



UFSM

Dissertação de Mestrado

**EMPREGO DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA
EM MEL PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E
CHUMBO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM
CHAMA**

Francisco Cunha da Rosa

PPGQ

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**EMPREGO DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA
EM MEL PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E
CHUMBO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM
CHAMA**

por

Francisco Cunha da Rosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química,
Área de Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria,
como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

A Comissão Examinadora abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**EMPREGO DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA
EM MEL PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E
CHUMBO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM
CHAMA**

Elaborada por

Francisco Cunha da Rosa

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler - Orientador (UFSM-RS)

Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário (UNESP-SP)

Prof^a. Dr^a. Cláudia Smaniotto Barin (UFSM-RS)

“Seja como for, a grandiosa revolução humana de uma única pessoa irá um dia impulsionar a mudança total do destino de um país e, além disso, será capaz de transformar o destino de toda a humanidade.”

Daisaku Ikeda

“Cada um de nós compõe a sua história, cada ser em si carrega o dom de ser capaz de ser feliz.”

Almir Sater

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade para a realização deste trabalho. Aqui personificada em dois de seus funcionários Ademir e Valéria.

Aos professores Claudia Barin e Amauri Menegário pelas considerações extremamente pertinentes e importantes para o aprimoramento deste trabalho e pela disponibilidade em fazerem parte de minha banca examinadora.

Ao qualificado grupo de professores que compõe o Setor de Química Industrial e Ambiental da UFSM. Os professores: Érico Flores, Valderi Dressler, José Neri Paniz, Edson Müller, Cezar Bizzi, Paola Mello, Fábio Duarte, Cláudia Barin e Juliano Barin. Todos que certamente foram participantes em menor ou maior magnitude desta vitória.

Ao meu orientador, o professor Valderi Dressler pela paciência e dedicação assim como ao meu co-orientador, o professor Fábio Duarte pelo incentivo e pelo norte proposto a este trabalho.

Aos professores José Neri e Érico Flores pelas inúmeras oportunidades de crescimento profissional que me foram proporcionadas ao permitirem que eu fizesse parte de um grupo como o SQIA e ao professor Juliano Barin pelos sempre oportunos questionamentos e propostas de discussão dos resultados.

Ao meu pai João Francisco espelho de coerência e verdade, à minha mãe Emília Cunha símbolo de persistência e dedicação e à minha avó Neli Júlia inspiração em minha escolha pelo mundo da educação.

À minha melhor amiga, companheira e amor da minha vida Luiza Zanardo da Rosa pelo o apoio irrestrito em todas as escolhas. Uma mulher fantástica que nunca mediu esforços para lutar ao meu lado.

Por fim, dedico esta vitória a meus dois filhos Júlia e Pedro Francisco. Pois, acredito que o maior legado que posso deixar-lhes é que através de esforço, coerência e persistência, todo sonho é possível.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
SUMÁRIO	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XIII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVII
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS DO MEL	5
3.2 ASPECTOS GERAIS SOBRE CÁDMIO E CHUMBO	8
3.3 PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS	9
3.4 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO.....	11
3.5 MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA.....	13
3.5.1 A DLLME aplicada para a extração de compostos orgânicos em mel	15
3.5.2 A DLLME aplicada a extração de Cd e Pb.....	17
3.6 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO	22
3.6.1 Espectrometria de absorção atômica.....	22
3.6.2 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.....	24
3.6.3 Comparação entre métodos de determinação elementar de Cd e Pb	25
3.7 ESTUDOS ENVOLVENDO DETERMINAÇÃO DE METAIS EM MEL	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	29
4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES	31

4.3 AMOSTRAS E MANUSEIO DE MATERIAIS	32
4.4 TÉCNICA DE DLLME.....	33
4.4.1 Avaliação dos solventes extratores e dispersores	34
4.4.2 Avaliação do número de lavagens do extrato	35
4.4.3 Avaliação do volume de solvente dispersor	35
4.4.4 Avaliação do volume de solvente extrator.....	36
4.4.5 Avaliação do pH da solução da amostra	36
4.4.6 Avaliação da concentração do agente complexante em solução.....	36
4.4.7 Avaliação da temperatura na extração de Cd e Pb no mel	36
4.4.8 Avaliação da velocidade de centrifugação	37
4.4.9 Avaliação da concentração da solução de mel	37
4.5 DETERMINAÇÃO DE Cd E Pb POR F AAS	37
4.5.1 Cálculo do fator de pré-concentração	38
4.5.2 Curvas analíticas.....	38
4.6 MÉTODO DE DECOMPOSIÇÃO DA AMOSTRA	39
4.6.1 Decomposição de mel por via úmida assistida por micro-ondas.....	39
5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	40
5.1 MÉTODO DE DLLME.....	41
5.1.1 Avaliação dos solventes extratores e dispersores	41
5.1.2 Avaliação das etapas de lavagem do extrato.....	44
5.1.3 Avaliação do volume de solvente dispersor	46
5.1.4 Avaliação do volume de solvente extrator.....	48
5.1.5 Avaliação do efeito da concentração da solução do NaDDTC.....	49
5.1.6 Avaliação do efeito do pH da solução da amostra	51
5.1.7 Avaliação da temperatura na extração.....	54
5.1.8 Avaliação da velocidade de centrifugação	55
5.1.9 Avaliação da concentração da solução de mel	57

5.1.10 Resumo das condições escolhidas para a extração de Cd e Pb de mel por DLLME.....	59
5.2 DETERMINAÇÃO DE Cd E Pb POR F AAS	60
5.2.1 Cálculo do fator de pré-concentração	60
5.2.2 Curvas de calibração	61
5.2.3 Ensaios de recuperação de Cd e Pb pelo método proposto	64
5.3 COMPARAÇÃO DE RESULTADOS COM OUTRO MÉTODO	65
5.3.1 Determinação de Cd e Pb por ICP-MS após decomposição de mel por MAWD.....	65
6 CONCLUSÕES	67
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas de contaminação de metais no mel por fontes naturais e antropogênicas (adaptado de Pohl ³).....	6
Figura 2. Sequência do procedimento de DLLME (adaptado de Primel <i>et al.</i> ⁴⁶).	13
Figura 3. Esquema geral de um espectrômetro de absorção atômica (adaptado de Welz <i>et al.</i> ⁹¹).....	22
Figura 4. Esquema de um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (adaptado de Becker ⁹⁴).....	24
Figura 5. a) Comparação de faixas de concentração de resposta linear dos métodos instrumentais e b) comparação de faixas de custos relativos dos métodos instrumentais F AAS, GF-AAS, ICP OES e ICP-MS (adaptado de Moron ⁹⁶).	25
Figura 6. Procedimento proposto empregando DLLME e F AAS.	34
Figura 7. Fórmula estrutural plana do dietilditiocarbamato de sódio.	36
Figura 8. Perfil do sinal de absorbância para Cd (a) e para Pb (b). (Linha em vermelho: sinal atômico; linha em azul: sinal do fundo (BG).).....	43
Figura 9. Intensidade dos sinais de absorbância integrada obtidos para 10 µg L ⁻¹ de Cd em 10 mL de solução aquosa contendo 50 g L ⁻¹ de mel após extração por DLLME empregando diferentes misturas de solventes extratores e dispersores (n = 5).	43
Figura 10. Intensidade dos sinais de absorbância integrada obtidos para 20 µg L ⁻¹ de Pb em 10 mL de solução aquosa contendo 50 g L ⁻¹ de mel após extração pro DLLME mediante diferentes misturas de solventes extratores e dispersores (n = 5).	44
Figura 11. Influência da lavagem do extrato com água purificada. Extratos obtidos a partir da DLLME para 10 mL de soluções com 50 g L ⁻¹ de mel com 10 µg L ⁻¹ de Cd (n = 5).....	45
Figura 12. Influência da lavagem do extrato com água purificada. Extratos obtidos a partir da DLLME para 10 mL de soluções com 50 g L ⁻¹ de mel com 20 µg L ⁻¹ de Pb (n = 5).....	45

Figura 13. Efeito do volume de acetonitrila (solvente dispersor) na extração por DLLME de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd em 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel (n = 5).....	46
Figura 14. Efeito do volume de acetona (solvente dispersor) na extração por DLLME de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb em 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel (n = 5).....	47
Figura 15. Influência do volume de tetracloreto de carbono na extração de Cd $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (n = 5) em 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel por DLLME.	48
Figura 16. Influência do volume de tetracloreto de carbono na extração de Pb $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (n = 5) em 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel por DLLME.	49
Figura 17. Estrutura prevista para o complexo de Cd ou Pb (M^{2+}) com DDTTC (Adaptado de Ferreira ¹⁰⁷).	50
Figura 18. Influência da concentração de NaDDTC em 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel na extração de Cd $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (n = 5) por DLLME.	51
Figura 19. Influência da concentração de NaDDTC em 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel na extração de Pb $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (n = 5) por DLLME.	51
Figura 20. Efeito do pH na extração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd por DLLME a partir de 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel (n = 5).	53
Figura 21. Efeito do pH na extração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb por DLLME a partir de 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel (n = 5).	53
Figura 22. Efeito da temperatura na extração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd por DLMME a partir de 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel (n = 5).	54
Figura 23. Efeito da temperatura na extração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb por DLMME a partir de 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel (n = 5).	54
Figura 24. Avaliação da velocidade de centrifugação necessária (t = 2 min) para a separação de fases na extração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd por DLLME empregando-se pós-extração e após duas lavagens dos extratos com água (n = 5).....	56
Figura 25. Avaliação da velocidade de centrifugação necessária (t = 2min) para a separação das fases na extração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb por DDLME empregando-se pós-extração e após duas lavagens dos extratos com água (n = 5).....	57
Figura 26. Efeito da concentração de mel em solução aquosa na extração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd (n = 5).	58

Figura 27. Efeito da concentração de mel em solução aquosa na extração de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb ($n = 5$).	58
Figura 28. Comparação entre a intensidade dos sinais com e sem aplicação de DLLME em soluções aquosas contendo 50 g L^{-1} de mel fortificadas com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e $80 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb.	60
Figura 29. Curvas de calibração para Cd envolvendo o método DLLME-F AAS.....	62
Figura 30. Curvas de calibração para Pb envolvendo o método DLLME-F AAS.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do mel.....	5
Tabela 2. Processo de produção do mel e possíveis fontes de contaminação com Pb (adptado de Pohl ³).	7
Tabela 3. Estudos publicados com a aplicação da DLLME em mel.....	16
Tabela 4. Estudos relacionados à determinação de Cd e/ou Pb com o emprego de DLLME para extração/pré-concentração dos elementos	18
Tabela 5. Condições operacionais para a determinação de Cd e Pb por ICP-MS....	30
Tabela 6. Resultados obtidos a partir da observação visual das combinações de 500 µL dos solventes dispersores e 100 µL dos extratores para a extração de 10 µg L ⁻¹ de Cd e 20 µg L ⁻¹ de Pb.	41
Tabela 7. Condições escolhidas para a extração de Cd e Pb pelo método DLLME.	59
Tabela 8. Características analíticas para Cd e Pb pelo método DLLME-F AAS.	64
Tabela 9. Ensaio de recuperação para Cd e Pb em mel (solução 50 g L ⁻¹) com o método DLLME- F AAS, com base nas curvas de calibração preparadas em água.	64
Tabela 10. Quantificação e ensaios de recuperação para Cd e Pb por MAD ICP-MS em mel.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

OMS, Organização Mundial da Saúde

ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*

DLLME, microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*

F AAS, espectrometria da absorção atômica por chama, do inglês *flame atomic absorption spectrometry*

MAWD, decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas, do inglês *microwave assisted wet digestion*

GF-AAS, espectrometria da absorção atômica por forno de grafite, do inglês *graphite furnace atomic absorption spectrometry*

ICP-OES, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*

MIC, combustão iniciada por micro-ondas, do inglês *microwave-induced combustion*

SPE, extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction*

LLE, extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction*

CPE, extração em ponto nuvem, do inglês *cloud point extraction*

SPME, microextração em fase sólida, do inglês *solid phase microextraction*

LPME, microextração em fase líquida, do inglês *liquid phase microextraction*

SDME, microextração com gota única, do inglês *single drop microextraction*

HF-LPME, microextração em fase líquida com fibra oca, do inglês *hollow fiber liquid phase microextraction*

NaDDTC, dietilditiocarbamato de sódio

IDLLME, microextração líquido-líquido dispersiva invertida, do inglês *inverted dispersive liquid-liquid microextraction*

HPLC, cromatografia a líquido de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*

CE, eletroforese capilar, do inglês *capillary electrophoresis*

GC, cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*

MS, espectrometria de massa, do inglês *mass spectrometry*

- LOD**, limite de detecção, do inglês *limit of detection*
- LOQ**, limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*
- APDC**, pirrolidina ditiocarbamato de amônio, do inglês *ammonium pyrrolidine dithiocarbamate*
- DDTP**, dietilditiofosfato, do inglês *diethylditiophosphate*
- PMBP**, 1-fenil-3-metil-4-benzoil-5-pirazolona, do inglês *1-phenyl-3-methyl-4-benzoyl-5-pyrazolone*
- Salem**, N,N'-bis(salicilideno)etilenodiamina, do inglês *N,N'-bis(salicylidene)ethylenediamine*
- 5-BrPADAP**, 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(dietilamino)fenol, do inglês *2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(diethyl amino)phenol*
- DPTH**, 2,2'-bis(di-2-piridinil-metileno)-tiocarboidrazona, do inglês *2,2'-Bis(di-2-pyridinyl-methylene)-thiocarbohydrazone*
- TOMATS**, salicilato de trioctilmetil amônio, do inglês *trioctylmethyl ammonium salicylate*
- BTAC**, 2-(2'-benzotiazolazo)-p-cresol, do inglês *2-(2'-benzothiazolylazo)-p-cresol*
- BDTA**, cloreto di hidratado de dimetiltetradecil amônio, do inglês *dimethyl tetradecyl ammonium chloride dihydrate*
- TAN**, 1-(2-tiazolilazo)-naftol, do inglês *1-(2-thiazolylazo)-naphthol*
- LI-TLS**, espectrometria de lente térmica com indução por laser, do inglês *laser induced-thermal lens spectrometry*
- FIA**, análise por injeção em fluxo, do inglês *flow injection analysis*
- UV-VIS**, espectrometria molecular ultravioleta-visível
- AFS**, espectrometria de fluorescência atômica, do inglês *atomic fluorescence spectrometry*
- XRF**, espectrometria de fluorescência de raio-X, do inglês *X-ray fluorescence spectrometry*
- PF**, fator de pré-concentração, do inglês *preconcentration factor*
- RSD**, desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*
- DAD**, detector por arranjo de diodos, do inglês *diode array detector*
- PAD**, detector por arranjo de fotodiodos, do inglês *photodiode array detector*

RESUMO

O mel, em função de ser proveniente de várias fontes botânicas e geográficas, tornou-se um importante indicador ambiental, uma vez que as abelhas entram em contato com inúmeros ambientes contaminados. Dentre esses contaminantes, Cd e Pb representam riscos potenciais à nossa saúde. Por isso, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina que os limites máximos permitidos para Cd e Pb em mel não excedam 500 ng g^{-1} . Devido a esta baixa concentração, faz-se necessário o emprego de técnicas sensíveis para a sua determinação. Portanto, neste trabalho, é proposto o emprego da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para a extração e pré-concentração de Cd e Pb em mel, com posterior determinação por espectrometria de absorção atômica por chama (F AAS). Desse modo, a partir da dissolução de aproximadamente $0,5000 \text{ g}$ de mel em 10 mL de água, para a aplicação da DLLME, foram avaliados os tipos e volumes de solventes extratores e dispersores, a concentração do agente complexante, o pH, a temperatura de extração e a velocidade de centrifugação. Na extração de Cd, verificou-se que as melhores condições foram de $140 \text{ }\mu\text{L}$ de tetracloreto de carbono (solvente extrator), $300 \text{ }\mu\text{L}$ de acetonitrila (solvente dispersor), $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de NaDDTC (complexante), pH 7, extração a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e centrifugação à 840 g . Para Pb, no entanto, melhores condições foram verificadas com o uso de $140 \text{ }\mu\text{L}$ de tetracloreto de carbono, $900 \text{ }\mu\text{L}$ de acetona (solvente dispersor), $0,50 \text{ g L}^{-1}$ de NaDDTC, pH 7, extração a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e centrifugação à 4600 g . Constatou-se que o método desenvolvido (DLLME-F AAS) é simples, rápido (6 min entre a extração e determinação), exato (recuperações de aproximadamente 89% para Cd e 100% para Pb) e preciso (RSD entre 4 e 10%). Foram obtidos os fatores de pré-concentração de 40 para Cd e 28 para Pb, limites de detecção (LODs - 3σ) de 18 ng g^{-1} para Cd e 135 ng g^{-1} para Pb e limites de quantificação (LOQs - 10σ) de 61 ng g^{-1} para Cd e de 449 ng g^{-1} para Pb. Estas características são comparáveis aos do método de digestão por via úmida em sistema fechado assistida por micro-ondas e posterior determinação dos elementos por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (MAWD e ICP-MS). Salienta-se, também, que os LOQs obtidos são inferiores ao valor máximo permitido (500 ng g^{-1} de mel) para Cd e

Pb, exigidos pelo MAPA. Portanto, o método proposto pode ser recomendado para análise de rotina de Cd e Pb em mel, visando atender a legislação vigente.



ABSTRACT

Honey has become an important environmental indicator, due to its various botanical and geographical sources, since bees come into contact with different environments that could be contaminated with toxic elements. Among these contaminants, Cd and Pb represent potential health risks of life. Additionally, in order to control the human exposition to contaminated honey, the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply determines 500 ng g^{-1} as the maximum allowable limits for Cd and Pb in honey. Once relatively low concentrations of Cd and Pb are present in honey samples, it is necessary to use powerful detection methods in order to allow its quantification of. However, even considering a sensitive technique as ICP-MS, the main problem is still the sample preparation methods, which normally employ relatively high temperature and dangerous acids. Additionally, this step is considered time and reagent consuming, generating high amount of residues. In this sense, the present work proposes the use of dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) on aqueous samples of honey for extraction and pre-concentration of Cd and Pb, with subsequent determination by F AAS. As the main advantage provided by developed method (DLLME - F AAS), it is simple, fast and reliable. After optimization of experimental conditions, limit of detection of 18 ng g^{-1} for Cd and 135 ng g^{-1} for Pb were obtained. These results are similar to those obtained using ICP-MS with wet digestion sample preparation using oxidant acids. Furthermore, it is important to mention that these limits are lower than those established by the Ministry of Agriculture (500 ng g^{-1} for Cd and Pb), which represents a promising method for routine analysis in food, to meet the regulations. It avoid the use of huge amount of concentrates acids, minimizing the generation of residues, fast and low cost.

1 INTRODUÇÃO

O mel é caracterizado por ser uma mistura viscosa, supersaturada, aromática e açucarada produzida por abelhas melíferas a partir do néctar das flores, nectários extraflorais e exsudatos sacarínicos. Trata-se de um produto biológico considerado extremamente complexo, visto que, em sua composição foram encontrados, cerca de, 118 compostos diferentes, variando com as diferentes locais e fontes florais.¹

Em função de possuir várias fontes botânicas e geográficas, o mel se tornou um importante indicador ambiental, uma vez que as abelhas entram em contato com inúmeros ambientes como água, solo, flores etc., que podem estar contaminados.²⁻⁴

Dentre esses contaminantes, Cd e Pb representam riscos potenciais à nossa saúde.⁵ A organização mundial de saúde (OMS) estabelece que os limites máximos de ingestão diária de Cd e Pb são de 1 e 2 ng g⁻¹ de peso corporal, respectivamente,⁶ e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina que os limites máximos permitidos para Cd e Pb no mel são de 500 ng g⁻¹.⁷

Devido as baixas concentrações de Cd e Pb em mel,^{2-4,8} faz-se necessário o emprego de técnicas sensíveis para detectar e quantificar esses elementos. Para tal, em muitos trabalhos,^{2,9-13} a determinação destes elementos é feita por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) após decomposição do mel em meio ácido. No entanto, há um forte apelo pelo emprego de métodos e/ou técnicas mais acessíveis, principalmente, no que se refere a custo.

Nesse sentido, as técnicas de extração e/ou pré-concentração são alternativas viáveis e que podem ser combinadas com técnicas de detecção de mais baixo custo, como a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Entre as diversas opções de técnicas de extração/pré-concentração, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) permite extrair/pré-concentrar compostos orgânicos ou inorgânicos de diferentes materiais que estejam solubilizados em água. Essa técnica, desenvolvida por Rezaee *et al.*¹⁴ em 2006, consiste na utilização de uma mistura apropriada de dois solventes, extrator e dispersor, os quais são

adicionados à amostra aquosa. Imediatamente após a mistura, a solução fica turva, sendo este, o momento em que ocorre a extração. A seguir, essa dispersão é separada, geralmente por centrifugação, e a fase orgânica, enriquecida, contendo o analito é analisada.

Entre as vantagens previstas dessa técnica, destacam-se a simplicidade de operação, os baixos custos envolvidos, as boas eficiências de extração (dificilmente inferiores a 90%), os elevados fatores de enriquecimento e a rapidez com que a extração ocorre (3 a 6 minutos)¹⁵ quando comparada aos métodos de decomposição assistidos por micro-ondas (MAWD) que envolvem em média 1 hora ou mais.⁴

A DLLME têm sido empregada, com frequência, para a extração de Cd e Pb e posterior determinação por F AAS.¹⁶⁻³⁰ Baixos limites de detecção (LODs) são reportados nestes trabalhos, os quais são comparáveis àqueles obtidos por ICP-MS.^{2,9-13} Apesar destas características da DLLME, esta técnica ainda não foi aplicada para a extração/pré-concentração de Cd e Pb em mel.

2 OBJETIVOS

Tendo em vista as características da DLLME e as baixas concentrações de Cd e Pb em mel, neste trabalho é proposto o emprego desta técnica para a extração/pré-concentração destes elementos e posterior determinação por F AAS.

Serão avaliadas as variáveis envolvidas na extração/pré-concentração de Cd e Pb, de forma a desenvolver um método rápido e de baixo custo, que atenda ao limite máximo de 500 ng g⁻¹ destes elementos em mel, imposto pela de legislação brasileira.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica das principais formas de preparo de amostras. Será dada ênfase sobre a microextração líquido-líquido dispersiva aplicada a mel e aos elementos em estudo (Cd e Pb). Também, será feita revisão sobre o emprego da espectrometria de absorção atômica por chama e da espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, as quais serão utilizadas neste trabalho para a determinação de Cd e Pb.

3.1 PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS DO MEL

O mel é caracterizado por ser uma mistura viscosa, supersaturada, aromática e açucarada, produzida por abelhas melíficas, a partir do néctar das flores, nectários extraflorais e exsudatos sacarínicos. Quando o néctar é transportado para a colmeia, pela abelha coletora, desencadeiam-se algumas modificações físicas, como perda de água, e químicas, principalmente a inversão da sacarose em glicose e frutose. A abelha coletora, então, passa o néctar para o papo da abelha laboratorista, que repete a manobra com outra abelha mais nova e assim sucessivamente, para que o mel atinja seu ponto ideal e seja inserido nos alvéolos, após ter recebido da circulação sanguínea do inseto uma porcentagem de ácido fórmico, assegurando sua conservação por longo tempo.^{1,31}

Embora o mel possa, superficialmente, ser caracterizado pela mistura de água e açúcares, esse produto biológico é considerado extremamente complexo, visto que, contém mais de 100 substâncias diferentes, variando com os diferentes locais e fontes florais.¹ A composição média do mel é apresentada na Tabela 1.^{1,31-32}

Além disso, o mel possui uma propriedade conhecida como cristalização (mel açucarado). Tal efeito, ocorre naturalmente em função da precipitação da glicose, que se encontra em grande quantidade no mel e é menos solúvel que a sacarose. Assim, o potencial de um mel açucarar é dado pela razão entre a quantidade de glicose/teor de água no mel. Esse fenômeno natural, pode ser corrigido aquecendo o mel em banho-maria até uma temperatura máxima de 40 °C, liquefazendo-o novamente.¹

Tabela 1. Composição química do mel.

Substâncias	Conteúdo médio (%, m/m)	Referência
Água	17,2	32
Glicose	30,3	32
Frutose	38,4	32

Tabela 1. Continuação

Substâncias	Conteúdo médio (% m/m)	Referência
Outros açúcares (sacarose, maltose,...)	10	1,31
Enzimas	Não informado	1
Proteínas	< 0,01	1
Ácidos orgânicos	0,5	1
Minerais	0,20	1
Vitaminas	< 0,01	1

Por ser proveniente de diversas fontes botânicas e geográficas, o mel tornou-se um importante indicador ambiental. Para a coleta do néctar, as abelhas percorrem, em média, uma área de 7 km², entrando em contato com diversos ambientes, tipos de flores e alimentos. Além disso, sabe-se que muitos desses ambientes sofrem ação antropogênica constante, sendo essa, a principal origem da contaminação ambiental por metais pesados nesse produto. Uma vez que as abelhas entram em contato com esses ambientes contaminados, esses insetos levam os contaminantes para a colmeia, desse modo, as mesmas contaminam o mel (Figura 1).²⁻⁴

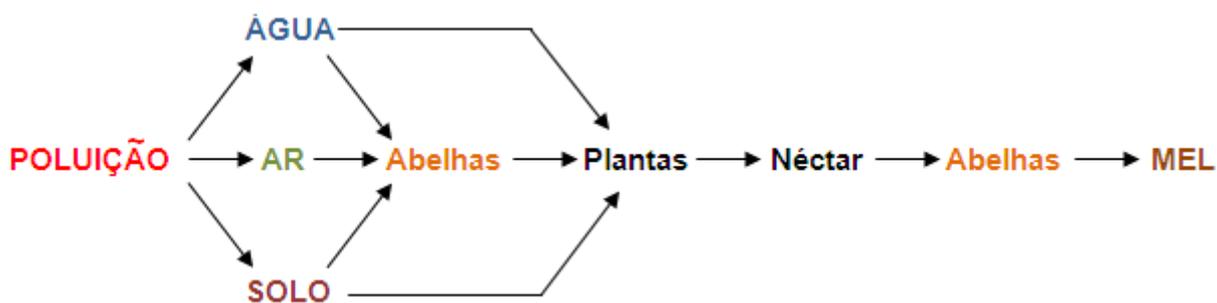


Figura 1. Formas de contaminação de metais no mel por fontes naturais e antropogênicas (adaptado de Pohl³)

Segundo Pohl,³ uma outra fonte possível de contaminação, sobretudo para Pb, ocorre através do processamento do mel e dos equipamentos utilizados para tal (Tabela 2).

Tabela 2. Processo de produção do mel e possíveis fontes de contaminação com Pb (adptado de Pohl³).

Estágios de processamento do mel	Fontes de contaminação
Remoção dos quadros	Tintas e conservantes, detritos de plantas, terra, contaminantes ambientais
Retirada do opérculo e extração	Equipamento de desoperculação, extratores, tanques de retenção, instalações (umidade, poeiras,...)
Filtração	Equipamento (maturadores, peneiras, clarificadores, filtros, material de aquecimento), recipientes, contaminantes ambientais
Decantação	Recipientes (baldes, tanques de armazenamento), contaminantes ambientais (umidade, poeiras, elevada temperatura)
Envase	Equipamento (envase e selagem), recipientes, poeiras, umidade, elevada temperatura

Outros contaminantes, como Cd, podem ser introduzidos com substâncias utilizadas para a nutrição das abelhas, tais como xaropes sintetizados industrialmente.³

Em função disso, há leis que regulamentam os limites toleráveis de substâncias potencialmente nocivas, que possam existir no mel. Nesse sentido, o MAPA divulga através de instruções normativas, sendo mais atual a Instrução Normativa nº 17 (29/05/2013), que os limites máximos permitidos para Cd e Pb, no mel, são de 500 ng g⁻¹.⁷ Em nível mundial as concentrações limitantes desses elementos em diversos tipos de alimentos variam entre 3 e 1500 ng g⁻¹.³³

3.2 ASPECTOS GERAIS SOBRE CÁDMIO E CHUMBO

O cádmio possui uma capacidade de retenção pulmonar de até 40% (assimilação diária equivalente a 20 ng). Já, em nível gastrointestinal, possui uma absorção de aproximadamente 5%. Esta absorção é influenciada por diversos fatores, sobretudo, o estado químico do elemento e as condições nutricionais do indivíduo. Do cádmio absorvido, cerca de 50 a 75% é depositado no fígado e rins. Embora os níveis sanguíneos sejam baixos, cerca de 90% do cádmio circulante encontra-se ligado à hemoglobina.⁵

Além disso, a meia vida biológica do Cd é de 19 a 40 anos, sobretudo nos rins, o que é explicado pela sua baixa excreção urinária, sendo que sua concentração aumenta mais rápido nos primeiros anos de vida. Ainda, a retenção renal desse metal é elevada com o aumento na concentração de metalotioneínas. Com base nisso, é possível inferir que o comprometimento renal requer especial atenção, visto que ocorre diminuição da absorção renal, que pode ser observada pelo aumento na excreção de proteínas, glicose e aminoácidos. Além das consequências renais, o Cd é um potente inibidor enzimático, através do deslocamento de metais de metaloproteínas tornando-as inoperantes.⁵

Diariamente, em torno de 220 a 400 µg de chumbo são introduzidos no organismo humano através dos alimentos. Sendo que, a absorção desse elemento depende da sua concentração, tempo de exposição, propriedades físico-químicas e de fatores relacionados ao indivíduo, tais como, idade e estado fisiológico. Através da via digestiva, o Pb é absorvido em cerca de 10%. Além disso, após ser absorvido, este metal é distribuído pelo organismo aos diversos órgãos e sistemas. No sangue, liga-se aos eritrócitos em proporção maior do que 90%, e nos tecidos moles aparece em baixas concentrações, relativamente mais altas no fígado e rins. Cerca de 90% de todo o Pb encontrado no organismo, está depositado nos ossos sob a forma de trifosfato de chumbo.⁵

Em função de sua configuração eletrônica (valência dois e orbital 6p livre), o chumbo liga-se, principalmente, com o enxofre de compostos biológicos. Isso, confere ao elemento uma série de consequências bioquímicas, tais como a inibição de enzimas. O chumbo também pode atuar sobre o sistema nervoso causando irritabilidade, cefaléia, perda de memória, paralisia, coma, podendo provocar neoplasias, quando da administração de doses elevadas.⁵

A OMS estabelece que os limites máximos de ingestão diária de Cd e Pb são de 1 e 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal, respectivamente.⁶

3.3 PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS

O tratamento da amostra, geralmente, é considerado o ponto mais crítico de um método analítico, pois, é a etapa em que podem ocorrer mais erros, além de envolver mais tempo e, normalmente, mais custos. Entre os métodos de preparo de amostras orgânicas, que visam à determinação de espécies inorgânicas, há diversas alternativas, entre elas a decomposição por via úmida em sistemas abertos ou fechados. Se for necessário aquecimento, o mesmo pode ser por sistema convencional ou assistido por radiação micro-ondas. Além disso, existem os métodos de combustão, que podem ser executados em mufla, em frasco de Schöniger, em bomba de combustão ou através de combustão iniciada por micro-ondas (MIC). Além desses métodos, ainda pode ser necessário o emprego de técnicas de pré-tratamento de amostras, tais como moagem e secagem.³⁴

Entre os métodos de preparo de amostras mencionadas, o mais utilizado é a decomposição de matrizes orgânicas por via úmida. Neste caso, os mesmos ocorrem com a adição de ácidos inorgânicos oxidantes, ou misturas de ácidos, ou ainda mistura de um ácido com o peróxido de hidrogênio, seguidos por aquecimento. Na maioria dos casos, esses métodos permitem a oxidação completa da matéria orgânica, deixando os elementos na sua forma inorgânica livre e apropriada para a determinação. Para essas decomposições os ácidos mais utilizados são HNO_3 , H_2SO_4 e HClO_4 .³⁴⁻³⁵

Nas decomposições por via úmida em sistemas abertos, dependendo das temperaturas atingidas, alguns elementos podem ser perdidos por volatilização. Dessa forma, no intuito de evitar essas perdas, são empregados os sistemas fechados de decomposição por via úmida. Entre os sistemas fechados, destacam-se os sistemas de alta pressão com aquecimento por radiação micro-ondas. A vantagem da MAD, sobre os sistemas abertos, é o incremento da pressão de vapor no interior do recipiente, o que faz aumentar a temperatura de ebulição dos ácidos utilizados. Isso permite que o ácido atinja temperaturas maiores, ainda no estado líquido, melhorando a eficiência de decomposição da matéria orgânica. No entanto,

na mesma medida em que a decomposição é mais eficiente, a elevação da pressão em um curto espaço de tempo, representa um sério risco de explosões desses sistemas, sobretudo com o uso de reagentes extremamente oxidantes, como o HClO_4 .³⁵

O ácido nítrico, por exemplo, não é um oxidante suficientemente forte para oxidar completamente a matéria orgânica em sistemas abertos. Assim, se o teor de carbono residual da decomposição for elevado, em função da oxidação incompleta da matéria orgânica, moléculas orgânicas são geradas, as quais poderão causar interferências de diferentes magnitudes na determinação do elemento. Para melhorar a eficiência da decomposição, o HNO_3 é utilizado em sistemas fechados, nos quais, inicialmente as amostras, pré-tratadas ou não, são adicionadas ao ácido em um frasco hermeticamente fechado que permite alcançar pressões elevadas. Logo após, a mistura é submetida a aquecimento com auxílio de radiação micro-ondas.³⁴⁻³⁶

Há estudos referentes à decomposição de mel^{2-4,9-13} por ação de ácido nítrico sob aquecimento convencional e assistidos por micro-ondas. Em todos os casos, observa-se que devem ser tomados cuidados especiais com relação a essa decomposição, visto que a matriz é rica em compostos orgânicos oxigenados, o que proporciona reações com elevada liberação de gás, levando ao incremento de pressão em curto espaço de tempo, o que ocasiona riscos de explosões em sistemas fechados. Dessa forma, o que se verifica nesses estudos, são etapas de preparo de amostras, relativamente, dispendiosas, com programas de aquecimento prolongados.

Além dos métodos de decomposição supracitados, há outras formas de preparo ou pré-tratamento de amostras, as quais não envolvem a oxidação da matriz orgânica. Essas são denominadas de técnicas de extração, que, frequentemente, são empregadas para a determinação de compostos orgânicos ou na análise de especiação química. No entanto, com a adição de moléculas orgânicas capazes de complexarem elementos, essas técnicas podem ser utilizadas, também, para a extração de metais. As técnicas de extração/pré-concentração têm como objetivo a obtenção de uma fração enriquecida com as espécies que se pretende determinar.³⁷⁻³⁸

3.4 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO

São conhecidas diversas técnicas de extração/pré-concentração, dentre as quais se pode destacar a extração em fase sólida (SPE) e a extração líquido-líquido (LLE).³⁸

Na SPE são usados sorventes sólidos, tais como carvão ativado, alumina e sílica gel. Estes podem estar contidos em pequenas colunas ou cartuchos, sob a forma de seringa. O princípio de separação assemelha-se ao fracionamento proporcionado em uma coluna de cromatografia. A separação se dá pela interação entre o elemento e os sítios ativos do sorvente, retendo o íon por adsorção na superfície do adsorvente (interações com grupos funcionais), troca iônica, quelação e/ou processos por formação de par-iônico. Após passar a amostra pelo sorvente pode ser feita a limpeza do mesmo (etapa de limpeza) com algum solvente que remova somente as impurezas retidas no sorvente para, só após, ser feita a eluição do analito com outro solvente. Essa técnica tem como vantagens a redução do volume de solventes em relação à LLE, baixos custos, rapidez, alta eficiência, separação com poucas perdas por evaporação, resultados reprodutíveis e reduzida exposição do analista a solventes orgânicos. Entretanto, embora apresente vantagens sobre a LLE, o custo para aquisição ou síntese do sorvente e o volume de solvente utilizado ainda são superiores aos das técnicas de microextrações.³⁸⁻³⁹

Na LLE, ocorre uma partição do analito entre duas fases líquidas, essencialmente imiscíveis. Essa técnica tem como características a simplicidade, por não requerer aparato especial, além da ampla gama de solventes que podem ser utilizados, que fornecem boa seletividade. A eficiência dessa extração, está condicionada a afinidade do analito pelo solvente extrator, que depende também do número de etapas de extração, além de fatores como pH, a fim de facilitar a formação de espécies desejadas, ou inibir a formação das indesejadas. Por fim, entre outras desvantagens da LLE, além de ser morosa, têm-se o elevado consumo de solventes orgânicos.^{38,40}

No intuito de minimizar as desvantagens citadas na SPE e LLE, pode-se destacar alternativas, tais como a extração em ponto nuvem (CPE) e as técnicas de microextração, que seguem os mesmos princípios supracitados, porém em microescala. Todas têm como objetivo reduzir o consumo de amostras e de solventes, os custos e o tempo de preparo. A partir disso, foram desenvolvidas a

microextração em fase sólida (SPME) e em fase líquida (LPME). Sendo que, desta derivam outras técnicas, como a microextração em gota suspensa (SDME), a microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) e DLLME.⁴⁰⁻⁴¹

Dentre as alternativas de extração em meios líquidos, tem-se a CPE, que consiste no emprego de um surfactante em quantidade acima de sua concentração micelar crítica. Dessa forma, a partir da adição de algum sal, ou de algum ácido, ou alteração na temperatura e ou na pressão, a solução fica turva e, após certo tempo, uma pequena fase, rica em surfactantes contendo o analito extraído, sedimenta. Enquanto que, a fase de grande volume e pequena quantidade de surfactante é descartada. Essa técnica é utilizada na extração de metais sob a forma de quelatos.⁴²⁻⁴³ Entre as principais desvantagens observadas, cita-se a dificuldade na separação das fases, podendo ocasionar perdas de analito, uma vez que há uma dependência muito grande de fatores físicos, como a temperatura e a pressão do sistema.^{15,44}

Na SPME é utilizada uma fibra oca de sílica fundida recoberta por um adsorvente adequado ao analito pretendido. Há duas formas de emprego da SPME: uma em que a fibra é imersa diretamente na amostra e outra, em que a fibra fica confinada no espaço da fase vapor (*headspace*), na qual os analitos voláteis serão retidos e pré-concentrados. Nesta técnica, as principais desvantagens apontadas são o efeito de memória, o curto tempo de uso da fibra e o custo relativo às demais técnicas de extração.^{37,45}

Na SDME é usada uma seringa, sendo que, na ponta da agulha, é formada uma gota de 1 a 3 μL contendo o solvente orgânico extrator. Após a etapa de separação/pré-concentração, a gota enriquecida é recolhida para o interior da seringa e, a seguir, procede-se a determinação do analito. Tal como na SPME, a SDME pode ser feita na forma imersa (DI-SDME) na amostra e por *headspace* (HS-SDME), aplicada a compostos voláteis. Uma desvantagem apontada sobre essas técnicas, é que a extração e a injeção no equipamento de medição, necessitam ser feitas separadamente e com aparatos diferentes. Outra desvantagem, mais associada à DI-SDME, é que a agitação, no frasco da amostra, pode fazer com que a gota suspensa seja perdida, causando desperdício de amostra, solvente e trabalho.⁴¹

A HF-LPME é uma microextração em fase líquida, na qual uma das fases líquidas está impregnada em uma fibra oca de polipropileno, que é mergulhada em

uma solução com líquido imiscível contendo o analito. Dessa forma, o analito é transferido de uma fase para a outra, através de uma ampla superfície de contato. O interior da fibra oca pode estar impregnado pelo próprio solvente extrator em sistema de extração de duas fases (amostra aquosa/solvente orgânico) ou, há casos em que a solução aceptora no interior da fibra pode ser outra fase aquosa acidificada ou alcalinizada, constituindo um sistema de extração de três fases (amostra aquosa/solvente orgânico/fase aquosa aceptora). Entre as desvantagens dessa técnica, consta a necessidade do uso de um aparato especial, que leva a dificuldades na sua reutilização em função de contaminação da fibra oca.⁴¹

3.5 MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA

Esta técnica foi desenvolvida em 2006 por Rezaee *et al.*¹⁴ reunindo características da LLE e da CPE. A técnica de DLLME consiste em uma mistura apropriada de dois solventes (extrator e dispersor), que é injetada na solução aquosa (amostra) provocando, imediatamente, a turvação do meio (momento em que ocorre a extração). A seguir, a dispersão é separada por centrifugação, a qual acelera o processo de sedimentação da fase orgânica extratora enriquecida com o analito extraído (Figura 3). A aplicação pioneira de Rezaee *et al.*¹⁴ foi na extração de compostos orgânicos (pesticidas) para posterior determinação por cromatografia a gás.

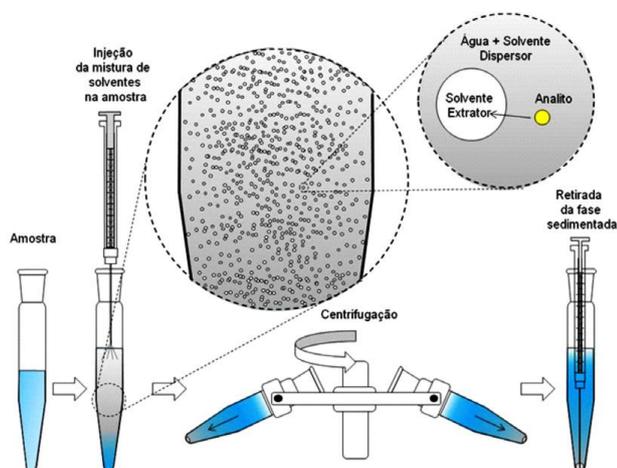


Figura 2. Sequência do procedimento de DLLME (adaptado de Primel *et al.*⁴⁶).

Entre as vantagens preditas dessa técnica, destacam-se a simplicidade de operação, por não requerer aparatos especiais, o baixo custo, a alta eficiência de extração dos analitos (geralmente superiores a 90%), o elevado fator de pré-concentração, tanto para compostos orgânicos como inorgânicos, e a rapidez com que a extração ocorre, com tempos aproximados de 3 a 6 minutos entre a injeção e o fim do processo.¹⁵ Além disso, fazendo-se uso de líquidos iônicos (IL-DLLME) como extratores, em vez de solventes organoclorados, a técnica torna-se ambientalmente mais favorável.⁴⁷

Na DLLME, o solvente dispersor é uma substância orgânica de baixo peso molecular e com característica anfifílica (com uma parte apolar e outra parte polar), para garantir a miscibilidade desse solvente, tanto com a fase aquosa, quanto com o solvente orgânico. Entre os solventes dispersores mais utilizados estão a acetona, a acetonitrila, o metanol e o etanol, cujas quantidades utilizadas variam de 0,2 a 2 mL.^{15,47-50}

O extrator deve ser um solvente orgânico insolúvel em água e com densidade maior do que esta, a fim de facilitar a sedimentação do mesmo e consequente separação entre as fases. Os solventes extratores mais utilizados são os organoclorados, tais como: clorobenzeno, clorofórmio e tetracloreto de carbono. Os volumes utilizados deste solvente variam de 8 até 250 μ L.^{15,48-50}

Embora tenha sido, inicialmente, proposta para a extração e pré-concentração de compostos orgânicos, a DLLME tem sido aplicada, com sucesso, no tratamento de amostras, visando a determinação de elementos diversos. Para tal, faz-se necessário, o uso de um agente complexante do metal em solução aquosa, conferindo um caráter apolar ao complexo formado. Desse modo, quando da injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor, o complexo metálico, por interações dipolo induzido-dipolo induzido, será extraído para a fase orgânica. Como agentes complexantes, podem ser utilizadas muitas substâncias, como pode ser visto na Tabela 4 (páginas 16 a 18), dentre as quais, destaca-se o uso do dietilditiocarbamato de sódio (NaDDTC).^{15,48-50}

Na técnica de DLLME há alguns fatores que afetam a eficiência de extração, entre eles, o tipo e volume dos solventes extrator e dispersor, o pH da amostra, o tipo e a quantidade de complexante e a velocidade de centrifugação.⁴⁷⁻⁵⁰

3.5.1 A DLLME aplicada para a extração de compostos orgânicos em mel

Desde 2006 foram publicados menos de vinte trabalhos (Tabela 3) sobre o uso da DLLME para a extração e posterior determinação de compostos orgânicos em mel. No entanto, nenhum desses trabalhos refere-se a extração de elementos. Dentre estes estudos, podem-se destacar os métodos assistidos por radiação micro-ondas⁵¹ e por ultrassom, aliado ao emprego de líquidos iônicos.⁵² Destaca-se, também, que em um dos trabalhos⁵³ o solvente organoclorado é substituído por 1-octanol, originando uma variante da DLLME, que foi denominada de DLLME inversa (IDLLME). Convém ressaltar ainda, o amplo emprego da acetonitrila como solvente dispersor para a DLLME aplicada a mel.⁵³⁻⁶¹

Tabela 3. Estudos publicados com a aplicação da DLLME em mel

Amostra	Analito	Dispensor	Extrator	LD	Determinação	Ref.
5 mL 200 g L ⁻¹	Cloranfenicol Tianfenicol	1 mL acetonitrila	30 µL 1,1,2,2-tetraclo- roetano	0,6 ng g ⁻¹ 0,1 ng g ⁻¹	LC-VWD	⁵⁴ , ⁵⁵ , ⁵⁶
20 mL 200 g L ⁻¹	Triazinas	50 µL triton X 114 10%	140 µL líquido iônico	5,3 µg kg ⁻¹	HPLC-DAD	⁶²
10 mL 100 g L ⁻¹	Sulfonamidas	750 µL metanol	100 µL líquido iônico	0,011 µg kg ⁻¹	HPLC-FS	⁵¹
10 mL 100 g L ⁻¹	Fármacos	200 µL metanol	55-60 µL líquido iônico	0,21 µg L ⁻¹	HPLC-DAD	⁵²
5 mL 100 g L ⁻¹	Fipronil	2 mL acetonitrila	100 µL tetracloreto de carbono	0,03 mg kg ^{-1*}	HPLC-PAD	⁵⁷
5 mL	Sulfonamidas	800 µL dimetilsulfóxido	400 µL Clorobenzeno	0,02 µg mL ⁻¹	CE-DAD	⁶³
20 mL 200 g L ⁻¹	Quercitina	300 µL acetonitrila	100 µL 1-octanol	0,26 ng mL ⁻¹	HPLC-UV	⁵³
5 mL 50 g L ⁻¹	Pesticidas organoclorados	750 µL acetonitrila	50 µL Clorofórmio	0,2 ng g ⁻¹	GC-IT/MS	⁵⁸
10 mL 100 g L ⁻¹	Tiaminas	500 µL acetonitrila	90 µL 1,1,2,2-tetraclo- roetano	0,09 ng mL ⁻¹	LC-FS	⁵⁹
3 mL 167 g L ⁻¹	Pesticidas organoclorados	450 µL acetona	100 µL Clorofórmio	0,3 ng g ⁻¹	GC-MS	⁶⁴
5 mL 50 g L ⁻¹	Inseticidas	500 µL acetonitrila	2 mL Diclorometano	0,5 µg kg ⁻¹	LC-MS/MS	⁶¹
10 mL 200 g L ⁻¹	Inseticidas	acetonitrila	100 µL Clorofórmio	0,02 ng g ⁻¹	LC-DAD e LC-IT-MS/MS	⁶⁰

* Só informado o LOQ.

3.5.2 A DLLME aplicada a extração de Cd e Pb

Há um diversos estudos associados ao emprego da DLLME na extração de Cd e Pb, para sua posterior determinação. Na Tabela 4, estão listados os trabalhos que foram encontrados na literatura.

Em alguns estudos^{20-21,25,65-67} as amostras foram submetidas a decomposições ácidas antes de proceder a DLLME e determinação dos elementos. É importante destacar, os elevados fatores de pré-concentração dos analitos com o emprego da técnica (Tabela 4), o que pode possibilitar a determinação dos elementos, através de técnicas menos sensíveis, mas mais acessíveis, como a F AAS e a espectrometria de absorção molecular no UV-VIS, por exemplo.

Além disso, pode ser observada (Tabela 4) a grande versatilidade da DLLME em relação a possibilidade do uso de diferentes técnicas de determinação, tais como fluorescência atômica de raios-X (XRF), espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), ICP-MS, e, sobretudo, F AAS e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS).

Também, de acordo com os dados constantes na Tabela 4, pode-se destacar que o principal solvente de extração usado é o tetracloreto de carbono, tanto para a extração dos complexos de Cd, quanto para os de Pb.

Tabela 4. Estudos relacionados à determinação de Cd e/ou Pb com o emprego de DLLME para extração/pré-concentração dos elementos

Amostra	Analito	Dispersor	Extrator	Complexante	LD*	Determinação	PF	Ref.
5 mL de água	Cd	500 µL metanol	34 µL tetracloreto de carbono	0,0001 g APDC	0,6 ng g ⁻¹	GF-AAS	125	68
25 mL de água	Pb	2,5 mL metanol	52 µL tetracloreto de carbono	50 µL DDTP (0,2%)	0,5 µg L ⁻¹	F AAS	450	16
5 mL urina e água	Pb	0,5 mL etanol	40 µL tetracloreto de carbono	1 mg mL ⁻¹ PMBP	39 ng L ⁻¹	GF-AAS	78	65
5 mL água	Pb	0,5 mL acetona	35 µL tetracloreto de carbono	5 µL DDTP (1%)	0,02 µg L ⁻¹	GF-AAS	150	69
5 mL água	Cd	500 µL metanol	34 µL tetracloreto de carbono	0,0001 g Salen	0,5 ng L ⁻¹	GF-AAS	122	70
12 mL água	Cu e Pb	metanol em fluxo	2% v/v Xileno	0,3% (m/v) DDTP amônio	0,54 µg L ⁻¹	F AAS	265	17
10 mL Água	Cd	- US	73 µL HMIMPF ₆	0,05% DDTC	7,4 ng L ⁻¹	GF-AAS	67	71
5 mL água	Pb e Cd	0,4 mL metanol	50 µL tetracloreto de carbono	0,1 mg de APDC / mL de metanol	0,01 µg L ⁻¹ Pb 0,004 µg L ⁻¹ Cd	GF-AAS	115	72
8,1 mL água	Pb e Cd	10 µL s ⁻¹ metanol	2% xileno em metanol	0,2% APDC	0,01 µg L ⁻¹ Pb 0,002 µg L ⁻¹ Cd	GF-AAS	80 e 34	73

Tabela 4. Continuação

Amostra	Analito	Dispersor	Extrator	Complexante	LD*	Determinação	PF	Ref.
10 mL Água	Pb	0,4 mL etanol	40 µL tetracloroeto de carbono	12 µL Ditizona 10^{-3} mol L ⁻¹	0,01 µg L ⁻¹	TLS	300	74
5 mL Água	Cd, Pb e Bi	0,5 mL metanol	17 µL tetracloroeto de carbono	15 µL DDTC 0,05 mol L ⁻¹	0,5 ng L ⁻¹ Cd; 1,6 ng L ⁻¹ Pb	FIA-ICP-MS	460 e 900	75
3 mL água alimentos	Cd e Cu	0,5 mL etanol	100 µL tetracloroeto de carbono	0,033% DDTC	0,01 ng L ⁻¹ Cd	UV-VIS	3458	66
20 mL Água	Pb		70 mg líquido iônico	0,25 mg APDC	1,5 µg L ⁻¹	F AAS	40	19
50 mL água	Pb, Cr, Co e Ni	1,5 mL etanol	80 µL undecanol	1,5 mmol L ⁻¹ 5-BrPADAP	1,3 ng L ⁻¹	GF-AAS	800	76
50 mL água	Pb	3 mL etanol	250 µL tetracloroeto de carbono	0,01 mmol L ⁻¹ Ditizona	0,95 ng L ⁻¹	SFA	20	77
5 mL água	Cd	2 mL etanol	200 µL clorofórmio	0,1 mol L ⁻¹ APDC	0,8 ng L ⁻¹	ICP-OES	75	78
5 mL água e amostras vegetais	Cd	0,5 mL THF	41 mg ácido decanoico	0,001 g APDC	0,3 µg L ⁻¹	F AAS	22	20
10 mL águas e alimentos	Cd	1 mL metanol	0,5 mL clorofórmio	1 mL DPTH 0,05%	0,4 µg L ⁻¹	F AAS	55	21
5 mL água	Pb	500 µL metanol	30 µL tetracloroeto de carbono	100 µL APDC 5%	4,1 ng mL ⁻¹	XRF	-	79

Tabela 4. Continuação

Amostra	Analito	Dispersor	Extrator	Complexante	LD*	Determinação	PF	Ref.
água	Cd	100 µL acetona	líquido iônico	40 mg TOMATS	1,16 ng mL ⁻¹	F AAS	40	22
água	Pb	-	-	-	2,53 µg L ⁻¹	F AAS	-	23
tecidos humanos	Cd e Pb	metanol	tetracloroeto de carbono	DDTP	5,6 ng L ⁻¹ Cd 45 ng L ⁻¹ Pb	GF-AAS	116 e 68	67
água mineral	Pb	-	-	DDTC	0,006 ng mL ⁻¹	GF-AAS	-	80
água	Cd	ACN	tetracloroeto de carbono	8 – hidróxiquinolina	19,4 ng L ⁻¹	AFS	-	81
água	Cd	THF	tetracloroetileno	Ditizona	1,2 µg L ⁻¹	F AAS	34,5	24
5 mL água	Cd	500 µL metanol	34 µL tetracloroeto de carbono	0.00010 g N-benzoyl-N-phenylhydroxylamine	0,6 ng L ⁻¹	GF-AAS	118	82
10 mL sangue digerido em ácido	Pb	não utilizado	45 µL líquido iônico	1 mL APDC (0,2%)	0,13 µg L ⁻¹	F AAS	-	25
5 mL água	Pb entre outros	500 µL metanol	30 µL tetracloroeto de carbono	100 µL DDTC (0,5%)	3,9 ng mL ⁻¹	XRF	-	83
40 mL água	Cd, Pb, Co e Ni	8 mL etanol	300 µL tricloroetileno	200 µL BTAC 7,4.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	0,3 µg L ⁻¹ Cd 0,6 µg L ⁻¹ Pb	ICP-OES	-	84
água	Cd e Zn	etanol	tetracloroeto de carbono	-	-	F AAS	-	26

Tabela 4. Continuação

Amostra	Analito	Dispersor	Extrator	Complexante	LD*	Determinação	PF	Ref.
-	Cd	etanol	tetracloroeto de carbono	2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol	-	F AAS	-	27
água	Cd	4:1 tributilfosfato	0,5 mL de tolueno	$1 \cdot 10^{-4}$ mol L ⁻¹ DTVTI	-	UV-VIS	-	85
10 mL água	Cd e Pb	100 µL Triton X 114 0,2 mol L ⁻¹	200 µL líquido iônico	200 µL APDC 0,5 mol L ⁻¹	0,2 ng L ⁻¹ Cd 3,0 ng L ⁻¹ Pb	GF-AAS	-	86
5 mL água	Cd	500 µL metanol	50 µL tetracloroeto de carbono	0,01% APDC em metanol	0,04 µg L ⁻¹	TXRF	-	87
10 mL água	Cd	325 µL acetona	50 mg líquido iônico	$1,1 \cdot 10^{-3}$ mol L ⁻¹ 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(diethylamino)phenol	0,06 µg L ⁻¹	F AAS	-	28
8 mL água	Pb	2 mL etanol	15 µL 1,2-diclorobenzeno	-	0,5 ng mL ⁻¹	F AAS	-	29
água	Pb	- Pareamento iônico e US	90 µL Clorobenzeno	4,5 mL KI 0,1 mol L ⁻¹ e 1 mL de BDTA 0,5%	0,8 ng mL ⁻¹	GF-AAS	-	88
água	Pb, Cd, Cu e Ni	Triton X 114	tetracloroeto de carbono	TAN	0,5 µg L ⁻¹	F AAS	-	30

*LD expreso apenas para Cd e Pb.

3.6 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO

Tão importante quanto à escolha de uma técnica adequada para preparo das amostras é a escolha da técnica de determinação. Para isso, deve-se levar em consideração aspectos relacionados à exatidão necessária, à quantidade de amostra disponível, à faixa de concentração esperada para o analito, às possíveis interferências associadas à amostra, às propriedades químicas e físicas da amostra e ao número de amostras a ser analisado. Além disso, outros critérios também podem ser adotados por parte do instrumento de determinação, como precisão, erros associados, sensibilidade, limite de detecção, faixa linear, seletividade, velocidade de medição (ou processamento), facilidade, conveniência, custo e disponibilidade do equipamento e custo por amostra.⁸⁹⁻⁹⁰

Existe um grande número de técnicas que podem ser utilizadas na determinação de metais, associados ou não, a métodos de decomposição de amostras ou a técnicas de extração e pré-concentração. Dentre essas técnicas de determinação, destacam-se a F AAS, GF-AAS⁹¹ e ICP-MS.⁹²⁻⁹⁴

3.6.1 Espectrometria de absorção atômica

A técnica de absorção atômica baseia-se na capacidade que átomos livres, gasosos e no estado fundamental, têm de absorver radiação eletromagnética proveniente de uma fonte de radiação (lâmpada de cátodo oco) com comprimento de onda (λ) específico ao elemento presente na cela de absorção (atomizador). A quantidade de radiação absorvida pelos átomos, que passam ao seu estado excitado, será proporcional à concentração dos mesmos. Os equipamentos de absorção atômica são constituídos conforme o esquema representado na Figura 3.⁹¹



Figura 3. Esquema geral de um espectrômetro de absorção atômica (adaptado de Welz *et al.*⁹¹).

Na espectrometria de absorção atômica podem ser usados diferentes atomizadores. No caso da determinação de Cd e Pb, a atomização é feita numa chama ou em um forno de grafite. Na espectrometria de absorção atômica com chama, a amostra líquida é introduzida através de um nebulizador pneumático e conduzida junto a uma mistura de um gás combustível (em geral acetileno) e de um gás comburente (em geral ar ou óxido nitroso) que geram a chama. Esta é responsável por atomizar o elemento. Quanto maior a população de átomos (no estado fundamental) na chama, maior será a quantidade de radiação absorvida. Na GF-AAS a amostra, contendo o analito, é aquecida eletrotermicamente em um forno de grafite. Nesse sistema, a amostra, líquida ou sólida, é injetada diretamente no interior do forno (com ou sem a presença de uma plataforma de grafite), sendo a mesma submetida a tratamento térmico, que normalmente envolve as etapas de secagem, pirólise e atomização (momento em que é feita a medição do elemento). A principal vantagem apontada é o ganho de sensibilidade desta técnica em relação a F AAS, visto que na GF-AAS os átomos ficam confinados em um espaço pequeno, fazendo com que a densidade de átomos gasosos, no estado fundamental, seja maior no momento da medição.⁹¹ Por outro lado, a F AAS, comparada à GF-AAS, possui como vantagens a simplicidade de operação, menor custo de manutenção e maior rapidez de análise, o que são fatores positivos para análises de rotina.⁹⁵⁻⁹⁶

A determinação de metais, dentre eles Cd e Pb, por F AAS é conhecida e difundida.⁹⁷⁻⁹⁹ No entanto, quando comparada a outras técnicas de determinação como GF-AAS, ICP OES e ICP-MS, possui LODs superiores.^{96,100} Dessa forma, as técnicas de extração/pré-concentração, como a DLLME, envolvendo posterior determinação de Cd e Pb por F AAS, surgem como alternativas interessantes e viáveis, a fim de melhorar os LODs. Assim, para Cd²¹ é possível alcançar LODs da ordem de $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que para Pb¹⁶, $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$. A combinação da DLLME com F AAS, potencializa novos estudos, fazendo-se uso de sistemas simples, rápidos e mais baratos, além de permitir a obtenção de LODs comparáveis a técnicas de melhor desempenho, como GF-AAS, ICP-MS e ICP OES.

3.6.2 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

Nesta técnica o plasma, produzido numa tocha, é responsável por atomizar, excitar e ionizar os elementos. Os íons, gerados na tocha, serão amostrados por uma interface que está ligada a um espectrômetro de massa (como um quadrupolo, por exemplo), o qual separa o isótopo escolhido do elemento, de acordo com sua razão massa/carga. Desse modo, o íon separado chega ao detector, resultando em um sinal de acordo com a concentração do elemento. Na Figura 4 está ilustrado o esquema das partes que compõe um instrumento de ICP-MS.^{94,101}



Figura 4. Esquema de um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (adaptado de Becker⁹⁴).

A técnica de ICP-MS tem como características a análise isotópica, a possibilidade de determinação multielementar e LODs, para muitos elementos, na ordem de ng L^{-1} .¹⁰¹

Em relação à determinação de elementos em mel, Madejczyk e Baralkiewicz¹¹ fizeram a decomposição de 1 g mel com 10 mL ácido nítrico concentrado por MAWD. Após a decomposição, as amostras foram diluídas e os elementos majoritários foram determinados por F AAS e ICP OES, ao passo que os elementos minoritários, em função de suas baixas concentrações, foram determinados por ICP-MS. Os autores sugerem, que as concentrações dos elementos minoritários permitem inferir sobre a qualidade do mel. Em 2012, estudo similar foi feito por Batista *et al.*,¹² no qual 22 elementos, dentre os quais Cd e Pb, foram determinados por ICP-MS, após MAWD.

A partir desses estudos,¹¹⁻¹² verifica-se a tendência da opção por determinações através da técnica de ICP-MS, nas situações em que as concentrações esperadas para os analitos são muito baixas (da ordem de ng g^{-1}). No entanto, mesmo com as vantagens já mencionadas, a técnica de ICP-MS apresenta

algumas desvantagens, tais como o custo relativamente elevado do equipamento, a maior complexidade de manuseio e maior custo de manutenção. Fatores esses, que tornam essa técnica menos acessível aos laboratórios, quando comparados aos equipamentos de F AAS, por exemplo.^{96,100-101}

3.6.3 Comparação entre técnica de determinação elementar de Cd e Pb

A escolha da técnica de determinação elementar é de fundamental importância. Para tal, é necessário levar em consideração, entre outros fatores, as faixas de concentração alcançadas e os custos para tal. Na Figura 5 estão resumidas algumas das características entre as técnicas F AAS, GF-AAS, ICP OES e ICP-MS.^{96,100}

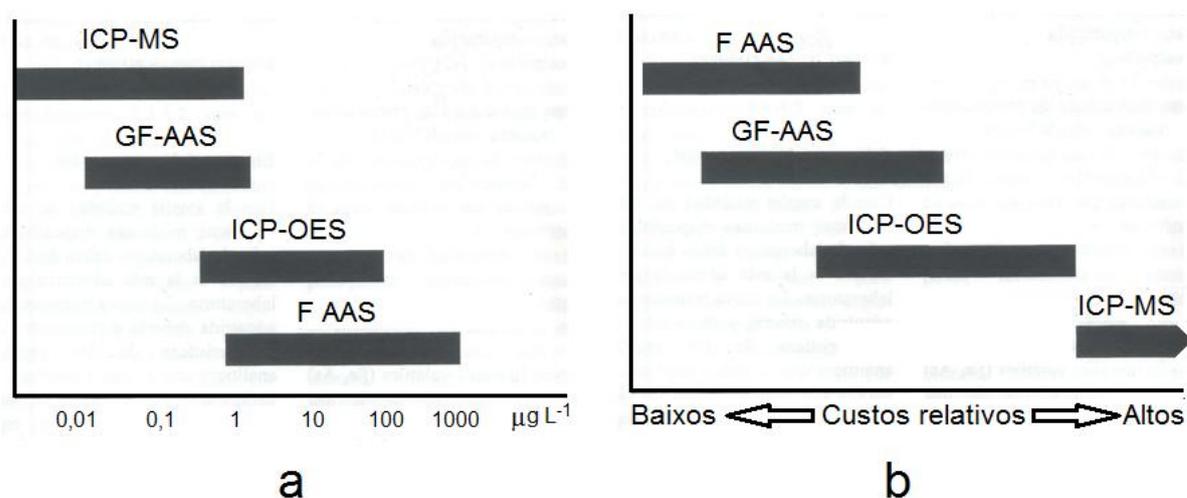


Figura 5. a) Comparação de faixas de concentração de resposta linear dos métodos instrumentais e b) comparação de faixas de custos relativos dos métodos instrumentais F AAS, GF-AAS, ICP OES e ICP-MS (adaptado de Moron⁹⁶).

Como é possível observar (Figura 5), apesar de verificar-se faixas lineares de concentração superiores, para determinação de metais como Cd e Pb, a técnica de F AAS possui custos relativamente menores, quando comparada às demais técnicas instrumentais representadas. Dessa forma, uma escolha pelo emprego da F AAS, precedida por técnicas de pré-concentração, pode ser uma importante ferramenta para melhora dos LODs, envolvendo custos menores que técnicas como a ICP-MS.

3.7 ESTUDOS ENVOLVENDO DETERMINAÇÃO DE METAIS EM MEL

Segundo Pohl *et al.*,⁸ o conteúdo de metais no mel pode servir como um indicador ambiental e geográfico. Elevados teores de Na e K, por exemplo, indicam um mel de origem próxima a regiões litorâneas, assim como, a proximidade com minas, siderúrgicas, áreas industrializadas, urbanas ou auto-estradas implicam em maiores concentrações de elementos como Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Mg, Mn, Ni, Pb, Pd ou Zn.

Em 2011, Chudzinska e Baralkiewicz,⁹ a fim de discriminar e classificar o mel de acordo com sua origem e detectar marcadores correspondentes, desenvolveram um estudo com 140 amostras de mel de diferentes regiões da Polônia na determinação de 15 elementos (incluindo Cd e Pb) por ICP-MS. Neste estudo, foi usado, aproximadamente, 1 g de mel que foi tratado com 9 mL de ácido nítrico concentrado e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% ($m\ m^{-1}$). A seguir a mistura foi submetida a aquecimento por radiação micro-ondas. De forma similar, em 2013, Ru *et al.*,¹⁰² propuseram a decomposição de 0,5 g de mel com 3 mL de ácido nítrico e 4 mL de peróxido de hidrogênio 30% ($m\ m^{-1}$) em sistema fechado assistido por radiação micro-ondas para a posterior determinação de Cu e Zn por F AAS e de Cd e Pb por GF-AAS. Envolvendo preparo de amostras similar ao anterior, Yücel e Sultanoglu,¹⁰³ determinaram por ICP OES, entre outros elementos, Cd e Pb, comprovando diferenças significativas nas concentrações desses elementos em mel entre regiões industrializadas e não industrializadas da Turquia.

Embora a maioria dos trabalhos propostos envolvam a determinação por ICP-MS, Honório *et al.*,¹⁰⁴ propuseram o pré-tratamento de mel com ácido nítrico para a posterior quantificação de metais, entre eles Cd e Pb, por voltametria de pulso diferencial.

Em 2012, Mendil,¹⁰⁵ propôs a determinação de Cd, Cu e Pb em alguns tipos de alimentos, dentre eles o mel, por F AAS após pré-concentração em sílica modificado com tiouréia. Neste estudo, foi empregada sílica modificada para promover a extração dos elementos em fase sólida. As amostras, aproximadamente 1 g, foram previamente decompostas em sistema fechado assistido por radiação micro-ondas com 5 mL de ácido nítrico concentrado e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% ($m\ m^{-1}$). Com o método proposto foram obtidos bons LODs para Cd e Pb, no entanto, pode ser considerado oneroso e dispendioso, visto que envolve a

decomposição das amostras em ácido seguida do emprego de um aparato especial para SPE, que possui tempo de uso limitado.

Por fim, observa-se, em todos os estudos supracitados, uma dependência da técnica de MAWD, com tempos de aquecimento prolongados sob baixas potências de radiação, condicionadas aos riscos de explosão do sistema. Isso onera o trabalho e põe em cheque a eficiência relativa dos métodos propostos, uma vez que se observa baixa frequência de análise, associada a custos elevados dos aparatos e equipamentos utilizados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os equipamentos, reagentes e amostras utilizadas no desenvolvimento deste trabalho. Além disso, serão descritos os procedimentos do método DLLME para a determinação de Cd e Pb em mel por F AAS e, por fim, as técnicas de preparo às quais as amostras foram submetidas, bem como as técnicas de determinação empregadas.

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

A determinação de Cd e Pb em mel foi executada utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica da Analytik Jena (modelo AAS Vario 6, Jena, Alemanha, <http://www.analytik-jena.de>), equipado com um queimador do tipo monofenda (100 mm de comprimento) para chama acetileno + ar. Nesse equipamento, são usadas lâmpadas de cátodo oco como fonte de radiação e sistema de correção de fundo com lâmpada de deutério. Os comprimentos de onda selecionados foram de 228,8 e 217,0 nm para Cd e Pb, respectivamente. A largura da fenda espectral foi de 0,8 nm para Cd e 1,2 nm para Pb e a corrente da lâmpada foi de 3,0 mA para Cd e 6,5 mA para Pb. As medições de Cd e Pb foram feitas em absorbância integrada, sem que tenha sido empregado qualquer algoritmo para aprimoramento dos sinais.

Para a comparação dos resultados com o método proposto, o mel foi decomposto através de MAWD em sistema fechado, adaptado de Tuzen *et al.*,⁴ na qual foi utilizado um forno de micro-ondas da Anton Paar (modelo Multiwave 3000, Microwave Sample Preparation System, Graz, Áustria, <http://www.anton-paar.com>), equipado com oito frascos de quartzo, com capacidade individual de 80 mL e pressão máxima de 80 bar.

Para a determinação de Cd e Pb, após decomposição, foi utilizado um equipamento de ICP-MS da PerkinElmer-SCIEX (modelo ELAN DRC II, EUA, <http://www.perkinelmer.com>), equipado com nebulizador concêntrico de quartzo, com câmara de nebulização ciclônica de quartzo e tocha com tubo injetor de quartzo com diâmetro interno de 2 mm. Na Tabela 5 são mostrados os parâmetros de operação do equipamento de ICP-MS. A avaliação das condições de operação do equipamento de ICP-MS foi feita diariamente através do monitoramento da intensidade do sinal obtido para $^{115}\text{In}^+$ (o qual deve ser superior a 30.000 contagens s^{-1} , cps, segundo recomendação do fabricante), da menor formação de óxidos, monitorada pela intensidade da espécie poliatômica $^{156}\text{CeO}^+$ (que deve ser inferior a 3% da intensidade do sinal obtido para $^{140}\text{Ce}^+$) e da menor intensidade do sinal para o $^{138}\text{Ba}^{2+}$ (inferior a 3% em relação ao $^{138}\text{Ba}^+$). Essa avaliação foi feita com uma solução contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ba e $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de In e Ce.

Tabela 5. Condições operacionais para a determinação de Cd e Pb por ICP-MS.

Parâmetro	
Potência do gerador de radiofrequência	1300 W
Vazão de argônio principal	15 L min ⁻¹
Vazão de argônio auxiliar	1,2 L min ⁻¹
Vazão de argônio do nebulizador	1,05 L min ⁻¹
Cone de amostragem e <i>skimmer</i>	Pt
Resolução	0,7 u
m/z monitorado	¹¹¹ Cd e ²⁰⁷ Pb

Para a pesagem das amostras, foi utilizada uma balança analítica Shimadzu (modelo AY220, Filipinas, <http://www.shimadzu.com.br>) com resolução de 0,0001 g.

O pH das soluções foi medido em um potenciômetro digital da Metrohm (modelo 781 pH/Ion Meter, Suíça, <http://www.metrohm.com.br>) com resolução de 0,01 unidades de pH.

Para o aquecimento das soluções, antes do procedimento de extração, foi utilizado um banho-maria da Cienlab (modelo CE-160/22A, Brasil, <http://www.cienlab.com.br>) com precisão de 1 °C.

O manuseio dos solventes orgânicos (dispensores e extratores), foi feito com o uso de microsseringas de 1,25 mL Hamilton (modelo 1001.25 LTN Agulha Fixa - Ponta Estilo 3, EUA, <http://www.hamiltoncompany.com>) e com tubos de borossilicato da Laborglas (Brasil, <http://www.laborglas.com.br>) com capacidade de 15 mL, com tampa.

As centrifugações das soluções foram executadas em uma centrífuga Hermle (modelo Z326K, Alemanha, <http://www.hermle-labortechnik.de>) com capacidade para 6 tubos de 15 mL.

As soluções de referência e de mel, assim como os extratos pós-injeção, foram acondicionadas em tubos de vidro borossilicato com fundo cônico (Laborglas) para centrifugação, com capacidade de 15 mL.

A destilação do ácido nítrico foi feita a baixa temperatura utilizando um sistema de destilação de quartzo da Milestone (modelo duoPUR, Subboiling Distillation System, Bergamo, Itália, <http://www.milestonesci.com>).

A água, após destilação e desionização, foi purificada através de um sistema Milli-Q (*Milli-Q Ultrapure Water Purification Systems, Gradient System, Millipore, EUA*, <http://www.millipore.com>).

4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Em todos os casos, a água utilizada foi previamente destilada e deionizada através de uma coluna de troca iônica (condutividade máxima de $0,6 \mu\text{S cm}^{-1}$) sendo, posteriormente, purificada no sistema da Milli-Q, com resistividade final de superior a $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$.

Os solventes orgânicos empregados como dispersores, foram a acetona com 99,5% de pureza (Labsynth, Brasil, <http://www.labsynth.com.br>), a acetonitrila com 99,8% de pureza (Carlo Erba, Itália <http://www.carloerbareagents.com>), o metanol 99,9% de pureza (Merck, Alemanha, <http://www.merck.com>) e o etanol 99,3% de pureza (F.Maia, Brasil, <http://sao-paulo.all.biz/f-maia-industria-e-comrcio-ltda-e3349>). Como solventes de extração foram utilizados o tetracloreto de carbono com 99,8% de pureza (Merck), o tricloroetileno com 99,5% de pureza (Merck), o diclorometano técnico (Belga Química, Brasil), o clorofórmio com 99,8% de pureza (Vetec, Brasil, <http://www.sigmaaldrich.com>), o 1,2 – dicloroetano (Vetec), o diclorobenzeno (Merck), o clorobenzeno (Merck) e o 1-octanol (Vetec). Como complexante foi utilizado o dietilditiocarbamato de sódio com 99% de pureza (Merck).

Para a construção das curvas de calibração e ensaios de recuperação, foi preparada uma solução estoque de Cd a partir de solução Titrisol da Merck (CdCl_2 , com 1000 mg L^{-1} de Cd) e de Pb a partir de solução Titrisol da Merck (PbCl_2 , com 1000 mg L^{-1} de Pb). Para a preparação das soluções de calibração, para a determinação de Cd e Pb por ICP-MS, foi utilizada uma solução de referência multielementar (SCP33MS, com concentração de 10 mg L^{-1} para Cd e Pb, SCP Science, Quebec, Canadá, <http://www.scpscience.com>), diluída em HNO_3 $0,7 \text{ mol L}^{-1}$.

O ácido nítrico concentrado (65% com densidade de $1,4 \text{ kg L}^{-1}$, Merck) foi bidestilado.

Para composição da chama, empregada no método DLLME-F AAS, foi utilizado acetileno comercial com pureza de 99,5% (White Martins, Brasil, <http://www.whitemartins.com.br>) e ar comprimido.

O plasma utilizado na técnica ICP-MS foi gerado a partir de argônio com pureza de 99,996% (White Martins).

4.3 AMOSTRAS E MANUSEIO DE MATERIAIS

O método de DLLME-F AAS foi empregado para a determinação de Cd e Pb em três amostras de mel, identificadas como A, B e C, provenientes de Agudo-RS, Santana do Livramento-RS e Candiota-RS respectivamente.

As três amostras foram previamente aquecidas durante 10 minutos em banho-maria a, aproximadamente, 45 °C, a fim de facilitar a pesagem. Após, as mesmas foram solubilizadas, sob agitação, com água purificada e o volume foi aferido para obter soluções de mel com concentrações de 50, 100, 150 e 200 g L⁻¹, que em 10 mL de solução aquosa, correspondem a 0,5000, 1,0000, 1,5000 e 2,0000 g de mel, respectivamente. Nestas soluções, o pH ficou na faixa de 4,0 a 4,5.

Todas as vidrarias e materiais de laboratório usados para o preparo de soluções, foram lavados adequadamente e descontaminados por imersão em HNO₃ 10% (v/v) por, no mínimo, 24 horas. Sendo enxaguados com água purificada imediatamente antes do uso.

Os tubos de vidro borossilicato cônicos, para centrifugação, foram, inicialmente, lavados com etanol e, a seguir, lavados novamente com água e descontaminados por imersão em ácido nítrico 10% (v/v) por 24 horas. Após a retirada da solução ácida, os mesmos foram enxaguados com água e secos à temperatura ambiente.

Os frascos de quartzo, utilizados na MAWD, foram descontaminados com ácido nítrico, usando um programa de aquecimento no forno de micro-ondas constituído de uma etapa de 10 min a 1000 W (sem rampa de aquecimento), seguido por 20 min para o arrefecimento. Ao término do programa, os frascos foram lavados com água purificada.

4.4 TÉCNICA DE DLLME

Numa avaliação preliminar, a técnica de DLLME para a extração de Cd e Pb do mel, foi adaptada de Rezaee *et al.*¹⁵ Para tal, foi pesado, com exatidão, em torno de 0,5000 g de mel diretamente em tubos de vidro borossilicato com fundo cônico. Em seguida, foi adicionada uma quantidade equivalente de Cd e Pb, para obter uma solução com concentração final de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Cd e Pb foram adicionados às amostras em virtude da concentração estar possivelmente abaixo dos LOD's esperados e, assim, obter-se um sinal de absorbância para facilitar a comparação dos parâmetros avaliados. O volume foi aferido a 10 mL com água purificada. A mistura foi então agitada, vigorosamente, até a completa dissolução do mel. Após aproximadamente 2 minutos de agitação, foi adicionado o NaDDTC a fim de se obter uma concentração equivalente a $0,25 \text{ g L}^{-1}$ e a solução foi agitada por mais 30 segundos. Posteriormente, a solução foi aquecida em banho-maria, sob temperatura controlada, onde permaneceu por 10 minutos. Após a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor, a solução foi centrifugada por 2 minutos para a separação de fases. Em seguida, a solução sobrenadante foi retirada, com auxílio de uma pipeta, e adicionada água purificada para lavagem, visando reduzir o teor de sódio proveniente do NaDDTC na fase aquosa e/ou outros componentes oriundos da amostra. A solução foi novamente centrifugada. Ao final desse processo, os extratos ficam prontos para a determinação de Cd e Pb por F AAS. O aspecto das soluções, na sequência das etapas do método da DLLME, pode ser visto na Figura 6.

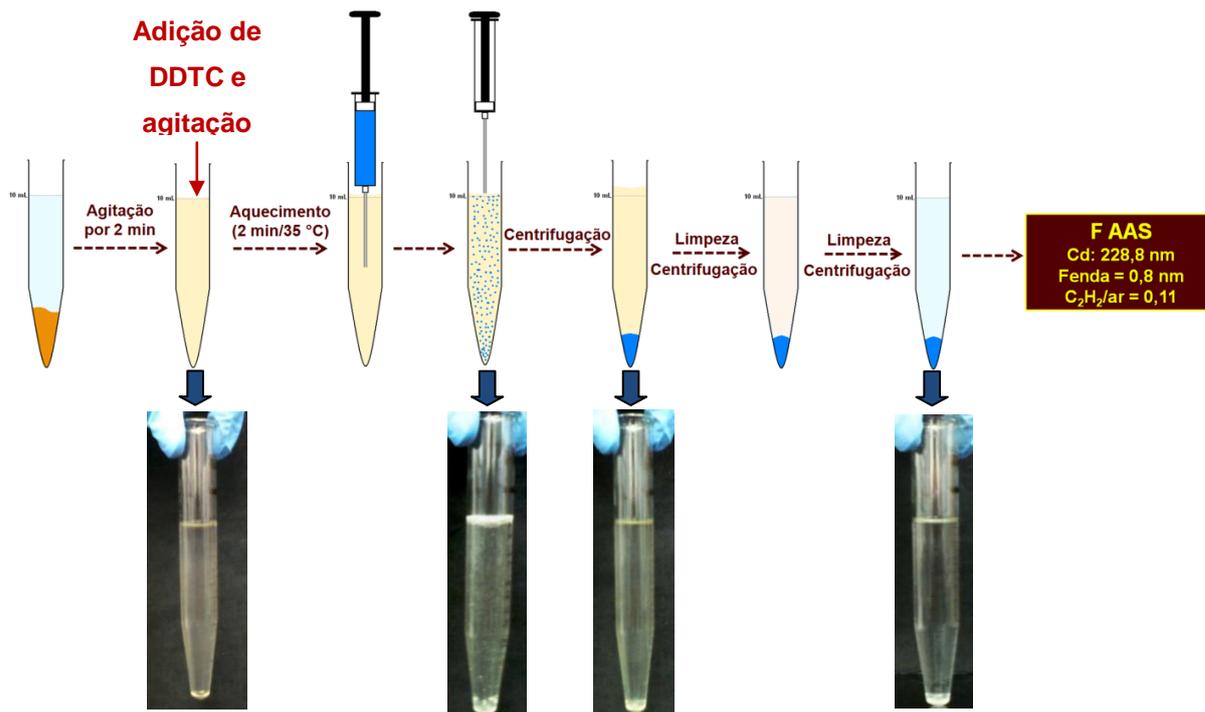


Figura 6. Procedimento proposto empregando DLLME e F AAS.

A determinação de Cd e Pb foi executada aspirando completamente a fase sedimentada diretamente do frasco. Isto foi feito, mergulhando o capilar do nebulizador do espectrômetro de absorção atômica, inicialmente na fase aquosa, momento em que o espectrômetro faz a leitura para a tomada da linha base e, a seguir, na fase orgânica contendo os analitos.

4.4.1 Avaliação dos solventes extratores e dispersores

Os solventes extratores e dispersores testados, foram conforme indicado por Reezae *et al*¹⁵. Para tal, foram avaliados acetona, acetonitrila, metanol e etanol como solventes dispersores e tetracloreto de carbono, clorofórmio, diclorometano, tricloreto de etileno, 1,2-dicloroetano, diclorobenzeno e clorobenzeno como solventes extratores.

Testes iniciais, foram feitos de acordo com aqueles reportados por Wen *et al.*⁶⁶ onde os volumes de dispersor e extrator foram fixados em 500 μ L e 100 μ L, respectivamente.

Como foram utilizados quatro solventes dispersores e sete solventes extratores, isso gerou vinte e oito combinações de solventes extratores e dispersores. Os testes foram feitos com uma solução de mel, a 50 g L^{-1} , na qual foram adicionados o equivalente a $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e Pb, respectivamente. Essa solução foi dividida entre cinquenta e seis tubos cônicos de vidro (alíquotas de 10 mL). A avaliação de todas as vinte e oito combinações desses solventes foi feita pela injeção em duplicata, observando, inicialmente, de modo visual se ocorreu a formação de fase sedimentada após a injeção e centrifugação. A partir disso, com a seleção das oito melhores condições de fase sedimentada, observadas visualmente, partiu-se para a comparação em função das determinações por F AAS, escolhendo-se a melhor condição (combinação de solventes extrator e dispersor) para Cd e Pb, separadamente. Para isso, considerou-se a melhor relação sinal ruído e/ou a melhor precisão.

4.4.2 Avaliação do número de lavagens do extrato

Para a determinação de Cd e Pb, por F AAS, em vista da possível existência de sódio proveniente do NaDDTC e dos componentes da amostra, dissolvidos no meio aquoso, foi inicialmente avaliado o número de lavagens necessárias, para que o sinal apresentasse melhor razão sinal/ruído e menor desvio padrão. Para tanto, foram avaliadas as condições com e sem lavagem (até 5 lavagens com água).

4.4.3 Avaliação do volume de solvente dispersor

Para a escolha do volume de solvente dispersor, o volume de solvente extrator foi fixado em $100 \text{ } \mu\text{L}$. Para o Cd, o volume de solvente dispersor avaliado foi de 200 a $900 \text{ } \mu\text{L}$ e de 300 a $1000 \text{ } \mu\text{L}$ para o Pb. Em ambos os casos, o incremento de volume foi de $100 \text{ } \mu\text{L}$.

4.4.4 Avaliação do volume de solvente extrator

Depois de fixados os volumes dos respectivos solventes dispersores, foi avaliado o efeito do volume de solvente extrator na faixa de 20 a 180 μL para Cd e de 40 a 160 μL para Pb.

4.4.5 Avaliação do pH da solução da amostra

Uma vez fixados o tipo e o volume dos solventes extrator e dispersor, foi avaliada a influência do pH da solução de mel sobre a extração de Cd e Pb. As soluções de mel foram preparadas e o pH foi ajustado adicionando-se HNO_3 1 mol L^{-1} ou NH_4OH 3,5 mol L^{-1} . Para os dois elementos, a faixa de pH avaliada foi de 1 a 10, com variação de uma unidade.

4.4.6 Avaliação da concentração do agente complexante em solução

Como agente complexante, foi escolhido o dietilditiocarbamato de sódio^{18,71} (Figura 7). Foram avaliadas as concentrações de NaDDTC na amostra na faixa de 0,25 a 1,25 g L^{-1} tanto para o Cd quanto para o Pb, com incrementos de 0,25 g L^{-1} .

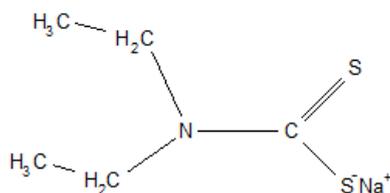


Figura 7. Fórmula estrutural plana do dietilditiocarbamato de sódio.

4.4.7 Avaliação da temperatura na extração de Cd e Pb no mel

Nos testes preliminares, verificou-se elevada variação nos resultados quando as extrações foram feitas à temperatura ambiente (aproximadamente 25 $^{\circ}\text{C}$). Por

esse motivo, foi avaliado o efeito da temperatura na faixa de 25 a 55 °C, para ambos os elementos, empregando as condições obtidas nas avaliações anteriores.

4.4.8 Avaliação da velocidade de centrifugação

A velocidade de centrifugação é um fator importante, visto que vai influenciar na separação das fases. Para tanto, o tempo de centrifugação foi fixado em 2 minutos e a velocidade de centrifugação variada na faixa de 840 a 3380 g para Cd e de 840 a 7610 g para Pb.

4.4.9 Avaliação da concentração da solução de mel

A fim de verificar possíveis interferências da matriz, foi avaliado o efeito da concentração de mel em solução aquosa. Para tal, foram avaliadas as concentrações de 50, 100, 150 e 200 g L⁻¹. As soluções foram preparadas de tal modo que as concentrações de Cd e Pb em solução fossem de 10 e 40 µg L⁻¹, respectivamente. As avaliações foram feitas empregando as melhores condições escolhidas para cada analito.

4.5 DETERMINAÇÃO DE Cd E Pb POR F AAS

Tendo em vista a dificuldade de retirar, quantitativamente, a fase orgânica enriquecida com o analito do frasco (tubo de vidro cônico) usado para a extração, a determinação foi feita aspirando diretamente a fase sedimentada contida no frasco. Para tal, o capilar do nebulizador pneumático foi introduzido na solução e aspirada a uma vazão de 6 mL min⁻¹ e a uma razão de acetileno/ar de 0,11 (chama oxidante). Foi observado menor sinal de fundo, para ambos os casos, quando comparados à chama estequiométrica.

4.5.1 Cálculo do fator de pré-concentração

Entre os grandes benefícios da DLLME, cita-se a rapidez com que o equilíbrio entre o extrator e o analito é atingido, sobretudo, em função da grande superfície de contato entre as fases. A partir desse equilíbrio atingido, é conveniente a determinação do fator de pré-concentração (*PF*) do analito na fase sedimentada. O *PF* é calculado pela razão entre concentração do elemento na fase sedimentada e a concentração inicial do mesmo na fase aquosa (Equação 1).¹⁵

$$PF = \frac{C_{sed}}{C_0} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: C_{sed} corresponde à concentração do analito na fase sedimentada e C_0 corresponde à concentração do analito na fase inicial (solução aquosa).

Neste trabalho o *PF* foi estimado pela razão entre a intensidade do sinal após a aplicação da DLLME pelo sinal obtido antes da DLLME, ambos medidos em soluções fortificadas com 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb.

4.5.2 Curvas analíticas

Neste trabalho foram avaliadas duas formas de calibração para cada elemento. Uma curva foi feita em soluções aquosas sem mel, e outra, na presença de mel (curva de adição de padrão), ambas elaboradas sob as condições de extração otimizadas. A DLLME foi aplicada nas soluções de referência, preparadas com água, e nas soluções de mel em concentrações na faixa de 0,5 a 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e de 20 a 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb.

A faixa linear de resposta foi definida em função da dispersão dos valores de absorbância integrada em relação à concentração do analito, através do teste estatístico de análise de tendência e linearidade.

4.6 MÉTODO DE DECOMPOSIÇÃO DA AMOSTRA

Para a comparação dos resultados e consequente verificação da exatidão do método proposto DLLME-F AAS, determinações de Cd e Pb foram feitas por ICP-MS após decomposição do mel por MAD.

4.6.1 Decomposição de mel por via úmida assistida por micro-ondas

As amostras foram pesadas diretamente nos frascos adicionando-se em seguida 6 mL de HNO_3 14,4 mol L^{-1} e deixadas em repouso por 12 horas. Após, para o emprego da MAD, o programa de aquecimento utilizado foi adaptado de Tuzen *et al.*,⁴ aplicando-se uma rampa de 10 min até 200 W permanecendo nessa condição por 5 min, a seguir 0 W por 2 min, seguido de uma rampa de 20 min até 1000 W, mantendo-se nessa condição por mais 5 min. Para arrefecimento dos frascos o equipamento foi mantido sob ventilação forçada por 20 min.

As decomposições foram feitas em frascos de quartzo, sendo utilizados 0,5000 g de amostra e 6 mL de HNO_3 concentrado.

Após a decomposição das amostras de mel, o conteúdo dos frascos foi transferido para tubos de polipropileno e avolumado para 25 mL com água purificada. Neste caso, para avaliação da exatidão do método e obtenção de sinal analítico, foram adicionados Cd e Pb em concentrações equivalentes a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados referentes ao método DLLME-F AAS proposto para a determinação de Cd e Pb em mel. Assim como, os resultados obtidos por MAWD-ICP-MS, para a comparação dos resultados com o método proposto.

5.1 MÉTODO DE DLLME

5.1.1 Avaliação dos solventes extratores e dispersores

A escolha adequada dos solventes extrator e dispersor, assim como seus respectivos volumes, é considerada crucial para a DLLME. O solvente dispersor deve ser solúvel em água a fim de promover ao solvente extrator (insolúvel em água) grande superfície de contato com o analito, que se encontra na amostra aquosa.^{15,48} Para tanto, diversas combinações de solventes dispersores e extratores foram testados. Os resultados, qualitativamente avaliados de forma visual (formação ou não de fase sedimentada), estão mostrados na Tabela 6. Todos os experimentos foram feitos na presença de mel, empregando 10 mL de amostra com 50 g L⁻¹ de mel, com adição de NaDDTC a uma concentração equivalente a 0,25 g L⁻¹, e injeção da mistura com 500 µL de solvente dispersor e 100 µL de solvente extrator. Após a injeção, as dispersões foram centrifugadas por 2 minutos à 1500 g para formação das fases sedimentadas.

Tabela 6. Resultados obtidos a partir da observação visual das combinações de 500 µL dos solventes dispersores e 100 µL dos extratores para a extração de 10 µg L⁻¹ de Cd e 20 µg L⁻¹ de Pb.

Solvente extrator (100 µL)	Solvente dispersor (500 µL)			
	Metanol	Etanol	Acetona	Acetonitrila
Tetracloroeto de carbono	-	+	+	+
Clorofórmio	-	-	+	+
Diclorometano	-	-	+	+
1,2 – dicloroetano	-	-	-	-
Tricloroetileno	-	+	+	+
Clorobenzeno	-	+	-	-
Diclorobenzeno	-	-	-	-

+ : formou fase sedimentada sem precipitado.

- : não formou fase sedimentada ou formou precipitado, que inviabiliza a sua introdução no espectrômetro de absorção atômica com chama.

O solvente dispersor metanol formou fases sedimentadas de pequeno volume e extremamente turvas, o que, em pouco tempo, levou a precipitação. Dessa forma, a combinação de solventes extratores com esse solvente dispersor foi considerada “negativa”, pois inviabiliza a sua introdução no espectrômetro de absorção atômica com chama.

O solvente dispersor etanol é melhor na formação da fase sedimentada em relação ao metanol, pois apresentou combinações “positivas”. Nos casos “negativos”, o comportamento foi semelhante ao mencionado com metanol. Nas três situações, apontadas como “positivas” (Tabela 5), apesar de formar fase sedimentada sem precipitado aparente, o volume é inferior a 50% do volume de solvente extrator adicionado.

Portanto, o metanol e o etanol, testados como dispersores, foram considerados inadequados em suas combinações com os diferentes extratores. Isso, possivelmente, pode ser atribuído à presença das enzimas catalase e fosfatase no mel, que têm por função facilitarem a associação de açúcares a alcoóis de cadeia curta.¹ Tal efeito, pode ter prejudicado a dispersão do metanol e do etanol com os solventes extratores.

Melhores resultados foram obtidos com os solventes dispersores acetona e acetonitrila. As fases sedimentadas ultrapassaram 70% do volume de solvente extrator adicionado. No entanto, os resultados obtidos nas combinações com 1,2-dicloroetano e clorobenzeno, foram considerados “negativos”, em função da formação de precipitados.

Desse modo, os solventes dispersores acetona e acetonitrila foram selecionados e avaliados através da comparação da intensidade dos sinais de para Cd e Pb obtidos por F AAS. Enquanto que, o tetracloreto de carbono, o clorofórmio, o diclorometano e o tricloroetileno foram testados como os solventes extratores.

O sinal obtido é transiente (na Figura 8 é mostrado o perfil do sinal), sendo o processamento feito em área integrada. Foi considerada a melhor condição quando a intensidade de sinal é maior (melhor razão sinal/ruído) e/ou quando a repetibilidade é melhor (considerado como o menor desvio padrão de 5 a 10 extrações).

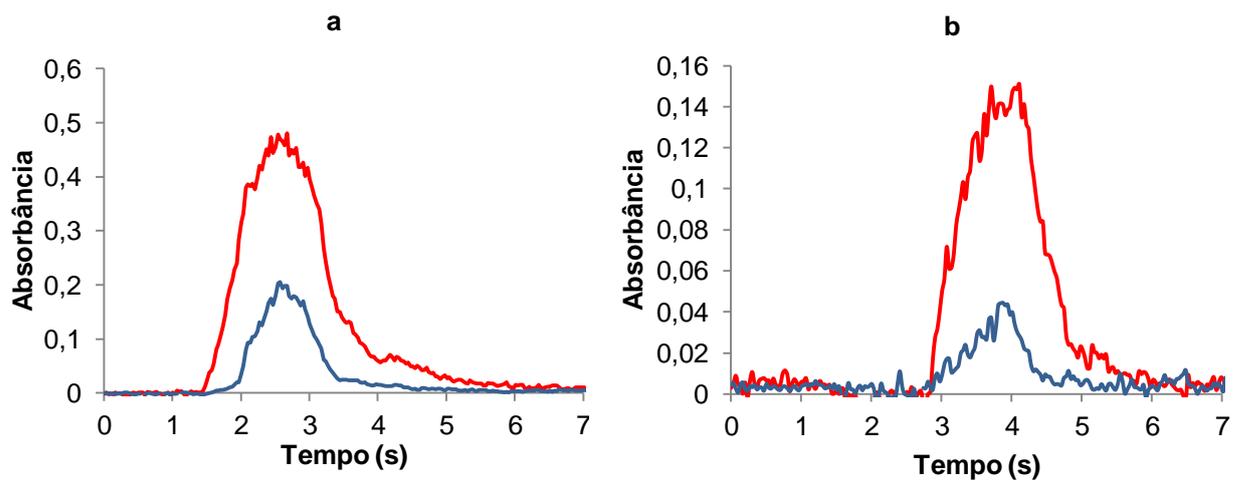


Figura 8. Perfil do sinal de absorvância para Cd (a) e para Pb (b). (Linha em vermelho: sinal atômico; linha em azul: sinal do fundo (BG).)

O sinal de fundo (BG) referido tanto para a medida de Cd quanto para Pb pode estar associado a presença de moléculas não dissociadas na chama com banda de absorção na faixa de 210 à 230 nm.⁹¹

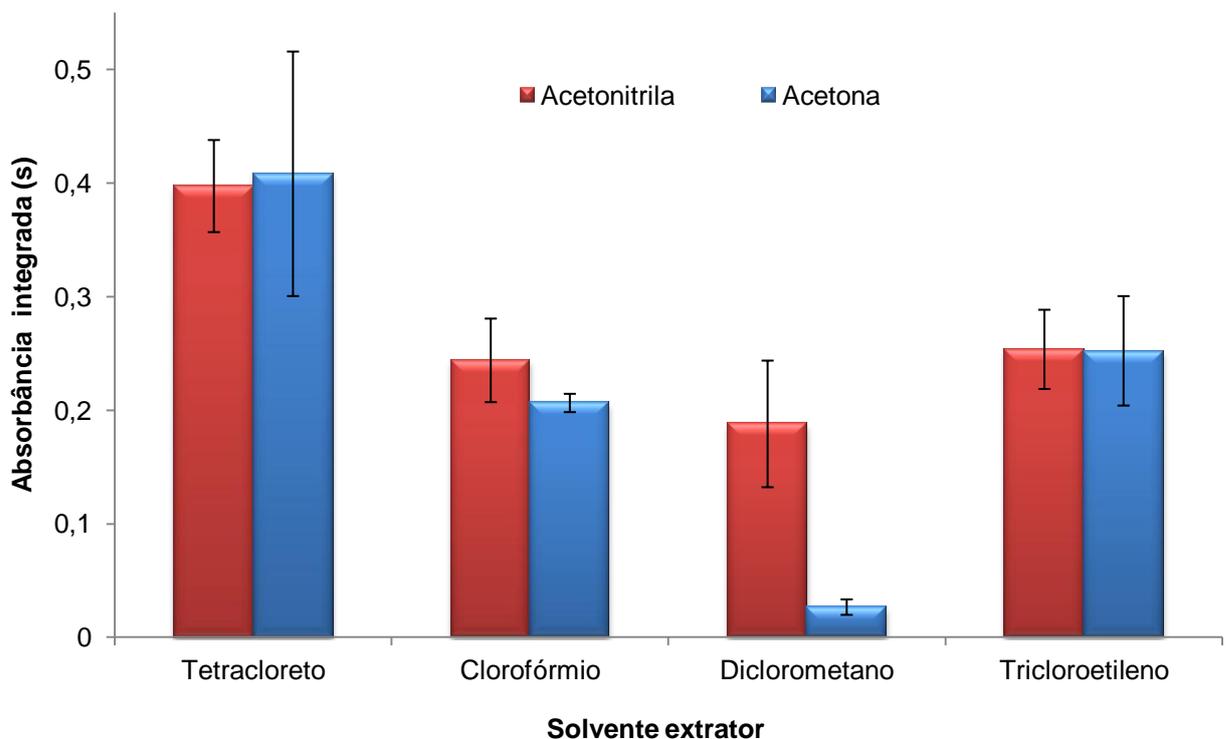


Figura 9. Intensidade dos sinais de absorvância integrada obtidos para $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd em 10 mL de solução aquosa contendo 50 g L^{-1} de mel após extração por DLLME empregando diferentes misturas de solventes extratores e dispersores ($n = 5$).

De acordo com os resultados representados na Figura 9, pode-se afirmar que o solvente extrator tetracloreto de carbono leva a uma melhor eficiência de extração de Cd por DLLME. Dessa forma, como não há diferença significativa (Teste t a um nível de confiança de 95%) entre a intensidade dos sinais de absorbância desse extrator, quando combinado com acetonitrila ou com acetona, optou-se pela escolha da combinação com acetonitrila, por apresentar o menor desvio padrão.

Para a extração de Pb por DLLME (Figura 10) foi escolhida acetona como solvente dispersor e tetracloreto de carbono como solvente extrator, pois o resultado obtido foi significativamente melhor que nas demais condições.

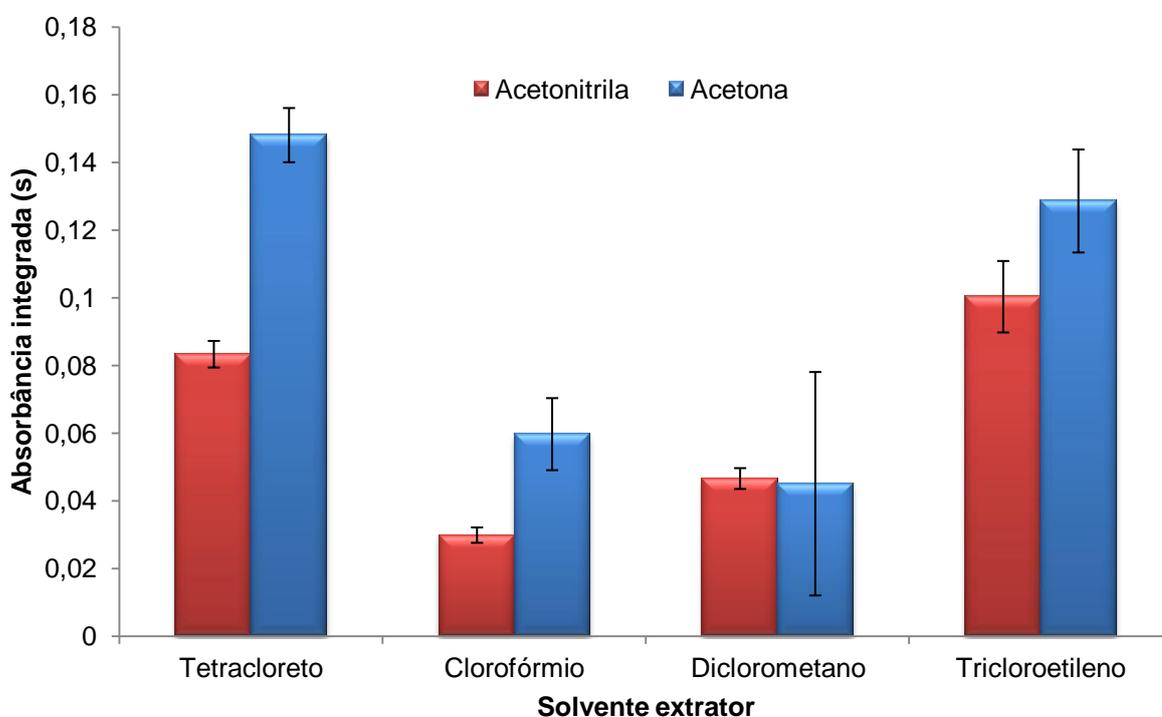


Figura 10. Intensidade dos sinais de absorbância integrada obtidos para $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb em 10 mL de solução aquosa contendo 50 g L^{-1} de mel após extração pro DLLME mediante diferentes misturas de solventes extratores e dispersores ($n = 5$).

5.1.2 Avaliação das etapas de lavagem do extrato

De posse das melhores condições de solvente extrator e dispersor para a extração de Cd e Pb, procedeu-se a avaliação do efeito da lavagem do extrato com água purificada, uma vez que foi observado que a precisão entre os resultados

melhorava quando o extrato é lavado. Os resultados podem ser observados nas Figuras 11 e 12.

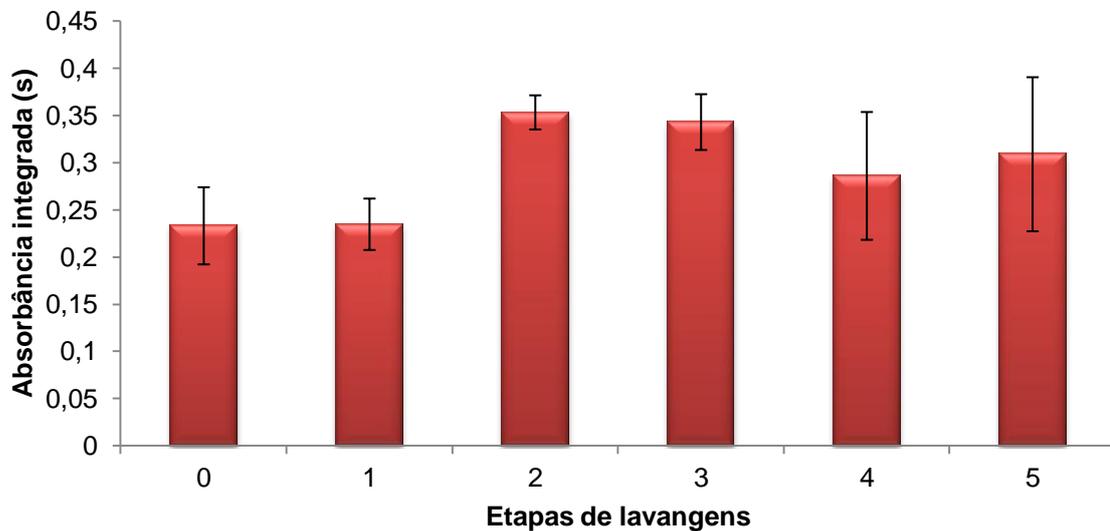


Figura 11. Influência da lavagem do extrato com água purificada. Extratos obtidos a partir da DLLME para 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd ($n = 5$).

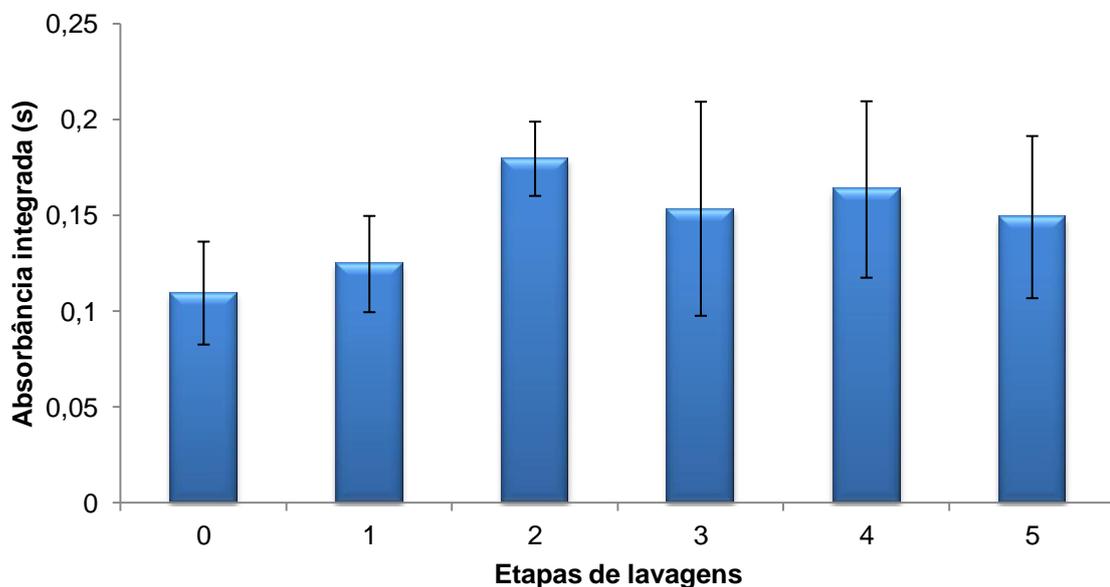


Figura 12. Influência da lavagem do extrato com água purificada. Extratos obtidos a partir da DLLME para 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel com $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb ($n = 5$).

Como pode ser observado nas Figuras 11 e 12, tanto para Cd quanto para Pb, a melhor condição foi de duas lavagens do extrato com água. Em ambos os casos, o desvio padrão foi menor que nas demais condições avaliadas, bem como, o sinal de absorvância integrada foi maior. Esse resultado pode ser consequência da menor influência, tanto do sódio, proveniente do complexante NaDDTC, quanto da própria matriz da amostra solubilizada na fase aquosa, pois, quando da tomada da linha base há menor interferência permitindo com que a razão sinal/ruído seja mais intensa.

5.1.3 Avaliação do volume de solvente dispersor

Com base nos resultados da avaliação preliminar dos solventes extratores e dispersores, foram escolhidos, como melhores solventes dispersores, a acetonitrila e a acetona para Cd e Pb, respectivamente. Entretanto, o desempenho da extração depende, também, do volume destes solventes. Dessa forma, foi avaliada a influência do volume do solvente dispersor visando uma melhor eficiência de extração do Cd e do Pb. Os resultados estão mostrados nas Figuras 13 e 14.

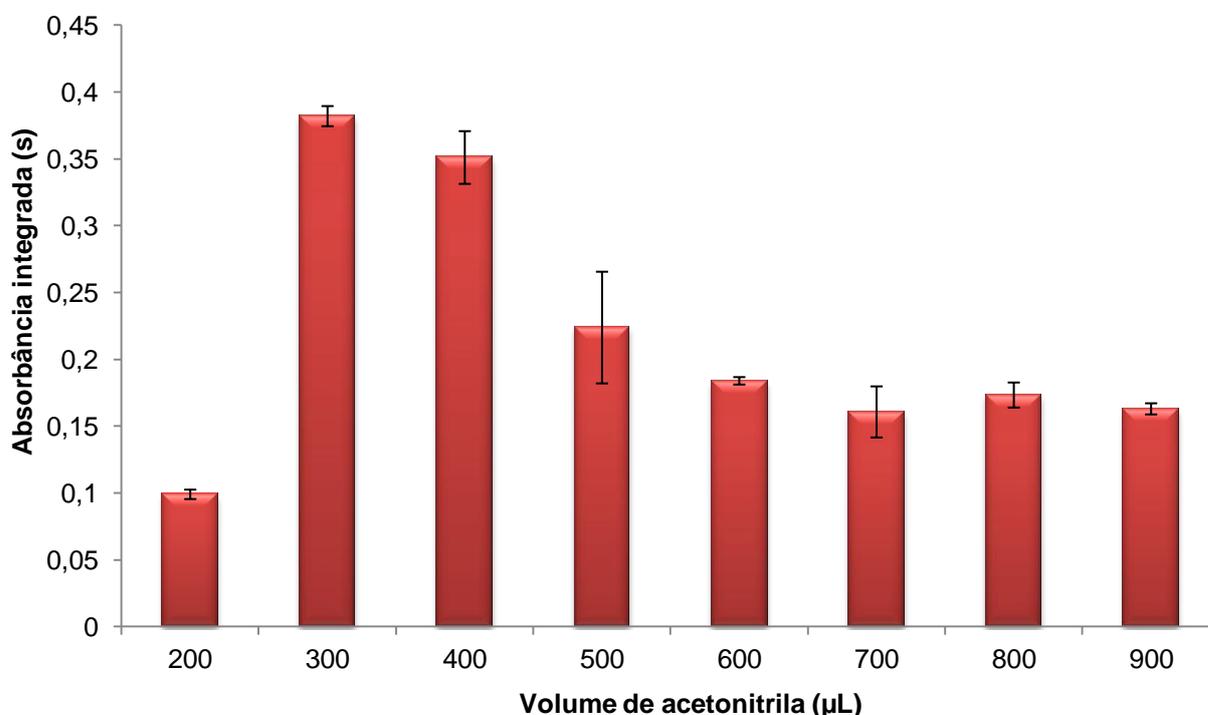


Figura 13. Efeito do volume de acetonitrila (solvente dispersor) na extração por DLLME de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd em 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel ($n = 5$).

Nas microextrações, tal como a DLLME, o objetivo na escolha dos volumes de solventes dispersores e extratores, é pelo menor volume possível com a maior eficiência de extração,^{15,47-48,50} desta forma melhorando o LOD do método. De acordo com os resultados da Figura 13, escolheu-se o volume de 300 μL de acetonitrila para a extração de Cd por ser o mais intenso além de apresentar baixo desvio padrão.

No mesmo sentido, observa-se que para a extração de Pb, o volume de acetona que levou a melhor extração foi 900 μL (Figura 14).

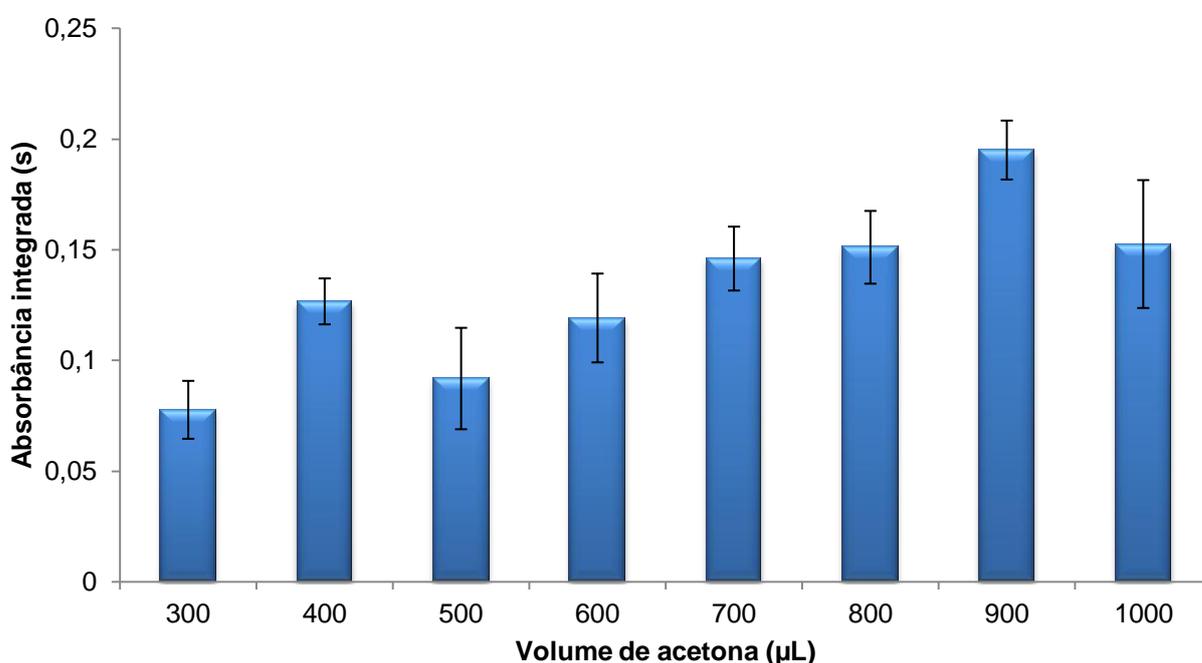


Figura 14. Efeito do volume de acetona (solvente dispersor) na extração por DLLME de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb em 10 mL de soluções com 50g L^{-1} de mel ($n = 5$).

A partir dos resultados nas Figuras 13 e 14, foi observado que o volume de acetona necessário é superior ao de acetonitrila para a dispersão de um mesmo volume de solvente extrator. Isso pode estar associado ao fato de a acetona, menos polar que a acetonitrila, ocasionar uma menor diminuição da tensão interfacial (entre a fase aquosa e a fase orgânica apolar) do que a acetonitrila. Dessa forma, a acetona precisa compensar este efeito com um maior volume, para que se obtenha uma dispersão mais eficiente proporcionando maior área de contato interfacial entre o extrator e a solução aquosa. Este efeito, pode ser explicado através da Equação 2.¹⁰⁶

$$w = \gamma \cdot \Delta A$$

Equação 2

Onde: w é o trabalho (corresponde à energia livre na superfície do líquido), γ é o valor da tensão interfacial (mN m^{-1}) e ΔA corresponde ao aumento na área superficial.

Dessa forma, quando o solvente dispersor é adicionado (acetona ou acetonitrila) à solução, ocorre a diminuição da tensão interfacial, aumentando a dispersão do solvente extrator no meio aquoso, o que implica no aumento da área de contato entre as fases. Conseqüentemente, espera-se uma maior eficiência de extração dos analitos. Além disso, com base na Equação 2, é possível inferir, embora não tenha sido avaliado, que o volume de acetona poderia ser reduzido caso o trabalho (w) fosse aumentado através de agitação da solução.

5.1.4 Avaliação do volume de solvente extrator

Assim como para o dispersor, o volume do solvente extrator deve ser avaliado para cada elemento a fim de obter a maior eficiência de extração. Nas Figuras 15 e 16 é mostrado o efeito do volume do solvente extrator na extração de Cd e Pb na DLLME, respectivamente.

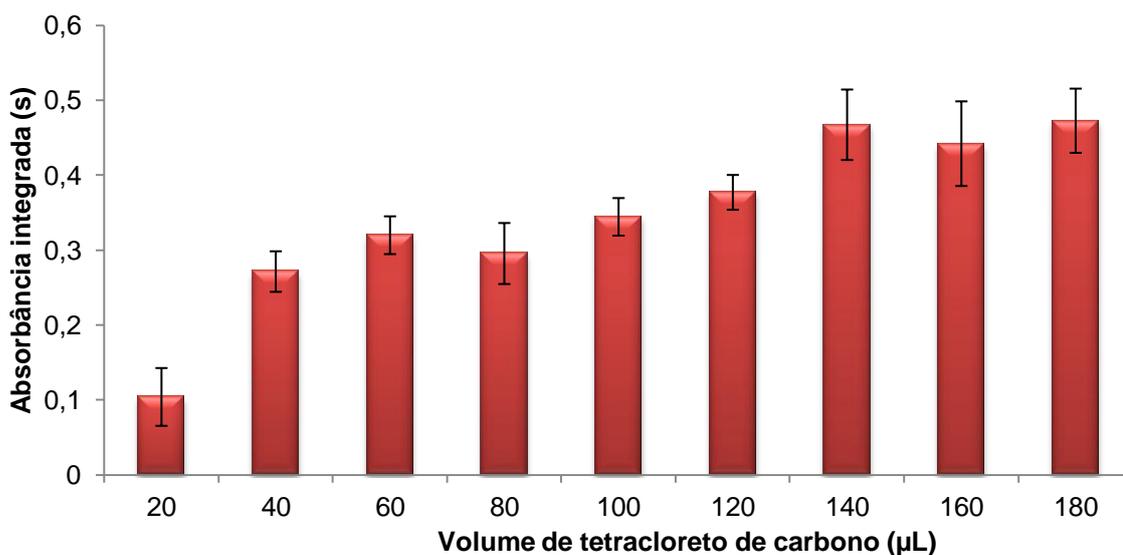


Figura 15. Influência do volume de tetracloreto de carbono na extração de Cd $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 5$) em 10 mL de soluções com 50g L^{-1} de mel por DLLME.

Embora não haja diferença significativa (Teste ANOVA em intervalo de confiança superior a 95%) entre os resultados obtidos (Figura 15), para os volumes de 140, 160 e 180 μL , optou-se por usar 140 μL de tetracloreto de carbono para a extração de Cd por DLLME, uma vez que, corresponde ao menor volume que resultou numa melhor relação sinal/ruído.

Tal como para Cd, o volume escolhido de tetracloreto de carbono para a extração de Pb foi de 140 μL (Figura 16). Embora os volumes de 80 e 120 μL não apresentem resultados com diferenças significativas (Teste ANOVA em intervalo de confiança superior a 95%) em relação ao escolhido, em ambos, observa-se elevada variação entre as medidas. Isso pode ser justificado pela formação de precipitado esbranquiçado em alguns ensaios, o que prejudicou a introdução da fase sedimentada no equipamento.

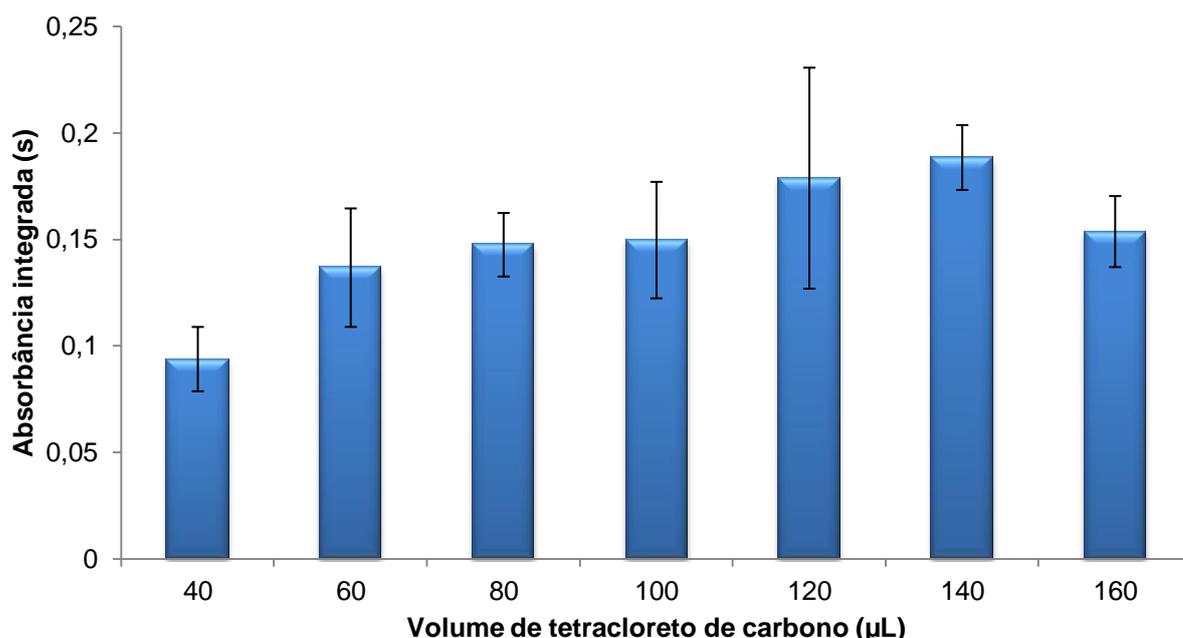


Figura 16. Influência do volume de tetracloreto de carbono na extração de Pb $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 5$) em 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel por DLLME.

5.1.5 Avaliação do efeito da concentração da solução do NaDDTC

Apesar de existirem diversos agentes complexantes para Cd e Pb, como pirrolidinaditiocarbamato de amônio (APDC), ditizona e dietilditiófosfato de amônio

(DDTP), optou-se por usar somente o dietilditiocarbamato de sódio,^{18,71} uma vez que o mesmo é relativamente seletivo para estes elementos e forma complexos relativamente estáveis.¹⁰⁷

A complexação do NaDDTC com os metais ocorre a partir da sua forma livre (ânion), sendo esta dependente do pH do meio. Isto é, em valor de pH superior a 3 essa espécie atuará como um ligante bidentado através dos pares de elétrons livres dos dois átomos de enxofre em sua estrutura. Isso pode ser observado na Figura 17,¹⁰⁷ que representa a estrutura do complexo com Cd^{2+} ou Pb^{2+} .

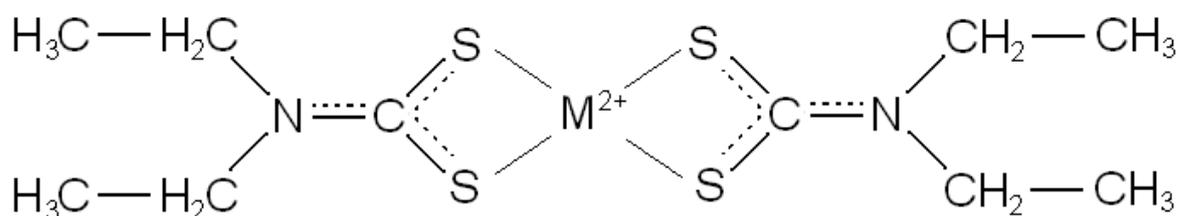


Figura 17. Estrutura prevista para o complexo de Cd ou Pb (M^{2+}) com DDTC (Adaptado de Ferreira¹⁰⁷).

Conforme os resultados obtidos para Cd (Figura 18), foi escolhida a concentração equivalente a $0,25 \text{ g L}^{-1}$ ($1,1 \text{ mmol L}^{-1}$) de NaDDTC na solução da amostra, uma vez que não houve diferença significativa entre os resultados (Teste ANOVA em intervalo de confiança superior 95%). Desse modo, optou-se pela menor concentração do complexante. Para a extração de Pb (Figura 19), foi escolhida a concentração de NaDDTC equivalente a $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ($2,2 \text{ mmol L}^{-1}$) na solução de mel. Nesta condição, houve diferença significativa entre os resultados obtidos para $0,25$ e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ (Teste t em intervalo de confiança superior a 95%).

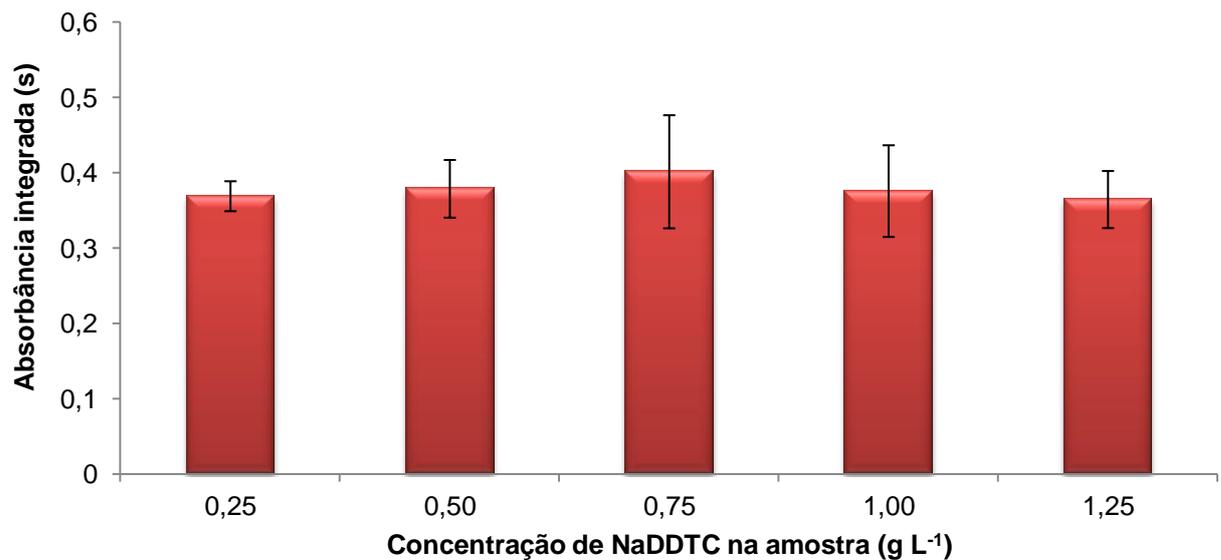


Figura 18. Influência da concentração de NaDDTC em 10 mL de soluções com 50 g L⁻¹ de mel na extração de Cd 10 µg L⁻¹ (n = 5) por DLLME.

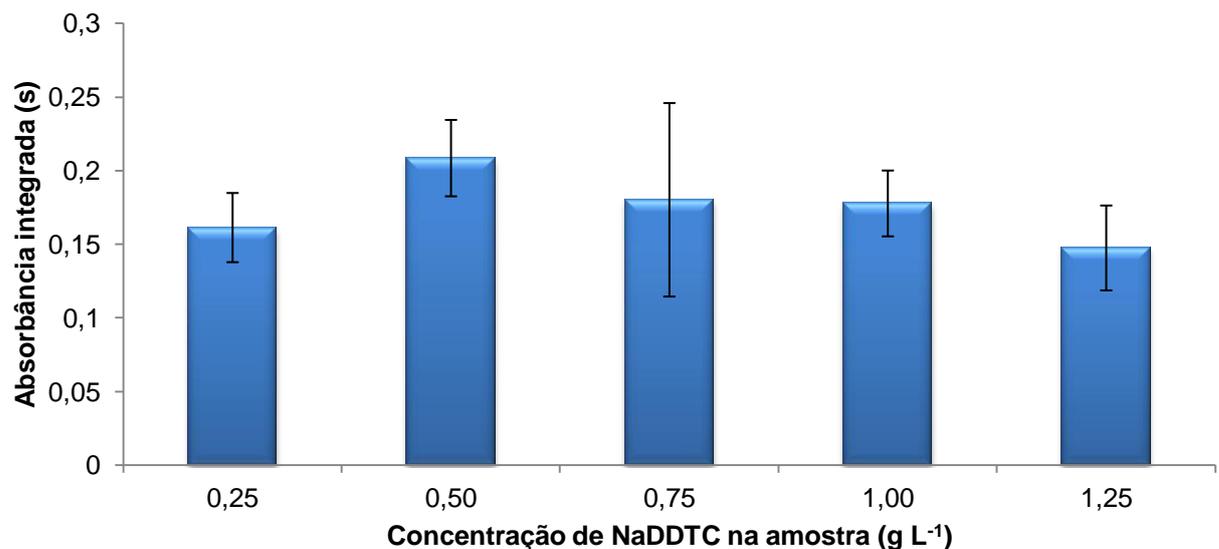
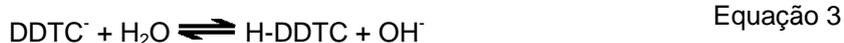


Figura 19. Influência da concentração de NaDDTC em 10 mL de soluções com 50 g L⁻¹ de mel na extração de Pb 20 µg L⁻¹ (n = 5) por DLLME.

5.1.6 Avaliação do efeito do pH da solução da amostra

Segundo Grzeskowiak *et al.*,⁴⁸ outro fator que deve ser avaliado na extração por DLLME é o pH. Esse parâmetro age sobre o agente complexante e,

consequentemente, sobre a complexação de Cd e Pb. Nas Equações 3 e 4, pode-se observar os equilíbrios que representam o NaDDTC em solução aquosa (Equação 3) e o equilíbrio de complexação do Cd ou do Pb (M^{2+}) pelo NaDDTC (Equação 4).⁸⁹



Como é sabido, para ocorrer a complexação do NaDDTC com o Cd ou Pb, o mesmo deve estar na forma não protonada (DDTC^-), conforme representado na Equação 4. Para tal, conforme a Equação 3, destaca-se que, em meios mais ácidos ($\text{pH} < 3$), esse equilíbrio tende a ser deslocado no sentido do complexante estar em sua forma protonada (HDDTC), o que não permite a complexação com Cd e Pb. Convém destacar que em pH 2, em caso de permanência prolongada das amostras no tubo de vidro, pode ocorrer a adsorção de Cd e Pb, não complexados, nas paredes do tubo.¹⁰⁸

Em meio neutro ou básico, o equilíbrio, representado pela Equação 3, desloca-se para a esquerda, facilitando a formação do DDTC^- (forma não protonada). Dessa forma, presume-se que o complexante esteja em sua forma livre para complexar o elemento, conforme a Equação 4. No entanto, em meios mais alcalinos ($\text{pH} > 8$), observou-se um decréscimo da extração de ambos os elementos. Isso, pode ser explicado pela possível formação de hidróxidos insolúveis de Cd e Pb [$\text{Cd}(\text{OH})_2$ e $\text{Pb}(\text{OH})_2$].¹⁰⁹

Portanto, para Cd e Pb, o pH escolhido para a solução aquosa (amostra) de mel foi 7 (Figuras 20 e 21), no qual, em ambos os casos, obteve-se a maior razão sinal/ruído e melhor precisão.

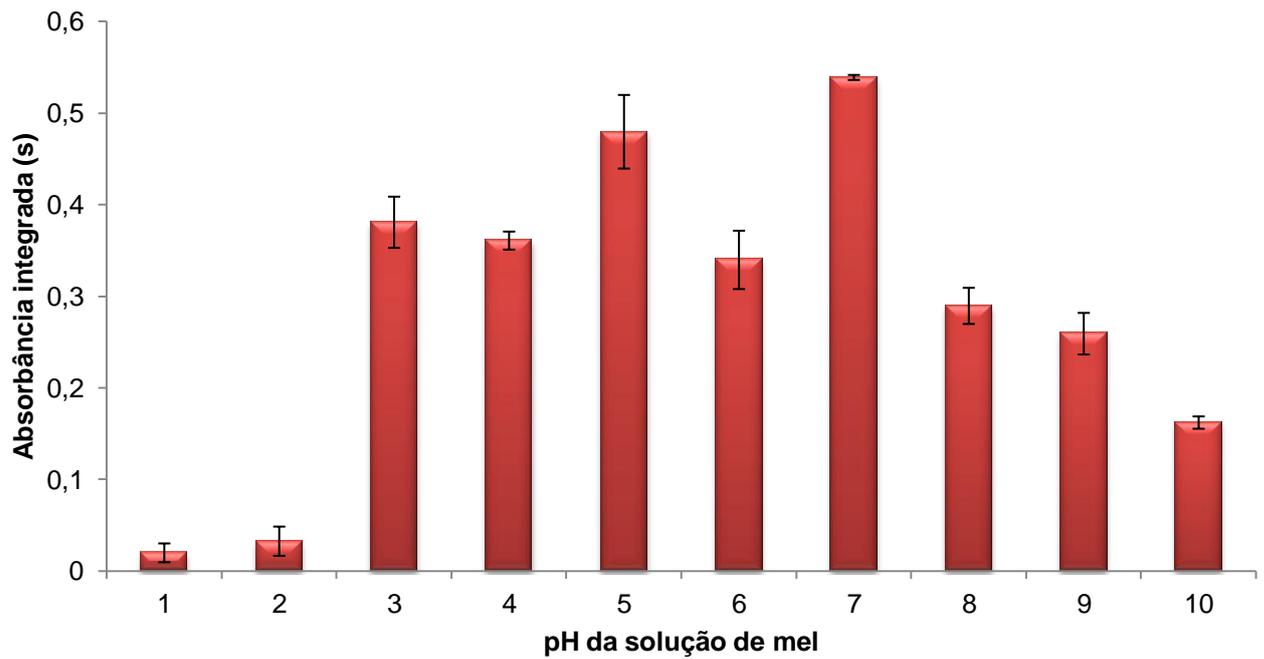


Figura 20. Efeito do pH na extração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd por DLLME a partir de 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel ($n = 5$).

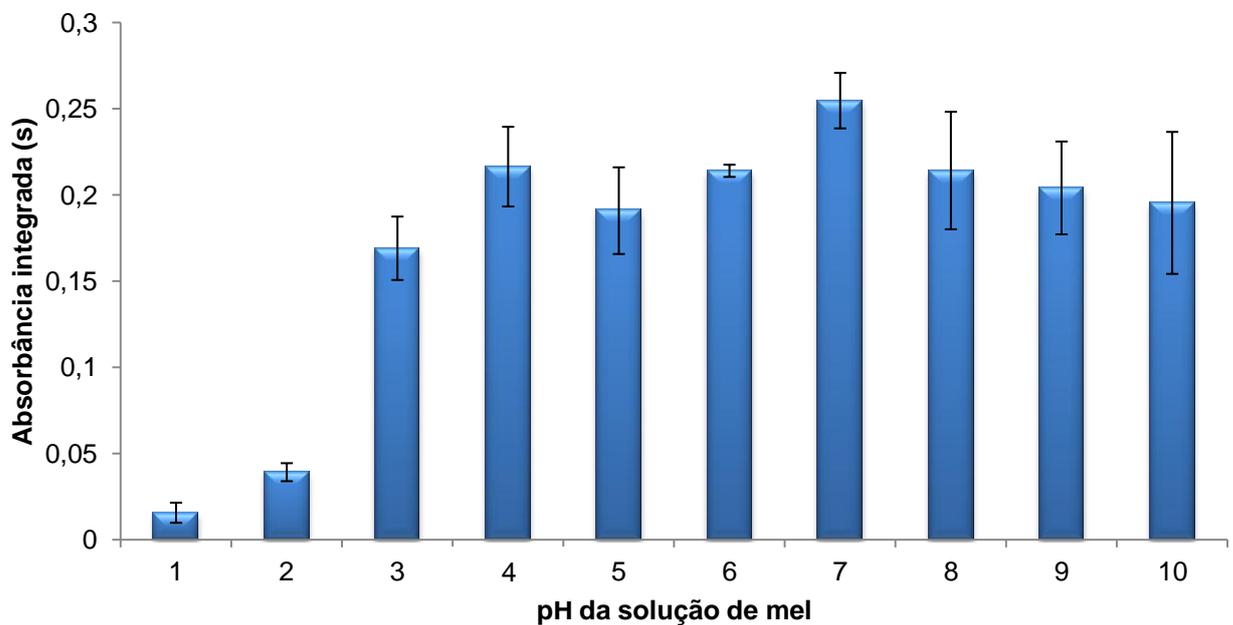


Figura 21. Efeito do pH na extração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb por DLLME a partir de 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel ($n = 5$).

5.1.7 Avaliação da temperatura na extração

Em testes preliminares, verificou-se elevada variação nos resultados quando as extrações foram feitas a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Por esse motivo, foi avaliado o efeito da temperatura entre 25 e 55 °C na extração de Cd (Figura 22) e Pb (Figura 23), empregando as condições ajustadas previamente.

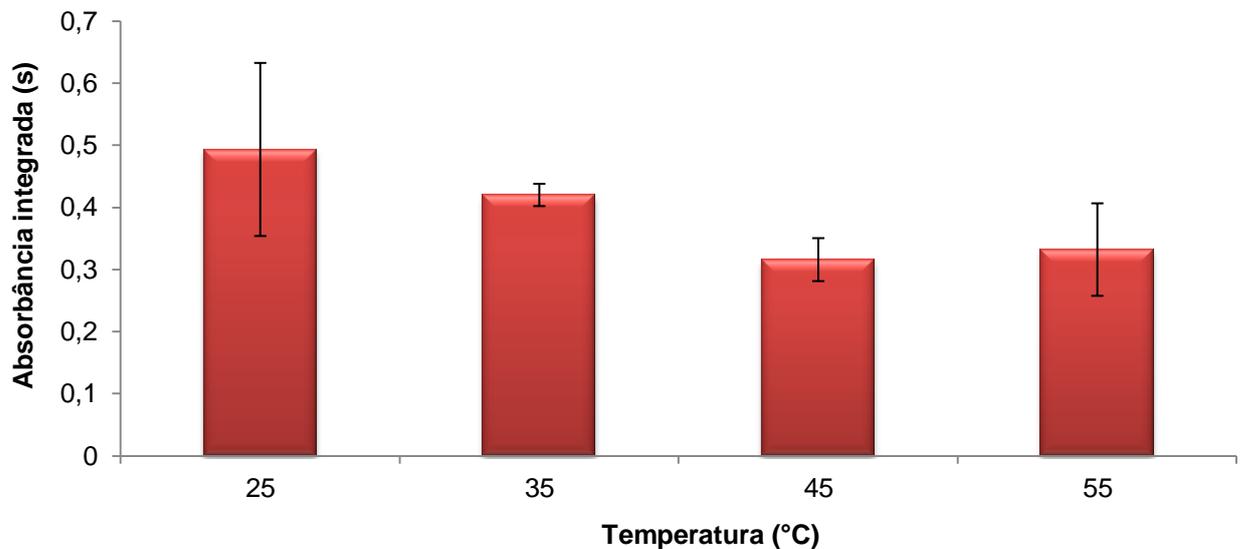


Figura 22. Efeito da temperatura na extração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd por DLMME a partir de 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel ($n = 5$).

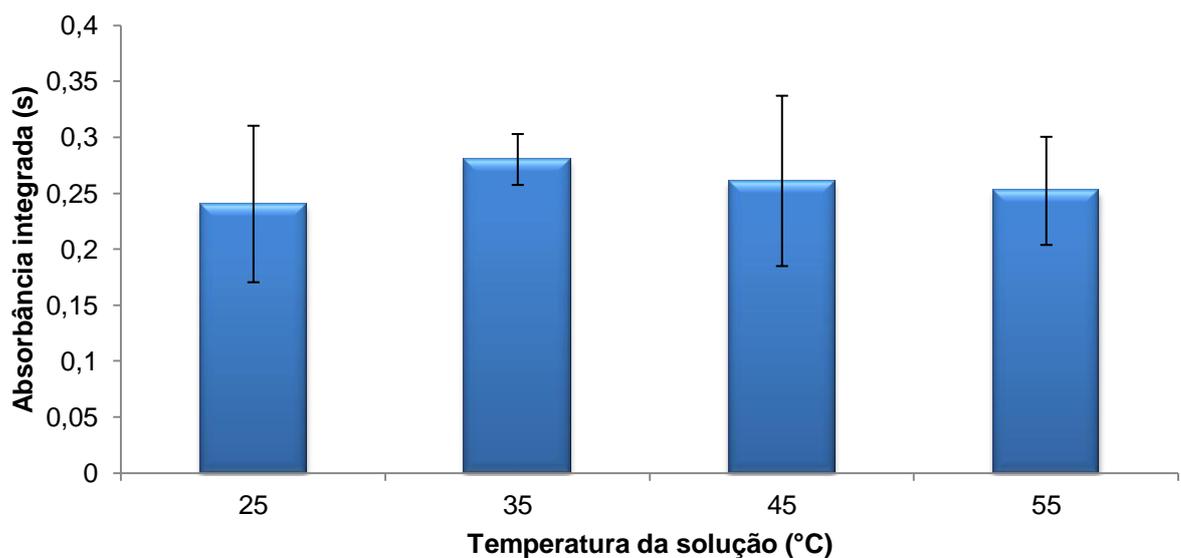


Figura 23. Efeito da temperatura na extração de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb por DLMME a partir de 10 mL de soluções com 50 g L^{-1} de mel ($n = 5$).

Em ambos os casos, a temperatura escolhida da solução aquosa de mel para a extração, foi de 35 °C. Condição na qual, foram obtidos resultados mais precisos, possivelmente em função da melhor homogeneização da solução em temperaturas mais elevadas ou pelo fato do mel cristalizar em temperatura em torno de 25 °C, devido a frutose separar-se da glicose. Sendo esta menos solúvel e precipita.¹

Outro fator importante observado é a diminuição da intensidade dos sinais de Cd e Pb a 45 e 55 °C. Isso pode estar associado a um possível aumento da solubilidade dos complexos em água com o aumento da temperatura, diminuindo a eficiência de extração do solvente orgânico.

5.1.8 Avaliação da velocidade de centrifugação

A centrifugação tem por objetivo acelerar a separação da fase sedimentada (extrato).¹⁵ Para tanto, o tempo de centrifugação, pós-extração e após cada lavagem, foi fixado em 2 minutos. A partir disso, variou-se apenas as velocidades de centrifugação, de 840 a 3380 *g* para Cd e de 840 a 7610 *g* para Pb.

Três parâmetros avaliados (itens 5.1.1 *Tipo de solvente extrator e dispersor*, 5.1.7 *Temperatura de extração* e 5.1.8 *Avaliação do efeito da velocidade de centrifugação*) permitem inferir sobre uma maior velocidade de sedimentação. A sedimentação, no processo de centrifugação, pode ser descrita pela *Lei de Stokes* (Equação 5).¹⁰

$$V_S = \frac{[D^2 \cdot (d_{\text{solvente}} - d_{\text{água}})]}{18 \cdot \mu} \quad \text{Equação 5}$$

Onde: V_S corresponde à velocidade de sedimentação, D diâmetro das gotas dispersas, d_{solvente} densidade do solvente extrator, $d_{\text{água}}$ densidade da água, μ viscosidade da solução aquosa.

É sabido que o solvente dispersor tem influência fundamental sobre o tamanho da gota de solvente extrator dispersa. Desse modo, o dispersor provoca a maior divisão das gotas do extrator (menor D das gotas). Isso, apesar de aumentar a área superficial do solvente extrator na solução, que é importante na fase da extração, tem efeito negativo sobre a velocidade de sedimentação do extrator

(Equação 5). Para tanto, uma forma de compensar esse inconveniente é alterar as outras duas variáveis da *Lei de Stokes* (Equação 5), isto é, a densidade do solvente extrator e a viscosidade. No intuito de aumentar a velocidade de sedimentação, pode-se aumentar a diferença de densidade entre o extrator e a água. Essa pode ser uma justificativa dos melhores resultados obtidos com tetracloreto de carbono (Item 5.1.1), para a extração de Cd e Pb. Uma vez que este é o solvente mais denso ($d = 1,63 \text{ g cm}^{-3}$, à 20 °C)¹¹¹ entre os avaliados. Outro fator que pode aumentar a velocidade de sedimentação é a elevação da temperatura da solução. Pois, o aumento da temperatura, implica na diminuição da viscosidade da solução aquosa (μ), facilitando a coalescência e migração das gotas do extrator através da solução.

Por último, a velocidade de sedimentação está associada diretamente à separação das fases (aquosa e sedimentada). Por isso, além dos fatores supracitados, a velocidade de centrifugação (Figuras 24 e 25) é uma condição relevante para a extração por DLLME, uma vez que, é responsável por acelerar mecanicamente a velocidade de sedimentação.

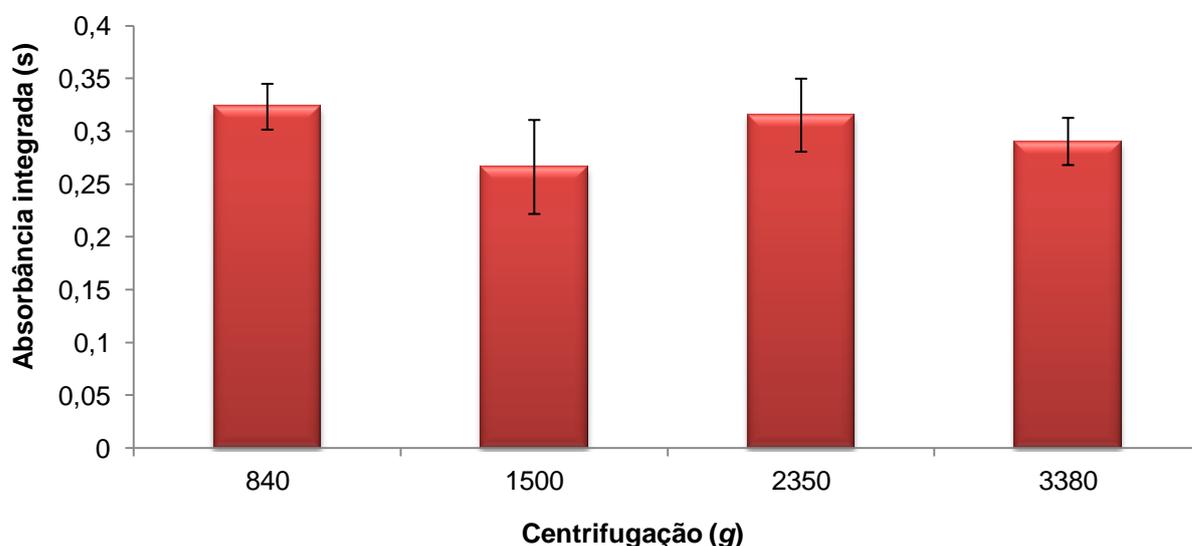


Figura 24. Avaliação da velocidade de centrifugação necessária ($t = 2 \text{ min}$) para a separação de fases na extração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd por DLLME empregando-se pós-extração e após duas lavagens dos extratos com água ($n = 5$).

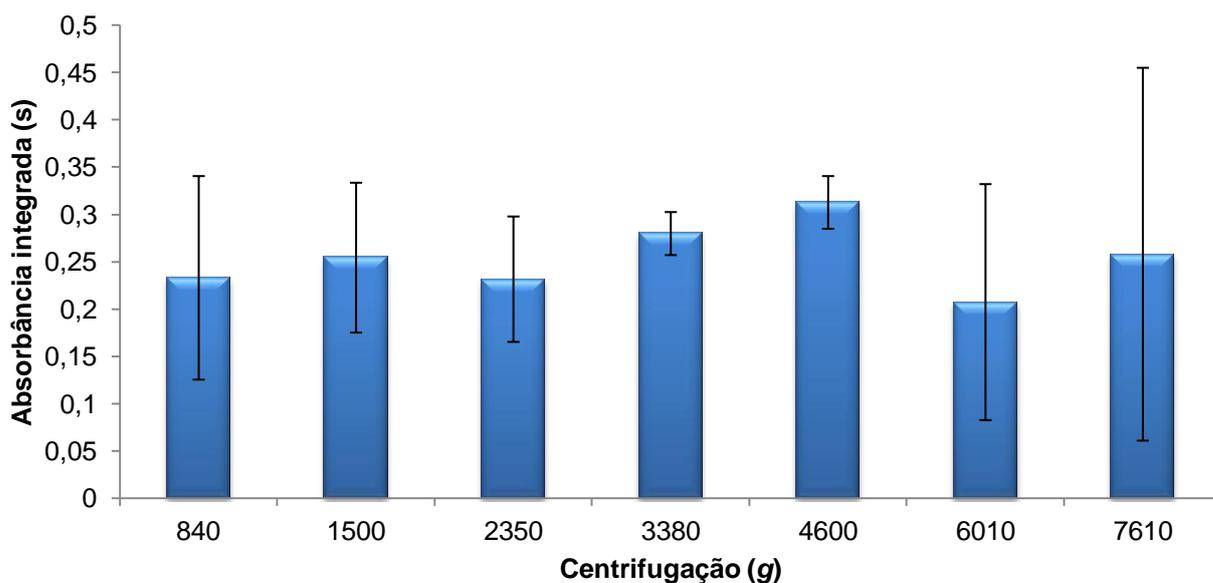


Figura 25. Avaliação da velocidade de centrifugação necessária ($t = 2\text{min}$) para a separação das fases na extração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb por DDLME empregando-se pós-extração e após duas lavagens dos extratos com água ($n = 5$).

Para a extração de Cd foi escolhida a velocidade de centrifugação de 840 g, visto que, não foi observada diferença significativa com as outras velocidades avaliadas (Teste ANOVA em intervalo de confiança superior a 95%). Apesar de não haver diferença entre os resultados, a escolha de 840 g foi em função da melhor precisão dos resultados. Quanto à velocidade de centrifugação para a extração de Pb, foi escolhido 4600 g, a qual é justificada pela obtenção de uma razão sinal/ruído superior e com bom desvio padrão.

Como pode ser observado, a velocidade de centrifugação para Pb deve ser bem maior do que para Cd, fato que pode estar associado ao maior volume de solvente dispersor que foi utilizado (900 μL de acetona). Como visto, esse volume elevado tende a causar diminuição no diâmetro das gotas do solvente extrator, contribuindo de forma negativa sobre a velocidade de sedimentação V_s (Equação 5).

5.1.9 Avaliação da concentração da solução de mel

Fixadas as demais condições de extração, foi avaliado o efeito da concentração de mel, na extração de Cd e Pb, nas soluções aquosas das amostras.

Os resultados podem ser vistos nas Figuras 26 e 27, os quais foram obtidos com soluções de mel enriquecidas com o equivalente a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e a $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb.

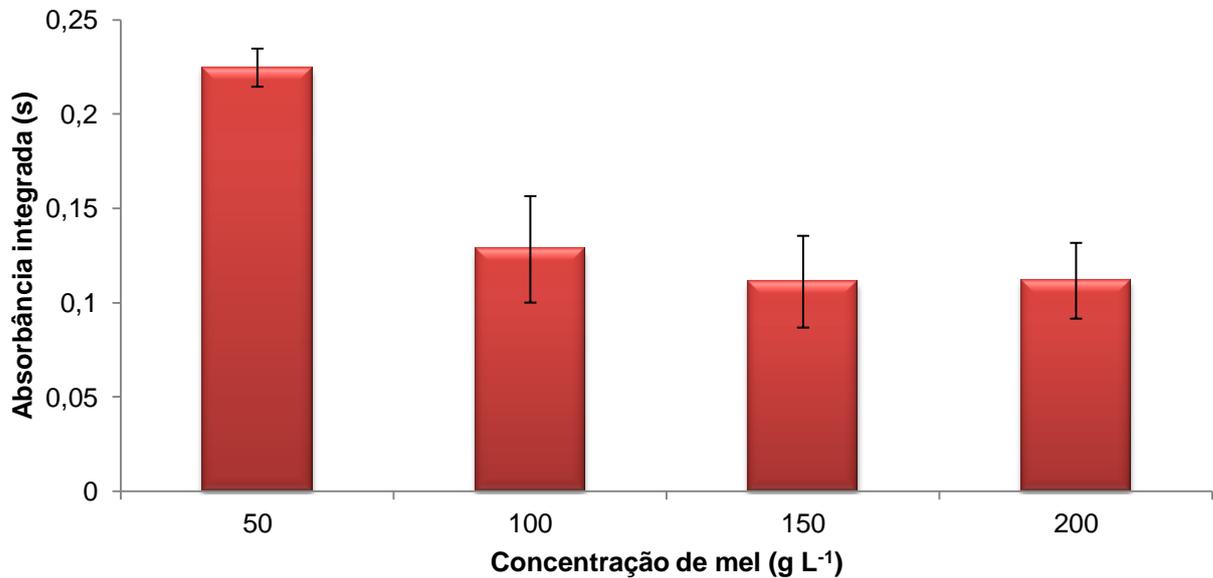


Figura 26. Efeito da concentração de mel em solução aquosa na extração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd ($n = 5$).

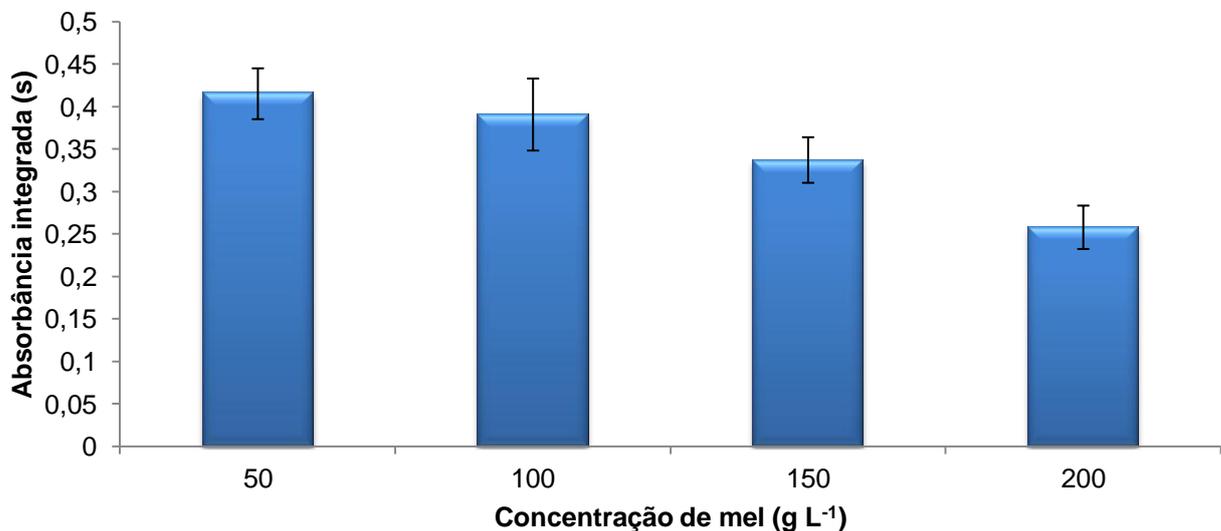


Figura 27. Efeito da concentração de mel em solução aquosa na extração de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb ($n = 5$).

Com base nos resultados das Figuras 26 e 27, foi escolhida a concentração de mel de 50g L^{-1} para a extração de Cd e Pb, tendo em vista a maior relação sinal/ruído e o menor desvio padrão obtido para ambos os elementos. Pode ser

observado que a matriz exerce um forte efeito no processo de extração, o qual é mais pronunciado para Cd. Essa diferença, pode estar associada ao fato do Cd^{2+} ser um ácido de *Lewis* menos mole que o Pb^{2+} . Isso facilita a interação do Pb com os átomos de enxofre do complexante, quando comparados aos oxigênios dos grupos hidroxila dos glicídios do mel, visto que, o oxigênio é uma base de *Lewis* mais dura do que o enxofre. Desse modo, supõe-se que os grupos OH dos glicídios oriundos dos componentes do mel, competem mais fortemente pelo Cd^{2+} com o complexante, do que pelo Pb^{2+} . Conseqüentemente, a extração do Cd pode ser mais afetada pela matriz.¹¹²⁻¹¹³

Apesar da possibilidade de contornar o efeito de matriz da amostra na determinação de Cd, massas inferiores a 50 g L^{-1} de mel não foram avaliadas em função das concentrações de Cd e Pb serem geralmente muito baixas (inferiores a 500 ng g^{-1}). Ou seja, diluindo mais a amostra o LOQ do método será piorado.

5.1.10 Resumo das condições escolhidas para a extração de Cd e Pb de mel por DLLME

As condições escolhidas para a extração de Cd e Pb por DLLME e determinação por F AAS, estão resumidas na Tabela 7.

Tabela 7. Condições escolhidas para a extração de Cd e Pb pelo método DLLME.

Parâmetros	Analitos	
	Cd	Pb
Tipo de solvente dispersor	Acetonitrila	Acetona
Tipo de solvente extrator	Tetracloroeto de carbono	Tetracloroeto de carbono
Volume de solvente dispersor	300 μL	900 μL
Volume de solvente extrator	140 μL	140 μL
Concentração de NaDDTC	0,25 g L^{-1}	0,50 g L^{-1}
pH da solução da amostra	7	7
Temperatura de extração	35 °C	35 °C
Velocidade de centrifugação	840 g	4600 g
Concentração da solução de mel	50 g L^{-1}	50 g L^{-1}

5.2 DETERMINAÇÃO DE Cd E Pb POR F AAS

Neste trabalho, buscou-se propor um método de determinação de Cd e Pb que seja rápido, barato e robusto, visando atender a legislação vigente no Brasil, para os limites máximos permitidos desses elementos em mel. Neste sentido, a F AAS é uma alternativa interessante e que satisfaz estas premissas, uma vez que, o equipamento é acessível a muitos laboratórios de análise de rotina, além de ser frequentemente citado para determinação de Cd e Pb.^{91,114} Portanto, a associação DLLME-F AAS pode ser uma importante ferramenta para determinação de Cd e Pb para análises de rotina em mel. Na literatura, são relatados trabalhos que envolvem esse acoplamento para a determinação de Cd e Pb.^{16-18,21} Porém, este é o primeiro trabalho, que faz uso de DLLME-F AAS, para a determinação destes elementos em mel.

5.2.1 Cálculo do fator de pré-concentração

Em função das baixas concentrações de Cd e Pb esperadas para a amostra, o fator de pré-concentração (*PF*) foi determinado pela razão entre a intensidade dos sinais de absorbância integrada (Figura 28) da fase sedimentada obtida pela DLLME, dividida pelo sinal obtido para solução aquosa medida antes da DLLME, utilizando-se soluções fortificadas com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e $80 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb.

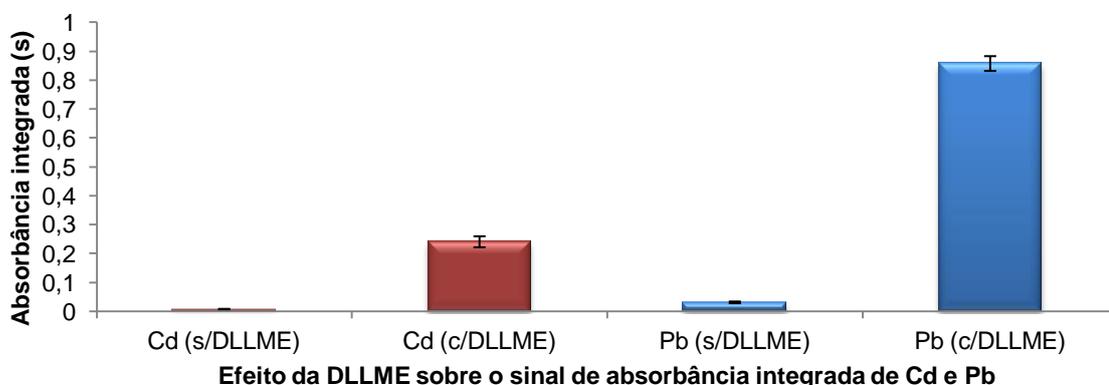


Figura 28. Comparação entre a intensidade dos sinais com e sem aplicação de DLLME em soluções aquosas contendo 50 g L^{-1} de mel fortificadas com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e $80 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb.

Tomando como base a razão entre as médias das absorvâncias integradas (com DLLME/sem DLLME), foram obtidos os fatores de pré-concentração de 40 e 28, para Cd e Pb, respectivamente.

Em alguns estudos relacionados à aplicação da DLLME para a extração de Cd em água, foram obtidos valores de *PF* de até 125,^{68,70} fazendo uso do tetracloreto de carbono como solvente extrator. Enquanto que, com o mesmo método, os valores de *PF* de 78 a 450 foram obtidos para a extração de Pb,^{16,65,69} usando o mesmo solvente. Porém, convém ressaltar que, em todos os estudos mencionados, os métodos foram aplicados para água, que, certamente, possui efeitos de matriz consideravelmente menores que as soluções de mel (Vide – item 2.1).

5.2.2 Curvas de calibração

Neste estudo foram avaliadas duas formas de calibração para Cd (Figura 29) e para Pb (Figura 30). As curvas de calibração foram elaboradas sob as mesmas condições de tratamento das amostras, sendo aplicada a DLLME nas soluções de referência, preparadas com água, com concentrações de 0,5 a 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e de 20 a 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb. Além disso, para a avaliação de possíveis efeitos de matriz, foi aplicada a DLLME para a extração de Cd e Pb a partir de soluções aquosas de mel a 50 g L^{-1} (curva de adição de padrão), nas mesmas concentrações empregadas para a curva aquosa.

A faixa linear de calibração foi avaliada em função da dispersão dos valores de absorvância integrada em relação à concentração do analito (Teste de análise de tendência e linearidade).

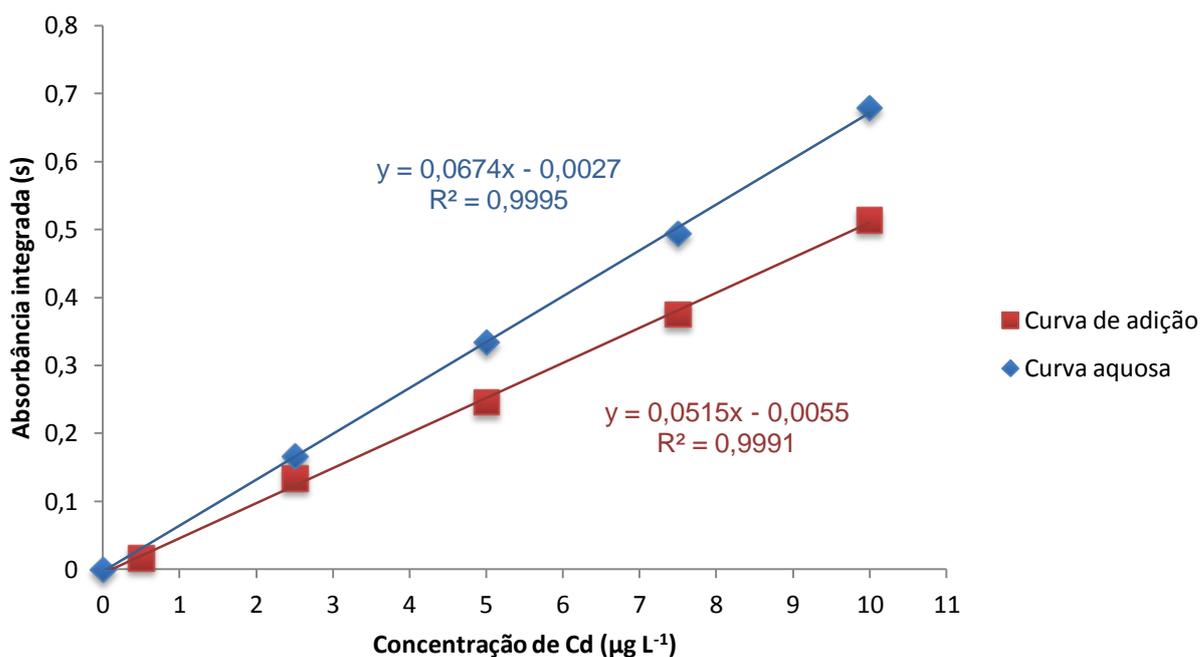


Figura 29. Curvas de calibração para Cd envolvendo o método DLLME-F AAS.

Para a determinação de Cd, pelo método DLLME-F AAS, observou-se diferença significativa entre as inclinações das curvas das curvas de calibração (superior a 20%), isto é, diferença de sensibilidade para Cd na curva preparada em água (curva aquosa) e na curva na presença da matriz (curva de adição de padrão). Isso evidencia interferência da matriz sobre o Cd no método proposto. Essa interferência pode estar associada a uma menor população de átomos do Cd na chama.⁹¹ A razão para isso pode estar associada à interação do Cd com espécies inorgânicas e/ou orgânicas, com elevada solubilidade em água e que podem não ter sido extraídas, contidas no mel conforme discutido no item 5.1.9. Dessa maneira, essas espécies competem fortemente com o NaDDTC, impedindo a complexação do Cd presente na solução. Outra possibilidade, pode ser devida à adsorção do Cd com as paredes do tubo de vidro que também pode impedir a complexação desse metal e sua consequente extração.¹⁰⁸

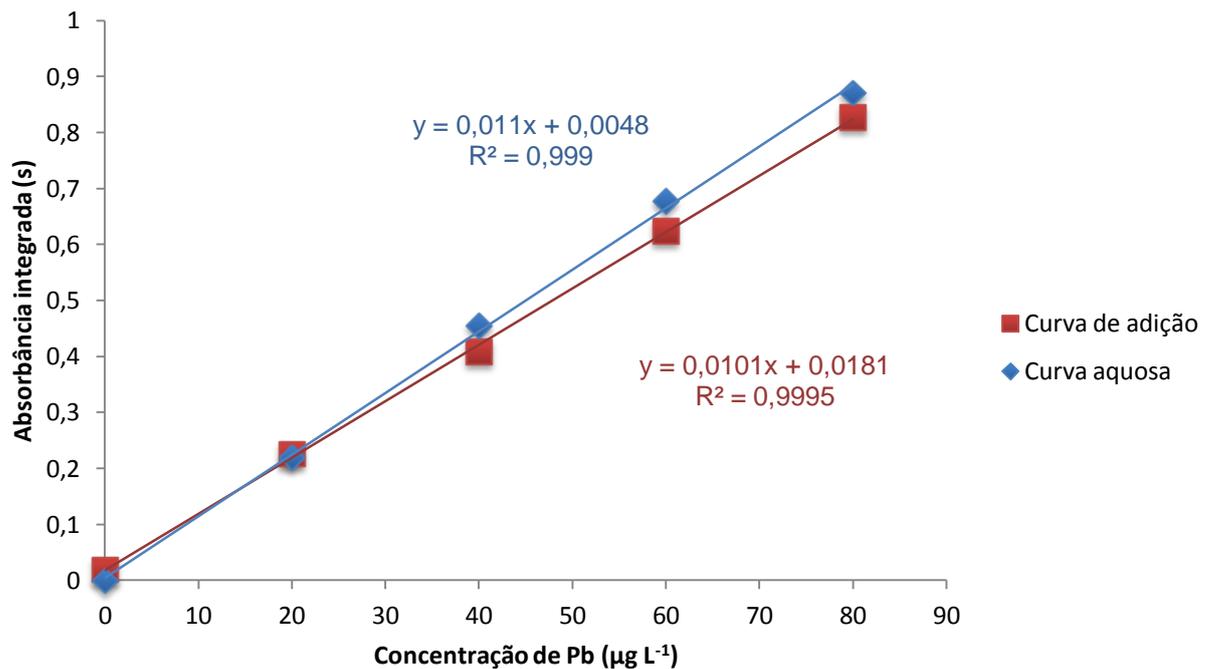


Figura 30. Curvas de calibração para Pb envolvendo o método DLLME-F AAS.

Para a determinação de Pb pelo método DLLME-F AAS, não foi observado diferença significativa entre as inclinações (sensibilidades do Pb) na curva aquosa e de na curva de adição de padrão (Figura 30), obtendo-se concordância entre os coeficientes angulares superior a 90%. Dessa forma, presume-se que não há interferências significativas da matriz na determinação de Pb. Isso, viabiliza o uso de curva de calibração preparada em água para a determinação de Pb em mel.

Na Tabela 8, estão resumidas algumas das características analíticas do método DLLME-F AAS para a determinação de Cd e Pb em mel.

Tabela 8. Características analíticas para Cd e Pb pelo método DLLME-F AAS.

Parâmetros	Analitos	
	Cd	Pb
Limite de detecção (3σ)	18 ng g ⁻¹	135 ng g ⁻¹
Limite de quantificação (10σ)	61 ng g ⁻¹	449 ng g ⁻¹
Coefficiente de determinação (R^2)	0,999	0,999
Faixa linear	3,0-10,0 µg L ⁻¹	22-80 µg L ⁻¹
Precisão (RSD)	4-8%	4-10%

5.2.3 Ensaios de recuperação de Cd e Pb pelo método proposto

Além das curvas de adição de padrão, para a avaliação de possíveis interferências nos métodos propostos, foram executados ensaios de recuperação de Cd e Pb (Tabela 9). Os testes foram feitos adicionando-se Cd e Pb para que fossem obtidas concentrações equivalentes a 5 µg L⁻¹ (100 ng g⁻¹) e a 20 µg L⁻¹ (400 ng g⁻¹), respectivamente, nas soluções aquosas de três amostras (A, B e C).

Tabela 9. Ensaio de recuperação para Cd e Pb em mel (solução 50 g L⁻¹) com o método DLLME-F AAS, com base nas curvas de calibração preparadas em água.

Amostra	Cd			Pb		
	Adicionado (ng g ⁻¹)	Obtido (ng g ⁻¹)	Recuperação (%)	Adicionado (ng g ⁻¹)	Obtido (ng g ⁻¹)	Recuperação (%)
Mel A	0	< LOD	-	0	< LOD	-
	99	79 ± 18	80	400	397 ± 46	99
Mel B	0	< LOD	-	0	< LOD	-
	97	86 ± 25	89	386	399 ± 28	103
Mel C	0	< LOD	-	0	< LOD	-
	98	60 ± 21	61	396	413 ± 30	104

É possível observar a partir dos dados da Tabela 9 valores satisfatórios de recuperação de Pb, com resultados concordantes ao efeito observado na avaliação das curvas de calibração (Figura 30). Da mesma forma, os resultados baixos de recuperação de Cd, também são concordantes com o observado na comparação das curvas de calibração (Figura 29), demonstrando a interferência da matriz sobre a determinação deste elemento.

De acordo com estes resultados, pode-se concluir que o método DLLME-F AAS para a determinação de Cd em mel, requer o emprego da curva de adição de padrão. Enquanto que é possível a determinação de Pb através de curva de calibração preparada em água.

5.3 COMPARAÇÃO DE RESULTADOS COM OUTRO MÉTODO

Os resultados obtidos através do método DLLME-F AAS, foram comparados com os resultados obtidos por MAD ICP-MS, cujos procedimentos foram adaptados de Tuzen *et al.*⁴

5.3.1 Determinação de Cd e Pb por ICP-MS após decomposição de mel por MAWD

As amostras de mel foram decompostas por MAD, conforme descrito no item 4.6.1, e Cd e Pb foram determinados por ICP-MS.

Os limites de detecção e quantificação obtidos por MAD ICP-MS, para Cd, foram de 9,9 e 33 ng g⁻¹, respectivamente. Enquanto, para Pb esses valores foram, respectivamente, 62 e 206 ng g⁻¹.

Tabela 10. Quantificação e ensaios de recuperação para Cd e Pb por MAD ICP-MS em mel.

Amostra	Cd			Pb		
	Adicionado (ng g ⁻¹)	Obtido (ng g ⁻¹)	Recuperação (%)	Adicionado (ng g ⁻¹)	Obtido (ng g ⁻¹)	Recuperação (%)
Mel A	0	< LOQ	-	0	< LOQ	-
	247	256 ± 17	104	1484	1564 ± 39	105
Mel B	0	< LOQ	-	0	< LOQ	-
	235	260 ± 6,3	111	1407	1614 ± 65	115
Mel C	0	< LOQ	-	0	< LOQ	-
	250	262 ± 21	105	1498	1594 ± 133	106

Tal como em estudos similares,^{2,9-13} empregando MAWD seguido de determinação através de ICP-MS, os níveis de Cd e Pb, nas amostras de mel, são muito baixos.

Destaca-se que com o método DLLME-F AAS é possível alcançar LODs e LOQs para Cd e Pb comparáveis aos níveis obtidos através da determinação por ICP-MS, a qual é uma técnica mais sensível (cerca 100 a 1000 vezes comparada a F AAS). Com estes limites, é possível que o método proposto seja usado em análise de rotina, pois, atende aos valores da legislação brasileira vigente.⁷ Salienta-se também, que apesar de serem necessários 6 minutos para cada extração (incluindo lavagens), o método é prático e de fácil operação, podendo serem feitos diversos ensaios simultâneos, além de permitir a operação em sistema mecanizado. Outro aspecto relevante, consiste no uso de um equipamento de determinação com custo relativamente baixo e mais acessível a laboratórios de análise química, quando comparado a um equipamento de ICP-MS.

6 CONCLUSÕES

O método DLLME-F AAS desenvolvido para a determinação de Cd e Pb em mel é simples, rápido e os resultados são precisos e exatos. Os LODs (18 ng g⁻¹ para Cd e 135 ng g⁻¹ para Pb) e os LOQs (61 ng g⁻¹ para Cd e 449 ng g⁻¹ para Pb) são comparáveis aos obtidos por ICP-MS após decomposição da amostra por MAWD, sendo que o método proposto apresenta um ganho de tempo substancial por não envolver decomposição da amostra que, neste trabalho, requer em torno de 13 horas, considerando as etapas de repouso do mel na presença do ácido e o programa de aquecimento.

É importante salientar que, embora a DLLME requer o uso de solventes organoclorados, o volume empregado é considerado muito baixo, podendo-se considerar o método ambientalmente favorável.

Os LOQs obtidos com a DLLME e F AAS, para a determinação de Cd e Pb, são inferiores a 500 ng g⁻¹ de mel, concentração máxima estabelecida pelo MAPA.

As recuperações foram satisfatórias para Pb, variando de 99 a 104%. O que evidencia a possível ausência de efeitos de matriz, fato que pôde ser comprovado através da concordância, superior a 90%, obtida entre os coeficientes angulares das curvas de calibração em água e na presença de mel (50 g L⁻¹). Na determinação de Cd, no entanto, as recuperações foram relativamente baixas, entre 61 e 89%. Isso evidencia o efeito de matriz sobre a extração desse elemento. Dessa forma, foi necessário o uso da calibração por adição de padrão.

Destaca-se, também, que o método DLLME-F AAS, empregado para a determinação de Cd e Pb em mel, é acessível à laboratórios de análise de rotina, visto que, é fácil de ser implementado, requer pouca quantidade de reagentes, principalmente solventes orgânicos, e a técnica de determinação é de uso comum em laboratórios de análises químicas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Camargo, R. C. R., Pereira, F. M., Lopes, M. T. R., Wolff, L. F., Mel: Características e Propriedades, 1ª ed., Embrapa, Teresina, 2006, 30p.
2. Pisani, A., Protano, G., Riccobono, F., Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy), *Food Chemistry* 107 (2008) 1553-1560.
3. Pohl, P., Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009) 117-128.
4. Tuzen, M., Silici, S., Mendil, D., Soylak, M., Trace element levels in honeys from different regions of Turkey, *Food Chemistry* 103 (2007) 325-330.
5. Larini, L., Toxicologia, 1ª ed., Manole LTDA, São Paulo-SP, 1987, pp. 135-143.
6. Organization, W. H., Food consumption and exposure assessment of chemicals, WHO, Geneva, 1997, 78p.
7. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa N° 17, 2013, 15p.
8. Pohl, P., Stecka, H., Sergiel, I., Jamroz, P., Different Aspects of the Elemental Analysis of Honey by Flame Atomic Absorption and Emission Spectrometry: A Review, *Food Analytical Methods* 5 (2012) 737-751.
9. Chudzinska, M., Baralkiewicz, D., Application of ICP-MS method of determination of 15 elements in honey with chemometric approach for the verification of their authenticity, *Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 2741-2749.
10. Chudzinska, M., Debska, A., Baralkiewicz, D., Method validation for determination of 13 elements in honey samples by ICP-MS, *Accreditation and Quality Assurance* 17 (2012) 65-73.
11. Madejczyk, M., Baralkiewicz, D., Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES, *Analytica Chimica Acta* 617 (2008) 11-17.
12. Batista, B. L., da Silva, L. R. S., Rocha, B. A., Rodrigues, J. L., Berretta-Silva, A. A., Bonates, T. O., Gomes, V. S. D., Barbosa, R. M., Barbosa, F., Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and estimation of geographic origin with data mining techniques, *Food Research International* 49 (2012) 209-215.

13. Chen, H., Fan, C., Wang, Z., Chang, Q., Pang, G., Uncertainties estimation for determination of 10 elements in Northeastern China black bee honey by ICP-MS, *Analytical Methods* 5 (2013) 3291-3298.
14. Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseinia, M.-R. M., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S., Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography A* 1116 (2006) 1-9.
15. Rezaee, M., Yamini, Y., Faraji, M., Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2342-2357.
16. Naseyia, M. T., Hemmatkhan, P., Hosseini, M. R. M., Assadi, Y., Combination of dispersive liquid-liquid microextraction with flame atomic absorption spectrometry using microsample introduction for determination of lead in water samples, *Analytica Chimica Acta* 610 (2008) 135-141.
17. Anthemidis, A. N., Ioannou, K.-I. 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 (2009) 86-91.
18. Yousefi, S. R., Shemirani, F., Development of a robust ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction against high concentration of salt for preconcentration of trace metals in saline aqueous samples: Application to the determination of Pb and Cd, *Analytica Chimica Acta* 669 (2010) 25-31.
19. Soylak, M., Yilmaz, E., Ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction of lead as pyrrolidinedithiocarbamate chelate prior to its flame atomic absorption spectrometric determination, *Desalination* 275 (2011) 297-301.
20. Jafarvand, S., Shemirani, F., Supramolecular-based dispersive liquid-liquid microextraction: A novel sample preparation technique utilizes coacervates and reverse micelles, *Journal of Separation Science* 34 (2011) 455-461.
21. Sanchez Rojas, F., Bosch Ojeda, C., Cano Pavon, J. M., Dispersive liquid-liquid microextraction combined with flame atomic absorption spectrometry for determination of cadmium in environmental, water and food samples, *Analytical Methods* 3 (2011) 1652-1655.
22. Mohamadi, M., Mostafavi, A., Flame Atomic Absorption Determination of Trace Amounts of Cadmium After Preconcentration Using a Thiol-Containing Task-Specific Ionic Liquid, *Journal of AOAC International* 94 (2011) 959-967.
23. Zhang, J.-W., Wang, Y.-K., Du, H.-Y., Du, X., Ma, J.-J., Li, J.-C., Development of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop for the Determination of Trace Lead in Water, *Clean-Soil Air Water* 39 (2011) 1095-1098.

24. Karim-Nezhad, G., Ahmadi, M., Zare-Dizajdizi, B., Background Corrected Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Cadmium Combined with Flame Atomic Absorption Spectrometry, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 22 (2011) 1816-1822.
25. Shah, F., Kazi, T. G., Naeemullah, Afridi, H. I., Soylak, M., Temperature controlled ionic liquid-dispersive liquid phase microextraction for determination of trace lead level in blood samples prior to analysis by flame atomic absorption spectrometry with multivariate optimization, *Microchemical Journal* 101 (2012) 5-10.
26. Mohammadi, S. Z., Baghelani, Y. M., Mansori, F., Shamspur, T., Afzali, D., Dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous separation of trace amounts of zinc and cadmium ions in water samples prior to flame atomic absorption spectrometry determination, *Quimica Nova* 35 (2012) 198-202.
27. Soylak, M., Unsal, Y. E., Dispersive liquid-liquid microextraction of cadmium(II) for preconcentration prior to flame atomic absorption spectrometric detection in water, *Toxicological and Environmental Chemistry* 94 (2012) 1480-1489.
28. Rajabi, M., Kamalabadi, M., Jamali, M. R., Zolgharnein, J., Asanjarani, N., Application of response surface methodology for optimization of ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction of cadmium from water samples, *Human & Experimental Toxicology* 32 (2013) 620-631.
29. Mohammadi, S. Z., Shamspur, T., Baghelani, Y. M., Combination of flame atomic absorption spectrometry with ligandless-dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration and determination of trace amount of lead in water samples, *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* 27 (2013) 161-168.
30. Li, Z., Yu, G., Song, J., Wang, Q., Liu, M., Yang, Y., Study on the determination of heavy metals in water samples with ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction prior to FAAS, *Water Science and Technology* 67 (2013) 247-253.
31. Wiese, H., Nova apicultura, Agropecuaria, 1986, 450p.
32. United States Department of Agriculture (USDA), Agriculture Handbook Number 335 - Beekeeping in the United States, 1980, 203p.
33. Codex General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed, Codex Stan 193^a ed., 1995, 39p.
34. Krug, F. J., *et.al.*, Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, F. J. Krug, 2008, 340p.
35. Anderson, R., Sample pretreatment and separation, Wiley India Pvt. Limited, 2008, 668p.
36. Knapp, G., Decomposition methods in elemental trace analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 3 (1984) 182-185.

37. Collins, C. H., Braga, G., Bonato, P. S., Fundamentos de cromatografia, Editora Unicamp, 2006, 453p.
38. Queiroz, S. C. N., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica, *Quimica Nova* 24 (2001) 68-76.
39. Liu, H. H., Dasgupta, P. K., Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 1817-1821.
40. Psillakis, E., Kalogerakis, N., Developments in liquid-phase microextraction, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22 (2003) 565-574.
41. Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A., Liquid-phase microextraction, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29 (2010) 1-14.
42. Liang, P., Li, J., Yang, X., Cloud point extraction preconcentration of trace cadmium as 1-phenyl-3-methyl-4-benzoyl-5-pyrazolone complex and determination by flame atomic absorption spectrometry, *Microchimica Acta* 152 (2005) 47-51.
43. Suvadhan, K., Kumar, K. S., Rekha, D., Subrahmanyam, P., Kiran, K., Jayaraj, B., Ramanaiah, S., Janardhanam, K., Chiranjeevi, P., Determination of rhodium in water samples using cloud point extraction (CPE) coupled with flame atomic absorption spectrometry (FAAS), *Microchimica Acta* 157 (2007) 237-244.
44. Somera, B. F., Oliveira, F. M., Barreto, W. J., Barreto, S. R. G., Tarley, C. R. T., Cloud point extraction/preconcentration of copper ions exploiting the formation of complexes with dmit 4,5-dimercapto-1,3-dithiol-2-thionate, *Quimica Nova* 35 (2012) 1600-1605.
45. Orlando, R. M., Biological samples cleanup during analytical method development, *Vita et Sanitas* 3 (2009) 18p.
46. Caldas, S. S., Goncalves, F. F., Primel, E. G., Prestes, O. D., Martins, M. L., Zanella, R., Modern techniques of sample preparation for pesticide residues determination in water by liquid chromatography with detection by diode array and mass spectrometry, *Quimica Nova* 34 (2011) 1604-1617.
47. Yan, H., Wang, H., Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography A* 1295 (2013) 1-15.
48. Zgola-Grzeskowiak, A., Grzeskowiak, T., Dispersive liquid-liquid microextraction, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 30 (2011) 1382-1399.
49. Kokosa, J. M., Advances in solvent-microextraction techniques, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 43 (2013) 2-13.
50. Kocurova, L., Balogh, I. S., Sandrejova, J., Andruch, V., Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review, *Microchemical Journal* 102 (2012) 11-17.

51. Xu, X., Su, R., Zhao, X., Liu, Z., Zhang, Y., Li, D., Li, X., Zhang, H., Wang, Z., Ionic liquid-based microwave-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization of sulfonamides in river water, honey, milk, and animal plasma, *Analytica Chimica Acta* 707 (2011) 92-99.
52. Zhang, J., Gao, H., Peng, B., Li, S., Zhou, Z., Comparison of the performance of conventional, temperature-controlled, and ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography in analyzing pyrethroid pesticides in honey samples, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 6621-6629.
53. Ranjbari, E., Biparva, P., Hadjmohammadi, M. R., Utilization of inverted dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV as a sensitive and efficient method for the extraction and determination of quercetin in honey and biological samples, *Talanta* 89 (2012) 117-123.
54. Chen, H., Ying, J., Chen, H., Huang, J., Liao, L., LC determination of chloramphenicol in honey using dispersive liquid-liquid microextraction, *Chromatographia* 68 (2008) 629-634.
55. Chen, H., Chen, H., Ying, J., Huang, J., Liao, L., Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey, *Analytica Chimica Acta* 632 (2009) 80-85.
56. Chen, H., Chen, H., Liao, L., Ying, J., Huang, J., Determination of Thiamphenicol in Honey by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction with High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatographic Science* 48 (2010) 450-455.
57. Tomasini, D., Sampaio, M. R. F., Cardoso, L. V., Caldas, S. S., Primel, E. G., Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and the modified QuEChERS method for the determination of fipronil in honey by high performance liquid chromatography with diode-array detection, *Analytical Methods* 3 (2011) 1893-1900.
58. Zacharis, C. K., Rotsias, I., Zachariadis, P. G., Zotos, A., Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organochlorine pesticides residues in honey by gas chromatography-electron capture and ion trap mass spectrometric detection, *Food Chemistry* 134 (2012) 1665-1672.
59. Vinas, P., Lopez-Garcia, I., Bravo-Bravo, M., Briceno, M., Hernandez-Cordoba, M., Dispersive liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography for thiamine determination in foods, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (2012) 1059-1066.
60. Campillo, N., Vinas, P., Ferez-Melgarejo, G., Hernandez-Cordoba, M., Liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry for the determination of neonicotinoid insecticides in honey samples using dispersive liquid-

- liquid microextraction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (2013) 4799-4805.
61. Jovanov, P., Guzsanyi, V., Franko, M., Lazic, S., Sakac, M., Saric, B., Banjac, V., Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey using optimized dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* 111 (2013) 125-133.
62. Wang, Y., You, J., Ren, R., Xiao, Y., Gao, S., Zhang, H., Yu, A., Determination of triazines in honey by dispersive liquid-liquid microextraction high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 4241-4246.
63. Wen, Y., Li, J., Zhang, W., Chen, L., Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with capillary electrophoresis for simultaneous determination of sulfonamides with the aid of experimental design, *Electrophoresis* 32 (2011) 2131-2138.
64. Kujawski, M. W., Pinteaux, E., Namiesnik, J., Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of selected organochlorine pesticides in honey by gas chromatography-mass spectrometry, *European Food Research and Technology* 234 (2012) 223-230.
65. Liang, P., Sang, H., Determination of trace lead in biological and water samples with dispersive liquid-liquid microextraction preconcentration, *Analytical Biochemistry* 380 (2008) 21-25.
66. 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 (2011) 249-254.
67. Zhang, C., Wang, Y., Cheng, X., Xia, H., Liang, P., Determination of cadmium and lead in human teeth samples using dispersive liquid-liquid microextraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Journal of the Chinese Chemical Society* 58 (2011) 919-924.
68. 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 (2007) 305-311.
69. Naseri, M. T., Hosseini, M. R. M., Assadi, Y., Kiani, A., Rapid determination of lead in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 75 (2008) 56-62.
70. Moghimi, A., Preconcentration ultra trace of Cd(II) in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction with Salen(N,N '-bis(salicylidene)-ethylenediamine) and determination graphite furnace atomic absorption Spectrometry, *Journal of the Chinese Chemical Society* 55 (2008) 369-376.

71. Li, S., Cai, S., Hu, W., Chen, H., Liu, H., Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for a sensitive determination of cadmium in water samples, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 64 (2009) 666-671.
72. Rivas, R. E., Lopez-Garcia, I., Hernandez-Cordoba, M., Determination of traces of lead and cadmium using dispersive liquid-liquid microextraction followed by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Microchimica Acta* 166 (2009) 355-361.
73. Anthemidis, A. N., Ioannou, K.-I. G., Development of a sequential injection dispersive liquid-liquid microextraction system for electrothermal atomic absorption spectrometry by using a hydrophobic sorbent material: Determination of lead and cadmium in natural waters, *Analytica Chimica Acta* 668 (2010) 35-40.
74. Shokoufi, N., Hamdamali, A., Laser induced-thermal lens spectrometry in combination with dispersive liquid-liquid microextraction for trace analysis, *Analytica Chimica Acta* 681 (2010) 56-62.
75. Jia, X., Han, Y., Liu, X., Duan, T., Chen, H., Dispersive liquid-liquid microextraction combined with flow injection inductively coupled plasma mass spectrometry for simultaneous determination of cadmium, lead and bismuth in water samples, *Microchimica Acta* 171 (2010) 49-56.
76. Mirzaei, M., Behzadi, M., Abadi, N. M., Beizaei, A., Simultaneous separation/preconcentration of ultra trace heavy metals in industrial wastewaters by dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop prior to determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Journal of Hazardous Materials* 186 (2011) 1739-1743.
77. Zhou, Q., Zhao, N., Xie, G., Determination of lead in environmental waters with dispersive liquid-liquid microextraction prior to atomic fluorescence spectrometry, *Journal of Hazardous Materials* 189 (2011) 48-53.
78. Salahinejad, M., Aflaki, F., Optimization and determination of Cd (II) in different environmental water samples with dispersive liquid-liquid microextraction preconcentration combined with inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Environmental Monitoring and Assessment* 177 (2011) 115-125.
79. Sitko, R., Kocot, K., Zawisza, B., Feist, B., Pytlakowska, K., Liquid-phase microextraction as an attractive tool for multielement trace analysis in combination with X-ray fluorescence spectrometry: an example of simultaneous determination of Fe, Co, Zn, Ga, Se and Pb in water samples, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26 (2011) 1979-1985.

80. Liu, Y. L., Wu, X. Y., Xiang, G. Q., He, L. J., Jiang, X. M., Zhang, H. X., Chen, F. P., Dispersive liquid-liquid microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for determination of trace lead in drinking water samples, *Asian Journal of Chemistry* 23 (2011) 4049-4052.
81. Zhou, Q., Zhao, N., Xiao, J., Preconcentration and sensitive methodology for the determination of cadmium in environmental waters using dispersive liquid-liquid microextraction prior to analysis by atomic fluorescence spectrometry, *Atomic Spectroscopy* 32 (2011) 62-67.
82. Moghimi, A., Poursharifi, M. J., Preconcentration and determination of ultratrace of Cd(II) in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction with N-Benzoyl-N-phenylhydroxylamine, *Asian Journal of Chemistry* 23 (2011) 1429-1434.
83. 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-Atomic Spectroscopy* 73 (2012) 79-83.
84. Silva, E. d. S., Correia, L. O., dos Santos, L. O., dos Santos Vieira, E. V., Lemos, V. A., Dispersive liquid-liquid microextraction for simultaneous determination of cadmium, cobalt, lead and nickel in water samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Microchimica Acta* 178 (2012) 269-275.
85. Kocurova, L., Balogh, I. S., Andruch, V., Dispersive liquid-phase microextraction procedure for spectrometric determination of cadmium, *Microchemical Journal* 107 (2013) 3-9.
86. Lopez-Garcia, I., Vicente-Martinez, Y., Hernandez-Cordoba, M., Determination of lead and cadmium using an ionic liquid and dispersive liquid-liquid microextraction followed by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 110 (2013) 46-52.
87. Margui, E., Queralt, I., Hidalgo, M., Determination of cadmium at ultratrace levels in environmental water samples by means of total reflection X-ray spectrometry after dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28 (2013) 266-273.
88. Afzali, D., Mohadesi, A. R., Falahnejad, M., Bahadori, B., Ultrasound-assisted ion-pair dispersive liquid-liquid microextraction of trace amounts of lead in water samples prior to graphite furnace atomic absorption spectrometry determination, *Journal of AOAC International* 96 (2013) 161-165.
89. Skoog, D. A., Crouch, S. R., Fundamentals of Analytical Chemistry, Brooks/Cole Cengage Learning, 2014, 1072p.

90. Harris, D. C., Quantitative Chemical Analysis, 6ª Ed., W. H. Freeman, 2003, 744p.
91. Welz, B., Sperling, M., Resano, M., Atomic Absorption Spectrometry, Wiley, 2008, 965p.
92. Mesko, M. F., Hartwig, C. A., Bizzi, C. A., Pereira, J. S. F., Mello, P. A., Flores, E. M. M., Sample preparation strategies for bioinorganic analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry* 307 (2011) 123-136.
93. Herbert, C. G., Johnstone, R. A. W., Mass Spectrometry Basics, Taylor & Francis, 2010, 474p.
94. Becker, S., Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications, Wiley, 2008, 514p.
95. Bizzi, C. A., Paniz, J. N. G., Rodrigues, L. F., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Solid sampling coupled to flame furnace atomic absorption spectrometry for Mn and Ni determination in petroleum coke, *Microchemical Journal* 96 (2010) 64-70.
96. Moron, C., Zacarias, I., Pablo, S., Produccion y manejo de datos de composicion quimica de alimentos en nutricion, FAO. Direccion de Alimentacion y Nutricion, 1997, 356p.
97. Kubova, J., Hanakova, V., Medved, J., Stresko, J., Determination of lead and cadmium in human hair by atomic absorption spectrometric procedures after solid phase extraction, *Analytica Chimica Acta* 337 (1997) 329-334.
98. Namiesnik, J., Rabajczyk, A., Land Development and Forms of Heavy Metals Occurrence (Zn, Cd, Pb) in Polish Rivers, *Polish Journal of Environmental Studies* 20 (2011) 141-155.
99. Andreu, V., Garcia, E. G., Total content and extractable fraction of cadmium, cobalt, copper, nickel, lead, and zinc in calcareous orchard soils, *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 27 (1996) 2633-2648.
100. Becker, J. S., Trace and ultratrace analysis in liquids by atomic spectrometry, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 243-254.
101. Montaser, A., Golightly, D. W., Inductively coupled plasmas in analytical atomic spectrometry, VCH Publishers, 1987, 1040p.
102. Ru, Q.-M., Feng, Q., He, J.-Z., Risk assessment of heavy metals in honey consumed in Zhejiang province, southeastern China, *Food and Chemical Toxicology* 53 (2013) 256-262.
103. Yucel, Y., Sultanoglu, P., Determination of industrial pollution effects on citrus honeys with chemometric approach, *Food Chemistry* 135 (2012) 170-178.
104. Honorio, G. G., Azevedo, G. C., Matos, M. A. C., Oliveira, M. A. L., Matos, R. C., Use of boron-doped diamond electrode pre-treated cathodically for the determination of

- trace metals in honey by differential pulse voltammetry, *Food Control* 36 (2014) 42-48.
105. Mendil, D., Determination of Cd (II), Cu (II), and Pb (II) in Some Foods by FAAS after Preconcentration on Modified Silica Gels with Thiourea, *Journal of Food Science* 77 (2012) T181-T186.
106. Attwood, D., Florence, A. T., Princípios Físico-Químicos em Farmácia, LMC - PHARMABOOKS, 690p.
107. Ferreira, I. P., Elucidação estrutural, espectroscópica e perfil farmacológico de novos complexos de ditiocarbamatos derivados de organoestênicos, de outros metais representativos e de alguns cátions de metais de transição, Dissertação, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013, 217p.
108. Struempfer, A. W., Adsorption characteristics of silver, lead, cadmium, zinc, and nickel on borosilicate glass, polyethylene, and polypropylene container surfaces, *Analytical Chemistry* 45 (1973) 2251-2254.
109. Vogel, A. I., Química Analítica Qualitativa, Ed. Mestre Jou, 1981, 665p.
110. Costa, E. C., Mecânica dos fluidos: lei de Stokes, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 1973, 11p.
111. Atkins, P. W., Físico-Química: Fundamentos, Livros Técnicos e Científicos, 2003, 476p.
112. Lee, J. D., Química Inorgânica não tão Concisa, Ed. Edgard Blucher, 1999, 527p.
113. Sigel, R. O., Skilandat, M., Sigel, A., Operschall, B., Sigel, H., Complex formation of cadmium with sugar residues, nucleobases, phosphates, nucleotides, and nucleic acids, A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel (Eds.) Cadmium: From Toxicity to Essentiality, Springer Netherlands, 2013, 191-274.
114. Sohrabi, M. R., Matbouie, Z., Asgharinezhad, A. A., Dehghani, A., Solid phase extraction of Cd(II) and Pb(II) using a magnetic metal-organic framework, and their determination by FAAS, *Microchimica Acta* 180 (2013) 589-597.