	DETERMINAÇÃO DE COBRE POR F AAS	60
4.2.1	Curva de calibração e linearidade.....	60
4.2.2	Limites de detecção e quantificação	62
4.2.3	Avaliação da exatidão e precisão.....	62
5	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é conhecida como uma das bebidas alcoólicas fermentadas mais antigas da história da humanidade (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 1983). A partir da receita tradicional de água, malte de cereal, levedo e lúpulo, são desenvolvidas uma infinidade de tipos de cervejas, selecionando e combinando esses com outros ingredientes, ou modificando fatores que influenciam no seu preparo, como temperatura, pressão e tempo de fermentação (MORADO, 2009). Para a fabricação da cerveja é necessário um rigoroso controle de qualidade, que assegure os parâmetros de um produto destinado ao consumo humano (ROSA; AFONSO, 2015).

Na constituição da cerveja, diversos compostos orgânicos podem estar presentes e são os responsáveis pela maior parte das características organolépticas da bebida (ARAÚJO *et al.*, 2005; GORISTEIN *et al.*, 1999). Durante o processo de fabricação da cerveja, espécies inorgânicas podem ser introduzidas a partir das matérias-primas utilizadas na produção, pela contaminação ambiental no armazenamento e transporte ou pelo contato da bebida com equipamentos, tanques e embalagens. Durante esses processos, elementos como o Cu, podem migrar para a cerveja (PIRES *et al.*, 2019).

Dentre os diferentes estados de oxidação do Cu, relacionados com importantes reações de oxirredução, a espécie Cu^{2+} é a responsável pela maioria das interações no meio biológico e exposições dos seres humanos a este elemento (ATSDR, 2022; FAIA *et al.*, 2017; BARCELOUX, 1999).

O Cu é um dos principais metais de transição presentes no corpo humano e apresenta um papel importante no metabolismo, bem como na atividade de algumas proteínas. Porém, o excesso de Cu no organismo humano é nocivo e variações de sua concentração podem provocar transtornos e enfermidades (SARGENTELLI *et al.*, 1996). No processamento da cerveja, a presença deste metal é desejável devido a sua influência como cofator de alguns processos fermentativos (PIRES *et al.*, 2019). Entretanto, efeitos indesejáveis sobre a qualidade da cerveja também estão relacionadas com a presença deste elemento (POHL, 2008; ROSA; AFONSO, 2009; CHRISFIELD; HOPFER; ELIAS, 2020).

A importância do monitoramento dos teores de metais presentes em alimentos e bebidas se justifica em função de suas propriedades essenciais ou tóxicas aos organismos vivos, podendo influenciar na qualidade do produto e na saúde dos

consumidores (PIRES *et al.*, 2019). Nesse contexto, o controle do teor de Cu em cervejas é importante, pois o consumo dessa bebida no mundo é elevado, sendo que no Brasil, por exemplo, o consumo médio per capita é de 67 L de cerveja por ano (JÚNIOR *et al.*, 2014).

Para garantir o controle de qualidade da cerveja quanto a concentração elementar, existem diversas técnicas analíticas disponíveis, como a espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) (ALVES *et al.*, 2011), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) (FELIX *et al.*, 2019), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (WIETSTOCK *et al.*, 2015), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (CHAREHSAZ *et al.*, 2021) e a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP-OES) (PIRES *et al.*, 2019).

A escolha da técnica de determinação elementar depende, entre outros fatores, dos instrumentos disponíveis no laboratório, se é pretendida uma análise total ou de especificação, da concentração dos analitos e do limite de quantificação (LOQ) do método. Além disso, não menos importante, deve-se considerar o tempo disponível e o custo das análises. Também é comum não se analisar amostras em sua forma original, pois elas podem conter espécies interferentes e serem incompatíveis com os equipamentos de medição (CARASEK; TONJES; SCHARF, 2002; SKOOG, 2006; KRUG; ROCHA, 2019).

Para contornar as dificuldades causadas na etapa de determinação devido ao efeito de matriz e às baixas concentrações do analito, alguns métodos podem ser empregados no preparo da amostra, como a decomposição por via úmida, extração e pré-concentração. Considera-se que quanto menor a concentração do analito, maiores tendem a ser os problemas relacionados a exatidão e precisão, de modo que o preparo da amostra é um dos fatores que requer atenção, pois é uma fonte de erros em potencial (CARASEK; TONJES; SCHARF, 2002; KRUG; ROCHA, 2019).

A decomposição da amostra por via úmida, como na decomposição assistida por micro-ondas (MAD) em frascos fechados, pode ser uma alternativa interessante para diminuição do efeito de matriz, principalmente para as amostras de origem orgânica. Porém, dependendo da massa de amostra utilizada e a diluição inerente ao processo, o LOQ pode não ser adequado, dependendo da concentração dos analitos e da técnica de determinação que será utilizada (KRUG; ROCHA, 2019; BIZZI *et al.*, 2017).

Considerando a concentração de Cu geralmente encontrada em cervejas, principalmente quando a amostra é previamente decomposta por via úmida, pode ser requerida a determinação por técnicas como ICP-OES ou ICP-MS. Estas técnicas são bastante utilizadas devido, por exemplo, a ampla faixa de trabalho, capacidade multi-elementar e baixo LOQ, porém, estes equipamentos nem sempre estão disponíveis em laboratórios, possuem custo de análise relativamente elevado e requerem maior treinamento e experiência do analista (SEEGER *et al.*, 2015; PIRES *et al.*, 2019; YAZICI *et al.*, 2019).

A utilização da espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) apresenta uma capacidade de detecção limitada para quantificação de elementos em baixa concentração, principalmente quando no método de preparo de amostras há uma inerente diluição da amostra. Em contrapartida, buscando a utilização de métodos mais simples e de baixo custo, o emprego da F AAS combinada com métodos de extração e pré-concentração, torna possível a quantificação de analitos em baixa concentração, atingindo valores de LOQ semelhantes, por exemplo, aos obtidos por ICP-OES, após decomposição por MAD. Dentre estes métodos, destaca-se a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (SEEGER *et al.*, 2015).

A DLLME é um método de preparo de amostras baseado em um sistema ternário de extração por solvente, frequentemente aplicado com a finalidade de isolar um ou mais analitos presentes em diferentes matrizes aquosas. De modo geral, a extração é feita pela combinação de pequenos volumes de dois solventes (um extrator e um dispersor) que são injetados rapidamente na amostra aquosa, levando à formação de uma dispersão do solvente extrator e consequente migração dos analitos para esta fase (REZAEI *et al.*, 2006).

Diferente da DLLME original (REZAEI *et al.*, 2006) aplicada para compostos orgânicos, na extração e pré-concentração elementar geralmente é necessário o uso de um agente complexante para ocorrer a migração do analito entre as fases (LIAO *et al.*, 2011; MACIEL *et al.*, 2014). Estudos demonstram a eficiência da DLLME na extração e pré-concentração de elementos (ŠKRLÍKOVÁ *et al.*, 2011; SEEGER *et al.*, 2015) e compostos orgânicos (ZHOU *et al.*, 2020; MARTINS *et al.*, 2014) em aplicações diversas (REZAEI *et al.*, 2010; CAMPILLO *et al.*, 2017).

Em métodos convencionais de extração, como a extração líquido-líquido (LLE), é feito o uso de grandes volumes de amostra e solventes orgânicos tóxicos, tornando o trabalho de alto custo, demorado e potencialmente danoso ao meio

ambiente, por gerar quantidades elevadas de resíduos. Em relação a LLE, a DLLME apresenta vantagens, pois é rápida, de baixo custo, de fácil operação, apresenta um grande fator de enriquecimento dos analitos e consome pequenos volumes de solventes orgânicos, configurando benefícios econômicos e ambientais (REZAEI *et al.*, 2010).

A DLLME combinada com a F AAS tem sido utilizada em função de sua boa seletividade, simplicidade, precisão e devido ao custo da instrumentação e de operação ser mais acessível. Para determinação elementar, essa combinação mostrou-se eficiente em amostras de água (ŞERIFE; KARTAL; DURAL, 2012), vinho (SEEGER *et al.*, 2015), mel (ROSA *et al.*, 2015), chá (YAZICI *et al.*, 2019), cachaça (MEIRA *et al.*, 2021), entre outras (REZAEI *et al.*, 2010; CAMPILLO *et al.*, 2017).

Entretanto, não foram encontrados na literatura, trabalhos que descrevem a extração de Cu em cerveja utilizando a DLLME com posterior determinação por F AAS. Com o objetivo de utilizar métodos mais simples e acessíveis para a determinação de elementos em baixa concentração, considerando os níveis de Cu em cerveja relatados na literatura (PIRES *et al.*, 2019), a combinação da DLLME com a F AAS desperta interesse, tendo em vista as vantagens da associação entre elas. Nesse contexto, este trabalho propõe o desenvolvimento de um método de preparo de amostra empregando a DLLME para determinação de Cu em cerveja, utilizando a F AAS como técnica de determinação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CERVEJA: HISTÓRIA, PRODUÇÃO E CONSUMO

A prática da cervejaria tem seus primeiros relatos na Mesopotâmia, região onde, da mesma forma que no Egito, a cevada cresce em estado selvagem. Nesse sentido, a cerveja é considerada uma das bebidas alcoólicas fermentadas mais antigas na história da humanidade. Evidências mostram que em torno de 6000 anos antes de Cristo (a.C), eram fabricadas cervejas feitas de cevada maltada, fazendo com que no quarto ou quinto milênio a.C. já existissem diversos tipos de cerveja (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 1983).

Originalmente, a cerveja não continha lúpulo em seu preparo. Foi na Europa, em torno do ano 1000, que o lúpulo foi adicionado na receita da cerveja, conferindo sabor e maior estabilidade ao produto. As descobertas de Louis Pasteur sobre o levedo e conservação de alimentos trouxeram mudanças significativas no processo produtivo da cerveja, expandindo sua comercialização, de modo que no início do século XX existiam mais de 3200 cervejarias (REBELLO, 2009; AQUARONE; LIMA; BORZANI, 1983).

A cerveja é uma bebida aquosa fermentada à base de amido e aromatizada com lúpulo. Essa definição simples abrange os quatro ingredientes tradicionais, que são utilizados na fabricação de cerveja: malte de cevada, água, lúpulo e levedura (KEUKELERIE, 2000).

Sua produção ocorre, inicialmente, por meio da hidratação dos grãos do cereal, o que desencadeia a sua germinação. Durante esse processo, enzimas transformam polissacarídeos presente nos grãos em mono e dissacarídeos. O cereal, depois de seco ou torrado, é denominado de malte, que apresenta sabor adocicado. Uma sopa (mosto) dos grãos maltados e lúpulo é preparada e, sob ação de leveduras, durante a fermentação, são produzidos etanol e dióxido de carbono (MORADO, 2009).

A partir da receita tradicional de água, malte de cereal, levedo e lúpulo, são desenvolvidas uma infinidade de tipos de cervejas. As diversas opções de maltes, seleção dos cereais utilizados, escolha de lúpulos com diferentes propriedades organolépticas, seleção ou combinação de diferentes espécies de leveduras, propriedades físico-químicas da água utilizada, detalhes do processo como os temperos adicionados, filtração, temperatura e tempo de fermentação, são alguns

dos fatores que possibilitam essa diversidade na indústria mundial de cervejas (MORADO, 2009).

Na Alemanha, utiliza-se apenas cevada para a obtenção do malte. Porém, em vários países, é permitido ou até obrigatório o uso de substitutos de parte do malte, como, por exemplo, arroz (ROSA; AFONSO, 2009). Quando não há indicação no rótulo, subentende-se que o malte é feito de cevada; em qualquer outro caso, acrescenta-se o nome do cereal, como o malte de milho, trigo, centeio, aveia ou de outros cereais (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 1983).

A indústria da cerveja contribui fortemente para o desenvolvimento econômico de diversos países e é, atualmente, uma das bebidas alcoólicas mais consumidas em todo o mundo (COLEN; SWINNEN, 2016). Ao consumir uma média de 67 litros de cerveja/habitante/ano, o Brasil ocupa a 24ª posição do ranking de consumo *per capita* mundial, que é liderado por República Tcheca (147 litros/habitante/ano). Com relação a produtividade, a China é o principal produtor de cerveja em termos de volume de produção, seguida dos Estado Unidos e Brasil (JÚNIOR *et al.*, 2014).

A qualidade das matérias-primas e os diferentes modos ou sistemas desenvolvidos e adotados para produção, permitiram a ocorrência da grande variedade de cervejas disponíveis hoje no mercado internacional, estimando-se que existam mais de 20 mil tipos de cervejas no mundo (ROSA; AFONSO, 2009).

A produção de cerveja requer muito conhecimento e prática, pois envolve várias e complexas reações químicas, que devem ocorrer sob monitoramento constante de temperatura, tempo, pressão e pH, entre outros fatores (MORADO, 2009). Nas diversas etapas de produção de cerveja é necessário que exista um rigoroso controle de qualidade, a fim de assegurar os parâmetros de um produto destinado ao consumo humano (ROSA; AFONSO, 2009).

2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CERVEJA

Em geral, a cerveja pronta para o consumo é composta de 90 a 95% de água, 2 a 6% de extrato residual, 0,35 a 0,50% de CO₂ e o teor alcoólico geralmente varia de 3 a 8% de etanol. Esses valores são variáveis de acordo com o tipo de cerveja (KEUKELERIE, 2000; AQUARONE; LIMA; BORZANI, 1983; ROSA; AFONSO, 2009).

Os principais compostos inorgânicos que podem ser encontrados na cerveja são os hidrogenocarbonatos, sulfatos, cloretos, nitritos e nitratos. Em geral, a

presença de sais na água é desejada e contribui para a qualidade da cerveja. A presença de nitritos e nitratos podem interromper a fermentação por serem tóxicos às leveduras (ARAÚJO *et al.*, 2005; GORISTEIN *et al.*, 1999; COELHO NETO *et al.*, 2020). Os cloretos, em geral, não são prejudiciais à cerveja e conferem a ela paladar, contudo teores acima de 100 mg L⁻¹ favorecem a corrosão dos equipamentos da linha de produção (ROSA; AFONSO, 2009).

Na cerveja, também estão presentes diversos compostos orgânicos, como proteínas, carboidratos, polifenóis, aminoácidos, entre outros. Os compostos orgânicos são os responsáveis pela maior parte das características organolépticas da bebida. Alguns compostos orgânicos são provenientes das matérias-primas ou são originados durante os processos decorrentes de sua produção, como em atividades enzimáticas na germinação do cereal ou do metabolismo das leveduras durante a fermentação (ARAÚJO *et al.*, 2005; GORISTEIN *et al.*, 1999).

As impressões sensoriais decorrentes da ingestão de cerveja são resultantes, também, da existência de uma complexa proporção de diferentes compostos voláteis presentes em baixas concentrações. Durante a produção da cerveja, devido as variações de temperatura ao longo do processo, moléculas podem ser perdidas ou modificadas, como é o caso de alguns terpenos, dentre eles o mirceno, cariofileno, humuleno e farneseno (KEUKELERIE, 2000).

Durante a inflorescência do lúpulo feminino, são encontradas glândulas ricas em lupulina, material amarelado, constituído principalmente por polifenóis, α -ácidos e β -ácidos. Essas substâncias irão influenciar diretamente no sabor, aroma, estabilização da espuma e conservação da bebida (COELHO NETO *et al.*, 2020; DURELLO, 2019).

Os α -ácidos, como humulona, os β -ácidos, como β -ionona e β -damascenona, são os responsáveis por conferir o amargor à cerveja. Alguns polifenóis, além de contribuírem para o sabor, em especial, as proantocianidinas de baixo peso molecular, também determinam a estabilidade coloidal da cerveja. Em certas situações, a fração polifenólica pode sofrer reações de oxidação e polimerização. Devido as diferentes condições empregadas na fabricação de cervejas, a ocorrência de espécies presentes em baixa concentração é muito variável (COELHO NETO *et al.*, 2020; KEUKELERIE, 2000; DURELLO, 2019).

Durante a fermentação, o metabolismo das leveduras incorpora açúcares simples, tais como a glicose e a maltose, produzindo dióxido de carbono, etanol,

ésteres, fenóis, ácidos orgânicos e álcoois superiores. Os ésteres conferem à cerveja aromas frutados, os fenóis de especiarias e os ácidos graxos que remetem ao sabor de manteiga. Os álcoois com massa molecular superior ao etanol, como o propan-1-ol e o 2-metilpropan-1-ol, também podem contribuir no aroma e sabor da bebida. Devido a diversidade química da mistura, também se desencadeiam reações de esterificação entre os ácidos e os álcoois produzidos na fermentação. O 3-metilbutan-1-ol, por exemplo, pode ser convertido em etanoato de pentila, contribuindo com aroma frutado. Além destes, chalconas, flavonoides e vitaminas do complexo B também estão presentes na cerveja (COELHO NETO *et al.*, 2020; ROSA; AFONSO, 2009).

2.2.1 Metais presentes na cerveja

Espécies inorgânicas podem ser adicionadas durante o processo industrial de elaboração da cerveja. No entanto, também podem estar presentes naturalmente a partir das matérias-primas utilizadas na produção, ou ainda, serem provenientes de contaminação ambiental desses insumos. A contaminação também é possível no armazenamento e transporte, pelo contato da bebida com equipamentos e embalagens ao longo do processo produtivo. Durante esses processos, elementos como Al, Co, Cr, Cu, Fe, Ni e Zn podem migrar facilmente para a cerveja, podendo comprometer a qualidade do produto final e a saúde dos consumidores (PIRES *et al.*, 2019).

Tanques, tubos e linhas de fluido utilizados para manuseio de cerveja, nas etapas de fermentação, condicionamento, filtração, carbonatação ou barris, pipas e latas em que o produto com qualidade final entra em contato, podem ser uma fonte potencial de contaminação da cerveja. A deterioração dos revestimentos das latas de alumínio e interação da cerveja com os recipientes, geralmente leva a um aumento nas concentrações de metais, que migram com facilidade para a cerveja. Pode-se presumir que quanto mais tempo de armazenamento, maiores as concentrações de metais que são encontradas na cerveja. Além disso, quanto maior a temperatura de armazenamento, mais rápida é a taxa de corrosão que ocorre na bebida enlatada (POHL, 2008).

Embora o procedimento moderno de fabricação de cerveja seja basicamente o mesmo que o usado desde os tempos antigos, os equipamentos usados hoje são

construídos de diferentes materiais. O material básico para esse equipamento é o aço inoxidável, mas algumas cervejarias ainda usam latão ou cobre. Como as bebidas de malte geralmente são ácidas, seu contato com cobre ou latão pode resultar em uma lixiviação de Cu, ente outros metais, no produto (JAGANATHAN; DUGAR, 1997).

A presença de metais na cerveja também pode ser derivada de ingredientes crus, destes, o malte é considerado como maior responsável pela entrada de íons metálicos na bebida, seguido da contribuição do lúpulo, fermento e água (WIETSTOCK *et al.*, 2015). A presença de Cu, Fe, Mn, Ni e Zn na cerveja relacionada ao lúpulo ou cevada (ou cereais adicionados), ocorre porque essas espécies são micronutrientes essenciais para plantas (PIRES *et al.*, 2019). As plantas de lúpulo podem ser tratadas com fungicidas à base de cobre, o que pode levar a um aumento na presença desse elemento na cerveja (CHRISFIELD; HOPFER; ELIAS, 2020).

A presença de metais na cerveja é um fator importante e que influencia no processo de fabricação. Ao considerar o crescimento e metabolismo de leveduras, muitos metais são cofatores essenciais para enzimas fermentativas, sendo componentes necessários de sistemas de transporte, apresentando diferentes funções estruturais ou de balanceamento de carga, tais como, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Ni e Zn (POHL, 2008). Além desses, Al, Ba, Cr, Na e Sr também estão relatados como frequentemente encontrados na composição química das cervejas (PIRES *et al.*, 2019).

Fatores indesejáveis também se relacionam com a presença de certos elementos na produção de cerveja, sendo um deles a turvação metálica ocasionada por elementos como Fe, Cu e Sn, que é prejudicial para a qualidade final do produto (ROSA; AFONSO, 2009). Metais de transição, incluindo Cu, Fe e Mn, também são conhecidos por catalisar a geração de espécies reativas de oxigênio na cerveja, reduzindo a estabilidade do produto (CHRISFIELD; HOPFER; ELIAS, 2020). As espécies reativas de oxigênio oxidam facilmente os compostos orgânicos presentes na cerveja, alterando a qualidade da espuma e a estabilidade do sabor da cerveja. Nesse processo, o teor de Cu e Fe são uma preocupação real, uma vez que estão envolvidos no condicionamento e envelhecimento da cerveja (POHL, 2008).

A presença de Cu também é relatada por seus íons afetarem a formação de compostos voláteis de enxofre, que geralmente têm contribuição no sabor na cerveja e, portanto, pode prejudicar a qualidade do produto quando presente em excesso (WALKER, 1995).

Além de exercerem importante influência no processo de fabricação da cerveja, a presença de alguns elementos, como Fe e Cu, representam um incremento na dieta alimentar de consumidores, existindo valores mínimos e máximos recomendados de ingestão diária (POHL, 2008). Visando promover e proteger a saúde da população, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou as quantidades destes elementos que devem ser consumidos diariamente para atender às necessidades nutricionais. Para a ingestão diária por adultos, o valor recomendado de Fe é 14 mg dia⁻¹ e Cu é 0,9 mg dia⁻¹ (BRASIL, 2005). Nesse mesmo segmento, a ANVISA através da instrução normativa n° 160, de 1° de julho de 2022, que trata sobre os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos, estabelece os níveis máximos de contaminantes inorgânicos presentes em bebidas alcoólicas, correspondendo a 5 mg L⁻¹ para Cu (BRASIL, 2022).

O Cu apresenta quatro estados de oxidação, a saber Cu⁰, Cu⁺, Cu²⁺ e Cu³⁺, para quais é atribuído importante participação em reações de oxirredução. No meio biológico, o Cu²⁺ é a forma iônica mais estável, sendo também encontrada formando complexos ou ligada à matéria orgânica (ATSDR, 2022; FAIA *et al.*, 2017; BARCELOUX, 1999). Embora as exposições humanas ao Cu sejam predominantemente na forma de Cu²⁺ (ATSDR, 2022), a representação “Cu” será utilizada neste trabalho.

Na literatura são relatados riscos associados a baixa e alta ingestão de Cu. Dessa forma, uma faixa ideal de ingestão é definida para a população em geral, sendo o limite inferior da faixa aceitável de ingestão oral de 20 µg por kg de peso corporal por dia e o limite superior tolerável de 10 mg por dia, sendo este último baseado na proteção contra danos ao fígado como o efeito adverso crítico (WHO, 1998; INSTITUTE OF MEDICINE, 2001).

A deficiência de Cu está associada com anemia, neutropenia e anormalidades ósseas, sendo pouco frequente em humanos. A ingestão acidental ou intencional de elevadas concentrações desse elemento pode causar dor epigástrica, dor de cabeça, náusea, tontura, vômito e diarreia, taquicardia, dificuldade respiratória, anemia hemolítica, hematúria, hemorragia gastrointestinal maciça, insuficiência hepática e renal e morte. Em grupos específicos da população pode ocorrer acúmulo de Cu no fígado, como é o caso de pacientes diagnosticados com a doença de Wilson, nesta condição, o cobre não é eliminado de forma adequada do organismo, podendo atingir níveis fatais (WHO, 1998).

Nesse contexto, o conhecimento da composição elementar da cerveja é de interesse tanto para cervejeiros, quanto para consumidores, e se justifica por diferentes razões. Tendo em vista a tecnologia cervejeira e o processamento da cerveja, o conhecimento sobre as funções e presença dos metais é de especial importância, pois afeta o processo de fabricação e exerce influência sobre a qualidade final do produto. Metais na cerveja também têm uma certa importância nutricional, pois dependendo da concentração e tipo, podem ser essenciais ou tóxicos para o corpo humano, afetando a saúde dos consumidores, sendo necessário o monitoramento de suas concentrações (POHL, 2008).

Tendo em vista os aspectos relacionados a presença de cobre na cerveja, a determinação da concentração desse elemento ao longo do processo produtivo é relevante, pois sua presença exerce influência na qualidade final do produto, pode afetar a saúde dos consumidores e a bebida deve atender a legislação vigente.

2.3 PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO ELEMENTAR

O desenvolvimento de métodos de preparo de amostra é uma área ativa de pesquisas em química analítica e diversos procedimentos promissores já foram propostos, sendo que o aumento nas demandas em análise de alimentos e amostras ambientais são alguns dos fatores que contribuíram com avanços nesse segmento (CHEN *et al.*, 2008). De modo geral, o preparo da amostra consiste na sua transformação para uma forma compatível com a técnica de determinação e a maneira de se preparar uma amostra para análise depende da sua natureza, do elemento ou composto a ser determinado e sua concentração, da precisão e exatidão desejadas, da técnica de determinação e do LOQ (KRUG; ROCHA, 2019).

O termo preparo de amostra pode englobar diferentes etapas, como limpeza, secagem, moagem, peneiramento e filtração, se estendendo a métodos de decomposição, extração, separação, enriquecimento, entre outros. No caso de bebidas gaseificadas, como a cerveja, que é saturada com CO₂, para a utilização de alíquotas com volume preciso no procedimento analítico, o primeiro passo no preparo de amostra consiste em um processo de degaseificação. Geralmente, o preparo da amostra é caracterizado como uma etapa demorada e de custo relativamente elevado, sendo responsável pela maior fonte de erros nos vários estágios de um procedimento analítico (POHL, 2008; KRUG; ROCHA, 2019; MATUSIEWICZ, 2017).

Muitas das técnicas instrumentais modernas de determinação elementar requerem a dissolução completa da amostra antes da determinação, pois a introdução de amostras é feita na forma de soluções aquosas para os equipamentos de F AAS, GF AAS, ICP-OES ou ICP-MS. Uma variedade de métodos é empregada, como a decomposição por via úmida, feita com béquer em chapa de aquecimento, ou radiação em forno de micro-ondas em sistemas abertos ou fechados, onde é possível alcançar altas pressões e temperaturas (MATUSIEWICZ, 2017).

Para a determinação elementar em amostras que contêm teores elevados de matéria orgânica, como é o caso da cerveja, os métodos de preparo empregados são, geralmente, os de decomposição por via úmida, baseados no aquecimento da amostra na presença de agentes oxidantes. De modo muito menos frequente, a cerveja pode ser decomposta por via seca, sendo incinerada em um forno de mufla (a 550 °C) e o resíduo é posteriormente dissolvido usando HCl diluído (FANTOZZI *et al.*, 1998; 2005; POHL, 2008).

Métodos de decomposição de amostras podem ser evitados aplicando a análise direta. Porém, a cerveja é uma matriz complexa considerando este tipo de abordagem, apresentando um teor relativamente alto de diferentes compostos orgânicos, como carboidratos, proteínas e outros originários do processamento dessa bebida. Neste sentido, a cerveja é reconhecida como uma fonte causadora de efeitos de matriz (NASCENTES *et al.*, 2005; POHL, 2008).

Em alguns casos, alguns efeitos de matriz poderiam ser minimizados através da simples diluição da amostra com água ou com ácidos diluídos. Entretanto, a diluição da amostra, inerente ao processo de decomposição por via úmida ou como estratégia para a minimização de efeitos de matriz, quando se trata da determinação de elementos em baixa concentração, pode ser considerada inadequada ou ineficiente, dependendo da técnica de determinação utilizada (NASCENTES *et al.*, 2005; KRUG; ROCHA, 2019).

A decomposição de amostras de cerveja por via úmida, pode ser feita tanto em sistemas abertos quanto fechados. Em sistema abertos, pode ser realizada com a utilização de frascos de vidro ou teflon, aquecidos em bloco digestor ou chapas de aquecimento. Esses procedimentos demandam tempo e são propensos a perdas e contaminações (BELLIDO-MILLA; MORENO-PEREZ; HERNANDEZ-ARTIGA, 2000; POHL, 2008; KRUG; ROCHA, 2019). Devido às temperaturas alcançadas neste tipo de sistema serem limitadas pelo ponto de ebulição dos reagentes, muitos compostos

orgânicos podem não ser completamente decompostos devido à baixa eficiência oxidativa, contribuindo para a incompleta recuperação dos elementos presentes em baixa concentração, ou interferindo na etapa de determinação, devido aos efeitos da matriz (KRUG; ROCHA, 2019).

Dentre os métodos de decomposição por via úmida em sistemas fechados amplamente empregados, destaca-se a MAD. Em geral, as amostras de cerveja são tratadas em alta temperatura com reagentes oxidantes concentrados, como HNO_3 , podendo ser combinado a H_2O_2 , para a decomposição da matriz orgânica (BELLIDO-MILLA *et al.*, 2004; POHL, 2008; PIRES *et al.*, 2019).

Atualmente, o aquecimento por irradiação micro-ondas em sistemas fechados vem sendo amplamente utilizado, apresentando várias vantagens sobre a abordagem tradicional de decomposição em frascos abertos e fornos tipo mufla. Estes sistemas permitiram a obtenção de alta eficiência de decomposição para uma variedade de matrizes, reduzem o tempo e o consumo de reagentes, assim como, minimizam o risco de perda de analito, contaminação da amostra e os efeitos de matriz, melhorando a precisão e a reprodutibilidade. Porém, a maior parte dos procedimentos de decomposição por via úmida requerem equipamentos de maior porte e custo, bem como demandam tempo de execução e atenção, experiência do analista para a obtenção de resultados satisfatórios e não ocorrência de acidentes (BELLIDO-MILLA *et al.*, 2004; POHL, 2008; KRUG; ROCHA, 2019; BIZZI *et al.*, 2017).

A determinação de metais em cerveja, assim como ocorre com outras amostras, apresenta dificuldades intrínsecas a todas as determinações analíticas, principalmente devido à baixa concentração em que alguns elementos podem estar presentes. Dessa forma, o desenvolvimento de métodos de preparo de amostra eficientes é de interesse de químicos analíticos, de modo a possibilitar a detecção em baixa concentração. Os métodos convencionais continuam sendo aprimorados na busca de maior rapidez, baixo custo, pouco gasto de reagente e pequena geração de resíduos, entre outros benefícios (OLIVEIRA, 2003; ANTHEMIDIS; LOANNOU, 2009; BIZZI *et al.*, 2017).

Nesse sentido, métodos miniaturizados de extração e pré-concetação foram desenvolvidos com o objetivo de superar aspectos negativos de métodos tradicionais que apresentam esta finalidade, como a LLE, que demanda o uso de grandes volumes de amostra e solventes orgânicos tóxicos, sendo considerado demorado, trabalhoso e prejudicial ao meio ambiente (ANTHEMIDIS; LOANNOU, 2009).

2.3.1 Microextração líquido-líquido dispersiva

Proposta pela primeira vez por Rezaee *et al* (2006), para a extração e pré-concentração de compostos orgânicos em água, a DLLME, pode ser considerada como uma versão miniaturizada da LLE, uma vez que requer pequenos volumes (da ordem de microlitros) de solventes e tem sido desenvolvida como uma abordagem alternativa e simples, capaz também de separar e pré-concentrar metais (ANTHEMIDIS; LOANNOU, 2009; ZGOLA-GRZÉSKOWIAK; GRZÉSKOWIAK, 2011).

A DLLME tem sido amplamente utilizada para extração e pré-concentração de analitos em diversas amostras, atendendo aos requisitos de miniaturização, com baixo custo, rapidez e eficiência de extração. Esse método consiste de um sistema ternário de solventes, composto por um solvente dispersor, um solvente extrator e a amostra aquosa. O solvente dispersor deve ser miscível tanto na fase aquosa quanto no solvente extrator, porém este último não pode ser miscível na fase aquosa. O procedimento consiste na injeção rápida da mistura de solventes (dispersor e extrator), com auxílio de uma seringa, em um tubo de fundo cônico, ocorrendo a turvação da solução e conseqüente extração dos analitos. Após a separação das fases por centrifugação, o solvente extrator é separado para posterior quantificação (MARTINS *et al.*, 2012).

Ao contrário dos métodos tradicionais de extração e pré-contração, como a LLE, que é geralmente lenta, apresentando maior possibilidade de contaminação e perda das espécies de interesse durante o manuseio da amostra, na DLLME também é possível utilizar um único frasco desde o preparo da amostra até a quantificação, tornando o trabalho de extração e pré-contração mais rápido, minimizando a possibilidade de erros associados a manipulação da amostra (CARASEK; TONJES; SCHARF, 2002; KORN, 2008).

Embora a DLLME tenha sido proposta inicialmente com a utilização de solventes extratores mais densos do que a água, de modo que este é sedimentado no fundo do tubo, sendo posteriormente recolhido e analisado, a utilização de solventes menos densos do que a água também tem sido proposta. Neste segundo caso, a fase sobrenadante é utilizada para a posterior determinação dos analitos (CHEN; CHEN; LI, 2010; MARTINS *et al.*, 2012; CAMPILLO *et al.*, 2017).

Existem várias abordagens alternativas que foram desenvolvidas usando a DLLME, por exemplo, os sistemas que usam uma seringa como ambiente de extração

em alternativa ao tubo de fundo cônico, sendo também mencionado o uso de ultrassom (US) ou vortex, para aumentar a eficiência da dispersão e consequente extração, ou compensar a ausência de um solvente dispersor, entre outras (MARTINS *et al.*, 2012; REZAEI; KHALILIAN, 2015; LEMOS *et al.*, 2022).

Em relação ao tipo de analito que é possível de ser determinado após o preparo da amostra por DLLME, são mencionados na literatura diversos compostos orgânicos, com variada gama de grupos funcionais. Nesse sentido, muitos trabalhos foram publicados desde o primeiro trabalho envolvendo DLLME (MARTINS *et al.*, 2012; CAMPILLO *et al.*, 2017; LEMOS *et al.*, 2022). Estudos diversos relatam a eficiência da DLLME na extração e subsequente determinação de compostos orgânicos e elementos em bebidas, alimentos, amostras biológicas e ambientais, entre outras (ŠKRLÍKOVÁ *et al.*, 2011; REZAEI *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2014; MACIEL *et al.*, 2014; SEEGER *et al.*, 2015; CAMPILLO *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2020; SHARMA; THAKUR; CHASKAR, 2021).

Nos primeiros dez anos após a primeira proposta de utilização da DLLME, o número de aplicações relacionadas à determinação de analitos inorgânicos foi consideravelmente inferior e apareceram com muito menos frequência em publicações (CAMPILLO *et al.*, 2017). Atualmente, a DLLME é reconhecida como um método adequado para extrair analitos orgânicos e inorgânicos, que podem ser quantificados por diferentes técnicas, dependendo da natureza do extrato e do analito (SAJID, 2022). A DLLME é compatível com diversas técnicas analíticas, tais como, cromatográficas (MARTINS *et al.*, 2014; SHARMA; THAKUR; CHASKAR, 2021), F AAS (ANTHEMIDIS; LOANNOU, 2009; PINHEIRO *et al.*, 2021), ICP-OES (REZAEI; KHALILIAN, 2015), ICP-MS (ELCI, 2013; SAJID; ASIF; IHSANULLLAH, 2021), espectrofotometria no ultravioleta-visível (MACIEL *et al.*, 2014; HIMMI *et al.*, 2022), entre outras.

Para o processo de extração por DLLME, alguns parâmetros são geralmente otimizados, tais como, volume e tipo de solventes extrator e dispersor, tempo de extração, efeito da adição de sal, pH, entre outros. Além disso, para a extração de metais, é necessário que o analito seja complexado com uma molécula orgânica anteriormente à etapa de extração, possibilitando a transferência do analito da fase aquosa para o solvente extrator (REZAEI *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2014; JAHROMI *et al.*, 2007; MACIEL *et al.*, 2014).

Visando a extração de Cu utilizando a DLLME, a complexação desse elemento tem sido feita utilizando alguns complexantes, como por exemplo o 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) (GHARANJIK *et al.*, 2020), ditizona (1,5-difeniltiocarbazona) (DIVRIKLI *et al.*, 2021), 8-hidroxiquinolina (BAHAR; ZAKERIAN, 2012), dietilditiofosfato de amônio (ANTHEMIDIS; LOANNOU, 2009), entre outros, sendo um dos mais frequentemente utilizados o dietilditioicarbamato de sódio (DDTC) (LIAO *et al.*, 2011; KOCOT; ZAWISZA; SITKO, 2012; SEEGER *et al.*, 2015).

O DDTC é um agente complexante acíclico, seu sal de sódio apresenta fórmula molecular $C_5H_{10}NS_2Na$, é solúvel em água, sendo bastante conhecido e amplamente aplicado na extração de Cu. A adição de uma solução aquosa de DDTC a uma solução ligeiramente ácida contendo Cu, produz um complexo marrom, pouco solúvel em água (SANDELL, 1959; VIOLA-RHENALS *et al.*, 2018).

A escolha do DDTC é atribuída à facilidade com que é preparado em laboratório e à formação de complexos relativamente estáveis. Estes complexos são solúveis em solventes apolares, como o clorofórmio ($CHCl_3$), tetracloreto de carbono (CCl_4), entre outros, mas insolúveis em solventes polares, como acetona (C_3H_6O), etanol (C_2H_5OH), metanol (CH_3OH), acetonitrila (C_2H_3N), água, entre outros. Ditiocarbamatos formam complexos estáveis com mais de 20 elementos, incluindo Ag, Au, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Os, Pt, Ru, V, Zn, sendo a formação e estabilidade dos complexos metálicos aprimorada através do controle do pH (VOGEL, 1989; VIOLA-RHENALS *et al.*, 2018; ODULARU; AJIBADE, 2019; DIVRIKLI *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021; AJIBOYE *et al.*, 2022).

O ditiocarbamato geralmente se liga a metais em uma quelação simétrica, porém outros modos de coordenação podem estar presentes, como monodentado e bidentado, sendo os mais prevalentes. A estabilidade de complexos com diferentes metais contendo diferentes estados de oxidação, pode ser atribuída à existência de formas de ressonância de ditiocarbamato. Um princípio geral estabelecido (Pearson, 1963) permite a correlação da capacidade de complexação de metais, onde que ácidos duros tendem a se associar com bases duras e ácidos moles com bases moles, sendo possível supor que o Cu possa ser complexado usando bases moles com um grupo funcional contendo enxofre, como é o caso do ditiocarbamato (VOGEL, 1989; VIOLA-RHENALS *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2021).

Estas características fazem com que a utilização de compostos de ditiocarbamato sejam usados com sucesso para a separação e pré-concentração e

posterior determinação de elementos em baixa concentração, através de diferentes técnicas analíticas, entre outras aplicações (VOGEL, 1989; VIOLA-RHENALS *et al.*, 2018; ODULARU; AJIBADE, 2019; YANG *et al.*, 2021; AJIBOYE *et al.*, 2022).

Além disso, a concentração do agente complexante e o pH da amostra também influenciam na extração de metais utilizando a DLLME. Soluções de ditiocarbamato de sódio são geralmente preparadas em uma concentração de 2%. O efeito do pH para a extração de elementos usando DLLME tem um papel importante na formação do complexo metal-quelante e sua posterior extração, podendo tornar o analito menos solúvel na fase aquosa (VOGEL, 1989; ZGOLA-GRZÉSKOWIAK; GRZÉSKOWIAK, 2011; MACIEL *et al.*, 2014).

Para a extração de Cu utilizando DDTC, tendo em vista a formação do complexo metal-quelante, um valor de pH inferior a 4 acelera a decomposição dos ditiocarbamatos, enquanto em valores de pH superiores a 7, ocorre a precipitação espécies menos solúveis de Cu. Considera-se que o pH em torno de dentro dessa faixa seja adequado reação de complexação de íons Cu (UDDIN; SALAM; HOSSAIN, 2013; CESUR, 2007).

A escolha de um solvente extrator apropriado e a otimização de seu volume podem ser considerados dois parâmetros fundamentalmente importantes na DLLME. Esse solvente deve possuir a capacidade de extração dos analitos e de não causar interferência na etapa de determinação. É recomendado o uso do menor volume possível, desde que seja suficiente para extrair todo o analito, com a finalidade de aumentar o fator de pré-concentração (MARTINS *et al.*, 2012).

O solvente extrator também dever ter a característica de ser imiscível na fase aquosa (amostra) e apresentar densidade maior que a água, pois, como mencionado anteriormente, após a centrifugação é necessário ocorrer a decantação do solvente extrator contendo o analito complexado para o fundo de um tubo cônico. Dentre os solventes extratores aplicado na DLLME destacam-se o CCl_4 , CHCl_3 , clorobenzeno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$), 1,2-diclorobenzeno (*o*- $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$), e tetracloretileno (C_2Cl_4), sendo amplamente utilizados (REZAEI *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2012; MACIEL *et al.*, 2014; CAMPILLO *et al.*, 2017). Cabe destacar que solventes com densidade menor que a da água também podem ser usados na DLLME, como undecan-1-ol, octan-1-ol, dodecan-1-ol, dodecan-2-ol, tolueno, xileno, heptanol, entre outros (CHEN; CHEN; LI, 2010; CAMPILLO *et al.*, 2017).

O uso de solventes ou materiais dispersivos de menor toxicidade também tem sido mencionados na literatura, sendo um dos principais desafios da DLLME. É importante destacar que alguns solventes bromados são menos tóxicos quando comparados com solventes de baixa densidade (MING-JIE *et al.*, 2015; LEONG; FUH; HUANG, 2014; MOREIRA; YOKOYA; GAITANI, 2014).

Para a escolha do tipo de solvente dispersor, é fundamental que ocorra sua solubilidade tanto na fase orgânica quanto na fase aquosa. O volume de solvente dispersor está diretamente associado a formação das microgotas no sistema ternário envolvendo a amostra (fase aquosa), solvente extrator e solvente dispersor, afetando a eficiência da extração, sendo o tipo e volume de solvente dispersor dois parâmetros geralmente avaliados (MARTINS *et al.*, 2012). A necessidade da miscibilidade do solvente dispersor tanto no solvente extrator (fase orgânica), quanto na fase aquosa (amostra), faz com que solventes como CH₃OH, C₂H₅OH, C₂H₃N e C₃H₆O sejam amplamente utilizados (REZAEI *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2012; CAMPILLO *et al.*, 2017).

No entanto, em alguns trabalhos aplicando a DLLME para a determinação elementar em bebidas alcoólicas, em função do C₂H₅OH estar naturalmente presente na amostra, optou-se pela estratégia de realizar o processo de DLLME utilizando apenas o solvente extrator, pois em algumas condições, foi possível constatar que a quantidade de C₂H₅OH contida na amostra seja suficiente para promover a dispersão, reduzindo assim, o consumo de reagentes (FAN; LIU; XIE, 2014; OLLER-RUIZ *et al.*, 2017; MEIRA, 2021).

Na DLLME, devido à grande área superficial entre o solvente extrator e a amostra aquosa, o equilíbrio é atingido rapidamente e o tempo de extração é tipicamente inferior a 3 min. Pode-se assim considerar que a extração é independente do tempo, sendo essa a principal vantagem desse método (REZAEI *et al.*, 2010).

A influência do efeito *salting-out*, que é induzido pelo aumento da força iônica no meio, também é um fator que pode ser considerado para a avaliação, uma vez que contribui na separação das fases. Essa influência será de acordo com as características de cada analito. Em alguns casos, o aumento na concentração de um sal (geralmente NaCl) que é adicionado a amostra, aumenta o volume de fase sedimentada, devido à diminuição da solubilidade do solvente extrator na presença de um sal. Em trabalhos envolvendo a DLLME, é mencionada uma grande variação

sobre a adição de sal, desde a não utilização, até a adição de 0,5 a 30% (ZGOLA-GRZÉSKOWIAK; GRZÉSKOWIAK, 2011; MARTINS *et al.*, 2012; NORONHA, 2015).

Mesmo havendo uma extensa aplicação da DLLME, inclusive na determinação de metais em bebidas, não foram encontrados na literatura trabalhos que descrevem especificamente a extração e pré-concentração de Cu em cerveja utilizando este método.

2.4 TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO ELEMENTAR EM CERVEJAS

Para a determinação elementar em cervejas, geralmente são empregadas técnicas de espectrométricas, dependendo da concentração desses elementos (POHL, 2008). Dentre essas técnicas, destacam-se na literatura a F AAS (BELLIDOMILLA *et al.*, 2004; POHL; SERGIEL, 2009; ALVES *et al.*, 2011), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) (NASCENTES *et al.*, 2005; LLOBAT-ESTELLES *et al.*, 2006; HUSÁKOVÁ, 2007; FELIX *et al.*, 2019), ICP-OES (ASFAW; WIBETOE, 2005; MARCANO *et al.*, 2010; WIETSTOCK *et al.*, 2015) e ICP-MS (MAHMOOD *et al.*, 2012; ALEXA *et al.*, 2018; CHAREHSAZ *et al.*, 2021). Além dessas, a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP-OES) também merece destaque, sendo uma nova e interessante alternativa (LEÃO *et al.*, 2017; PIRES *et al.*, 2019).

Devido a cerveja ser reconhecida como uma fonte notável de efeitos de matriz, a decomposição das amostras é normalmente realizada antes da análise através das técnicas mencionadas acima. Para simplificar e melhorar a velocidade da análise de amostras de cerveja, em alguns casos a digestão pode ser evitada utilizando a análise direta, porém no caso do ICP-OES, esse procedimento pode ocasionar supressão do sinal analítico e/ou instabilidade no plasma, podendo a detecção de elementos presentes em baixa concentração ser uma limitação (ASFAW; WIBETOE, 2005; POHL, 2008).

Amostras de cerveja não decompostas, também são aplicadas em medições utilizando GF AAS ou F AAS, onde a diluição das amostras com água ou ácidos diluídos pode ser necessária, a fim de minimizar possíveis efeitos de matriz que acompanham os processos de atomização, bem como para evitar o efeito memória, devido ao depósito de sólidos na cabeça do queimador, ou a cobertura do tubo de grafite por uma camada de cinzas. Adotar essa estratégia pode ser adequado na

determinação de elementos em baixa concentração por GF AAS, devido ao maior confinamento da nuvem atômica no caminho óptico, porém na F AAS, devido a diluição da nuvem atômica nos gases da chama, pode comprometer o LOQ (HUSÁKOVÁ, 2007; POHL, 2008; LLOBAT-ESTELLES *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2009).

Apesar das técnicas de plasma apresentarem muitas vantagens, como determinação multi-elementar e ampla faixa de trabalho, alguns inconvenientes como o alto custo de aquisição da instrumentação, de operação e de manutenção, tornam equipamentos de ICP-OES e ICP-MS menos disponíveis em laboratórios. Estas técnicas também requerem maior treinamento e experiência do analista, apresentando geralmente o consumo de volumes elevados de reagentes que levam, conseqüentemente, a maior geração de resíduos (PIRES *et al.*, 2019; YAZICI *et al.*, 2019). Além disso, devido a incompatibilidade dos equipamentos com solventes orgânicos, a utilização métodos de preparo que possibilitam a pré-concentração dos analitos através deste tipo de solvente, podem se tornar limitados ou mais trabalhosos, demandando por exemplo, etapas de evaporação do extrato (MALLAH; SHEMIRANI; MARAGHEH, 2008; REZAEI *et al.*, 2010; REZAEI; KHALILIAN, 2015).

Neste sentido, a F AAS pode ser considerada compatível com a DLLME visando a pré-concentração dos analitos, uma vez que neste caso é possível a utilização de solventes orgânicos. É uma alternativa aos procedimentos que requerem etapas de evaporação do extrato e posterior diluição em solvente apropriado, diminuindo a variação da eficiência de extração, principal fonte de incerteza no preparo de amostras que tem esse objetivo (MALLAH; SHEMIRANI; MARAGHEH, 2008; MARTINS *et al.*, 2012).

A F AAS é uma técnica amplamente difundida, devido a maior disponibilidade em laboratórios quando comparada com as demais técnicas mencionadas, sendo economicamente mais acessível em termos de aquisição, operação e manutenção, apresentando simplicidade operacional e boa seletividade. Porém, uma das principais limitações da F AAS ocorre na quantificação de elementos presentes em baixa concentração, quando utilizados métodos de preparo de amostra que envolvem etapas de diluição, podendo prejudicar o LOQ e exigir algum método extração ou de pré-concentração previamente à análise. Apesar disso, quando associado a um método de preparo de amostra eficiente, o uso dessa técnica apresenta sucesso, evitando interferências matriciais (WU *et al.*, 2009; SEEGER *et al.*, 2015; YAZICI *et al.*, 2019).

O método preconizado para a determinação elementar de cerveja, proposto pela *The Royal Society of Chemistry*, baseia-se na quantificação por F AAS, porém com prévia decomposição da amostra com H_2SO_4 e H_2O_2 em chapa de aquecimento (WATSON, 1994). O procedimento consiste na adição de 5 mL de H_2SO_4 concentrado e 20 mL de H_2O_2 30% à 20 mL de cerveja previamente desgaseificada e sob aquecimento lento. Após a obtenção de uma solução incolor, o digerido é avolumado a 25 mL com água purificada. Esse método requer tempo e é suscetível a perdas e contaminações (BELLIDO-MILLA *et al.*, 2004).

Em compensação, a DLLME combinada com a F AAS pode ser aplicada com sucesso para a determinação de metais. Tratando-se exclusivamente da aplicação em bebidas, alguns trabalhos, por exemplo, demonstram que essa combinação se mostrou eficiente em amostras de água (ŞERIFE; KARTAL; DURAL, 2012), vinho (SEEGER *et al.*, 2015), chá (YAZICI *et al.*, 2019), mel (ROSA *et al.*, 2015) e cachaça (MEIRA *et al.*, 2021), entre outras aplicações (REZAEI *et al.*, 2010; CAMPILLO *et al.*, 2017).

Na DLLME, o alto fator de enriquecimento dos analitos em pequenos volumes de solventes orgânicos ajuda a melhorar a capacidade de detecção de metais por F AAS. Algumas aplicações relatam que no método pode ser obtido um fator de pré-concentração de até 250 vezes, variando de acordo com o elemento e matriz, possibilitando alcançar baixos valores de LOQ, semelhantes aos tipicamente obtidos através de técnicas como o ICP-OES, com boa precisão. Algumas vantagens como a simplicidade, redução do volume de reagentes consumidos e pouca geração de resíduos, quando em comparação com os métodos de extração como a LLE, configuram a união de duas técnicas que possibilitam benefícios econômicos e ambientais (REZAEI *et al.*, 2010; SEEGER *et al.*, 2015; YAZICI *et al.*, 2019).

O alto fator de enriquecimento, facilidade operacional, baixo consumo de volumes de solventes orgânicos, tempo de extração muito curto, por ser relativamente segura e de baixo impacto ambiental, tornaram o método de preparo de amostra por DLLME muito popular. O uso de volumes na ordem de microlitros para extração e pré-concentração por DLLME combinada com F AAS se mostra um método eficiente, que proporciona sinais semelhantes e reprodutíveis na determinação de diversos elementos (REZAEI *et al.*, 2010; ZGOLA-GRZÉSKOWIAK; GRZÉSKOWIAK, 2011; YAZICI *et al.*, 2019; MEIRA *et al.*, 2021).

Neste sentido, as características descritas demonstram o potencial e justificam o interesse no desenvolvimento deste trabalho, que tem como objetivo a extração, pré-concentração e determinação de Cu em amostras de cerveja, utilizando a DLLME combinada com F AAS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Para a determinação de Cu pelo método proposto, foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com chama (modelo AAS Vario 6, Analytik Jena, Alemanha), equipado com uma lâmpada de deutério utilizada como corretor de fundo e um queimador monofenda de 100 mm, empregando chama ar/acetileno. Como fonte de radiação eletromagnética, foi utilizada uma lâmpada de catodo oco (Photron, Austrália) de Cu, operada a 3 mA, com comprimento principal de 324,8 nm e fenda espectral de 1,2 nm. Os sinais foram obtidos no modo de absorbância integrada, com tempo total de integração de 30 s.

Para a obtenção de valores de referência e comparação dos resultados com o método proposto, foi aplicado um método de MAD, sendo realizada no sistema baseado em câmara única de reação (UltraWAVE[®] SRC, Microwave Digestion System, Milenstone, Itália). Esse sistema é constituído de uma câmara de reação de aço inoxidável, revestida com um reservatório de PTFE com capacidade total de 1 L, onde é possível a utilização de 15 frascos de decomposição, cada um com capacidade de 15 mL. Durante a operação do sistema, sensores monitoram conjuntamente potência, pressão e temperatura em que se encontra a câmara de reação ao longo da decomposição das amostras, sendo as condições limite, de acordo com o fabricante, 1500 W, 199 bar e 300 °C, respectivamente.

A determinação de Cu nos digeridos foi feita utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (modelo Optima 4300 DV, PerkinElmer, EUA), equipado com nebulizador Gemcone[®] e câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc., Austrália) e tocha com tubo injetor de quartzo de 2,5 mm de diâmetro interno. A determinação de Cu nos digeridos também foi feita em um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (modelo NexION[®] 300X, PerkinElmer, EUA), equipado com nebulizador concêntrico, câmara de nebulização ciclônica e tocha com tubo injetor de quartzo de 2 mm de diâmetro interno.

Na Tabela 1 estão mostradas as condições operacionais dos instrumentos de ICP-OES e ICP-MS utilizadas para a determinação de Cu.

Tabela 1 - Condições operacionais dos equipamentos de ICP-OES e ICP-MS para a determinação de Cu e cerveja após MAD

Parâmetro	ICP-OES	ICP-MS
Potência do gerador de radiofrequência (W)	1400	1300
Vazão de argônio principal (L min ⁻¹)	15	18
Vazão de argônio auxiliar (L min ⁻¹)	0,2	1,2
Vazão de argônio nebulizador (L min ⁻¹)	0,70	0,95
Cone de amostragem e <i>skimmer</i>	-	Pt
<i>Hyper skimmer</i>	-	Al
Vista de observação	Axial	-
Isótopos monitorados (m/z)	-	⁶⁵ Cu
Comprimentos de onda espectral (nm)	Cu 327,393	-

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A degaseificação das amostras foi feita em banho de ultrassom (modelo P 180 H, Elmasonic, Alemanha), com capacidade para 18 L e frequência de 37 e 80 kHz, com amplitude variável e potência de 330 W. Para a degaseificação, as amostras foram transferidas para béqueres de vidro e a frequência alternada de modo a não ocorrer a projeção da amostra para fora do béquer.

Também foi avaliada a DLLME assistida por US empregando um sistema com probe, frequência de 20 kHz e potência nominal de 130 W (modelo Vibra-Cell™ 130 Sonics and Materials Inc, EUA), o qual foi inserido diretamente no frasco de extração.

Para a determinação do pH das amostras foi empregado um pHmetro (781 pH/Ion Meter, Metrohm, Suíça), equipado com um eletrodo de vidro combinado (6.0262.100, Metrohm), com resolução de 0,01 unidades de pH.

Para os procedimentos de pesagem foi utilizada uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu, Brasil) com resolução de 0,0001 g e capacidade máxima de 220 g. Quanto ao manuseio das amostras e preparo de soluções de referência, foram utilizados micropipetadores automáticos (Eppendorf®, Alemanha), com volumes variáveis entre 0,5 e 10; 10 e 100; 100 e 1000; e 500 e 5000 µL.

Para o preparo das soluções de referência e manuseio das amostras antes e após a decomposição, foram utilizados tubos de polipropileno com tampa e capacidade máxima de 15 e 50 mL (Sarstedt, Alemanha).

A separação das fases após a extração por DLLME foi feita em uma centrífuga (modelo Q-222T208, Quimis, Brasil) com capacidade máxima de 8 tubos de 15 mL.

Para a remoção da fase aquosa na etapa de lavagem foram usadas pipetas de Pasteur.

Para dispersão dos solventes na DLLME e manuseio de demais solventes orgânicos, foram utilizadas seringas de vidro com agulha fixa (Hamilton, EUA) com volumes compreendidos entre 50 e 250 μL e tubos graduados de vidro borossilicato com fundo cônico e capacidade para 15 mL (Laborglas, Brasil).

A avaliação e discussão de resultados foram fundamentados em testes estatísticos. Para comparação de duas médias foi utilizado o teste *t-Student* (com nível de confiança de 95%). Para 3 ou mais médias foi aplicada a análise de variância (ANOVA, com nível de confiança de 95%). Esses testes foram feitos utilizando os recursos disponíveis no Software Paleontological Statistics Package (Hammer; Harper; Ryan, 2001). Para a avaliação de *outliers* foi utilizado o teste de Grubbs com o auxílio dos recursos disponíveis no software GraphPad Statistics (MOTULSKY, 2022).

3.2 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram de grau analítico. A água foi destilada e deionizada em coluna de troca iônica e, posteriormente, purificada em sistema Milli-Q® (Ultrapure Water Purification Systems, Millipore, EUA), com resistividade superior a 18,2 $\Omega\text{M cm}$. O HNO_3 P.A. (65% m/m, 1,4 kg L^{-1} , Merck, Alemanha) foi destilado em sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição (modelo duoPUR, Milestone, Itália).

A curva de calibração externa para determinação de Cu por F AAS foi preparada utilizando solução de referência monoelementar (Titrisol Merck, contendo 1000 mg L^{-1} de Cu), a qual foi inicialmente diluída a 10 mg L^{-1} em HNO_3 5% (para estoque) e, posteriormente partir desta solução, foi preparada a curva de calibração nos intervalos de 5 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu.

Para a calibração dos equipamentos de ICP-OES e ICP-MS foi utilizada solução de referência multielementar com concentração de 10 mg L^{-1} , (SCP33MS, PlasmaCAL, Canadá) a qual foi diluída em HNO_3 5%, nos intervalos de concentração entre 1 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e entre 0,1 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Quanto ao método da DLLME, foram avaliados como solventes extratores $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ (99%, $d = 1,11 \text{ g mL}^{-1}$, Merck), $\text{o-C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$ (99%, $d = 1,30 \text{ g mL}^{-1}$, Merck), C_2Cl_4

(puríssimo, $d = 1,62 \text{ g mL}^{-1}$, Merck) CHCl_3 (99%, $d = 1,49 \text{ g mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich, Brasil) e CCl_4 (99,5% $d = 1,59 \text{ g mL}^{-1}$, Dinâmica, Brasil). Como solventes dispersores, foram avaliados CH_3OH (96,7%, $d = 0,79 \text{ g mL}^{-1}$, F. Maia, Brasil), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (99,9%, $d = 0,788 \text{ g mL}^{-1}$, Vetec, Brasil), $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (99,8% $d = 0,79 \text{ g mL}^{-1}$, Alphatec, Brasil), $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ (99,8% $d = 0,786 \text{ g mL}^{-1}$, Carlo Erba, Itália). As soluções contendo o complexante DDTc foram preparadas a partir do sal (99%, Sigma-Aldrich).

A geração do plasma nos instrumentos de ICP-OES e ICP-MS foi feita com argônio (99,998%, White Martins-Linde, Brasil). Acetileno (99,9% White Martins-Linde, Brasil) foi utilizado como combustível para o instrumento de F AAS, enquanto que ar comprimido foi utilizado como oxidante.

3.3 LIMPEZA E DESCONTAMINAÇÃO DOS MATERIAIS UTILIZADOS

Os frascos de quartzo utilizados na decomposição por MAD foram descontaminados em forno de micro-ondas após cada ciclo de decomposição, com 6 mL de HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$. O programa de irradiação consistiu de irradiação por 10 min a 1500 W, com temperatura máxima de $220 \text{ }^\circ\text{C}$, seguida de uma etapa de resfriamento por 20 min. Ao final do programa de irradiação, os resíduos da descontaminação foram descartados e os frascos lavados com água ultrapura e secos com ar comprimido.

Os tubos de vidro borossilicato cônicos para centrifugação, seringas e demais vidrarias utilizadas foram descontaminados em solução de HNO_3 20% (v/v), no mínimo 24 h e, posteriormente, lavados com água ultrapura e secos a temperatura ambiente ou com auxílio de ar comprimido, quando necessário.

3.4 AMOSTRAS

As amostras de cerveja usadas em todas as etapas foram adquiridas no comércio local das cidades de Ijuí/RS e Santa Maria/RS. Dentre os tipos de cerveja, estão Lager e Pilsen. Os tipos de malte são os de cevada ou milho. O teor etílico nas amostras compreende valores entre 4,5 e 5,2% e o pH entre 4,0 e 4,5. As amostras foram enumeradas de 1 a 7, para fins de representação neste trabalho. Na etapa de otimização da DLLME, a amostra 1 foi utilizada em todas as avaliações. Esta cerveja é do tipo Lager, fabricada a partir de malte de cevada, possuindo $\text{pH} = 4,3$.

Cabe ressaltar que todas as amostras de cerveja utilizadas neste trabalho são de produção em escala industrial, o que pressupõe a ocorrência de etapas de filtragem e possivelmente menor teor de sólidos do que quando comparada com cervejas produzidas artesanalmente.

3.5 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE COBRE EM CERVEJA

Neste trabalho, foi desenvolvido um método de preparo de amostra empregando a DLLME para a posterior determinação de Cu por F AAS. Como método de referência para o teor de Cu nas amostras 1, 2 e 3, foi utilizado a MAD e determinação por ICP-MS e ICP-OES. Em ambos os casos, antes do método de DLLME ou MAD, após abertas, as amostras foram transferidas para béqueres de vidro e submetidas a desgaseificação em banho de US (1 h, 30 °C, amplitude de 30%, 80 kHz de frequência). Os procedimentos utilizados para cada método serão descritos a seguir.

3.5.1 Decomposição de cerveja por MAD

Para a obtenção dos valores de referência para Cu, foram utilizadas três das amostras de cerveja (1, 2 e 3). Em triplicata, 2 mL de cada amostra foram decompostos com 2 mL de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹. Antes do programa de irradiação, as amostras foram pré-digeridas a 70 °C por 30 min em banho maria. Em seguida, os frascos foram inseridos na cavidade do forno de micro-ondas, o sistema foi fechado, pressurizado, e iniciado o programa de irradiação (rampa de 15 min até 230 °C, permanência a 230 °C por 10 min e 30 min de resfriamento). O programa utilizado para a decomposição de cerveja foi adaptado das recomendações do fabricante do forno de micro-ondas para a decomposição de alimentos (MILESTONE, 2013).

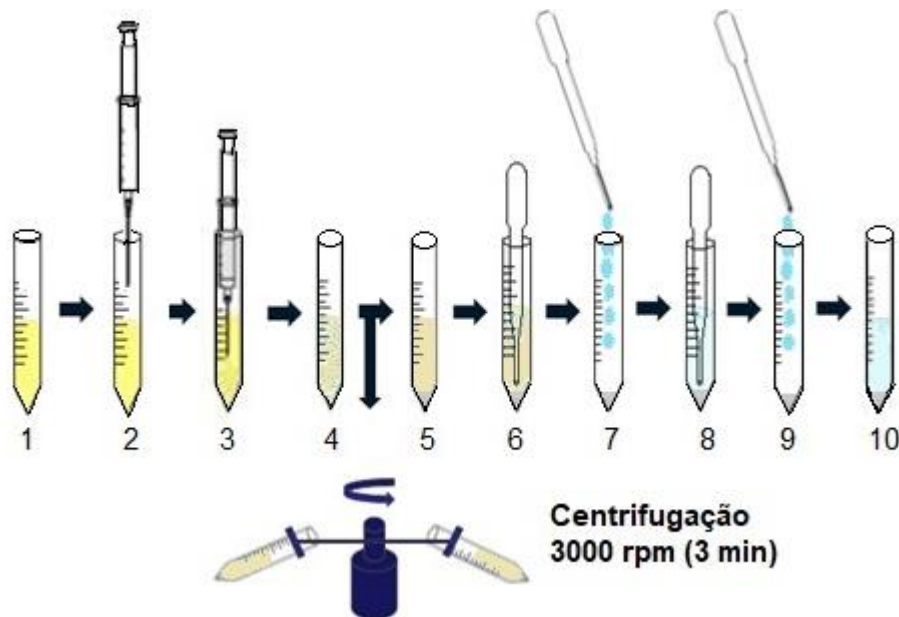
Após a decomposição, os digeridos foram transferidos para frascos descartáveis de polipropileno e avolumados a 15 mL com água ultrapura. Posteriormente, a determinação de Cu foi feita por ICP-OES e ICP-MS.

3.5.2 Otimização da DLLME para extração de Cu em cerveja

3.5.2.1 Procedimento geral da DLLME para extração, pré-concentração e determinação de Cu por F AAS

O procedimento geral da DLLME (Figura 1) consiste na transferência de 5 mL de cerveja para os tubos de vidro de fundo cônico de 15 mL (etapa 1), seguida da adição de 500 μ L da solução do complexante (etapa 2). Posteriormente, é feita a adição rápida da mistura entre solvente extrator e dispersor (ou apenas extrator) à amostra (etapa 3). Após esta etapa (3) é possível observar a formação de uma solução turva, pela formação de microgotas dispersas na amostra (etapa 4), as quais são centrifugadas para a formação da fase sedimentada no fundo do tubo cônico (etapa 5). Após a separação de fases, foram feitas lavagens do extrato, procedimento que consiste na remoção da cerveja (fase aquosa) com pipeta de Pasteur (etapa 6), adição lenta de 10 mL de água (etapa 7). Este procedimento de lavagem foi repetido mais uma vez (etapas 9 e 10). Por fim, a fase sedimentada no fundo do tubo cônico, contendo cerca de 10 mL de água sobre o extrato (etapa 8), foi utilizada para a quantificação de Cu por F AAS.

Figura 1 - Etapas envolvidas no procedimento de DLLME



Fonte: Adaptado de (MACIEL, 2013).

É importante ressaltar que o volume de água remanescente sobre o extrato foi utilizado para o auto zero do equipamento de F AAS, até o início da integração do sinal analítico, quando foi iniciada a aspiração do extrato contendo Cu.

3.5.2.2 Avaliação da formação da fase sedimentada

Inicialmente, foram feitos estudos preliminares para avaliar a formação (ocorrência, quantidade e qualidade) da fase sedimentada na amostra pela combinação de solventes extratores e dispersores. Foram avaliados como solventes extratores apenas solventes mais densos que a água, dentre eles, C_6H_5Cl , $o-C_6H_4Cl_2$, C_2Cl_4 e CCl_4 e $CHCl_3$. Como solventes dispersores foram avaliados CH_3OH , C_2H_5OH , C_2H_3N e C_3H_6O .

Em um primeiro momento, o efeito sobre a formação da fase sedimentada foi investigado utilizando 500 μL de solvente dispersor e 100 μL de cada solvente extrator em 5 mL e 10 mL de amostra (SEEGER *et al.*, 2015; MEIRA *et al.*, 2021). Foram avaliadas 20 diferentes combinações de solventes dispersor e extrator. Cada mistura foi enumerada de 1 a 20 para melhor discussão dos resultados, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Soluções combinadas de solventes extratores e dispersores

Solventes extratores	Solventes dispersores			
	CH_3OH	C_2H_5OH	C_3H_6O	C_2H_3N
C_6H_5Cl	1	6	11	16
$o-C_6H_4Cl_2$	2	7	12	17
C_2Cl_4	3	8	13	18
CCl_4	4	9	14	19
$CHCl_3$	5	10	15	20

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

É importante mencionar que também foram feitas avaliações sobre a formação da fase sedimentada utilizando somente a injeção de solventes extratores individualmente.

3.5.2.3 Avaliação do solvente extrator

Os solventes extratores avaliados foram C_6H_5Cl , $o-C_6H_4Cl_2$, C_2Cl_4 e CCl_4 e $CHCl_3$. O efeito destes solventes sobre a eficiência de extração foi investigado através das determinações por F AAS, utilizando o extrato contido em 100 μL (volume pré-fixado) de cada solvente obtido após a injeção em 5 mL de amostra, contendo 500 μL de DDTc 2% (m/v). O branco de cada um dos solventes também foi utilizado como critério de escolha. As condições como concentração e volume do complexante e volume de amostra, foram mantidas constantes nos experimentos subsequentes até suas otimizações.

3.5.2.4 Avaliação do volume solvente extrator

Para avaliar o efeito do volume do solvente extrator na DLLME, foram feitos experimentos contendo diferentes volumes do solvente selecionado na etapa anterior, variando entre 50 e 200 μL , em intervalos de 25 μL .

3.5.2.5 Avaliação do uso de US na DLLME

O uso de ultrassom para melhorar a dispersão foi avaliado de duas formas. A primeira consistiu em realizar o procedimento descrito no item 3.5.2.1, porém com uma etapa de sonicação com probe logo após a adição do solvente extrator e antes da centrifugação. A outra forma foi feita pela injeção do solvente extrator simultaneamente à sonicação, com a probe introduzida na amostra. Após o uso do US, foram feitas as etapas de centrifugação e lavagem do extrato. Em ambos os casos, a probe foi imersa na cerveja a cerca de 1 cm de seu nível, dentro do tubo cônico. A eficiência da extração dessas duas formas de uso de US foi comparada com os resultados utilizando a DLLME convencional, sem a utilização de US.

3.5.2.6 Avaliação do volume de amostra

Para avaliar o efeito do volume de amostra na extração, foram feitos experimentos contendo diferentes volumes de amostra, variando entre 5 e 12,5 mL, em intervalos de 2,5 mL.

3.5.2.7 Avaliação do pH

A influência do pH na DLLME foi investigada pela variação do pH das amostras entre 2,0 e 6,0 com intervalos de 0,5 unidades de pH. O ajuste do pH foi feito com soluções de HCl 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 0,1 mol L⁻¹. Para o ajuste de pH, a cerveja foi transferida para tubos descartáveis de polipropileno de 50 mL, onde foram adicionadas as soluções de HCl ou NaOH, conforme a necessidade. Após o ajuste do pH, a cerveja foi transferida para os tubos cônicos de vidro para a execução do procedimento de DLLME. O estudo foi feito utilizando as condições da DLLME previamente otimizados.

3.5.2.8 Avaliação da concentração do complexante

O efeito da concentração do DDTc como complexante na eficiência de extração do Cu foi avaliado adicionado um volume fixo de 500 µL, nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0% (m/v), utilizando as condições da DLLME previamente otimizados.

3.5.3 Determinação de Cu por F AAS

Para a determinação de Cu por F AAS, foi feita a aspiração da fase orgânica sedimentada diretamente no tubo de vidro cônico (SEEGER *et al.*, 2015; ROSA *et al.*, 2015). Para isso, o capilar do nebulizador pneumático foi introduzido na fase aquosa, sendo a fase sedimentada aspirada logo após o início da integração do sinal no instrumento.

3.5.3.1 Curva de calibração e linearidade

Para a quantificação de Cu por F AAS, foi construída uma curva de calibração externa, passando por todo o processo da DLLME, nas condições otimizadas para cerveja nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 µg L⁻¹ de Cu.

A faixa linear de resposta foi definida em função da dispersão dos valores de absorbância integrada em relação à concentração do analito. Através do método de regressão linear foi estimado o coeficiente de determinação (R²), representando o

grau de ajuste dos dados experimentais à curva de calibração, sendo que quanto mais próximo da unidade, menor é a dispersão dos dados melhor a correlação dos valores.

3.5.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LOD) e o LOQ foram estimados através da curva de calibração externa. O LOD é expresso como três vezes o desvio padrão somado a concentração média do branco, sendo considerado como a concentração mínima do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O LOQ é expresso como dez vezes o desvio padrão somado a média do branco, sendo considerado como a concentração mínima que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis (INMETRO, 2007). Como branco, utilizando água ultrapura, onde foram feitas 10 determinações completas (água ultrapura submetida ao procedimento otimizado de DDLME e quantificação por F AAS) independentes (Thompson; Ellison; Wood, 2002).

3.5.3.3 Exatidão e precisão

Devido à falta de material de referência certificado para Cu em cerveja, a exatidão foi avaliada a partir de comparação dos resultados obtidos com o método de referência (MAD) e determinação de Cu por ICP-OES e ICP-MS. A exatidão do método desenvolvido também foi avaliada através de ensaios de recuperação, em diferentes amostras de cerveja, pela adição de Cu equivalente a concentração de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ nas amostras. Para a avaliação da precisão foi utilizado como critério o desvio padrão relativo (RSD) entre as medições.

4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA DLLME

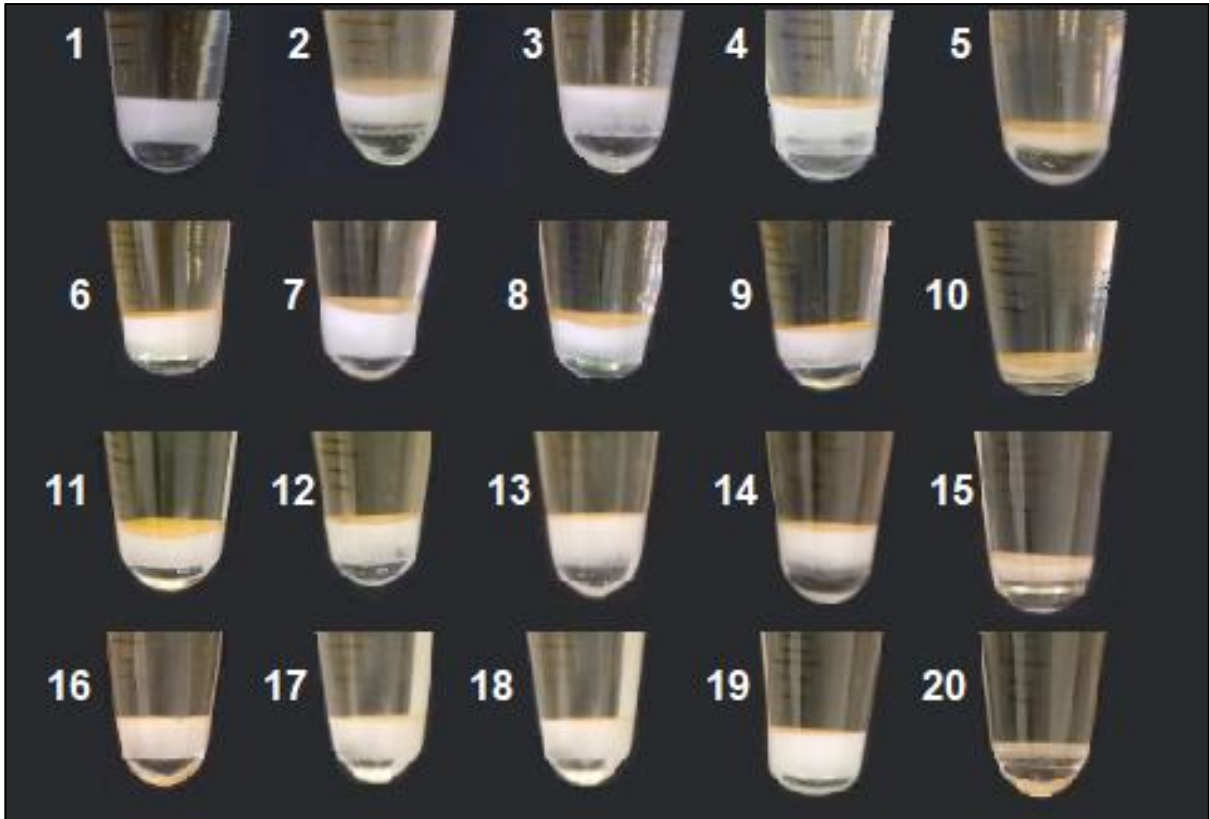
4.1.1 Avaliação da fase sedimentada e determinação por F AAS

Na primeira fase de experimentos para avaliar a formação, quantidade e qualidade da fase sedimentada na amostra, as 20 combinações entre os solventes extratores (C_6H_5Cl , $o-C_6H_4Cl_2$, C_2Cl_4 e CCl_4 e $CHCl_3$) e os solventes dispersores (CH_3OH , C_2H_5OH , C_2H_3N , C_3H_6O) foram avaliadas, conforme descrito no item 3.5.2.2.

A escolha de solventes foi feita com base na disponibilidade no laboratório, bem como por serem descritos na literatura como adequados ao método (REZAEI *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2012). O efeito sobre a formação da fase sedimentada foi investigado utilizando a combinação de 500 μ L de cada solvente dispersor contendo 100 μ L de cada solvente extrator, sendo a mistura, inicialmente, injetada em 10 mL de amostra.

Após a DLLME, constatou-se que na fase sedimentada ocorreu a formação de uma espécie de coloide bastante consistente (Figura 2), o qual ficou compactado no fundo do tubo após a centrifugação. Os valores de 1 a 20 na Figura 2 são referentes às combinações de solventes extratores e dispersores, conforme numeração descrita na Tabela 2.

Figura 2 - Efeito sobre a formação da fase sedimentada utilizando a combinação de solventes extratores (100 μ L) e dispersores (500 μ L). Condições: 10 mL de cerveja, 3 min de centrifugação a 3000 rpm



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Mesmo após as etapas de lavagem, esse tipo de fase sedimentada não apresentou compatibilidade para a utilização no instrumento de F AAS, pois não foi possível (ou ocorreu parcialmente) a sucção do extrato através do capilar do nebulizador do espectrômetro. Caso fosse dada continuidade às tentativas de sucção do extrato, haveria grande risco de entupimento do sistema. É importante ressaltar que este aspecto físico foi observado para todas as combinações de solvente extrator e dispersor, com alguma variação no volume da fase sedimentada obtida, de acordo com cada solvente extrator. O mesmo experimento também foi conduzido reduzindo o volume de amostra para 5 mL, o que não foi suficiente para resolver os inconvenientes mencionados.

Considerando a cerveja como uma bebida com teor médio de álcool etílico em torno de 5%, ou seja, já contendo um dos principais solventes dispersores em sua composição, foram feitas avaliações sobre a formação da fase sedimentada utilizando somente os solventes extratores. Apenas a título de exemplificação, considerando o

volume de 10 mL de uma amostra com teor alcoólico de 5%, o volume de álcool etílico será de cerca de 500 μ L, típico volume de solvente dispersor usado na DLLME. (LIANG; SANG, 2008; WEN *et al.*, 2011).

Inicialmente, foi feita uma avaliação visual (qualitativa) dos extratos utilizando apenas solventes extratores (Figura 3). De maneira excepcional, nesta avaliação, o volume de solvente extrator foi aumentado para 500 μ L, apenas para melhorar a visualização da fase sedimentada.

Figura 3 - Efeito do tipo de solvente extrator sobre a formação da fase sedimentada. Condições: 10 mL de cerveja, 500 μ L de solvente extrator, 3 min de centrifugação a 3000 rpm

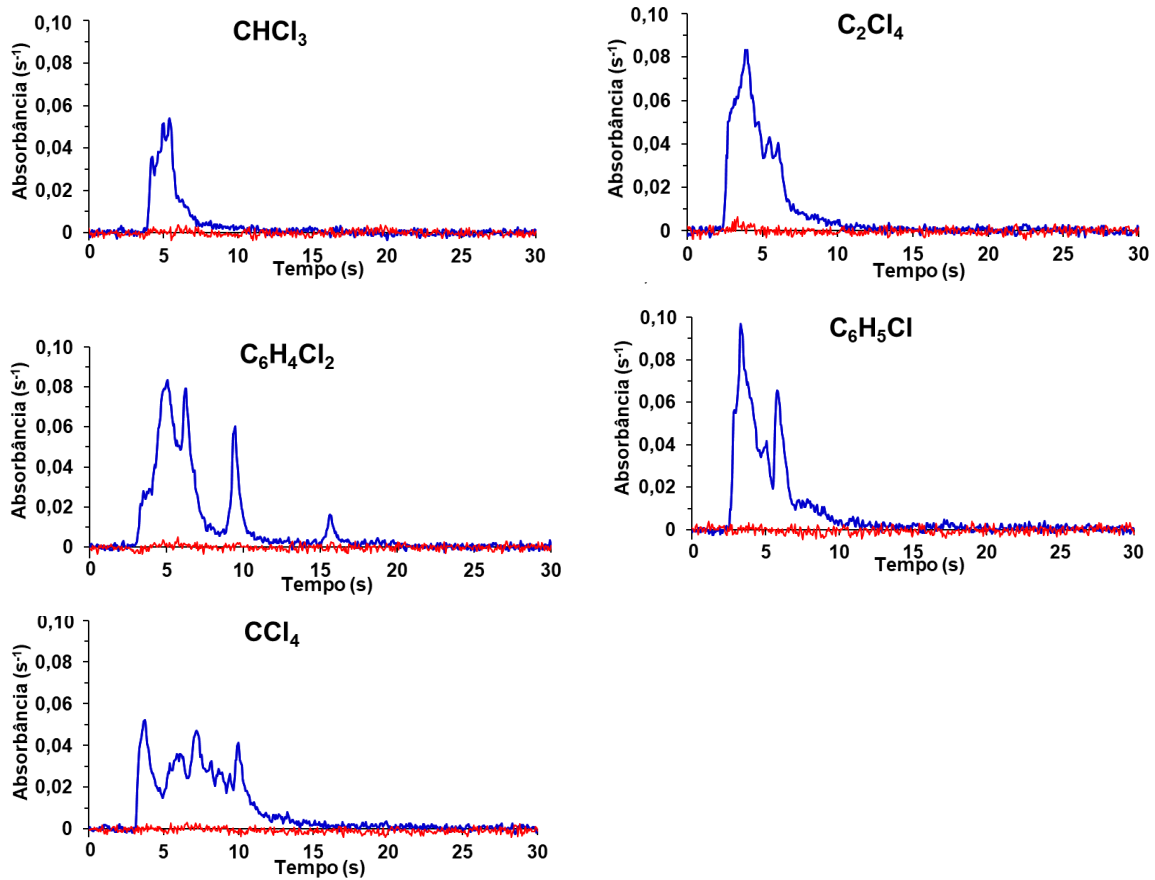


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A gota com menos “sólido” disperso foi observada para o CHCl_3 , seguida pela gota formada usando o C_2Cl_4 , os outros solventes como o CCl_4 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ e *o*- $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$ apresentaram maior quantidade de material depositado sobre o extrato. Após as etapas de lavagem, o material sólido depositado sobre a fase sedimentada foi removido em grande parte, devido a sua não compactação no fundo do tubo. Cabe salientar todo o extrato (solvente + fração coloidal) foi aspirado pelo capilar do instrumento, não comprometendo o sistema de nebulização. De modo geral, para a aspiração do extrato foi necessário o manejo no capilar para que todo extrato fosse introduzido no sistema de nebulização do instrumento de F AAS, devido ao espalhamento e aderência do solvente extrator e grumos da fração coloidal nas laterais do tubo de vidro.

Juntamente com a avaliação visual do aspecto dos extratos, foram avaliados qualitativamente os sinais de absorvância integrada no instrumento de F AAS. Os sinais analíticos para cada um dos solventes extratores estão mostrados na Figura 4, onde a linha em azul representa o sinal de absorção atômica e a linha em vermelho representa o sinal de fundo (BG).

Figura 4 - Perfil do sinal de absorvância para Cu em cada um dos solventes extratores. Condições: 5 mL de cerveja, 500 μ L de DDTC 2% (m/v), 100 μ L de solvente extrator, 3 min de centrifugação a 3000 rpm e 2 etapas de lavagem



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Com base neste experimento, ao se observar que os sinais de absorvância integrada obtidos para Cu seriam passíveis de quantificação, com sinais de fundo desprezíveis, todos os 5 solventes extratores mencionados seguiram para a avaliação do tipo de solvente extrator mais adequado ao processo, porém comparando os valores de absorvância integrada para cada um dos solventes. Para a otimização da extração de Cu em cerveja, alguns parâmetros foram fixados e posteriormente otimizados, sendo eles o volume de amostra (5 mL), de solvente extrator (100 μ L), 500 μ L de DDTC 2% (m/v). O tempo e a velocidade de centrifugação foram selecionados como 3 min a 3000 rpm, respectivamente, (ŠKRLÍKOVÁ *et al.*, 2011; MACIEL *et al.*, 2014; OLLER-RUIZ *et al.*, 2017), sendo constatado como o necessário para obter um sistema bifásico adequado. Na avaliação das etapas de lavagem, foi possível constatar a obtenção de extratos com aspecto límpido, após duas etapas

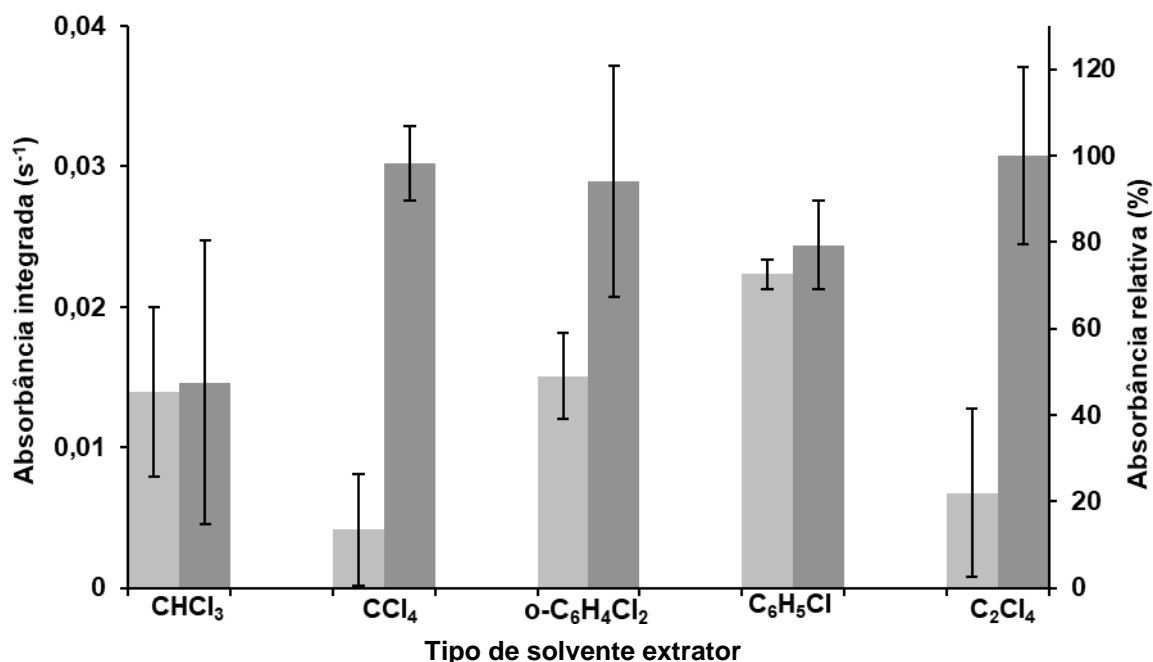
(SEEGER *et al.*, 2015; ROSA *et al.*, 2015), utilizando 10 mL de água em cada. Desta forma, estes parâmetros foram mantidos fixos em todas as demais etapas do trabalho.

Salienta-se que, embora, predominantemente ocorra a complexação entre o DDTC e íons Cu^{2+} , a representação Cu foi adotada neste trabalho de modo a facilitar a comunicação das informações relacionadas aos procedimentos descritos.

4.1.2 Avaliação do tipo de solvente extrator

A seleção do solvente extrator foi feita pela avaliação dos valores de absorvância integrada, a partir da injeção na amostra de 100 μL de cada solvente extrator. As intensidades dos sinais de absorvância integrada (em percentual relativo) para Cu utilizando $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$, $\text{o-C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$, C_2Cl_4 , CCl_4 e CHCl_3 estão mostradas na Figura 5. Para auxiliar na escolha do tipo de solvente, os sinais para o branco de cada um dos solventes também foi analisado. Este experimento foi feito utilizando 5 mL água ultrapura em substituição à amostra, mantendo constante os demais parâmetros. Estes resultados também estão mostrados na Figura 5. Para os brancos, são apresentados valores obtidos como sinal de absorvância integrada e, para as amostras, como sinal de absorvância relativa em percentual.

Figura 5 - Avaliação do tipo de solvente para extração de Cu na amostra (cinza escuro) e no branco (cinza claro). Condições na amostra: 5 mL de cerveja, 500 μ L de DDTC 2% (m/v), 100 μ L de solvente extrator, 3 min de centrifugação a 3000 rpm e 2 etapas de lavagem. Condições para branco: 5 mL água ultrapura, 500 μ L de DDTC 2% (m/v), 100 μ L de solvente extrator, 3 min de centrifugação a 3000 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5)



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Dentre os cinco solventes avaliados, o complexo Cu-DDTC apresentou, em média, maior afinidade pelos solventes extratores C₂Cl₄ e CCl₄ que apresentam menor polaridade entre os avaliados (PENA-PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2009). Pode-se observar também que para esses solventes foi obtida a melhor relação sinal de Cu na amostra sobre sinal de Cu no branco. Embora a solubilidade do C₂Cl₄ em água (150 mg L⁻¹) seja inferior comparada ao CCl₄ (770 mg L⁻¹) (PENA-PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2009), o que pode acarretar em menor volume do solvente extrator na fase sedimentada, o CCl₄ se mostrou mais adequado para a extração de Cu, pois apresentou o sinal para a amostra com menor RSD (9%) e menor sinal no branco. Com base nessa avaliação, o CCl₄ foi selecionado para os experimentos subsequentes.

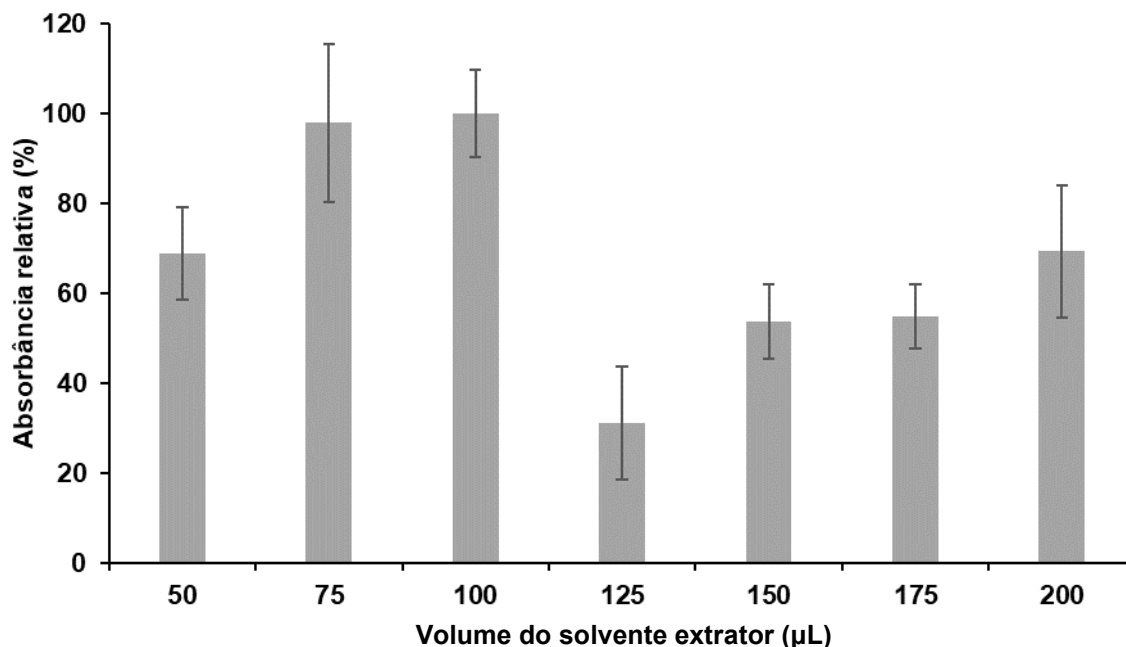
O mecanismo que possibilita interações entre do solvente extrator CCl₄ com o complexo formado, é um dos fatores que contribui para com a eficiência na extração de Cu (PLYUSNIN *et al.*, 2011; ILIEV; YORDANOV; SHOPOV, 1984). Resultados semelhantes são observados em outros trabalhos envolvendo a DLLME, nos quais a

utilização de DDTC e CCl_4 também foi adequada para a extração de Cu em amostras de vinho (SEEGGER *et al.*, 2015) e água (LIAO *et al.*, 2011). A eficiência na extração e pré-concentração de outros elementos usando DDTC e CCl_4 , também é mencionada (AL-SAIDI; EMARA, 2014). O CCl_4 pode ser aplicado na extração de diferentes analitos por DLLME (KHOSROVSHAHI *et al.*, 2022; SÁ *et al.*, 2021; SIXTO; MOLLO; KNOCHEN, 2019) e já foi descrito na literatura como o segundo principal solvente extrator mais utilizado em trabalhos envolvendo a DLLME (CAMPILLO *et al.*, 2017).

4.1.3 Avaliação do volume de solvente extrator

A seleção do volume de solvente extrator, foi feita pela avaliação dos sinais obtidos como absorbância integrada dos extratos obtidos pela injeção de 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 μL de CCl_4 , como mostrado na Figura 6.

Figura 6 - Avaliação do volume de CCl_4 como solvente para extração de Cu. Condições: 5 mL de cerveja, 500 μL de DDTC 2% (m/v), 3 min de centrifugação a 3000 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5)



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

O volume de solvente extrator tem efeito importante no fator de pré-concentração do analitos em métodos de microextração, como a DLLME. Um dos objetivos é a utilização do menor volume de solvente possível, com a melhor eficiência

de extração (REZAEI *et al.*, 2010; ZGOLA-GRZÉSKOWIAK; GRZÉSKOWIAK, 2011; MARTINS, 2012). É importante mencionar que o extrato da DLLME é totalmente introduzido no sistema de nebulização do instrumento F AAS e a aspiração do extrato é muito rápida, uma vez que o volume é tipicamente inferior a 200 μL . Além disso, o perfil do sinal é o mesmo quando o volume do solvente de extração foi alterado.

Com os dados da Figura 6, também é possível verificar que o aumento do volume do solvente de extração não apresentou um comportamento linear de aumento ou redução dos sinais analíticos. Dentre os volumes avaliados, 100 μL foram selecionados para a sequência dos experimentos por apresentar maior intensidade no sinal de absorvância e menor RSD (7%), sendo possível considerar como o volume mais eficiente na extração e pré-concentração de Cu, contido no volume de amostra (5 mL).

4.1.4 Avaliação do US na DLLME

Pelo motivo de não ter sido usado solvente dispersor, a utilização de ultrassom como auxiliar da etapa de extração de Cu da cerveja foi avaliada para eventual melhora na eficiência de extração (CAMPILLO *et al.*, 2017). A avaliação foi feita de duas maneiras:

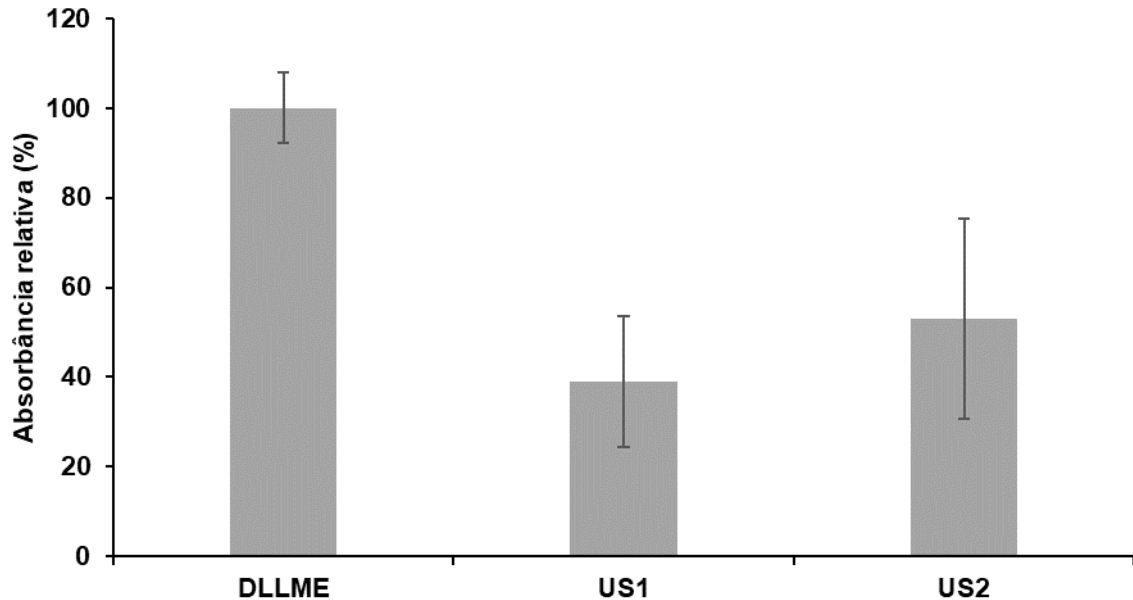
i) sonicação (30 s e amplitude de 70%) após a injeção do solvente extrator (denominado “US1”).

ii) injeção do solvente extrator simultaneamente à sonicação (30 s e amplitude de 70%) (denominado “US2”).

Após a etapa de sonicação, as amostras seguiram para a centrifugação e demais etapas do procedimento de DLLME

A eficiência da extração de US1 e US2 foi comparada com os resultados utilizando a DLLME no modo convencional, sem a utilização de ultrassom. Os resultados para estes experimentos estão mostrados na Figura 7.

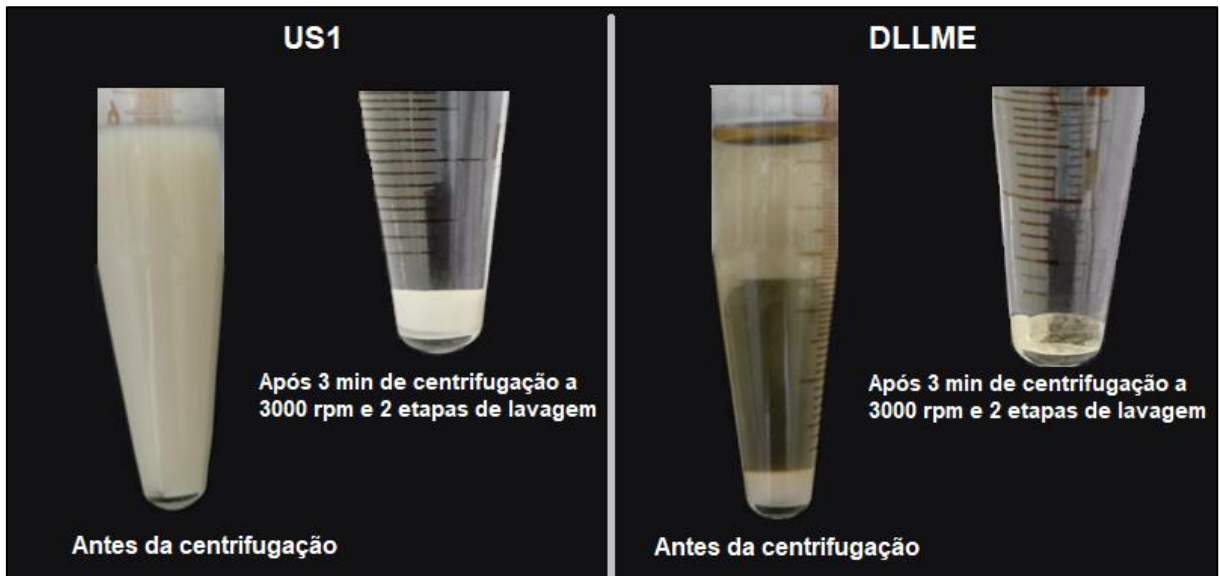
Figura 7 - Efeito do uso de US na DLLME para extração de Cu. Condições: 5 mL de cerveja, 500 μ L de DDTC 2% (m/v), 100 μ L de solvente extrator (CCl_4), 3 min de centrifugação a 3000 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5)



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Em ambos os casos utilizando US, devido a complexa composição química da cerveja (proteínas, carboidratos, polifenóis, aminoácidos, ácidos graxos, água, álcoois, entre outros), além da presença do CCl_4 , foi formada uma emulsão bastante estável entre o solvente extrator e a amostra, comportamento este esperado para a aplicação de US em um sistema bifásico (SUSLICK, 1990; TAHA *et al.*, 2020). Proteínas podem atuar como emulsificantes, reduzindo a tensão interfacial entre a fase aquosa e apolar, quando associadas ao efeito de cavitação ocasionado pelo US, conduzindo a emulsificação. Este processo é conhecido no preparo e estabilização de emulsões (ZHOU *et al.*, 2021). O aspecto da emulsão antes da centrifugação e após a centrifugação e 2 etapas de lavagem, podem ser observados na Figura 8.

Figura 8 - Avaliação do US na DLLME e aspecto da fase sedimentada, após etapas de centrifugação e lavagem. Condições: 5 mL de cerveja, 500 μ L de DDTC 2% (m/v), 100 μ L de CCl_4



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Na Figura 8 está exemplificado o US1, porém em ambas utilizações do US (US1 E US2) o aspecto e resultado obtidos foram semelhantes. Em todos casos houve a separação das fases, sendo observado que a fase sedimentada oriunda da DLLME convencional ficou mais límpida quando comparada com o uso do US.

Além disso, na fase sedimentada nos métodos envolvendo US, ocorreu um efeito indesejável, a formação de uma espécie de coloide bastante consistente, semelhante ao que foi constatado na etapa de avaliação da fase sedimentada (item 4.1.1), utilizando a combinação de solventes extratores e dispersores.

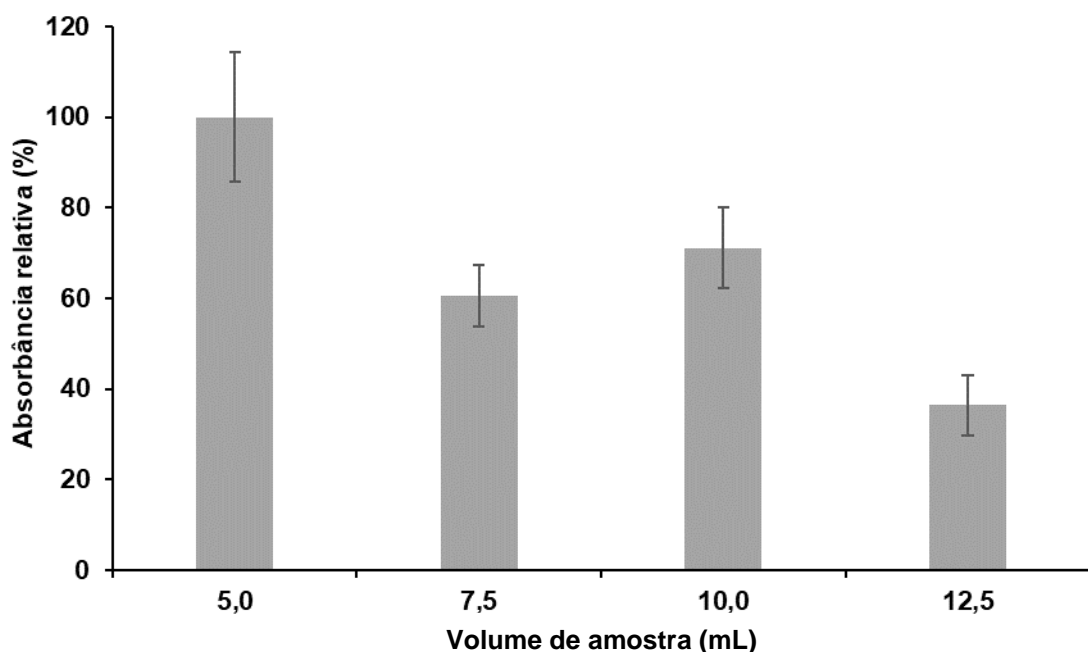
Neste sentido, a fase sedimentada resultante após o uso de US não apresentou compatibilidade com a F AAS, pois a sucção do extrato através do capilar do nebulizador do espectrômetro ocorreu de forma parcial, levando aos menores sinais e maiores valores de desvio padrão (Figura 7). Os valores de RSD para US1, US2 e DLLME convencional foram de 37, 42 e 8%, respectivamente.

Em abordagens alternativas da DLLME quando o uso de US é aplicado com objetivo de obtenção de emulsões, uma etapa adicional utilizando agentes desemulsificantes é requerida para melhorar a separação de fases (MING-JIE *et al.*, 2015; LEONG; FUH; HUANG, 2014). Como tal procedimento não foi apreciado neste trabalho, os resultados obtidos demonstraram que o US não foi adequado ao método proposto e esse procedimento não foi utilizado nos experimentos posteriores.

4.1.5 Avaliação do volume de amostra

A avaliação do volume de amostra foi feita para 5; 7,5; 10 e 12,5 mL, sendo que o volume máximo avaliado foi limitado para evitar que a amostra fosse perdida durante a centrifugação. Os resultados estão mostrados na Figura 9.

Figura 9 - Efeito da variação do volume de amostra para extração de Cu. Condições: 500 μ L de DDTc 2% (m/v), 100 μ L de CCl_4 , 3 min de centrifugação a 3000 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5)



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A avaliação do volume da amostra é um parâmetro importante pois, teoricamente, a quantidade de analito que chega ao atomizador aumenta com o aumento da quantidade de amostra (CAMPILLO *et al.*, 2017). Considerando que, em teoria, o aumento do volume de amostra gera um aumento proporcional do sinal analítico os valores de absorbância relativa foram normalizados, dividindo o valor de absorbância pelo volume de amostra. Este artifício permitiu fazer uma comparação equiparável entre os diferentes volumes. Os resultados para o volume da amostra (Figura 9) são apresentados como a razão entre a absorbância integrada (s^{-1}) e o volume da amostra (mL).

Uma das vantagens da DLLME é a utilização de pequenos volumes (5 a 20 mL) de amostra (ŞERIFE; KARTAL; DURAL, 2012; CAMPILLO *et al.*, 2017). A máxima

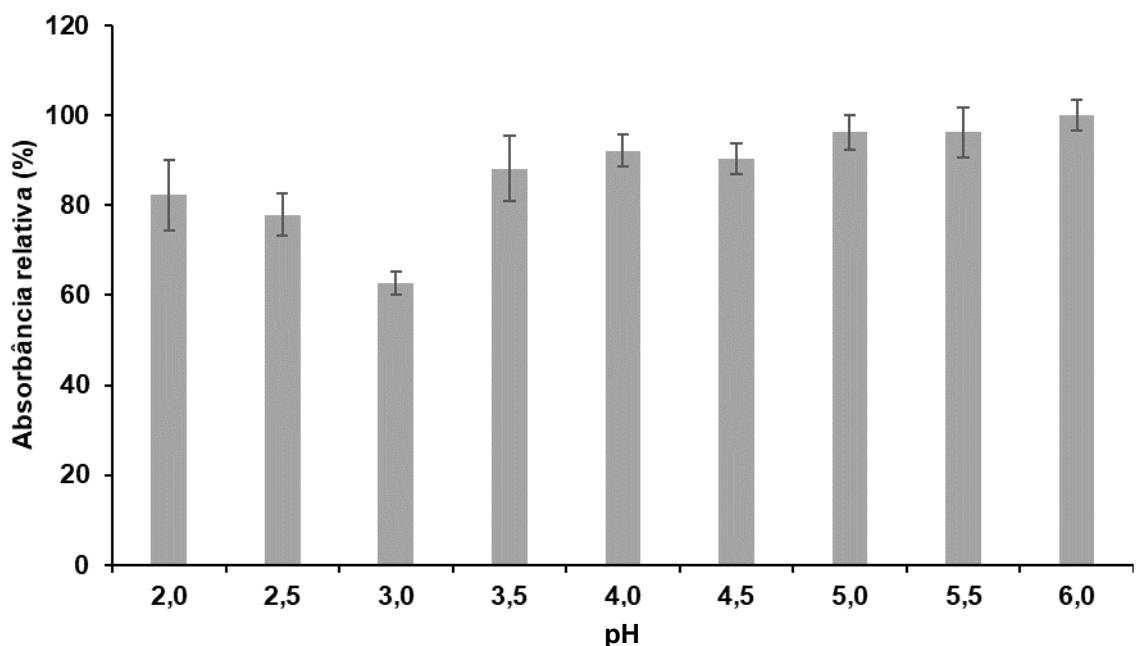
eficiência de extração geralmente é alcançada com volumes de amostra menores, pois volumes maiores dificultam dispersão do solvente extrator na amostra (CAMPILLO *et al.*, 2017). Como pode ser visto na Figura 9, o aumento do volume da amostra causou uma diminuição no sinal analítico. Este efeito pode ser atribuído à quantidade insuficiente de solvente de extração. Desta forma, a condição otimizada para a utilização de 100 μ L de solvente extrator, foi o volume de amostra previamente fixado em 5 mL. Assim, 5 mL de amostra foram selecionados para novos experimentos.

4.1.6 Avaliação do pH da amostra

A avaliação do pH da amostra sobre a eficiência na extração de Cu foi feita para valores de 2,0 a 6,0 com intervalos de 0,5 unidades de pH.

As intensidades do sinal de absorbância integrada em percentual relativo para Cu utilizando diferentes valores de pH estão mostradas na Figura 10.

Figura 10 - Efeito do pH da amostra para extração de Cu. Condições: 5 mL de cerveja, 500 μ L de DDTC 2% (m/v), 100 μ L de solvente extrator (CCl_4), 3 min de centrifugação a 3000 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5)



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

O pH da solução é considerado um dos parâmetros mais importantes para a extração de metais. O DDTC é um complexante não seletivo, formando complexos com diversos metais de transição (KHOSH MARAM; SAADATI; KARIMI, 2020; VIOLA-RHENALS *et al.*, 2018) e a estabilidade do complexo metal-quelante pode ser aprimorada pelo ajuste do pH. Para complexos de carbamatos a faixa de pH de 3,0 a 5,0 é considerada adequada (CESUR, 2007; KOCOT; ZAWISZA; SITKO, 2012; UDDIN; SALAM; HOSSAIN, 2013; SEEGER *et al.*, 2015).

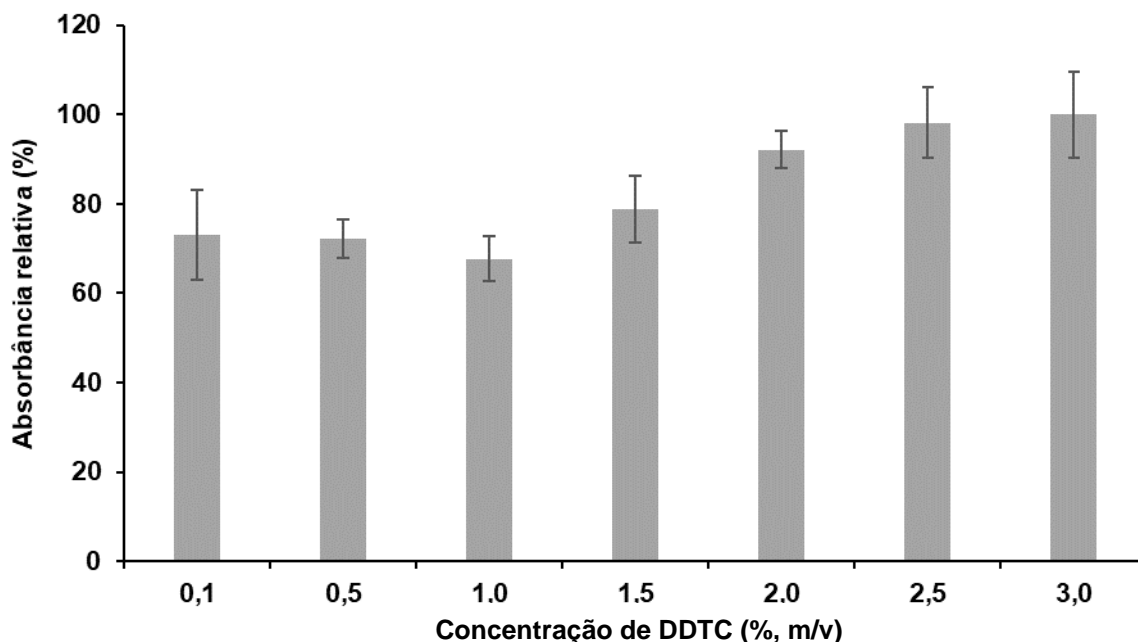
O pH das amostras de cerveja utilizadas neste trabalho é compreendida entre 4,0 e 4,5. Avaliando os valores de desvio padrão e a média das absorvâncias, não foi observada diferença significativa (ANOVA) na faixa de pH entre 4,0 e 6,0. Deste modo, o Ajuste do pH das amostras não é necessário e isso pode ser considerado uma vantagem, minimizando o número de etapas do procedimento.

Para a extração de Cu com DDTC, resultados semelhantes foram observados (KOCOT; ZAWISZA; SITKO, 2012), sendo considerado que o pH em torno de 5,0 seja adequado reação de complexação de Cu com DDTC, não devendo ser inferior a 4,0 por acelerar a decomposição de ditiocarbamatos e valor de pH acima de 7,0 aceleraria precipitação de espécies insolúveis de Cu (UDDIN; SALAM; HOSSAIN, 2013; CESUR, 2007).

4.1.7 Concentração do complexante

A eficiência de extração de Cu, foi avaliada adicionando um volume fixo de 500 µL de soluções contendo DDTC nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0% (m/v). Na Figura 11 são mostradas as intensidades do sinal de absorvância integrada em percentual relativo para Cu utilizando diferentes concentrações de complexante.

Figura 11 - Efeito da concentração do DDTC como complexante para extração de Cu. Condições: 5 mL de cerveja, 500 μ L de DDTC, 100 μ L de solvente extrator (CCl_4), 3 min de centrifugação a 3000 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n=5)



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Soluções de DDTC são tipicamente utilizadas em concentração de 2%. (VOGEL, 1989). Considerando que o DDTC não é um reagente seletivo, é necessário selecionar uma quantidade suficiente deste reagente para assegurar a complexação do analito (SEEGER *et al.*, 2015; KHOSH MARAM; SAADATI; KARIMI, 2020; VIOLA-RHENALS *et al.*, 2018)

A concentração do complexante de 2,0 a 3,0% elevou a média das absorbâncias, porém nas concentrações de 2,5 e 3,0% o RSD também aumentou. Destaca-se que foi verificado uma incompleta dissolução do quelante nas concentrações acima de 2%. Não havendo divergências significativas (ANOVA) nas absorbâncias para as concentrações do complexante de 2,0 a 3,0%, a solução de DDTC 2,0% foi selecionada para os experimentos subsequentes, por apresentar a intensidade de sinal para o analito com menor RSD (inferior a 5%).

4.1.8 Resumo das condições avaliadas para a extração de Cu em cerveja por DLLME

As condições escolhidas para a extração de Cu por DLLME e determinação por F AAS, estão resumidas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições selecionadas para a extração de Cu por DLLME

Parâmetros	Condições
Volume de amostra (mL)	5
Tipo de solvente extrator	CCl ₄
Volume de solvente extrator (µL)	100
Concentração de DDTC (% m/v)	2,0
Volume da solução de DDTC (µL)	500
pH	não requer ajuste
Velocidade de centrifugação (rpm)	3000
Tempo de centrifugação (min)	3
Etapas de lavagem	2

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

4.2 DETERMINAÇÃO DE COBRE POR F AAS

4.2.1 Curva de calibração e linearidade

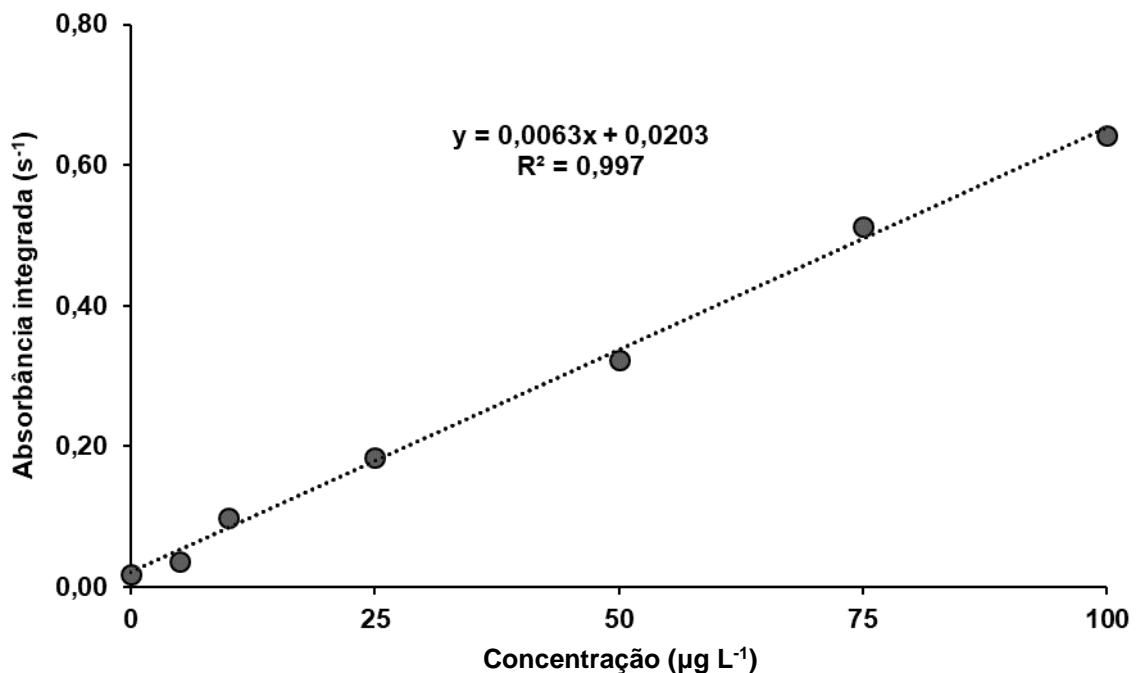
A curva de calibração foi elaborada sob as mesmas condições empregadas no tratamento das amostras, passando por todas as etapas da DLLME, sendo aplicada em soluções de referência, preparadas em água ultrapura com concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 µg L⁻¹ de Cu. Cada ponto da curva de calibração foi feito com 5 replicatas.

Devido a solução de referência, ter sido diluída para a obtenção das curvas de calibração ter sido preparada em HNO₃ 5%, o volume utilizado foi suficiente para levar o pH da água ultrapura para a faixa de trabalho (entre pH 4,0 e 5,0) considerada adequada para a complexação do Cu utilizando DDTC.

Para a avaliação da faixa linear de calibração, foi feito um estudo da curva de calibração externa em função da dispersão dos valores de absorvância integrada em relação a concentração do analito (teste de análise de tendência e linearidade). A

equação da reta apresentou-se como $y = 0,0063x + 0,0203$, com valor do coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,997. Os resultados mostraram que o instrumento responde linearmente na curva analítica preparada em água (adicionando analito antes da DLLME), apresentando linearidade nos intervalos de concentração apresentados (Thompson; Ellison; Wood, 2002). A curva de calibração externa é mostrada na Figura 12.

Figura 12 - Curva de calibração externa



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

É importante ressaltar que, apesar de ser recomendado que se inicie a curva de calibração a partir do LOQ do método. Neste caso, apesar de o valor de LOQ corresponder a $9 \mu\text{g L}^{-1}$, verificou-se que o sinal em área de pico para o ponto de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ também apresentou intensidade adequada para quantificação, sendo inserido na curva de calibração para avaliação da linearidade.

A faixa linear foi avaliada de 5 a $200 \mu\text{g L}^{-1}$. Para valores de concentração a maiores de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, a resposta do equipamento deixou de ser proporcional ao aumento da concentração, nas condições de DLLME otimizadas.

Cabe destacar que as curvas de calibração que não são preparadas no mesmo dia estão sujeitas ao efeito da variação da resposta do equipamento. Com

relação a possíveis efeitos de interferentes, neste estudo, a otimização sempre foi feita diretamente na amostra, de modo a minimizar tais efeitos.

4.2.2 Limites de detecção e quantificação

O LOD e LOQ para Cu estabelecidos a partir do método DLLME/F AAS proposto e nos métodos de referência MAD/ICP-MS E MAD/ICP-OES, estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de LOD e LOQ para MAD/ICP-MS, MAD/ICP-OES e DLLME/F AAS

	MAD/ICP-OES	MAD/ICP-MS	DLLME/F AAS
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	12	8,8	3,2
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	32	24	9,1

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Os valores de LOD e LOQ estabelecidos a partir do método DLLME/F AAS para a determinação de Cu em cerveja, são condizentes com os verificados na literatura para a determinação de Cu por F AAS em amostras de vinho, após extração por DLLME, sendo mencionados LOD e LOQ, respectivamente, de 6,3 e 19 $\mu\text{g L}^{-1}$ (SEEGER *et al.*, 2015). Em amostras de água potável, para a determinação de Cu por F AAS após DLLME, os valores de LOD e LOQ obtidos se mostraram um pouco menores, 1,23 e 6,14 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (DIVRIKLI *et al.*, 2021). Para a determinações de Cu em amostras de água do mar, associando a DLLME e ICP-MS, foram obtidos valores de LOD e LOQ inferiores, 0,07 e 0,20 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. (SAJID; ASIF; IHSANULLAH, 2021). Estes estudos reforçam a eficiência do método de DLLME para extração e pré-concentração visando a determinação de Cu amostras contendo diferentes níveis de concentrações deste analito.

4.2.3 Avaliação da exatidão e precisão

Inicialmente, a avaliação do método de DLLME/F AAS proposto, foi feita com base na comparação entre os resultados obtidos na determinação de Cu por ICP-MS e ICP-OES após MAD, os resultados são expressos na Tabela 5.

Tabela 5 - Determinações de Cu por ICP-OES e ICP-MS após MAD (n=3) e por F AAS após DLLME (n=5). Resultados expressam a média de Cu em $\mu\text{g L}^{-1} \pm$ desvio padrão

Amostra	MAD/ICP-OES	MAD/ICP-MS	DLLME/F AAS
Cerveja 1	52,3 \pm 4,4	53,2 \pm 1,4	58,8 \pm 2,0
Cerveja 2	50,4 \pm 3,2	52,7 \pm 4,9	50,0 \pm 4,1
Cerveja 3	41,5 \pm 2,5	47,4 \pm 2,5	40,2 \pm 5,3

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Os resultados obtidos para as três amostras pelo método DLLME/F AAS, quando comparados com o método MAD/ICP-MS ou MAD/ICP-OES, não apresentaram diferença significativa entre as medidas (teste *t-Student*). Deste modo, o método DLLME/F AAS apresenta exatidão para a determinação de Cu em cerveja.

Na sequência da avaliação, o método proposto foi aplicado em outras quatro amostras de cerveja, sendo a quantificação de Cu feita através da curva de calibração externa. Na Tabela 6, estão mostrados os valores encontrados na determinação de Cu por F AAS após DLLME.

Tabela 6 - Aplicação do método DLLME/F AAS em diferentes amostras de cerveja. Resultados expressam a média de Cu em $\mu\text{g L}^{-1} \pm$ desvio padrão (n=5)

Amostra	Concentração
Cerveja 4	49,4 \pm 3,4
Cerveja 5	20,6 \pm 2,8
Cerveja 6	48,2 \pm 7,6
Cerveja 7	26,5 \pm 2,3

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Os valores encontrados na determinação de Cu em cerveja através do método DLLME/F AAS, mostram-se de acordo com o relatado na literatura para cervejas brasileiras. Em um estudo envolvendo a avaliação de diferentes amostras, dentre elas, cervejas do tipo Pilsen e Lager, são mencionados valores entre 25 e 114 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu após MAD ou análise direta após diluição e determinação por MIP-OES (PIRES *et al.*, 2019).

Posteriormente a aplicação do método DLLME/F AAS para a determinação de Cu em diferentes amostras de cerveja, foram feitos ensaios de recuperação com as 7 amostras utilizadas neste trabalho. Nesse caso, antes do processo de DLLME foi feita

a adição de Cu, em concentração equivalente a $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$ nas amostras, seguido da determinação de Cu por F AAS. Na Tabela 7, estão expressos os valores de concentração de Cu para o ensaio de recuperação para as 7 amostras de cerveja. As recuperações foram calculadas a partir das concentrações determinadas antes da adição e depois da adição de concentração equivalente a $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu, utilizando os resultados obtidos através da curva de calibração externa.

Tabela 7 - Ensaio de recuperação para Cu nas amostras de cerveja empregando o método proposto DLLME/F AAS

Amostra	Concentração na amostra ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração Adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração encontrada após adição ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Cerveja 1	$58,8 \pm 2,0$	25,0	$83,3 \pm 10,7$	98
Cerveja 2	$50,0 \pm 4,1$	25,0	$76,0 \pm 0,9$	104
Cerveja 3	$40,2 \pm 5,3$	25,0	$67,0 \pm 7,0$	107
Cerveja 4	$49,4 \pm 3,4$	25,0	$78,3 \pm 2,3$	116
Cerveja 5	$20,6 \pm 2,8$	25,0	$48,2 \pm 9,3$	110
Cerveja 6	$48,2 \pm 7,6$	25,0	$71,1 \pm 4,5$	92
Cerveja 7	$26,5 \pm 2,3$	25,0	$54,3 \pm 2,0$	111

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Desta forma, os resultados obtidos nos ensaios de recuperação utilizando o método DLLME/F AAS para Cu apresentam valores entre 92 e 116% e os RSDs da medida de concentração nas amostras variou entre 3 e 16%, os quais foram considerados satisfatórios e comprovam a confiabilidade do método (BRITO *et al.*, 2003). Cabe destacar que o método é de fácil implementação, requerendo pouca quantidade de reagentes.

5 CONCLUSÃO

O método DLLME/F AAS desenvolvido para a determinação de Cu em cerveja mostrou-se adequado para esta finalidade, uma vez que os resultados obtidos apresentaram precisão e exatidão adequadas, não sendo constatadas diferenças significativas quando os resultados foram comparados com os obtidos por ICP-OES e ICP-MS, após a decomposição da amostra por MAD. Os ensaios de recuperação foram satisfatórios, apresentando valores entre 92 e 116%, com RSDs inferiores a 16%, expressando a precisão do método.

O preparo da amostra por DLLME combinado com a F AAS para a etapa de quantificação apresenta algumas vantagens como, alto fator de enriquecimento (cerca de 50 vezes), simplicidade instrumental e operacional. Também apresenta a possibilidade de utilização de um único frasco, desde o preparo da amostra até a quantificação, o que minimiza riscos de perda e contaminação por manipulação da amostra.

Apesar das vantagens do método proposto, o processo de calibração é moroso. Cada replicata de solução de referência ou amostra requer em torno de 4 min para o preparo, considerando todas as etapas envolvidas no procedimento da DLLME. Embora tenham sido utilizados volumes reduzidos de um solvente extrator clorado, considerar o método proposto como ambientalmente amigável, como mencionado na literatura, carece de cautela, uma vez que durante a nebulização no equipamento de F AAS, são gerados vapores e resíduos líquidos inerentes ao processo e que precisam de destinação adequada.

O valor de LOQ obtido com o método DLLME/F AAS torna possível a determinação de Cu em níveis inferiores aos regulamentados pela ANVISA. para a presença de Cu em bebidas alcoólicas, como é o caso da cerveja. Neste sentido, o método proposto pode contribuir como alternativa para o monitoramento de Cu em amostras de cerveja, podendo ser aplicado em pesquisa e análises de rotina.

Este estudo também apresenta potencial para estimular o desenvolvimento de novos métodos utilizando a DLLME para a determinação elementar em cerveja e em outras amostras, levando em consideração parâmetros além dos que foram otimizados neste trabalho. Tendo em vista suas vantagens, a DLLME combinada com F AAS ou outras técnicas de quantificação pode continuar sendo difundida e utilizada visando a determinação elementar.

REFERÊNCIAS

- ALEXA, L.; KÁNTOR, A.; KOVÁCS, B.; CZIPA, N. Determination of micro and trace elements of commercial beers. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, 7 (4), p. 432-436, 2018.
- AJIBOYE, T. O.; AJIBOYE, T. T.; MARZOUKI, R.; ONWUDIWE, D. C. The Versatility in the Applications of Dithiocarbamates. **International Journal of Molecular Sciences**, 23 (3), 1317, 2022. 36 p.
- AL-SAIDI, H. M.; EMARA, A. A. A. The recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration and determination of inorganic analytes. **Journal of Saudi Chemical Society**, 18, p. 745-761, 2014.
- ALVES, V. N.; BORGES, S. S. O.; NETO, W. B.; COELHO, N. M. M. Determination of Low Levels of Lead in Beer Using Solid-Phase Extraction and Detection by Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Automated Methods and Management in Chemistry**, Article ID 464102, 2011. 6 p.
- ANTHEMIDIS, A. N.; LOANNOU, K. G. On-line sequential injection dispersive liquid-liquid microextraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of copper and lead in water samples. **Talanta**, 79, p. 86-91, 2009.
- AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. **Biotecnologia**, v. 5. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda, 1983. 243 p.
- ARAÚJO, A. S.; DA ROCHA, L. L.; TOMAZELA, D. M.; SAWAYA, A. C. H. F.; ALMEIDA, R. R.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer. **The Analyst**, 130, p. 884-889, 2005.
- ASFAW, A.; WIBETOE, G. Direct Analysis of Beer by ICP-AES: A Very Simple Method for the Determination of Cu, Mn and Fe. **Microchimica Acta**, 152, p. 61-68, 2005.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Copper** (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2022.
- BAHAR, S.; ZAKERIAN, R. Determination of Copper in Human Hair and Tea Samples after Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop (DLLME-SFO). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Vol. 23, No. 6, p. 1166-1173, 2012.
- BARCELOUX, D. G. Copper. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, 37(2), p. 217-230, 1999.

BELLIDO-MILLA, D.; MORENO-PEREZ, J. M.; HERNANDEZ-ARTIGA, M. P. Differentiation and classification of beers with flame atomic spectrometry and molecular absorption spectrometry and sample preparation assisted by microwaves. **Spectrochimica Acta B**, 55, p. 855–864, 2000.

BELLIDO-MILLA, D.; ONATE-JAEN, A.; PALACIOS-SANTANDER, J. M.; PALACIOS-TEJERO, D.; HERNANDEZ-ARTIGA, M. P. Beer digestions for metal determination by atomic spectrometry and residual organic matter. **Microchimica Acta**, 144, p. 183-190, 2004.

BIZZI, C. A.; PEDROTTI, M. F.; SILVA, J. S.; BARIN, J. S.; NOBREGA, J. A.; FLORES, E. M. M. Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 32, p. 1448-1466, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC Nº 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre ingestão diária recomendada (IDR) para proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 23/09/2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC Nº 722, de 1º de julho de 2022. Limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 06 de julho de 2022.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, p. 129-146, jan./dez. 2003.

CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; ŠANDREJOVÁ, J.; ANDRUCH, V. Ten years of dispersive liquid-liquid microextraction and derived techniques. **Applied Spectroscopy Reviews**, 52:4, p. 267-415, 2017.

CARASEK E.; TONJES, J. W.; SCHARF, M. Pré-concentração de chumbo e cádmio em um sistema de micro extração líquido-líquido e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 748-752, 2002.

CESUR, H. Selective Solid-Phase Extraction of Cu(II) Using Freshly Precipitated Lead Diethyldithiocarbamate and its Spectrophotometric Determination. **Chemical Papers**, 61 (5), p. 342-347, 2007.

CHAREHSAZ, M.; HELVACIOGLU, S.; CETINKAYA, S.; DEMIR, R.; ERDEM, O.; AYDIN, A. Heavy metal and essential elements in beers from turkey market: A risk assessment study. **Human and Experimental Toxicology**, Vol. 40(8), p. 1241-1249, 2021.

CHEN H.; CHEN R.; LI, S. Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, 1217, p. 1244-1248, 2010.

CHEN, Y.; GUOA, Z.; WANG, X.; QIU, C. Review Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, 1184, p. 191–219, 2008.

CHRISFIELD, B.J.; HOPFER, H.; ELIAS, R.J. Impact of Copper Fungicide Use in Hop Production on the Total Metal Content and Stability of Wort and Dry-Hopped Beer. **Beverages**, 6, 48, p. 1-17, 2020.

COELHO NETO, D. M.; FERREIRA, L. L. P.; SAD, C. M. S.; CASTRO, E. V. R.; BORGES, W. S.; FILGUEIRAS, P. R.; LACERDA J. V. Conceitos Químicos Envolvidos na Produção da Cerveja: Uma Revisão. **Revista Virtual de Química**, Vol. 12, nº 1, p. 1-28, 2020.

COLEN, L.; SWINNEN, J. Economic growth, globalisation and beer consumption. **Journal of Agricultural Economics**, 67, p. 186 -207, 2016.

DIVRIKLI, U.; ALTUN, F.; AKDOĞAN, A.; SOYLAK, M.; ELÇI, L. An efficient green microextraction method of Co and Cu in environmental samples prior to their flame atomic absorption spectrometric detection. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 101:15, p. 2728-2741, 2021.

ELCI, L.; ELCI, A.; BERG, T. A.; TYSON, J. F. Dispersive liquid-liquid microextraction and microsample injection system coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry for inorganic arsenic speciation in natural waters. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 93(10), p. 1065-1073, 2013.

FAIA, R.; LEMOS, L. M.; MOURÃO-JÚNIOR, C. A.; ANDREAZZI, A. E. Metabolismo do cobre e doença de Wilson: uma Revisão. **Revista Médica de Minas Gerais**, 26: e-1833, 2017.

FAN, Y.; LIU, S.; XIE, Q. Rapid determination phthalate esters in alcoholic beverages by conventional ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. **Talanta**, 119, p. 291-298, 2014.

FANTOZZI, P.; MONTANARI, L.; MANCINI, F.; GASBARRINI, A.; ADDOLORATO G.; SIMONCINI, M.; CARDINI, M.; GHISELLI, A.; SCACCINI, C. In vitro antioxidant capacity from wort to beer. **Food Science and Technology**, 31, p. 221-227, 1998.

FELIX, C. S. A.; DA SILVA, D. L. F.; CHAGAS, A. V. B.; DE MELO, M. B.; JUNIOR, R. A. C.; DAVID, J. M.; FERREIRA, S. L. C. A green on-line digestion system using 70% hydrogen peroxide and UV radiation for the determination of chromium in beer employing ETAAS. **Microchemical Journal**, 146, p. 1204-1208, 2019.

GHRANJIK, R.; NASSIRI, M.; HASHEMI, S. H. Spectrophotometric Determination of Copper and Nickel in Marine Brown Algae after Perconcentration with Surfactant Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, Vol. 39, No. 3, p. 117-126, 2020.

GORISTEIN, S.; ZEMSER, M.; VARGAS-ALBORES, F.; OCHOA, J. L.; PAREDES-LOPEZ, O.; SCHELER, C. H.; SALNIKOW, J.; MARTIN-BELLOSO, O.; TRAKHTENBERG, S. Proteins and amino acids in beers, their contents and relationships with other analytical data. **Food Chemistry**, 67, p. 71-78, 1999.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, 4(1): 9pp. 2001. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.

HIMMI, M. F. M.; YIH, B. S.; YUSOFF, F.; SALEH, N. M. Extraction of Phenol from Water using Dispersive Liquid-liquid Microextraction Coupled with UV-VIS Spectroscopy. **Journal of Analytical Chemistry**, Vol. 77, No. 1, p. 8-17, 2022.

HUSÁKOVÁ, L.; CERNOHORSKÝ, T.; ŠRÁMKOVÁ, J.; VAVRUŠOVÁ, L. Direct determination of arsenic in beer by electrothermal atomic absorption spectrometry with deuterium background correction (D2-ET-AAS). **Food Chemistry**, 105, p. 286-292, 2007.

LEÃO, P. R. P.; MEDINA, A. L.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S. Decomposição de amostras de cerveja com sistema de refluxo para determinação monoelementar por F AAS/AES e determinação multielementar por MIP OES. **Brazilian Journal of Food Technology**, 21, e2017062, 2018. 11 p.

ILIEV, V. I.; YORDANOV, N. D.; SHOPOV, D. Studies on the intermolecular interactions of metal chelate complexes-viii. On the interactions of dithiocarbamate-copper(ii) and -copper(i) complexes with haloalkanes. **Polyhedron**, Vol. 3, No. 3, p. 291-296, 1984.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, **DOQCGCRE-008**, 2007. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidog/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf. Acessado em: 28 de maio de 2022.

INSTITUTE OF MEDICINE (US). Panel on Micronutrients. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington (DC): **National Academies Press** (US); 2001. 773 p.

JAGANATHAN, J.; DUGAR, S. M. Atomic Absorption Spectrometric Determination of Copper in Malt Beverages. **Atomic Spectroscopy**, Vol. 18(5), p. 156-159, 1997.

JÚNIOR, O. C.; TEIXEIRA JUNIOR, J. R.; GALINARI, R.; RAWET, E. L.; DA SILVEIRA, C. T. J. O setor de bebidas no Brasil. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, nº 40, p. 93-129, 2014.

JAHROMI, E. Z.; BIDARI, A.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. R. M.; JAMALI, M. R. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry Ultra trace determination of cadmium in water samples. **Analytica Chimica Acta**, 585, p. 305-311, 2007.

KEUKELERIE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, 23, p. 108-112, 2000.

KHOSH MARAM, L.; SAADATI, M.; KARIMI, A. A simple and rapid technique for the determination of copper based on air-assisted liquid–liquid microextraction and image colorimetric analysis. **Analytical Methods**, 12, p. 3490-3498, 2020.

KHOSROSHAHI, E. M.; MOGADDAM, M. R. A.; FARAJZADEH, M. A.; JAVADZADEH, Y.; NEMATI, M. Application of magnetic benzamide-coated SiC nanocomposite in effervesces-assisted DSPE combined with DLLME for the extraction of pesticides from fruit juice samples. **Microchemical Journal**, 181, 107749, 2022. 10 p.

KOCOT, K.; ZAWISZA, B.; SITKO, R. Dispersive liquid–liquid microextraction using diethyldithiocarbamate as a chelating agent and the dried-spot technique for the determination of Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se and Pb by energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, 73, p. 79-83, 2012.

KORN, M. G. A.; BOA MORTE, E. S.; SANTOS, D. C. M. B.; CASTRO, J. T.; BARBOSA, J. T. P.; TEIXEIRA, A. P.; FERNANDES, A. P.; WELZ, B.; SANTOS, W. P. C., SANTOS, E. B. G. N., KORN, M. Sample preparation for the determination of Metals in food samples using spectroanalytical methods - a review. **Applied Spectroscopy Reviews**, 43:2, p. 67-92, 2008.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2^a ed. São Paulo: Editora SBQ, 2019.

LEMOS, V. A.; BARRETO, J. A.; SANTOS, L. B.; ASSIS, R. S.; NOVAES, C. G.; CASSELLA, R. J. In-syringe dispersive liquid-liquid microextraction. **Talanta**, 238, 123002, 2022. 9 p.

LEONG, M.; FUH, M.; HUANG, S. Beyond dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A** (2014) 1335, p. 2-14.

LIANG, P.; SANG, H. Determination of trace lead in biological and water samples with dispersive liquid–liquid microextraction preconcentration. **Analytical Biochemistry**, 380, p. 21-25, 2008.

LIAO, X.; LIANG, B.; LI, Z.; LI, Y. A simple, rapid and sensitive ultraviolet-visible spectrophotometric technique for the determination of ultra-trace copper based on injection-ultrasound assisted dispersive liquid–liquid microextraction. **Analyst**, 136, p. 4580–4586, 2011.

LLOBAT-ESTELLES, M.; MAURI-AUCEJO A. R.; MARIN-SAEZ, R. Detection of bias errors in ETAAS: Determination of copper in beer and wine samples. **Talanta**, 68, p. 1640-1647, 2006.

MACIEL, J. V. **Desenvolvimento de método para determinação de ferro e cobre em vinho por espectrofotometria empregando DLLME**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, 2013.

MACIEL, J. V.; SOARES, B. M.; MANDLATE, J. S.; PICOLOTO, R. S.; BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; DUARTE, F. A. Simple and Fast Method for Iron Determination in White and Red Wines Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62, p. 8340-8345, 2014.

MAHMOOD, N.; PETRACO, N.; HE, Y. Elemental fingerprint profile of beer samples constructed using 14 elements determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): multivariation analysis and potential application to forensic sample comparison. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 402, p. 861-869, 2012.

MALLAH, M. H.; SHEMIRANI, F.; MARAGHEH, M. G. Use of dispersive liquid-liquid microextraction for simultaneous preconcentration of samarium, europium, gadolinium and dysprosium. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Vol. 278, No.1, p. 97-102, 2008.

MARCANO, E.; GÓMEZ, C.; BENZO, Z.; LAINE, J. Estudio preliminar sobre la determinación de elementos traza en cervezas venezolanas por ICP-OES. **Química Nova**, Vol. 33, No. 3, p. 653-655, 2010.

MARTINS, M. L.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Determination of pesticides and related compounds in water by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical Methods**, 6, p. 5020-5027, 2014.

MARTINS M. L.; PRIMEL E. G.; CALDAS S. S.; PRESTES O. D.; ADAIME M. B.; ZANELLA R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, 4(1), p. 35-51, 2012.

MATUSIEWICZ, H. Sample Preparation for Inorganic Trace Element Analysis. **Physical Sciences Reviews**, Vol. 2, No. 5, p. 1-39, 2017.

MEIRA, L. A.; BARRETO, J. A.; CERQUEIRA, U. M. F. M.; BEZERRA, M. A.; DIAS, F. S. Ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction Ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (USDLLME) of zinc in Brazilian sugarcane spirit samples. **Journal of the Iranian Chemical Society**, 18, p. 603-610, 2021.

MILESTONE. Digestion method for food samples. Milestone, Srl **UltraWAVE, Operator Manual**. Sorisole, 2013.

MING-JIE, L.; HONG-YI, Z.; XIAO-ZHE, L.; CHUN-YAN, C.; ZHI-HONG, S. Progress of Extraction Solvent Dispersion Strategies for Dispersive Liquid-liquid Microextraction. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 43(8), p. 1231-1240, 2015.

MORADO, R. **Larousse da cerveja**. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009. 116 p.

MOREIRA, B. J.; YOKOYA, J. M. C.; GAITANI, C. M. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. **Scientia Chromatographica**, 6 (3), p.186-204, 2014.

MOTULSKY, H. J. **GraphPad Statistics**. Acessado em 22 de maio de 2022 disponível em <https://www.graphpad.com/quickcalcs/contMenu/>

NASCENTES, C. C.; KAMOGAWA M. Y.; FERNANDES, K. G.; ARRUDA, M. A. Z.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Direct determination of Cu, Mn, Pb, and Zn in beer by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, 60, p. 749–753, 2005.

NORONHA, L. M. S.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; OLIVEIRA, A. F. Evaluation of the effects of Hofmeister series on salting out in the determination of organophosphorous pesticides and pyrethroids by LDS/DLLME. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 26(9), p. 1897-1901, 2015.

ODULARU. A. T.; AJIBADE P. A. Dithiocarbamates: Challenges, Control, and Approaches to Excellent Yield, Characterization, and Their Biological Applications. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, 8260496, p. 1-15, 2019.

OLIVEIRA, E. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Vol. 14, No. 2, p. 174-182, 2003.

OLLER-RUIZ, A.; VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; FENOLL, J.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Triple Quadrupole Mass Spectrometry with Liquid Chromatography and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Determination of Monoterpenes in Alcoholic Drinks. **Food Analytical Methods**, 10, p. 3615-3622, 2017.

PEARSON R. G. Hard and soft acids and bases. **Journal of the American Chemical Society**, 85, 22, p. 3533-3539, 1963.

PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: a review. **Spectrochimica Acta Part B**, 64, p. 1-15, 2009.

PINHEIRO, F. C.; AGUIRRE, M. A.; NÓBREGA, J. A.; CANALS, A. Dispersive liquid-liquid microextraction of Cd, Hg and Pb from medicines prior to ICP OES determination according to the United States Pharmacopeia. **Analytical Methods**, 13, 5670, 2021.

PIRES, L. N.; DIAS, F. S.; TEIXEIRA, L. S. G. Assessing the internal standardization of the direct multi-element determination in beer samples through microwave-induced plasma optical emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 1090, p. 31-38, 2019.

PLYUSNIN, V. F.; KOLOMEETS, A. V.; GRIVIN, V. P.; LARIONOV, S. V., LEMMETYINEN, H. Photochemistry of Dithiocarbamate Cu(II) Complex in CCl₄. **The Journal of Physical Chemistry A**, 115, p.1763-1773, 2011.

POHL, P. Determination and fractionation of metals in beer - a review. **Food Additives and Contaminants**, 25 (06), p. 693-703, 2008.

POHL, P.; SERGIEL, I. Evaluation of the Total Content and the Operationally Defined Species of Copper in Beers and Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, p. 9378-9384, 2009.

REBELLO, F. F. P. Produção de cerveja. **Revista Agroambiental**, p.145-155, 2009.

RENATO S.; DURELLO R. S.; SILVA L. M.; BOGUSZ J. S. Química do Lúpulo. **Química Nova**, Vol. 42, nº 8, p. 900-919, 2019.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEIN, M. M.; AGHAEI, E.; AHMADIA, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal Chromatography A**, 1116, p. 1-9, 2006.

REZAEI, M.; KHALILIAN, F. Preconcentration of uranium in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with solid-phase extraction and determination with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **The Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, 29 (3), p. 367-376, 2015.

REZAEI M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, 1217, p. 2342-2357, 2010.

ROSA, F. C.; DUARTE F. A.; PANIZ, J. N. G.; HEIDRICH G. M.; NUNES, M. A.G.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER. V. L. Dispersive liquid-liquid microextraction: An efficient approach for the extraction of Cd and Pb from honey and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, 123, p. 211-217, 2015.

ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. A Química da Cerveja. **Química nova na escola**, Vol. 37, Nº 2, p. 98-105, 2015.

SÁ, I. P.; ALMEIDA, O. N.; LIMA, D. C.; SILVA, E. G. P.; SANTOS, L. N.; LUZARDO, F. H. M.; VELASCO, F. G.; GONZALEZ, M. H.; AMORIM, F. A. C. Determination of lanthanide and actinide elements by energy dispersive x-ray fluorescence spectrometry applying DLLME preconcentration and dried spot. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, 182, 106253, 2021. 9 p.

SAJID, M.; ASIF, M.; IHSANULLAH, I. Dispersive liquid-liquid microextraction of multi-elements in seawater followed by inductively coupled plasma-mass spectrometric analysis and evaluation of its greenness. **Microchemical Journal**, 169, 106565, 2021. 8 p.

SAJID, M. Dispersive liquid-liquid microextraction: Evolution in design, application areas, and green aspects. **Trends in Analytical Chemistry**, 152, 116636, 2022. 16 p.

SANDELL, E. B. **Colorimetric determination of trace of metals**. Interscience, New York, ed. 3, 1959.

SARAGENTELLI, V.; MAURO, A. E.; MASSALONI, A. C. Aspectos do metabolismo do cobre no homem. **Química Nova**, 19, p. 290-293, 1996.

SEEGER, T. S.; ROSA, F. C.; BIZZI C. A.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M.; DUARTE, F. A. Feasibility of dispersive liquid-liquid microextraction for extraction and preconcentration of Cu and Fe in red and white wine and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, 105, p. 136-140, 2015.

SHARMA, N.; THAKUR, P.; CHASKAR, M. G. Determination of eight endocrine disruptor pesticides in bovine milk at trace levels by dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC-MS determination. **Journal of Separation Science**, 44, p. 2982-2995, 2021.

ŞERIFE, S.; KARTAL, S.; DURAL, S. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Procedure for the Determination of Palladium by Flame Atomic Absorption Spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Vol. 23, No. 6, p. 1033-1040, 2012.

SIXTO, A.; MOLLO, A.; KNOCHEN, M. Fast and simple method using DLLME and FAAS for the determination of trace cadmium in honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, 82, 103229, 2019. 6 p.

ŠKRLÍKOVÁ J.; ANDRUCH, V.; BALOGH, L. S.; KORCÚVÁ, L.; NAGY, L.; BAZEL', Y. A novel, environmentally friendly dispersive liquid-liquid microextraction procedure for the determination of copper. **Microchemical Journal**, 99, p. 40-45, 2011.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

SUSLICK, K. S. Sonochemistry. **Science**, 247(4949), p. 1439-1445, 1990.

TAHA, A.; AHMED E.; ISMAIEL, A.; ASHOKKUMAR, M.; XU, X.; PAN, S.; HU, H. Ultrasonic emulsification: An overview on the preparation of different emulsifiers-stabilized emulsions. **Trends in Food Science & Technology**, 105, p. 363-377, 2020.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, Vol. 74, No. 5, p. 835-855, 2002.

UDDIN, M. N.; SALAM, M. A.; HOSSAIN, M. A. Spectrophotometric measurement of Cu(DDTC)₂ for the simultaneous determination of zinc and copper. **Chemosphere**, 90, p. 366-373, 2013.

VIOLA-RHENALS, M.; PATEL, K. R.; JAIMES-SANTAMARIA, L.; WU, G.; LIU, J.; DOU, Q. P. Recent advances in antabuse (disulfiram): the importance of its metal-binding ability to its anticancer activity. **Current Medicinal Chemistry**, 25, p. 506-524, 2018.

VOGEL, A. I.; JEFFERY, G. H.; BASSETT, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C. **Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis**, 5th Edition, Longman Scientific and Technical, Harlow, 1989. 877 p.

WALKER, M. D. The influence of metal ions on concentrations of flavor active sulphur compounds measured in beer using dynamic headspace sampling. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 67, p. 25-28, 1995.

WATSON, C. A. Official and Standardized Methods of Analysis, 3rd ed., **Royal Society of Chemistry**, Cambridge, 1994.

WEN X.; YANG, Q.; YAN, Z.; DENG, Q. Determination of cadmium and copper in water and food samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with UV-vis spectrophotometry. **Microchemical Journal**, 97, p. 249-254, 2011.

WIETSTOCK, P. C.; KUNZ, T.; WATERKAMP, H.; METHNER, F. J. Uptake and release of Ca, Cu, Fe, Mg, and Zn during beer production. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, 73, p. 179-184, 2015.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Copper: Environmental Health Criteria 200**, Geneva, 1998.

WU, P.; HE, S.; LUO, B.; HOU, X. Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry: A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, 44, p. 411-437, 2009.

YANG, X.; PENG, X.; KONG, L.; HU, X. Removal of Ni(II) from strongly acidic wastewater by chelating precipitation and recovery of NiO from the precipitates. **Journal of environmental sciences**, 104, p. 365-375, 2021.

YAZICI, E.; FIRAT, M.; CHORMEY, D. S.; BUDAK T. B.; SAHIN, C.; TURAK, F.; BAKIRDERE, S. Trace Level Determination of Cadmium in Different Water Matrices and Rose Hip Tea Sample by Dispersive Liquid-liquid Microextraction Slotted Quartz Tube, Flame Atomic Absorption Spectrometry After Complexation with a New Imidazole-based Ligand. **Atomic Spectroscopy**, Vol. 40(1), p. 24-30, 2019.

ZGOLA-GRZÉSKOWIAK, A.; GRZÉSKOWIAK, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, 30, p. 1382-1399, 2011.

ZHOU, L.; ZHANG, J.; XING, L.; ZHANG, W. Applications and effects of ultrasound assisted emulsification in the production of food emulsions: a review. **Trends in Food Science & Technology**, 110, p. 493-512, 2021.

ZHOU, Z.; NI W., JI, Z.; LIU, S.; HAN, X.; LI, X.; MAO, J., Development of a rapid method for determination of main higher alcohols in fermented alcoholic beverages based on dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Food Analytical Methods**,13, p. 591-600, 2020.