

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

Maiuca Alberto Seco

**EMPREGO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA  
PARA EXTRAÇÃO DE FERRO EM CERVEJA E DETERMINAÇÃO  
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA**

Santa Maria, RS  
2023

Maiuca Alberto Seco

**EMPREGO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA PARA  
EXTRAÇÃO DE FERRO EM CERVEJA E DETERMINAÇÃO POR  
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA**

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

Orientador: Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte

Santa Maria, RS  
2023

**Maiuca Alberto Seco**

**EMPREGO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA PARA  
EXTRAÇÃO DE FERRO EM CERVEJA E DETERMINAÇÃO POR  
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA**

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

Aprovada em 09 de Março de 2023.

---

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

---

**Juliana Villela Maciel, Doutora (FURG)**

---

**Cezar Augusto Bizzi, Doutor (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2023

Quero estender os meus agradecimentos à **República Federativa do Brasil** pela oportunidade de formação acadêmica desde graduação e pós-graduação.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)**, à **Universidade Federal de Santa Maria**, ao **Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA)** e ao **Centro de Estudos em Petróleo (CEPETRO)** pelo espaço e pela possibilidade da execução deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** incentivo à pesquisa e pelo apoio financeiro concedido por meio da bolsa de Mestrado.

Ao Prof. Dr. **Fábio Andrei Duarte**, pela orientação neste trabalho durante todos esses anos, pelo apoio e esforço para que tudo desse certo, pelo exemplo de profissionalismo, pela amizade e convívio, por acreditar em mim e proporcionar-me uma oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Obrigado, **Fábio**.

Ao Prof. Dr. **Cezar Augusto Bizzi** e à Dr<sup>a</sup>. **Juliana Villela Maciel** pela participação da banca examinadora desta dissertação e pelas valiosas críticas que, toda certeza, contribuiram para o aperfeiçoamento para este trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Paola de Azevedo Mello**, pelas suas contribuições valiosas no exame de qualificação para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores** e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Lívia Paulia Dias Ribeiro** pelo auxílio iniciais para minha chegada na UFSM e em especial ao **Érico Flores** pelo convívio e pela amizade e, principalmente, pela oportunidade e espaço no LAQIA/CEPETRO para desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do LAQIA do Departamento de Química da UFSM, pelo convívio, acolhimento, amizade e colaboração. Em especial, **Eliana T. F. Larruscain**, **Samuel R. Waechter**, **Alice P. Holkem**, **Letícia C. Brudi**, **Jader R. K. Silveira**, **Gustavo R. Bitencourt** e **Paola C. Crestani**, pelas preciosas sugestões e assim como pela colaboração de forma direta na execução deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria do PPGQ, **Ademir** e **Miguel**, pelo auxílio, atenção demonstradas durante o meu tempo no programa e pelo exemplo profissional.

A todos **os docentes do curso de Licenciatura em Química da UNILAB** pela formação inicial, pela amizade, bem como pelas suas contribuições para minha passagem de Fortaleza/CE para Santa Maria/RS, em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Viviane G. P. Ribeiro** pela confiança e por ficar na frente desse apoio de passagem para minha chegada na UFSM. Gratos a todos pelo gesto.

Ao **Numna Té, Sílvia M. A. Carvalho, Siozimila F. Onhinam, Walnice C. da Silva e Hilquias S. E. Chiquete** pela amizade, disposição nas horas que eu precisava.

## RESUMO

### EMPREGO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA PARA EXTRAÇÃO DE FERRO EM CERVEJA E DETERMINAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA

AUTOR: Maiuca Alberto Seco

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte

Neste trabalho foi desenvolvido um método de preparo de amostra baseado na microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para extração e pré-concentração de Fe em cerveja e subsequente determinação por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS). Apesar de a DLLME preconizar o uso de um solvente extrator e um solvente dispersor, neste trabalho foi utilizado apenas o solvente extrator. Para extração de Fe por DLLME, foi avaliado o tipo e volume de solvente extrator, volume da amostra, concentração e tipo de complexante, efeito do pH, efeito da adição de sal, além da influência do número de lavagens após a extração. Após a otimização da DLLME, foram definidos 75 µL de 1,2-diclorobenzeno (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>) como solvente extrator, 10 mL de cerveja (sem qualquer diluição) como volume de amostra, 500 µL de pirrolidina ditiocarbamato de amônio (APDC) 0,5% (m/v) como agente complexante, não sendo necessário ajuste de pH, adição de sal e lavagens após a extração. Após a otimização das condições da DLLME, foi feita uma curva de calibração externa, a partir da qual foi possível obter um coeficiente de determinação maior que 0,99. O método proposto DLLME/F AAS foi aplicado para determinação de Fe em três amostras de cerveja e os resultados foram comparados com os obtidos após decomposição assistida por micro-ondas (MAD) e determinação por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). A concentração de Fe nas 3 amostras variou entre 59,7 e 68,2 µg L<sup>-1</sup> e entre 54,4 e 57,2 µg L<sup>-1</sup> para DLLME/F AAS e MAD/ICP-OES, respectivamente. O método proposto para a extração e pré-concentração de Fe apresentou uma boa precisão e exatidão e pode ser utilizado em análise de rotina para determinação de Fe em cerveja e matrizes similares.

**Palavras-chave:** DLLME. Ferro. Cerveja. F AAS. Preparo de amostra.

## ABSTRACT

### USE OF DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION FOR THE EXTRACTION OF IRON IN BEER AND DETERMINATION BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

AUTHOR: Maiuca Alberto Seco  
ADVISOR: Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte

In this work, a sample preparation method based on dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) for the extraction and preconcentration of Fe in beer and subsequent determination by flame atomic absorption spectrometry (F AAS) was developed. Although DLLME recommends the use of an extracting solvent and a dispersing solvent, in this work only the extracting solvent was used. For Fe extraction by DLLME, the type and volume of extracting solvent, sample volume, concentration and type of complexant, pH effect, effect of salt addition, and the influence of the number of washing steps after extraction were evaluated. After optimization of DLLME, 75  $\mu\text{L}$  of 1,2-dichlorobenzene ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$ ) as extracting solvent, 10 mL of beer (without any dilution) as sample volume, 500  $\mu\text{L}$  of 0.5% (w/v) ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (APDC) as complexing agent were selected, without the need for pH adjustment, salt addition and washing steps after extraction. After optimization of the DLLME conditions, an external calibration curve was carried out, from which a determination coefficient better than 0.99 was obtained. The proposed DLLME/F AAS method was applied for Fe determination in three beer samples and the results were compared with those obtained after microwave assisted decomposition (MAD) and determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). The Fe concentration in the 3 samples ranged from 59.7 to 68.2  $\mu\text{g L}^{-1}$  and from 54.4 to 57.2  $\mu\text{g L}^{-1}$  for DLLME/F AAS and MAD/ICP-OES, respectively. The proposed method for Fe extraction and preconcentration presented suitable precision and accuracy and can be used in routine analysis for Fe determination in beer and similar matrices.

**Keywords:** DLLME. Iron. Beer. F AAS. Sample preparation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Procedimento geral de DLLME para extração de Fe ..... 30
- Figura 2 – Avaliação do tipo de solvente para extração de Fe em 5 mL (cinza claro) e 10 mL (cinza escuro) de cerveja. Condições experimentais: 5 ou 10 mL de cerveja, 500 µL de complexante DDTC 1% (m/v), 100 µL de solvente extrator, 4 min de centrifugação a 3500 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam a média e o desvio padrão (n = 7). ..... 36
- Figura 3 – Avaliação do volume de C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub> como solvente para extração de Fe. Condições experimentais: 10 mL de cerveja, 500 µL de complexante DDTC 1% (m/v), 4 min de centrifugação a 3500 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n = 7). ..... 38
- Figura 4 – Efeito da variação do volume da amostra para extração de Fe. Condições experimentais: variação do volume da amostra entre 2,5 e 12,5 mL, 75 µL de C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>, 500 µL de complexante DDTC 1% (m/v) 4 min de centrifugação a 3500 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n = 7). ..... 39
- Figura 5 – Avaliação do efeito da concentração de APDC e DDTC como complexantes para extração de Fe. Condições: 10 mL de cerveja, 500 µL de complexante de DDTC (cinza escuro) e APDC (cinza claro) variando porcentagem entre 0,5, 1,0, 2,0 e 3%, 75 µL de solvente extrator (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>), 4 min de centrifugação a 3500 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n = 7). ..... 41
- Figura 6 – O efeito do pH na amostra para extração de Fe. Condições experimentais: 10 mL de cerveja, solvente extrator, 500 µL de complexante APPC 0,5%, 75 µL de solvente extrator diclorobenzeno (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>), 4 min de centrifugação a 3500 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão (n = 7). ..... 43
- Figura 7 – O efeito de adição de sal na microextração Fe por DLLME a partir das seguintes condições experimentais: 10 mL de solução da amostra de cerveja, 75 µL de diclorobenzeno como solvente extrator, 500 µL de complexante e 5 min de centrifugação. As barras de erros representam o desvio padrão (n = 7). ..... 44

Figura 8 – Efeito do número de etapas de lavagem após a extração por DLLME. Condições experimentais: 10 mL de cerveja, 75  $\mu$ L de diclorobenzeno como solvente extrator, 500  $\mu$ L de complexante e 5 min de centrifugação. As barras de erros representam o desvio padrão (n = 7)..... 46

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Trabalhos descritos na literatura sobre a determinação de Fe utilizando o método de extração .....   | 24 |
| Tabela 2 – Os solventes orgânicos utilizados no estudo como solventes extratores. ....  | 27 |
| Tabela 3 – Condições escolhidas para extração de Fe por DLLME .....   | 47 |
| Tabela 4 – A determinação de Fe por ICP-OES após MAD (n = 3) e por F AAS após DLLME (n = 7). Os resultados ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) expressam a média $\pm$ desvio padrão. .... | 48 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|         |   |
|---------|---|
| ANVISA  | Agência Nacional de Vigilância Sanitária  |
| ANOVA   | Análise da variância, do inglês <i>analysis of variance</i>   |
| AOAC    | Associação do Químicos Agrícolas Oficiais, do inglês <i>Association of Official Agricultural Chemists</i>                                     |
| APDC    | Pirrolidina ditiocarbamato de amônio, do inglês <i>ammonium pyrrolidinedithiocarbamate</i>  |
| DDTC    | Dietilditiocarbamato de sódio, do inglês <i>sodium diethyldithiocarbamate</i>   |
| DLLME   | Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>   |
| DTCs    | Ditiocarbamatos, do inglês <i>Dithiocarbamates</i>  |
| EEA     | Agência Europeia do Ambiente, do inglês <i>European Environment Agency</i>  |
| GF AAS  | Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês <i>grafite furnace atomic absorption spectrometry</i>                      |
| F AAS   | Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês <i>flame atomic absorption spectrometry</i>   |
| HPA     | Sistema de decomposição em alta pressão, do inglês <i>High Pressure Asher</i>   |
| ICH     | Conferência Internacional de harmonização do inglês <i>International Conference of harmonisation</i>  |
| ICP-OES | Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> |
| ICP-MS  | Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>                      |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia  |
| LLE     | Extração líquido-líquido, do inglês <i>liquid-liquid extraction</i>   |
| LOD     | Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i>   |
| LOQ     | Limite de quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i>   |
| MAD     | Decomposição assistida por micro-ondas, do inglês <i>microwave-assisted digestion</i>   |
| PTFE    | Politetrafluoretileno   |

|      |  |
|------|--|
| rpm  | Rotações por minuto  |
| RSD  | Desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i>                 |
| SBSE | Extração sortiva em barra de agitação, do inglês <i>stir bar sorptive extraction</i> |
| SD   | Desvio padrão, do inglês <i>standard deviation</i>                                   |
| SDME | Microextração de gota única, do inglês <i>single drop microextraction</i>            |
| SPE  | extração em fase sólida, do inglês <i>solid phase extraction</i>                     |

## SUMÁRIO

|               |  |           |
|---------------|--|-----------|
| <b>1.</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>2.</b>     | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | <b>18</b> |
| 2.1.          | CERVEJA.....   | 18        |
| 2.2.          | ELEMENTOS ESSENCIAIS E NÃO ESSENCIAIS PRESENTES NA<br>CERVEJA.....   | 18        |
| 2.3.          | MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO.....  | 19        |
| <b>2.3.1.</b> | <b>Microextração líquido-líquido dispersiva</b> .....  | <b>21</b> |
| 2.4.          | TÉCNICAS EMPREGADAS PARA DETERMINAÇÃO DE FERRO EM<br>CERVEJA.....  | 22        |
| <b>2.4.1.</b> | <b>Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e<br/>espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado</b><br>..... | <b>22</b> |
| <b>2.4.2.</b> | <b>Espectrometria de absorção atômica com chama</b> .....  | <b>23</b> |
| <b>3.</b>     | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | <b>26</b> |
| 3.1.          | INSTRUMENTAÇÃO.....  | 26        |
| 3.2.          | REAGENTES .....  | 27        |
| 3.3.          | AMOSTRAS.....  | 28        |
| 3.4.          | OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA DLLME PARA EXTRAÇÃO E PRÉ-<br>CONCENTRAÇÃO DE FERRO EM CERVEJA.....   | 28        |
| <b>3.4.1.</b> | <b>Escolha do tipo de solvente extrator</b> .....  | <b>30</b> |
| <b>3.4.2.</b> | <b>Escolha do tipo de solvente dispersor</b> .....   | <b>30</b> |
| <b>3.4.3.</b> | <b>Escolha do volume do solvente extrator</b> .....  | <b>31</b> |
| <b>3.4.4.</b> | <b>Escolha do volume de amostra</b> .....  | <b>31</b> |
| <b>3.4.5.</b> | <b>Concentração do complexante</b> .....   | <b>31</b> |
| <b>3.4.6.</b> | <b>Efeito do pH</b> .....  | <b>32</b> |
| <b>3.4.7.</b> | <b>Efeito de adição de sal</b> .....   | <b>32</b> |
| <b>3.4.8.</b> | <b>Número de etapas de lavagem</b> .....   | <b>32</b> |
| 3.5.          | PARÂMETROS DO MÉTODO DLLME/F AAS .....   | 33        |
| <b>3.5.1.</b> | <b>Curva de calibração e linearidade</b> .....   | <b>33</b> |
| <b>3.5.2.</b> | <b>Limites de detecção e quantificação</b> .....   | <b>33</b> |
| <b>3.5.3.</b> | <b>Exatidão e precisão</b> .....   | <b>34</b> |
| <b>4.</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>35</b> |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 4.1.      | ESCOLHA DO SOLVENTE EXTRATOR.....                  | 35        |
| 4.2.      | ESCOLHA DO VOLUME DO SOLVENTE EXTRATOR .....       | 37        |
| 4.3.      | ESCOLHA DO VOLUME DE AMOSTRA .....                 | 39        |
| 4.4.      | CONCENTRAÇÃO E TIPO DE COMPLEXANTE .....           | 40        |
| 4.5.      | EFEITO DO PH.....                                  | 42        |
| 4.6.      | EFEITO DA ADIÇÃO DE SAL .....                      | 44        |
| 4.7.      | NÚMERO DE LAVAGENS.....                            | 45        |
| 4.8.      | APLICAÇÃO E DESEMPENHO DO MÉTODO DLLME/F AAS ..... | 47        |
| <b>5.</b> | <b>CONCLUSÃO .....</b>                             | <b>50</b> |
|           | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                            | <b>51</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

As principais bebidas alcoólicas produzidas por meio do processo de fermentação são cerveja, cidra de maçã, vinho, saquê e hidromel (Makwana e Hati, 2019). A cerveja é uma bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, com ação da levedura e com adição de lúpulo. A produção de cerveja teve seu início pelos povos da Mesopotâmia, onde cultivavam e se alimentavam do grão de cevada deixados na chuva, o que ocasionava a fermentação espontânea por ação de leveduras (Ribeiro *et al.*, 2021). A produção de cerveja é um processo complexo que envolve a utilização de diversos ingredientes e etapas de produção (Rosa *et al.*, 2015).

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais consumidas mundialmente e, no Brasil, é a mais consumida (Neto *et al.*, 2020). As principais matérias-primas usadas na fabricação da cerveja atualmente (água, malte, lúpulo e levedura) contribuem para sua composição de alta complexidade, devido à presença de proteínas, vitaminas, minerais, ácidos orgânicos como etanol, além de nutrientes como, Ca, K, Fe, P, Mg, Na, entre outros (Polak *et al.*, 2013).

A presença de Fe em cerveja pode ser proveniente de diversos fatores, incluindo a água utilizada na produção e equipamentos utilizados no processo. Sua presença em concentrações elevadas pode afetar o crescimento das leveduras e o sabor do produto final, podendo transmitir um sabor metálico e agressivo à cerveja, bem como uma cor escura devido às associações com compostos orgânicos, o que resulta em atividade de levedura e dificulta a produção de espuma (limite máximo permitido no mosto e na cerveja é de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de Fe (Pohl, 2008; Filik e Giray, 2012). Para Fe, é relatado na literatura (Leão *et al.*, 2018) que, não existe limite máximo na legislação brasileira. Sendo assim, a sua determinação torna-se importante para o controle de qualidade da cerveja.

O Fe está em quarto lugar na abundância dos elementos na crosta terrestre (depois do O, Si e Al) e em segundo lugar entre os metais na crosta terrestre. Quando se trata de número de oxidação, os estados de oxidação mais comuns são Fe(II) e Fe(III) (Cornelis *et al.*, 2003). Do mesmo modo, o Fe é um elemento muito versátil em todos os campos da ciência (Teixeira *et al.*, 2012). Este elemento desempenha um papel notável nas reações químicas, por exemplo, nos processos geológicos, na química ambiental, na bioquímica, entre outros. Desse modo, a eficácia biológica e

ambiental do Fe depende, todavia, de suas propriedades químicas, por exemplo, valência, solubilidade e grau de formação de complexos. Portanto, este elemento exerce um papel importante no metabolismo das plantas, onde é essencial para o transporte de elétrons fotossintéticos e respiratórios, redução de níveis de nitrato e desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (Cornelis *et al.*, 2003).

Diferentes técnicas têm sido empregadas para a determinação de Fe, tais como espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) (Citak *et al.*, 2009), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) (Naseri *et al.*, 2008), espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (Zedan *et al.*, 2023), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Krug, 2019, Feist e Mikula, 2014).

De maneira geral, amostras submetidas para determinação elementar encontram-se na forma sólida, necessitando a dissolução parcial ou total da amostra antes da introdução no instrumento de medição. Para que uma amostra seja transformada em solução, é necessária uma etapa prévia de decomposição para a conversão dos analitos em compostos solúveis, bem como para a redução das interferências associadas à matriz. (Krug *et al.*, 2019). Vale ressaltar, a eficiência do processo de decomposição é dependente da ocorrência das reações químicas em condições específicas de temperatura e pressão. A instrumentação moderna, desenvolvida especificamente para decomposições assistidas por radiação micro-ondas, apresenta facilidades para monitorar a temperatura e a pressão do sistema amostra durante o processo reacional, fato que agrega segurança ao operador. (Krug *et al.*, 2019).

Apesar das diversas vantagens dos métodos de decomposição, procedimentos de extração e pré-concentração tornam-se necessários quando a concentração do analito é muito baixa ou próxima ao limite de quantificação (LOQ) (Dadfarnia e Haji Shabani, 2010). Portanto, as vantagens da pré-concentração, além da miniaturização, são o baixo consumo de reagentes, especialmente de solventes orgânicos, que geralmente são tóxicos e de maior custo. Outra vantagem da pré-concentração está relacionada com a melhoria na seletividade durante a extração, pois a análise pode ser realizada com a utilização de reagentes seletivos, que ajudam no aumento da probabilidade de extração do analito, diminuindo assim as interferências por componentes da matriz. Por fim, é possível determinar o analito em baixa

concentração, possibilitando à sua determinação com boa precisão e com melhor LOQ (Rezaee *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2014b; Silveira *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2013).

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) consiste em um sistema ternário de solventes (amostra aquosa, solvente dispersor e solvente extrator) que formam duas fases imiscíveis, onde a solubilidade dos analitos em qualquer das fases é conduzida pela polaridade relativa do sistema, sendo que os analitos são geralmente apolares, apresentando maior afinidade pela fase orgânica (Rezaee *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2014b). De acordo com a literatura (Al-Saidi e Emara, 2014), dentre os diversos métodos de pré-concentração utilizados para subsequente determinação elementar em amostras aquosas, a DLLME tem sido amplamente empregada, considerando a sua eficiência na extração tanto para determinação elementar (Gharehbaghi *et al.* 2011) quanto de compostos orgânicos (Martins *et al.*, 2012). Porém, não foram encontrados trabalhos na literatura relatando a extração de Fe em amostra de cerveja empregando a DLLME.

A presença de altas concentrações de Fe em cerveja pode causar problemas de saúde dos consumidores, como anemia e alterações no sabor, ou seja, em virtude de efeitos adversos à saúde que pode ocorrer como consequência de concentrações elevadas de Fe em cerveja, pode ser originário de contaminações no processo de produção, como a utilização de equipamentos inadequados ou a contaminação da água de lavagem. Nesse sentido, a determinação de alguns elementos, como o Fe, se faz importante tanto para os consumidores quanto para os produtores.

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um método simples, de baixo custo, que não requer longo tempo de preparo da amostra, que seja menos moroso e que permita a extração quantitativa de Fe em cerveja para posterior determinação por F AAS.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. CERVEJA

A cerveja é uma bebida fermentada à base de amido e aromatizada com lúpulo (Keukeleirc, 2000). A cerveja é composta, em geral, de 2 a 6% de extrato residual, 2 a 6% de etanol, 0,5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e de 90 a 95% de água, dependendo do tipo de cerveja produzido (Rosa *et al.*, 2015). De acordo com legislação brasileira, conforme definido no art. 36, do decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009 (BRASIL, 2009), a cerveja é definida como bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção e adição de lúpulo ou extrato de lúpulo.

As principais matérias-primas para produção de cerveja são: *i*) água, a qual representa cerca de 90% da composição em massa da cerveja e exerce grande influência sobre a qualidade desta; *ii*) malte, cereal que reúne várias características que justificam sua utilização na produção de cerveja e é rico em amido, contém enzimas, possui uma casca que confere proteção ao grão durante a malteação e dá aroma e sabor característicos ao produto; *iii*) lúpulo, na fabricação de cerveja é utilizada a flor seca da planta fêmea do lúpulo, que confere estabilidade do sabor e a retenção da espuma); *iv*) levedura, a adição de fermento é a fase mais importante para definir o paladar da cerveja, sendo que o tipo de fermentação dependerá da levedura utilizada (Rosa *et al.*, 2015).

### 2.2. ELEMENTOS ESSENCIAIS E NÃO ESSENCIAIS PRESENTES NA CERVEJA

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em seu relatório, (Impacto-REMAI, 2020) propõem que contaminantes de natureza inorgânica ou orgânica, que não são adicionados de forma intencional a alimentos, são consideradas substâncias tóxicas. A contaminação por essas substâncias pode ser por meio de fontes alimentares, resultado de produção, fabricação, tratamento, armazenamento de alimentos ou reações, além da contaminação ambiental. Os efeitos tóxicos provocados por contaminantes dependem da quantidade ingerida e das características do indivíduo.

Por outro lado, a quantidade de Fe necessária para o ser humano é dependente da idade, sexo e dieta. Por exemplo, para crianças de até 6 meses de vida a quantidade de Fe diária recomendada é de 0,27 mg, para mulheres grávidas é de 27 mg e entre 8 e 18 mg para homens e mulheres adultos (Trumbo *et al.*, 2001). Os níveis elevados de Fe no organismo podem acarretar sérios problemas à saúde humana tais como, no sistema nervoso e câncer, formação de radicais livres e neurodegeneração (associado à inflamação) Haider, 2015 Bhatia 2011).

A literatura científica (Williams *et al.*, 1995; Nascimento *et al.*, 2012; McElhaney, *et al.*, 2009), evidencia que muitas plantas e micronutrientes têm a capacidade de bioacumular Fe. Essa capacidade torna o Fe um micronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. A deficiência de Fe no organismo é um dos principais contribuintes que leva à anemia e disfunções no sistema imunológico. Nesse sentido, esse elemento é importante na manutenção da homeostase celular, bem como faz presente em diferentes processos metabólicos e fermentativos (componente funcional de proteínas, enzimático e estabilizador).

O Fe está entre os elementos mais abundantes na crosta terrestre. Portanto, o Fe está entre os micronutrientes mais importantes para as plantas, influenciando assim a fotossíntese e a formação de clorofila e hidratos de carbono.

### 2.3. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO

A extração do analito em qualquer que seja o método analítico é considerada uma das etapas fundamentais para determinação elementar. Na literatura, métodos clássicos de extração como extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE) (Domínguez *et al.*, 2011; Quigley *et al.*, 2016; Ibrahim *et al.*, 2014) tem sido amplamente descrita para determinação de compostos orgânicos e elementos. Por outro lado, a evolução dos métodos de extração reduziu a complexidade e o tempo no tratamento da amostra. Portanto, o desenvolvimento dos métodos de extração alternativos e/ou miniaturizados como a microextração em fase sólida (SPME), extração sortiva em barra de agitação (SBSE), microextração de gota única (SDME), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) tem se destacado. Cada método citado acima apresenta as suas vantagens e desvantagens, as quais serão discutidas no decorrer do texto (Urkude *et al.* 2019; Almendral, M. J. *et al.* 2004). Cabe destacar

que serão destacados apenas princípios, vantagens e desvantagens desses métodos de forma separada, com foco especial para a DLLME.

A extração líquido-líquido (LLE) é um método clássico de extração muito utilizado para pré-concentração de diferentes classes de analitos (Martins *et al.*, 2012), também conhecido como extração e partição por solventes, mas também é tradicionalmente utilizada para limpeza da amostra. Este método consiste em separar compostos com base nas suas solubilidades relativas em dois líquidos imiscíveis, geralmente em água e um solvente orgânico (Urkude *et al.*, 2019). Apesar da LLE oferecer alta reprodutibilidade (Moreira *et al.*, 2014a), a principal desvantagem do método é que o tempo de execução, moroso, laborioso e requer grandes quantidades de solventes orgânicos, que representam uma ameaça potencial para saúde humana e ao ambiente. Também apresenta limitações quanto a formação de emulsão e caso os analitos tenham diferença significativa de polaridade, é difícil obter uma extração eficiente utilizando um único procedimento de LLE (Urkude *et al.*, 2019).

A extração de Fe foi feita utilizando LLE a partir da extração com metilisobutilcetona (MIBK). No método proposto, o analito foi complexado com pirrolidina ditiocarbamato de amônio (APDC) e, posteriormente, determinado por F AAS. Foram utilizados 100 mL de amostra de água do mar, 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup> e 50  $\mu\text{L}$  de APDC 2%, com pH da solução ajustado entre pH 3 e 4. Em seguida, foram adicionados 100 mL de MIBK com agitação durante 3 min. Depois disso, a separação das fases ocorreu após cerca de 10 min e o Fe foi posteriormente determinado por F AAS. O processo de mistura e extração foi feito com um misturador rotativo (modelo Eppendorf 3300) que permitiu o manuseio simultâneo de 24 tubos (Kremlin e Petersen, 1974).

A SPE é um método de extração que emprega membranas, pequenas colunas descartáveis na forma de seringa ou cartuchos (Skoog *et al.*, 2006). A SPE é um método comumente utilizado para remover compostos interferentes da matriz e obter uma amostra mais limpa para uma análise menos susceptível a interferentes. O procedimento básico de SPE consiste no isolamento e concentração do analito a partir de um fluxo de amostra de na forma gasosa, fluido ou líquido (mais comum) por transferência para retenção (sorção) em uma fase sólida. A fase sólida é então isolada da amostra e os analitos são recuperados por eluição, utilizando um líquido ou fluido, ou por dessorção térmica da fase sólida (Starowicz *et al.*, 2019).

Para além da análise de uma grande diversidade de amostras de alimentos, a SPE oferece amplas oportunidades de otimização e de avanços nas amostras de alimentos. Adicionalmente, este método também pode ser aplicado e combinado com outros métodos de preparo de amostras, conforme necessário (Urkude *et al.*, 2019). As principais vantagens da SPE são os altos fatores de enriquecimento, simplificação da matriz (limpeza da amostra) e a transferência da matriz da amostra para um solvente diferente ou para a fase gasosa. Portanto, a SPE é um método muito comum em muitas áreas da química, incluindo química ambiental, farmacêutica, clínica, alimentar e industrial (Poole e Poole, 2012).

Embora estes métodos desempenhem as tarefas acima de forma adequada, eles também apresentam uma série de desvantagens referente à etapa de transferência do analito aprisionado no cartucho de SPE que geralmente requer o uso de solventes tóxicos (Quigley *et al.*, 2016).

### **2.3.1. Microextração líquido-líquido dispersiva**

A DLLME foi desenvolvida por (Rezaee *et al.*, 2006) para extração de pesticidas organofosforados em água. Desde então, este método foi considerado uma versão miniaturizada da LLE, principalmente por utilizar pequenos volumes de solvente extrator (dezenas a poucas centenas de microlitros). O método é baseado em um sistema ternário de solventes, que consiste em uma mistura apropriada de um solvente extrator (imiscível em água) e um solvente dispersor (miscível em água e/ou no solvente extrator), o qual é injetado rapidamente na amostra líquida com auxílio de uma seringa, causando a turvação da solução. Essa adição rápida faz com que ocorra a dispersão do solvente extrator no meio líquido, formando gotas muito pequenas, aumentando significativamente a área de contato entre as duas fases, o que favorece a extração dos analitos. (Rezaee *et al.*, 2006).

Atualmente, são encontrados alguns trabalhos na literatura empregando a DLLME para a posterior determinação elementar (Giokas *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2013, Silveira *et al.*, 2022). Além de apresentar as vantagens citadas acima, a DLLME pode ser combinada com diversos métodos para extração dos compostos orgânicos e inorgânicos, dependendo da natureza do analito (Dmitrienko *et al.*, 2020; Khani *et al.*, 2011).

Os métodos da microextração para o preparo de amostras apresentam alguns fatores que justificam as suas vantagens como a redução de solventes colorados, menores custos de análise, bem como economia na compra de solventes de alta pureza. Além disso, a determinação de analitos que estão presentes em amostras em um nível de concentração muito baixo, geralmente, requer procedimentos analíticos que incluem uma etapa preliminar de isolamento/enriquecimento do analito (Spiegel et al., 2014).

As características do método permitem a extração de compostos com caráter orgânico, o que não é o caso do Fe. Os metais na fase aquosa estão presentes geralmente na forma de íons, onde são solúveis e devem ser complexados para poderem ser transferidos para fase orgânica. Neste caso, os carbamatos se destacam por formar quelatos estáveis com vários cátions, dentre eles o Fe(II) e Fe(III). Neste sentido, esta classe de ligantes é comumente utilizada em sistemas de pré-concentração e extração como, por exemplo, APDC e dietilditiocarbamato de sódio (DDTC), com grande aplicabilidade para elementos como Cu, Bi, Cr, Fe, Mo, Pb, Zn, entre outros (Grzésekowiak et al., 2011).

Os ditiocarbamatos (DTCs) são grupos de pequenas moléculas orgânicas com forte capacidade quelante para espécies inorgânicas, os quais têm sido amplamente utilizados em métodos de extração. A habilidade dos DTCs em formar complexos metálicos estáveis confere-lhes um papel fundamental e justifica a extensa utilização desta classe de compostos como ligantes superiores (Kanchi et al., 2014).

## 2.4. TÉCNICAS EMPREGADAS PARA DETERMINAÇÃO DE FERRO EM CERVEJA

### 2.4.1. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

De acordo com a literatura (Pereira et al., 2010; Soós et al., 2021) as técnicas de ICP-MS e ICP-OES são frequentemente utilizadas para determinação de metais, não-metais e halogênios, devido a suas características de detecção multielementar, baixos valores de limite de detecção (LOD) e ampla faixa linear. Essas técnicas, normalmente são passíveis de utilização de soluções diluídas para obter recuperações quantitativas para todos os analitos. E essas técnicas são largamente

utilizadas para análise de elementos incluindo a determinação de Fe (Pereira *et al.*, 2013), além disso, normalmente, uma parte fundamental da análise é a preparação da amostra antes da medição.

#### **2.4.2. Espectrometria de absorção atômica com chama**

As técnicas AAS envolvem a medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética, proveniente de uma fonte de radiação primária, por átomos no estado fundamental gasosos. Os dois tipos de atomizadores mais usados em AAS são a chama e o forno de grafite. A técnica de F AAS é a mais utilizada para determinação elementar em níveis de  $\text{mg L}^{-1}$ , enquanto a GF AAS é utilizada para determinações em baixas concentrações ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Krug, 2019).

O Fe está entre os elementos mais frequentemente determinados por F AAS. A determinação de Fe em uma chama oxidante (ar-acetileno) está sujeita a interferências por elementos como Si, Sr, Al e Mn, os quais podem suprimir o sinal de Fe. No entanto, com exceção das amostras metalúrgicas, estes elementos citados acima geralmente estão presentes em altas concentrações em quase todas as amostras, o que pode ser um problema na determinação de Fe. Portanto, a extensão da interferência depende, contudo, das condições, tais como a relação combustível/oxidante, temperatura da chama, entre outros (Welz e Sperling, 1999). Apesar da possibilidade de interferências na determinação de Fe por F AAS, a determinação deste elemento é muito mais susceptível a erros quando um instrumento de ICP-MS é usado, devido a formação de interferências isobáricas. (Komjarova e Blust, 2006).

Algumas aplicações da DLLME têm sido descritas na literatura para subsequente determinação de Fe. Na Tabela 1, estão mostrados outros exemplos de aplicações que abordem determinação de Fe, DLLME e/ou técnicas de detecção.

Tabela 1 – Trabalhos descritos na literatura sobre a determinação de Fe utilizando a DLLME como método de extração

(continua)

| Amostra                         | Analito | Condições experimentais  | Preparo de amostra | Detecção | Referência                   |
|---------------------------------|---------|--|--------------------|----------|------------------------------|
| Água com diferentes salinidades | Fe      | Foram utilizadas amostras de água de torneira (baixa salinidade, variando de 0 a 0,5), água estuarina (salinidade média, variando 0,5 a 30) e as amostras coletadas em alto mar (salinidade alta, variando de 30 a 35). Para o procedimento de DLLME, alíquotas de 10 mL de uma amostra de água contendo concentração conhecida de Fe(III) foram transferidas para tubos de vidro com fundo cônico de 15 mL. O pH foi ajustado com HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ou NaOH 0,1 mol L <sup>-1</sup> . O agente complexante (300 µL de solução de APDC 1% (m/v) foi adicionado à amostra e misturado. Em seguida, os tubos foram deixados em repouso por 1 min para formação do complexo. Após, foi feita a injeção rápida da mistura entre 500 µL de etanol (solvente dispersor) e 50 µL de 1,2-diclorobenzeno (solvente extrator), com auxílio de uma seringa de 2,5 mL. Uma solução turva foi rapidamente produzida, a qual foi centrifugada a 3000 rpm por 5 min e as gotículas dispersas do solvente de extração foram sedimentadas. A fase aquosa foi removida e a fase orgânica foi diluída até 3 mL com etanol como solvente dispersor para subseqüente medição de absorbância por UV-Vis. | DLLME              | UV-Vis   | Pereira <i>et al.</i> , 2013 |
| Vinho branco e tinto            | Fe e Cu | Alíquotas de 1 mL de vinho e 500 µL de solução de APDC 1% (m/v) foram colocadas em um tubo de vidro de 15 mL com fundo cônico e diluídas até 5 mL com água ultrapura. Foi feito ajuste em pH 3,0, quando necessário. Uma mistura contendo 1300 µL de acetonitrila (solvente dispersor) e 80 µL de C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> (solvente extrator) foi rapidamente injetada na amostra com auxílio de uma microsseringa de 2,5 mL. Após a injeção, formou-se uma solução turva que foi centrifugada a 3000 rpm durante 3 min, e pequenas gotículas de solvente de extração contendo o analito complexado [Fe(APDC) <sub>3</sub> ] foram depositadas no fundo do tubo. Para reduzir algumas interferências durante as medições, a fase sedimentada (extrato) foi lavada com água ultrapura (3 mL e centrifugação a 3000 rpm durante 3 min). A fase aquosa foi removida e o extrato foi diluído até 3 mL com acetonitrila para posterior determinação do Fe por UV-Vis.  | DLLME              | UV-Vis   | Maciel <i>et al.</i> , 2014  |

(conclusão)

| <b>Amostra</b>   | <b>Analito</b> | <b>Condições experimentais</b>   | <b>Preparo de amostra</b> | <b>Deteção</b> | <b>Referência</b>          |
|--|----------------|--|---------------------------|----------------|----------------------------|
| Amostra de água e as amostras de alimentos (folha de espinafre, maçã e tomate) | Fe(III)        | As amostras de água foram filtradas em um filtro de membrana de celulose (0,45 µm) e mantidas congeladas até à análise. As amostras de alimentos (folha de espinafre, maçã e tomate) foram lavadas com água ultrapura, secas a 90 °C até peso constante e moídas em almofariz de porcelana. Previamente à DLLME, as amostras (0,3-0,4 g) foram decompostas em forno de micro-ondas (4 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado e 2 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e digerida utilizando uma técnica de digestão por micro-ondas. aferidas a 10 mL após a decomposição. Na DLLME, 10 mL da solução aquosa do analito (pH 5,0) foram misturados com 0,1 mL de 0,01 mol L <sup>-1</sup> de ácido gálico (GA) e 0,1 mL de 0,01 mol L <sup>-1</sup> de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAG). Formou-se uma solução turva após injeção rápida de uma mistura de 200 µL de tetracloroetileno (solvente extrator) e 200 µL de acetona (solvente dispersor). Após a turvação da solução, foi feita a centrifugação a 4000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi cuidadosamente eliminado e o volume da fase de sedimentação foi completado até 0,5 mL com etanol. O extrato foi analisado por espectrofotometria em 560 nm. | DLLME                     | UV-Vis         | Zedan <i>et al.</i> , 2023 |

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. INSTRUMENTAÇÃO

A determinação de Fe em cerveja após DLLME foi feita empregando um espectrômetro de absorção atômica com chama (modelo AAS Vario 6, Analytik Jena, Alemanha), equipado com uma lâmpada de deutério para a correção de fundo e com chama ar e acetileno. Foi usada uma lâmpada de cátodo oco de Fe como fonte de radiação, com comprimento de onda de 248,3 nm, corrente de 6,5 mA e fenda espectral de 0,2 mm.

Um instrumento de ICP-OES (Spectro Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments, Alemanha), equipado com um nebulizador de fluxo cruzado acoplado a uma câmara de nebulização duplo passo (tipo *Scott*) foi utilizado para determinação de Fe e obtenção de valores de referência (decomposição assistida por micro-onda, MAD). As condições experimentais utilizadas foram potência do gerador de radiofrequência de 1400 W, gás do plasma, nebulização e auxiliar com vazões de 12, 1,0 e 1,00 L min<sup>-1</sup>, respectivamente. As linhas de emissão monitoradas para Fe foram 238,204, 239,562 e 259,941 nm.

Para a pesagem dos reagentes, foi utilizada uma balança analítica (modelo MARK M214A, BEL Equipamentos Analíticos, Brasil), com capacidade máxima de 220 g e resolução de 0,01 g.

Foi utilizado um pHmetro (modelo 781 pH/Ion Meter, Metrohm, Suíça), com um eletrodo de vidro combinado, sensor de temperatura e resolução de 0,01 unidades de pH.

Para desgaseificação das amostras foi utilizado um de banho ultrassônico com frequência 35 ou 130 kHz (modelo Elma/DE-78224, tipo: TI-H10, Helma GmbH & Co., Alemanha), com potência de 220-240 W, volume útil de 8,6 L e amplitude de 0 a 100%.

Para separação das fases após a DLLME, foi utilizada uma centrífuga (modelo Q-222T208, Quimis, Brasil), com a capacidade para 8 frascos de 15 mL.

Para obtenção dos valores de referência para a concentração de Fe nas amostras de cerveja, foi feita a decomposição assistida por micro-ondas em sistema fechado (modelo Multiwave Pro, Anton Paar, Áustria). Neste sistema é possível a decomposição de até 8 frascos simultaneamente, com pressão, potência e temperatura máximas de 80 bar, 1500 W e 280 °C, respectivamente.

### 3.2. REAGENTES

A água utilizada no preparo de soluções, descontaminação e limpeza dos materiais foi previamente destilada e deionizada em coluna de troca iônica convencional (condutividade máxima de  $0,6 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) e, em seguida, purificada em sistema Milli-Q® (modelo Millipore, USA), com resistividade de  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ .

Para a descontaminação dos frascos utilizados, foi utilizada uma solução de  $\text{HNO}_3$  20%. O  $\text{HNO}_3$  P.A. (Merck, Alemanha) foi previamente destilado em um sistema de sub-ebulição (modelo duoPUR® 2.01E, Milestone, Bergamo, Itália).

Foi utilizada uma solução de referência monoelementar  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de Fe (Titrisol, Merck), a qual inicialmente foi diluída até  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (em  $\text{H}_2\text{O}$ ) e, subsequentemente, a partir desta solução ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), foram preparadas as soluções de referência da curva de calibração, com concentração entre  $0,050$  e  $0,250 \text{ mg L}^{-1}$  de Fe.

Tabela 2 – Os solventes orgânicos utilizados no estudo como solventes extratores.

| Solvente                 | Fórmula molecular                 | Marca                 | Pureza % | Densidade ( $\text{g mL}^{-1}$ ) |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------|----------|----------------------------------|
| Tetracloroeto de carbono | $\text{CCl}_4$                    | Dinâmica, Brasil      | 99,5     | 1,59                             |
| Diclorobenzeno           | $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$ | Merck                 | 99       | 1,30                             |
| Tetracloroetileno        | $\text{C}_2\text{Cl}_4$           | Dinâmica, Brasil      | 99,5     | 1,59                             |
| Clorofórmio              | $\text{CHCl}_3$                   | Sigma-Aldrich, Brasil | 99       | 1,49                             |
| Monoclorobenzeno         | $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$   | Merck                 | 99       | 1,11                             |

Fonte: (Autor, 2023).

A calibração do equipamento de ICP-OES foi feita utilizando a solução de referência multielementar com concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (SCP33MS, PlasmaCAL, Canada). A curva de calibração foi preparada em  $\text{HNO}_3$  5%, com concentração entre  $1$  e  $80 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Foram avaliados como complexantes para Fe o DDTc (99% de pureza, Sigma-Aldrich) e o APDC (97% de pureza, Sigma-Aldrich). Ambos os reagentes foram preparados em água ultrapura para uso na DLLME.

A solução tampão usada na DLLME foi composta por 0,1 mol L<sup>-1</sup> de ácido acético (Vetec, Brasil) e 0,1 mol L<sup>-1</sup> de acetato de sódio (Vetec, Brasil).

### 3.3. AMOSTRAS

As três amostras de cerveja utilizadas neste trabalho foram adquiridas no comércio local, na cidade de Santa Maria/RS, Brasil. As amostras foram identificadas como C1, C2 e C3, as quais apresentam características diferentes e com teor alcoólico diferente como, pilsen 4,8%, lager 5,0% e pilsen (puro malte) 5,3%, respectivamente. A amostra C1 foi selecionada aleatoriamente e usada para a otimização da DLLME.

Antes do procedimento de DLLME, as amostras foram desgaseificadas utilizando banho ultrassônico durante 1 h, com troca da água do banho a cada 20 min. Quando necessário, o pH foi ajustado com soluções de NH<sub>4</sub>OH 0,1 mol L<sup>-1</sup> (Vetec, Brasil) e 0,1 mol L<sup>-1</sup> de HCl.

### 3.4. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA DLLME PARA EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE FERRO EM CERVEJA

Para a extração quantitativa de Fe por DLLME, foram avaliados os parâmetros como tipo de solvente extrator e o seu volume, volume de amostra, concentração e tipo de complexante, assim como o efeito do pH, adição de sal e número de etapas de lavagem. Excepcionalmente, neste trabalho não foi usado o solvente dispersor, pois, de acordo com experiência previa do grupo de pesquisa (Silveira *et al.*, 2022), só foi possível obter a separação de fases entre solvente extrator e matriz cerveja na ausência do solvente dispersor.

O procedimento de DLLME empregado para a extração de Fe em cerveja está mostrado na Figura 1 e consistiu na cerveja desgaseificada (etapa 1), transferência de 10 mL de cerveja previamente desgaseificada para um tubo de vidro de 15 mL com fundo cônico (etapa 2). Em seguida, foi feita a adição do agente complexante (complexante) mediante leve agitação (etapa 3). Após, foi feita a rápida injeção do solvente extrator em 10 mL da amostra onde foi observada a turvação da solução,

seguida de uma leve agitação manual (etapa 4). A solução turva foi centrifugada por 4 min a 3500 rpm para separação das fases (etapa 5). Depois da centrifugação, foi observada uma formação da fase sedimentada correspondente ao solvente extrator no fundo do tubo de vidro (etapa 6). Após a centrifugação, o sobrenadante (fase aquosa) foi retirado (etapa 7). Devido a possibilidade de haver material insolúvel ao redor da fase sedimentada e para minimizar eventuais interferências durante as medições, a fase sedimentada (extrato) foi lavada, com auxílio de uma pipeta Pasteur, adicionando água ultrapura no tubo de vidro até o volume de cerca de 10 mL (etapa 8) e na etapa (9) água preenchida para auto zero para subsequente determinação por F AAS (etapa 10). Este procedimento de adição e retirada do sobrenadante e adição de água ultrapura, após a remoção da matriz, foi repetido uma única vez e preenchida uma única vez que corresponde a 0 (zero) lavagens.

Cabe mencionar que o volume de água remanescente sobre o extrato após “zero lavagens” foi mantido e utilizado para o auto zero do equipamento de F AAS, até início da integração do sinal analítico, quando foi iniciada a aspiração do extrato contendo o analito.

Para a decomposição das amostras pelo método de referência (MAD), foram utilizados 2 mL de  $\text{HNO}_3$  e 1 mL de  $\text{HCl}$ , ambos concentrados. Cabe salientar que as vidrarias sempre foram previamente descontaminadas por imersão em solução de  $\text{HNO}_3$  20% (v/v) por, no mínimo, 24 h e, subsequentemente, lavadas com água ultrapura.

Figura 1 – Procedimento geral de DLLME para extração de Fe



Fonte: (Autor, 2023)

### 3.4.1. Escolha do tipo de solvente extrator

No procedimento de DLLME, a escolha do solvente extrator adequado é considerada uma das etapas mais importantes para uma extração eficiente. Neste estudo, foram avaliados os seguintes solventes extratores:  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$ ,  $\text{C}_2\text{Cl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$  e  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ . Estes solventes são mais densos que água, fato que facilita a amostragem do extrato e aspiração pelo sistema de nebulização do instrumento de F AAS. Os experimentos para avaliação do tipo de solvente extrator foram feitos utilizando 100  $\mu\text{L}$  de cada solvente, adicionados à volumes de amostra que variaram entre 5 e 10 mL, contendo 500  $\mu\text{L}$  de complexante.

### 3.4.2. Escolha do tipo de solvente dispersor

No procedimento de extração, o tipo de solvente dispersor e extrator usando na DLLME é um parâmetro significativo para garantir boa eficiência de extração. A mistura de solvente dispersor e extrator, miscível na fase aquosa (amostra) e na fase orgânica (solvente extrator) é injetada rapidamente na amostra, resultando na

formação de uma solução turva. A principal característica a ser considerada na escolha do tipo do solvente dispersor é a sua miscibilidade na fase orgânica (solvente extrator) e na fase aquosa (amostra), além de ser capaz de diminuir a tensão superficial entre ambas as fases. (Rezaee *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2012; Al-Saidi e Emara, 2014).

Para este trabalho não foi utilizado solvente dispersor, pois de acordo com publicação recente do grupo de pesquisa (Silveira *et al.*, 2022), foi observado a formação de uma fase sólida sedimentada no fundo do tubo cônico, o que não permitia a aspiração pelo capilar do sistema de nebulização do instrumento de F AAS. Neste sentido, independentemente da combinação entre solventes extratores e dispersores, para todos foi observada a formação do sólido, inviabilizando o uso do solvente dispersor.

#### **3.4.3. Escolha do volume do solvente extrator**

Após fixar o tipo do solvente extrator, foi avaliada a influência do volume do solvente extrator, variando os volumes de 25, 50, 75, 100, 125, 150 e 200  $\mu\text{L}$ . O experimento feito foi utilizando o solvente extrator previamente selecionado na avaliação anterior, 500  $\mu\text{L}$  de agente complexante e entre 5 e 10 mL de cerveja.

#### **3.4.4. Escolha do volume de amostra**

Para a escolha do volume de amostra, foram avaliados os volumes de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 mL. Este experimento foi feito fixando as melhores condições obtidas nos experimentos anteriores.

#### **3.4.5. Concentração do complexante**

Para avaliar o efeito da concentração de complexante na extração de Fe, foram adicionados diferentes tipos de complexante (APDC e DDTTC), variando a concentração entre 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0% (m/v), com volume fixado em 500  $\mu\text{L}$ . Os demais parâmetros foram os mesmos usados nos experimentos previamente otimizados.

### 3.4.6. Efeito do pH

O pH na extração por DLLME desempenha um papel crucial para a formação do complexo e subsequente extração. Por este motivo, foi avaliada a influência do pH na extração, variando entre pH 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5. Cabe salientar que o ajuste de pH foi feito usando soluções de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e NH<sub>4</sub>OH 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

### 3.4.7. Efeito de adição de sal

O estudo da influência da concentração de sal, conhecido como efeito *salting out*, na extração do Fe por DLLME foi feito pela adição de solução de NaCl à amostra. Após o ajuste do pH, foi avaliado o efeito de adição de NaCl nas quantidades de 0,0 (sem adição); 12,3; 24,6; 36,9; 49,2 e 61,5 mg de NaCl, que correspondem à concentração de 0,0 (sem adição); 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,10 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente, em cada um dos frascos contendo cerveja. Em seguida, os experimentos foram conduzidos com as demais condições experimentais previamente otimizadas.

### 3.4.8. Número de etapas de lavagem

Como descrito na literatura (Rosa *et al.*, 2015), foi feita a avaliação do número de lavagens do extrato, com intuito de reduzir/eliminar eventuais sinais de fundo causado pela matriz ou por algum dos reagentes utilizados. Dessa forma, foram avaliados 0, 1, 2, 3 e 4 ciclos de lavagens. O procedimento consiste na retirada do sobrenadante, com ajuda de pipeta de Pasteur, após a centrifugação, seguido da adição lenta de cerca de 10 mL de água ultrapura no tubo. Após repetir e preencher com água ultrapura uma única vez esta etapa, o sobrenadante não foi retirado e foi levado para instrumento para que fosse possível fazer o auto zero no instrumento de F AAS. Quando a matriz foi retirada e foi apenas adição de uma alíquota de água sem retirá-la, o procedimento foi considerado como etapa de 0 (zero) lavagem.

### 3.5. PARÂMETROS DO MÉTODO DLLME/F AAS

#### 3.5.1. Curva de calibração e linearidade

Entende-se por linearidade a capacidade de um método em mostrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Para avaliar a linearidade para a determinação de Fe por F AAS, foi construída uma curva de calibração externa (passando por todo o processo de DLLME) nas concentrações de 0,0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25 mg L<sup>-1</sup> de Fe. Cabe salientar, que cada ponto da curva (n = 6), foram utilizados 10 mL da solução padrão (ou 10 mL de amostra para quantificação), seguido da adição de 500 µL de complexante e 75 µL de solvente extrator. Após a extração, a mistura foi centrifugada por 4 min.

A validade das curvas de calibração foi avaliada através do método da regressão linear, onde foi possível estimar o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>). Estes parâmetros representam o grau de ajuste dos dados experimentais à curva de calibração, pois quanto mais próximo da unidade, menor é a dispersão dos dados e menor é a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

#### 3.5.2. Limites de detecção e quantificação

Para poder calcular os valores de LOD e LOQ, foi obtida uma curva de calibração externa com cinco níveis de concentração, na faixa de 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 e 0,25 mg L<sup>-1</sup> em água ultrapura, sob condições experimentais da DLLME otimizadas, a partir de 10 mg L<sup>-1</sup> de uma solução de referência de Fe(III). É importante mencionar que toda a curva de calibração externa foi preparada no mesmo dia. Os valores LOD e LOQ foram estimados a partir da curva de calibração externa. Dessa forma, LOD foi calculado como a concentração equivalente a 3 (três) vezes o desvio padrão de 10 (dez) medições do branco, dividido pela inclinação da curva após a pré-concentração. O LOQ foi calculado como a concentração equivalente a 10 (dez) vezes o desvio padrão de 10 (dez) medições do branco, dividido pela inclinação da curva após a pré-concentração.

### 3.5.3. Exatidão e precisão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor dito como verdadeiro. A exatidão pode ser avaliada através de ensaios de recuperação, permitindo comparar valores esperados com valores observados pela aplicação do método. No entanto, este parâmetro também pode ser avaliado a partir de comparação entre técnicas distintas, comparação com métodos oficiais ou através do uso de materiais de referência certificados (CRM). (INMETRO, 2007; ICH, 2005; Ribani *et al.*, 2004).

A precisão é um termo geral utilizado para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. (INMETRO, 2007; ICH, 2005; Ribani *et al.*, 2004).

Neste trabalho, para avaliação da exatidão do método de DLLME desenvolvido para determinação de Fe foi feita pela decomposição assistida por micro-onda (MAD), seguida da determinação de Fe por ICP-OES. A etapa de preparação da MAD consistiu em: 1) Adição da amostra: 5 mL da amostra foram transferidos para o frasco de quartzo, enquanto que 5 mL de água ultrapura foram transferidos para os brancos; 2) Adição do ácido: Foram adicionados 2 mL de  $\text{HNO}_3$  14 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL de HCl 12 mol  $\text{L}^{-1}$  a cada frasco; 3) Pré-reação: A pré-reação foi realizada em banho ultrassom em quatro etapas (30 min a 30 °C, 30 min a 50 °C, 60 min a 70 °C resfriamento até abaixo de 50 °C); 4) Programa de irradiação: 15 min a 1400 W e 20 min a 0 W para resfriamento; 5) os digeridos foram avolumados a 15 mL e feita a determinação de Fe por ICP-OES.

Para avaliação dos resultados, foi utilizado o teste t-student (nível de confiança de 95%) para a comparação de duas medidas, e para três ou mais médias foi utilizada a análise de variância (ANOVA, com nível de confiança de 95%). As avaliações estatísticas foram realizadas com auxílio do programa GraphPad InStat® (Version 3.1, 2009).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para maior seletividade, exatidão e precisão para a determinação de Fe por F AAS após DLLME, a eficiência do parâmetro e/ou condição como tipo e volume do solvente extrator, volume de amostra, concentração e o tipo de complexante, efeito do pH, efeito de adição de sal e número de etapas de lavagem foram otimizados. A seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste estudo.

### 4.1. ESCOLHA DO SOLVENTE EXTRATOR

De acordo com a literatura (Rezaee *et al.*, 2006; Tabrizi, 2010), a escolha tipo de solvente extrator adequado é considerada um fator importante para uma extração eficiente no procedimento da extração por DLLME. Os solventes extratores avaliados ( $\text{CCl}_4$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_2$ ,  $\text{C}_2\text{Cl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$  e  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ ) possuem propriedades físicas diferentes como densidade e solubilidade em água. Cabe destacar que essas propriedades podem afetar diretamente no equilíbrio e na separação de fases, bem como na partição dos analitos entre a fase orgânica e a fase aquosa.

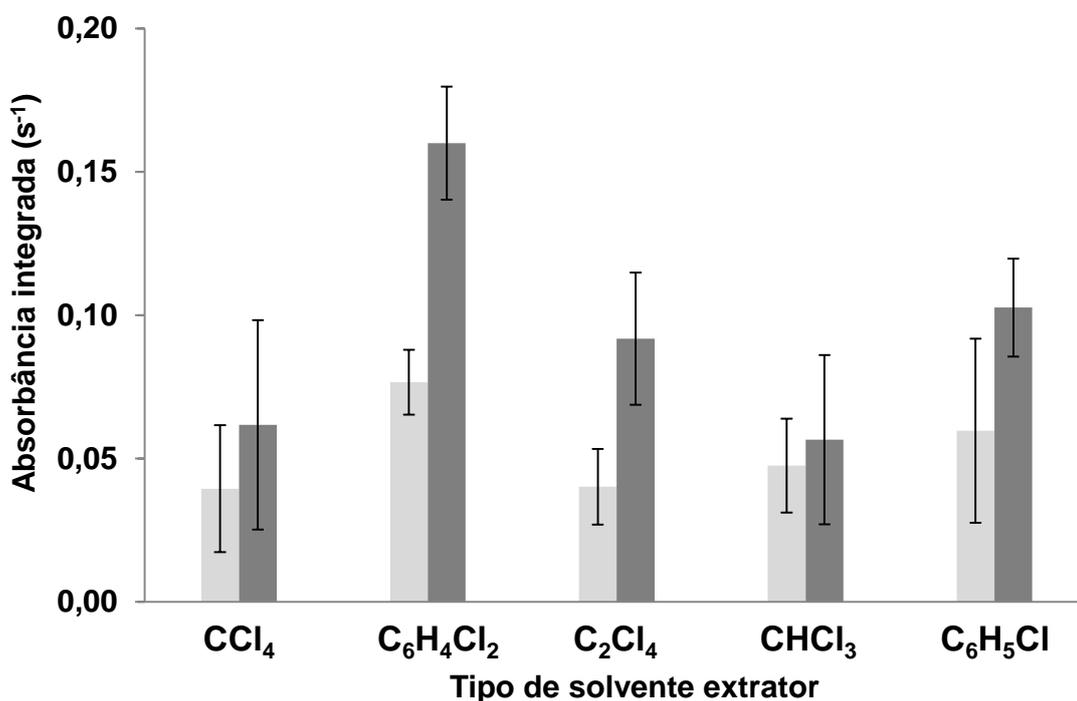
A solubilidade do solvente de extração em água pode influenciar diretamente no volume da fase sedimentada e na partição do analito. Se a solubilidade do solvente extrator for elevada, pode ocorrer a solvatação das moléculas do solvente na fase aquosa, desta forma impedindo a migração eficiente para a fase orgânica e o resultado será um volume menor da fase sedimentada, acarretando um fator de enriquecimento maior, porém com um menor percentual de recuperação. No entanto, o inverso ocorre quando a solubilidade do solvente extrator em água é baixa, tendo como resultado um volume de fase sedimentada maior, o que implica em um menor fator de enriquecimento e uma maior porcentagem de recuperação. (Wang, *et al.* 2023; Chatzimitakos, *et al.* 2023).

A reação entre DDTTC e vários íons metálicos produz complexos metálicos moderadamente solúveis em água que podem ser extraídos de um meio aquoso com uma variedade de solventes orgânicos não-polares (Rezaee *et al.*, 2006).

Assim, foram avaliados cinco solventes extratores ( $\text{CCl}_4$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_2$ ,  $\text{C}_2\text{Cl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$  e  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ ) para os volumes de 5 e 10 mL de amostra, como mostrado na Figura 2. De acordo com os resultados obtidos para os volumes de 5 e 10 mL, foi selecionado o

volume de 10 mL de amostra devido a maior eficiência na extração. Os resultados obtidos na escolha do solvente extrator após a DLLME estão mostrados na Figura 2 ( $\text{CCl}_4$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$ ,  $\text{C}_2\text{Cl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ ).

Figura 2 – Avaliação do tipo de solvente para extração de Fe em 5 mL (cinza claro) e 10 mL (cinza escuro) de cerveja. Condições experimentais: 5 ou 10 mL de cerveja, 500  $\mu\text{L}$  de complexante DDTC 1% (m/v), 100  $\mu\text{L}$  de solvente extrator, 4 min de centrifugação a 3500 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam a média e o desvio padrão ( $n = 7$ ).



Fonte: (Autor, 2023).

A escolha do solvente extrator mais adequado para a DLLME é muito importante para obter uma boa seletividade e uma extração eficiente do analito.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 2, o sinal de absorbância integrada do Fe com  $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$  como solvente extrator mostrou-se superior em comparação aos demais solventes extratores avaliados. Além disso, o  $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$  exibiu menor valor de RSD (12%) em comparação com os demais solventes extratores.

Cabe destacar que o  $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$  apresenta alta hidrofobicidade, característica desejável, considerando que o complexo formado entre Fe e DDTC também apresenta propriedades não polares, sendo assim, a interação entre  $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$  e o complexo entre  $\text{Fe}^{3+}$  e DDTC é mais efetiva em comparação aos outros solventes

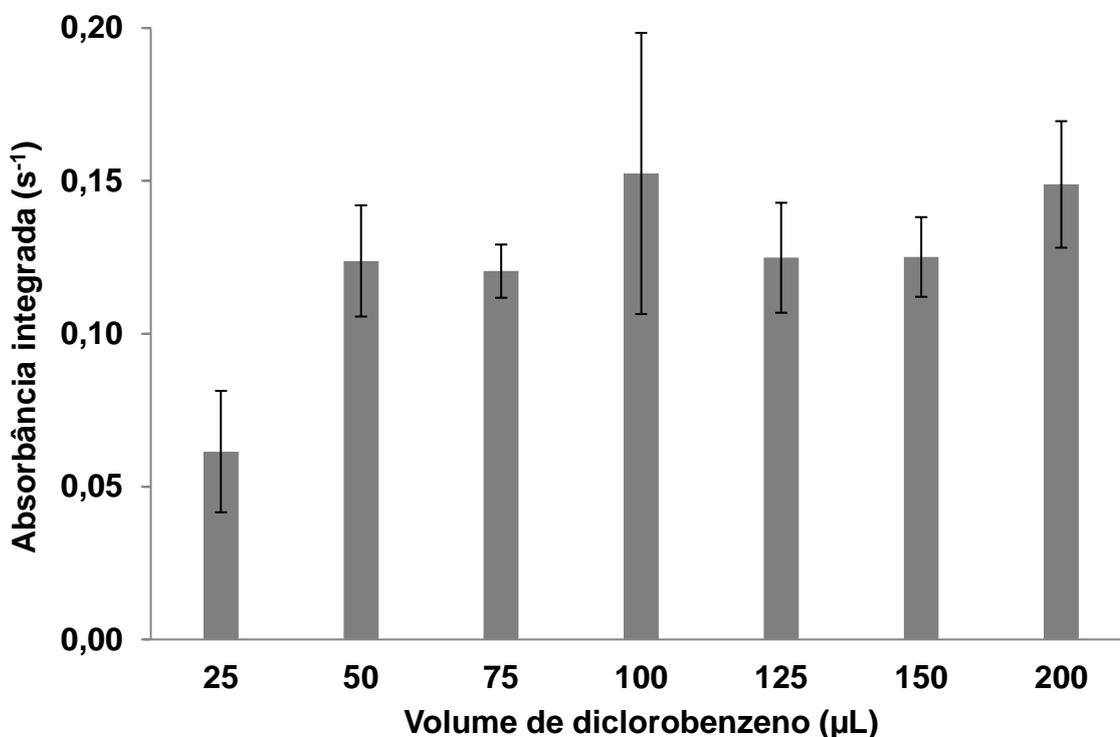
avaliados (Sant'Ana *et al.*, 2003). Portanto, o  $C_6H_4Cl_2$  foi selecionado para ser o solvente extrator para todas as otimizações subsequentes devido a sua alta recuperação de extração de Fe e baixo valores de RSD (12%), valor correspondente aos resultados obtidos na escolha de solvente extrator.

#### 4.2. ESCOLHA DO VOLUME DO SOLVENTE EXTRATOR

Conforme encontrado na literatura (Viña *et al.*, 2014), a avaliação do volume do solvente extrator é uma etapa importante, pois este tem grande influência sobre o fator de pré-concentração. Quando o volume do solvente é aumentado, o volume da fase sedimentada obtida após a centrifugação aumenta e o fator de pré-concentração diminui. Portanto, o volume ideal deve garantir fatores de pré-concentração elevados e um volume suficiente da fase sedimentada para análise subsequente após a centrifugação. Inicialmente, para a escolha do solvente extrator, foi fixado o volume de 100  $\mu$ L de solvente, conforme trabalho relatado na literatura (Silveira *et al.*, 2022). Assim sendo, para avaliar o efeito do volume de solvente extrator ( $C_6H_4Cl_2$ ), foram investigados diferentes volumes (25, 50, 75, 100, 125, 150 e 200  $\mu$ L). Para essa avaliação, o volume de amostra foi fixado em 10 mL.

Os resultados da escolha do volume de  $C_6H_4Cl_2$  como solvente extrator sobre a eficiência na extração do Fe por DLLME estão mostrados na Figura 3.

Figura 3 – Avaliação do volume de  $C_6H_4Cl_2$  como solvente para extração de Fe. Condições experimentais: 10 mL de cerveja, 500  $\mu L$  de complexante DDTC 1% (m/v), 4 min de centrifugação a 3500 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão ( $n = 7$ ).



Fonte: (Autor, 2023).

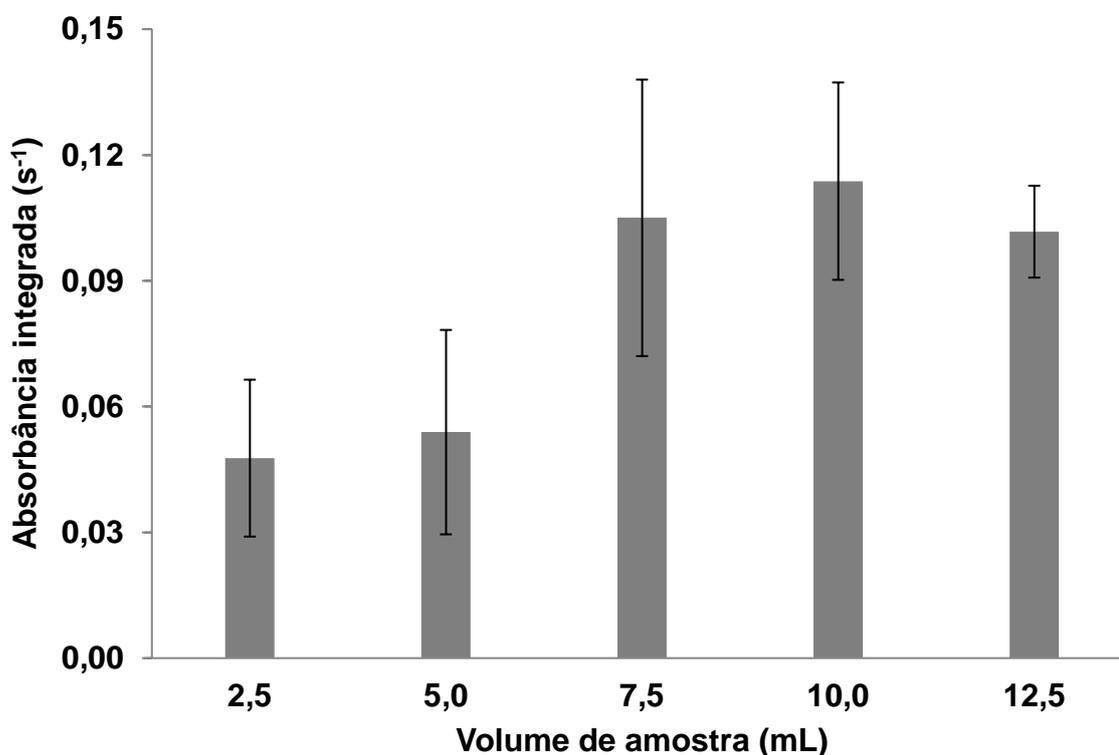
De acordo com os resultados mostrados na Figura 3, foi observado que o volume de 25  $\mu L$  apresentou um comportamento diferente dos demais volumes e as maiores recuperações foram encontrados nos volumes maiores. O volume de 100  $\mu L$  apresentou maior eficiência na extração de Fe, porém com maior valor de RSD (30%), inviabilizando sua escolha como volume de solvente extrator para os experimentos subsequentes. Por outro lado, os volumes de 50, 75, 125, 150 e 200  $\mu L$  apresentaram uma boa recuperação na extração de Fe e um valor de RSD relativamente baixo (7,22). Nessa perspectiva, foi utilizado a ANOVA (95% de nível de confiança). A partir da ANOVA observou que os volumes não apresentaram diferença significativa. Então, procurou-se usar o menor volume possível com o menor desvio padrão, de modo que o volume de 75  $\mu L$  de  $C_6H_4Cl_2$  foi escolhido como a condição mais apropriada para os experimentos subsequentes.

#### 4.3. ESCOLHA DO VOLUME DE AMOSTRA

Além dos volumes de amostra previamente avaliados (5 e 10 mL), também foram avaliados outros volumes de amostra (2,5, 7,5 e 12,5 mL). Para estes experimentos foi utilizado 75  $\mu\text{L}$  de  $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$  como solvente extrator, bem como foram fixados os seguintes parâmetros de DLLME previamente otimizados: 75  $\mu\text{L}$  de  $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$ , 500  $\mu\text{L}$  de complexante DDTC 1% (m/v), 100  $\mu\text{L}$  de solvente extrator, 4 min de centrifugação a 3500 rpm e 2 etapas de lavagem.

Os resultados da escolha do volume de amostra encontrados estão mostrados na Figura 4.

Figura 4 – Efeito da variação do volume da amostra para extração de Fe. Condições experimentais: variação do volume da amostra entre 2,5 e 12,5 mL, 75  $\mu\text{L}$  de  $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$ , 500  $\mu\text{L}$  de complexante DDTC 1% (m/v) 4 min de centrifugação a 3500 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão ( $n = 7$ ).



Fonte: (Autor, 2023).

O volume da amostra é um parâmetro que pode afetar a eficiência de extração. Isso se explica pelo fato de o volume de amostra ser uma variável importante porque o fator de enriquecimento aumenta com o aumento da proporção entre volume de

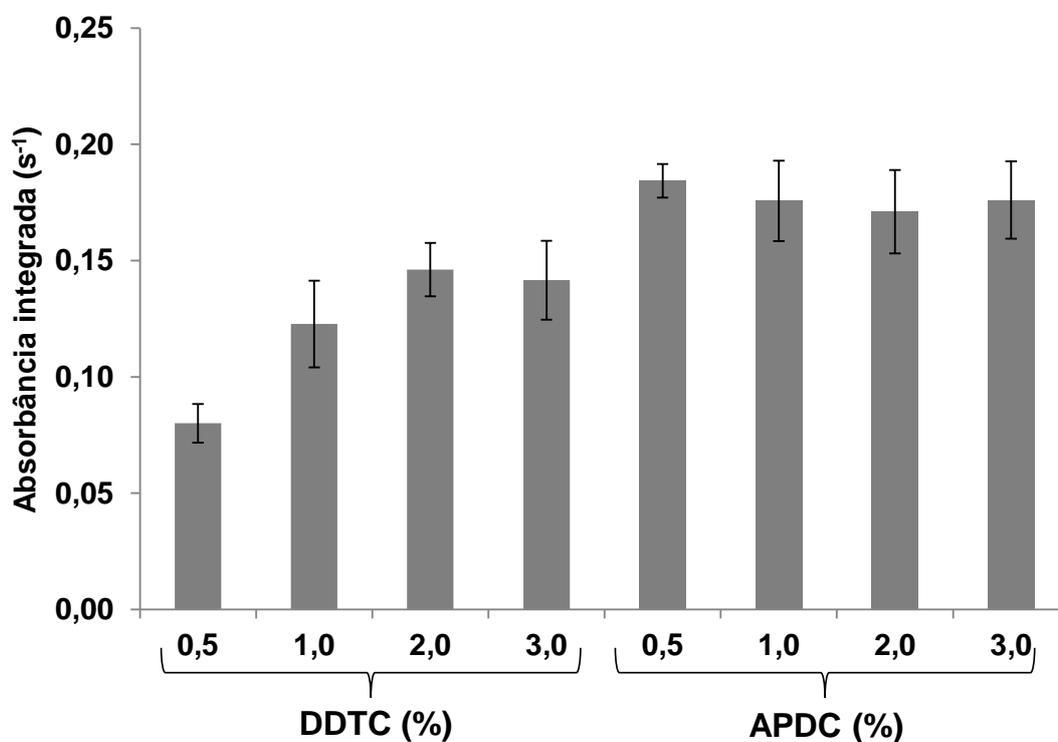
amostra e volume de solvente extrator. Em geral, os volumes de amostra variam entre 5 e 40 mL, embora a eficiência máxima de extração seja normalmente alcançada com volumes de amostra de 10-20 mL, pois volumes maiores dificultam a transferência de massa e a extração dos analitos para fase orgânica (Campillo *et al.*, 2010).

Conforme mostrado na Figura 4, os menores volumes como 2,5 e 5,0 mL apresentaram os menores valores de absorvância integrada em comparação aos volumes maiores. Assim sendo, ao aumentar o volume de amostra, ou seja, a quantidade de analito disponível, os valores de absorvâncias aumentaram. No entanto, o sinal de absorvância para 12,5 mL diminuiu, o que pode ser explicado pela diluição da fase sedimentada na amostra, pois volumes maiores podem dificultar a transferência de massa e a extração dos analitos para fase orgânica (Campillo *et al.*, 2010). É importante mencionar que os volumes de 7,5, 10 e 12,5 mL, não apresentaram diferença significativa, apresentando o valor de absorvância entre 0,11, 0,11 e 0,10, respectivamente. Ainda, a condição de 12,5 mL apresentou menor valor de RSD, igual a 10,79%, em comparação com as demais condições. No entanto, o volume de 12,5 mL não foi escolhido tendo em vista o volume máximo (15 mL) dos tubos de vidros utilizados, dificultando o manuseio após aferição do volume total do método proposto. Após essas avaliações, o volume de 10 mL foi escolhido como a melhor condição para dar continuidade aos experimentos.

#### 4.4. CONCENTRAÇÃO E TIPO DE COMPLEXANTE

Os procedimentos de DLLME utilizados para extração de elementos exige o uso de um ligante/complexante adequado para transferir analitos para o solvente extrator. Dessa forma, tem sido proposta a utilização de diferentes tipos de agentes quelantes, com destaque para o APDC e o DDCT (Grzésekowiak *et al.*, 2011). Neste estudo, foram utilizados os dois agentes quelantes e avaliado o efeito da sua concentração na resposta analítica para Fe. Por esta razão, foram utilizadas diferentes concentrações de APDC e DDTC, nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,0 e 3% (m/v), para ambos os complexantes conforme mostrado na Figura 5. Os resultados da escolha da concentração e tipo de complexante obtido na avaliação para otimização dos experimentos subsequentes estão mostrados na Figura 5.

Figura 5 – Avaliação do efeito da concentração de APDC e DDTC como complexantes para extração de Fe. Condições: 10 mL de cerveja, 500  $\mu$ L de complexante de DDTC e APDC variando porcentagem entre 0,5, 1,0, 2,0 e 3%, 75  $\mu$ L de solvente extrator ( $C_6H_4Cl_2$ ), 4 min de centrifugação a 3500 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão ( $n = 7$ ).



Fonte: (Autor, 2023).

Na comparação entre os complexantes, observou-se que houve maior eficiência na extração de Fe com o complexante APDC que apresentou maior valor de absorbâncias em relação ao DDTC.

Destaca-se que, em todas as condições otimizadas, que foi necessária uma leve agitação manual nos tubos de vidro durante o procedimento de DLLME. Após essa leve agitação, observou-se a formação de uma dispersão com microgotas. Essas microgotas, aumentam a área superficial e favorecem o processo de extração.

Os agentes complexantes avaliados neste trabalho têm sido utilizados em inúmeros trabalhos empregando DLLME para diferentes elementos, o que os caracteriza como de baixa seletividade. Desta maneira, em baixas concentrações, além de haver baixa disponibilidade de complexante, ainda ocorre a competição da reação com outros íons presentes na solução da amostra Fe(III) e Fe(II) (Pereira *et al.*, 2013).

Dessa forma, agentes quelantes (APDC e DDTC) não são seletivos e reagem com muitos íons metálicos. Em um meio reacional competitivo, o agente quelante pode reagir com várias espécies metálicas como no caso de APDC, reduzindo assim a eficiência de extração do analito. A este respeito, os efeitos interferentes de outros elementos foram descritos na literatura e cátions com potencial interferente como Cr, Zn, Cd, Pb, Cu, Ca e Mn não afetaram os resultados. (Giokas *et al.*, 2001).

Na literatura (Grieken *et al.*, 1982; Salvador *et al.*, 2002 Pereira, *et al.*, 2013) os carbamatos são reagentes muito usados pela baixa solubilidade em soluções aquosas. O APDC é comumente utilizado por ser um agente quelante não específico, que reage com íons metálicos, formando um complexo muito estável com a maioria dos metais de transição.

De acordo com a literatura Pereira *et al.*, 2013, conforme mencionada, a solubilidade do complexo  $\text{Fe}(\text{APDC})_3$  em 1,2-diclorobenzeno é maior do que em outros solventes devido às interações entre o grupo hidrofóbico do complexo e as propriedades não-polares. Além disso,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$  apresenta alta capacidade de extração e baixa solubilidade em água, o que permite a sua utilização na extração e pré-concentração no método de DLLME.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 5, o agente complexante que atingiu maior eficiência de extração para Fe foi o APDC. Por outro lado, nas mesmas concentrações (0,5, 1,0, 2,0, e 3,0%) avaliadas para ambos os complexantes (APDC e DDTC), o complexante DDTC, teve uma baixa recuperação na extração de Fe supostamente pela incompleta complexação de Fe(III) pelo APDC. O Fe(III) é então determinado, pela subtração da concentração de Fe(II) de Fe total. As concentrações e tipo de complexante com maiores valores de absorvância foi atribuído ao complexo APDC devido a sua propriedade de reagir favoravelmente com íons metálicos e ao bom desempenho na extração de Fe. Portanto, APDC 0,5% foi escolhido neste estudo como o complexante para todas as otimizações subsequentes.

#### 4.5. EFEITO DO pH

De acordo com a literatura, muitos trabalhos (Pereira *et al.*, 2013); Giokas *et al.*, 2001) mostram que o pH da amostra é um dos fatores importantes para a formação de um quelato metálico nas extrações usando a DLLME. O procedimento de ajuste de pH do meio facilita que os analitos permaneçam na forma neutra, permitindo assim a

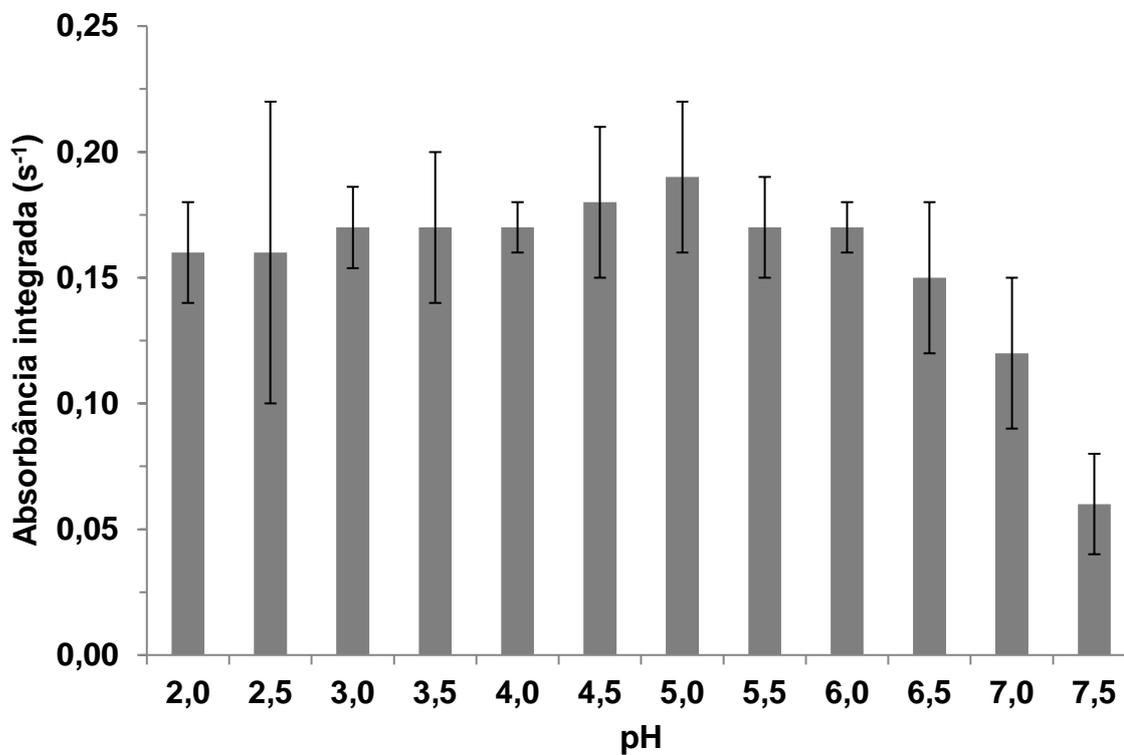
partição dos analitos nas microgotas no solvente extrator. O pH da solução pode afetar de forma significativa na extração do Fe, sendo que o pH ótimo para a extração varia de acordo com o agente complexante utilizado no procedimento em estudo.

O efeito do pH na formação do complexo e extração de Fe por DLLME foi avaliado para os valores de pH entre 2,0 e 7,5. Para isso, foi feito o ajuste de pH nas alíquotas de amostra utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ou  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Os resultados obtidos na avaliação do efeito do pH na extração de Fe estão mostrados na Figura 6.

Como pode ser observado na Figura 6, os resultados mostram que os valores de absorvância para Fe foram maiores para soluções ácidas, isso mostra que, a eficiência máxima de extração de Fe por 0,5% APDC foi alcançada numa faixa de pH 4,5 a 5,0. Foi observada uma diminuição significativa da eficiência de extração a um pH de 7,5. Este fato pode ter tido por três razões, ou seja, variações de pH, formação de espécies não extraíveis durante a neutralização antes da extração e mistura insuficiente das fases aquosa e orgânica. Conforme os resultados da Figura 6, a concordância máxima foi alcançada em pH próximo de 5, mas tendo em conta o elevado valor de RSD de cerca de 14, em comparação com pH original da amostra (pH em torno de 4,0), o valor de RSD foi igual a 6. Para os valores de pH entre 2,0 e 6,5 não houve diferença significativa (ANOVA). Portanto, não foi necessário o ajuste de pH das amostras para experimentos subsequentes, uma vez que as 3 amostras em estudo apresentaram valores de pH entre 4,0 e 4,5, o que minimiza número de etapas do procedimento.

Figura 6 – O efeito do pH na amostra para extração de Fe. Condições experimentais: 10 mL de cerveja, solvente extrator, 500  $\mu\text{L}$  de complexante APDC 0,5%, 75  $\mu\text{L}$  de solvente extrator

diclorobenzeno ( $C_6H_4Cl_2$ ), 4 min de centrifugação a 3500 rpm e 2 etapas de lavagem. As barras de erros representam o desvio padrão ( $n = 7$ ).



Fonte: (Autor, 2023).

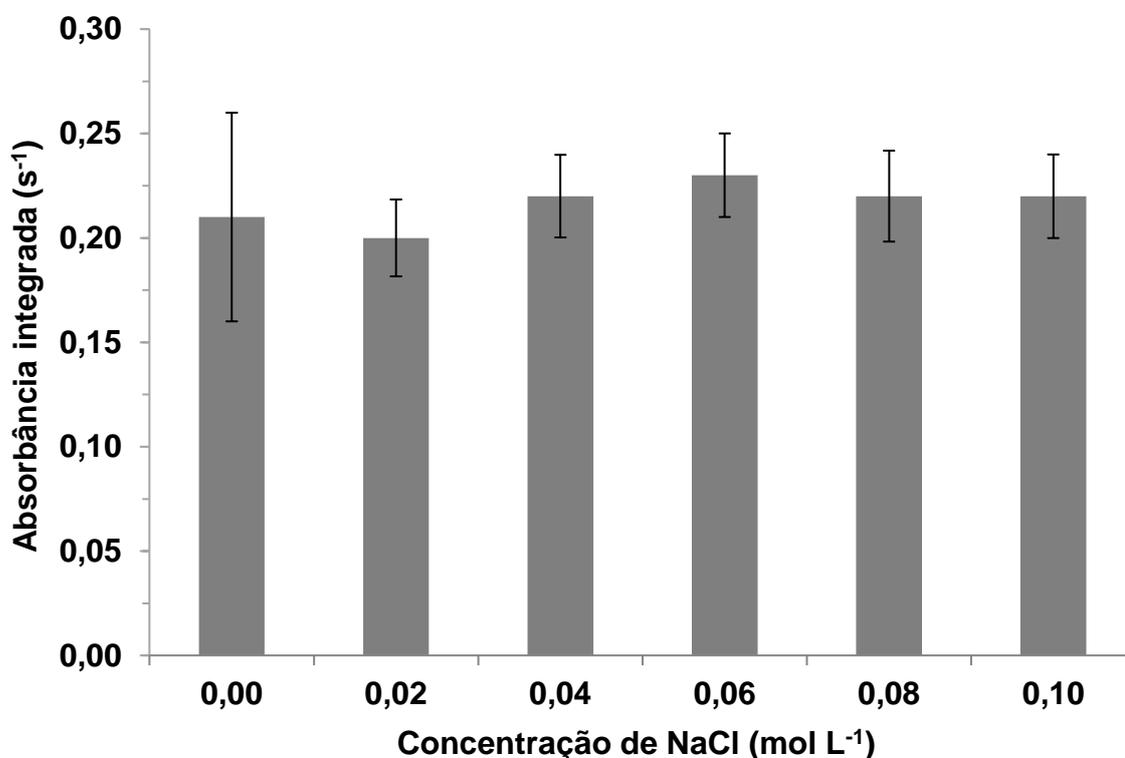
#### 4.6. EFEITO DA ADIÇÃO DE SAL

Foi feito o estudo de adição de sal na amostra para avaliar a eficiência de extração de Fe. Como descrito na literatura (Fayazi *et al.*, 2011;), a adição de sal pode ter efeitos diferentes quando soluções iônicas são utilizadas. Assim, foram aplicadas diferentes condições para avaliar a influência da adição de sal, onde NaCl com as concentrações de 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 e 0,1 mol L<sup>-1</sup> adicionado à amostra, bem como uma condição sem adição de sal.

Na Figura 7 estão mostrados os resultados encontrados sobre o efeito de adição de sal na amostra para extração de Fe.

Figura 7 – O efeito de adição de sal na microextração Fe por DLLME a partir das seguintes condições experimentais: 10 mL de solução da amostra de cerveja, 75  $\mu$ L de diclorobenzeno como

solvente extrator, 500  $\mu\text{L}$  de complexante e 5 min de centrifugação. As barras de erros representam o desvio padrão ( $n = 7$ ).



Fonte: (Autor, 2023).

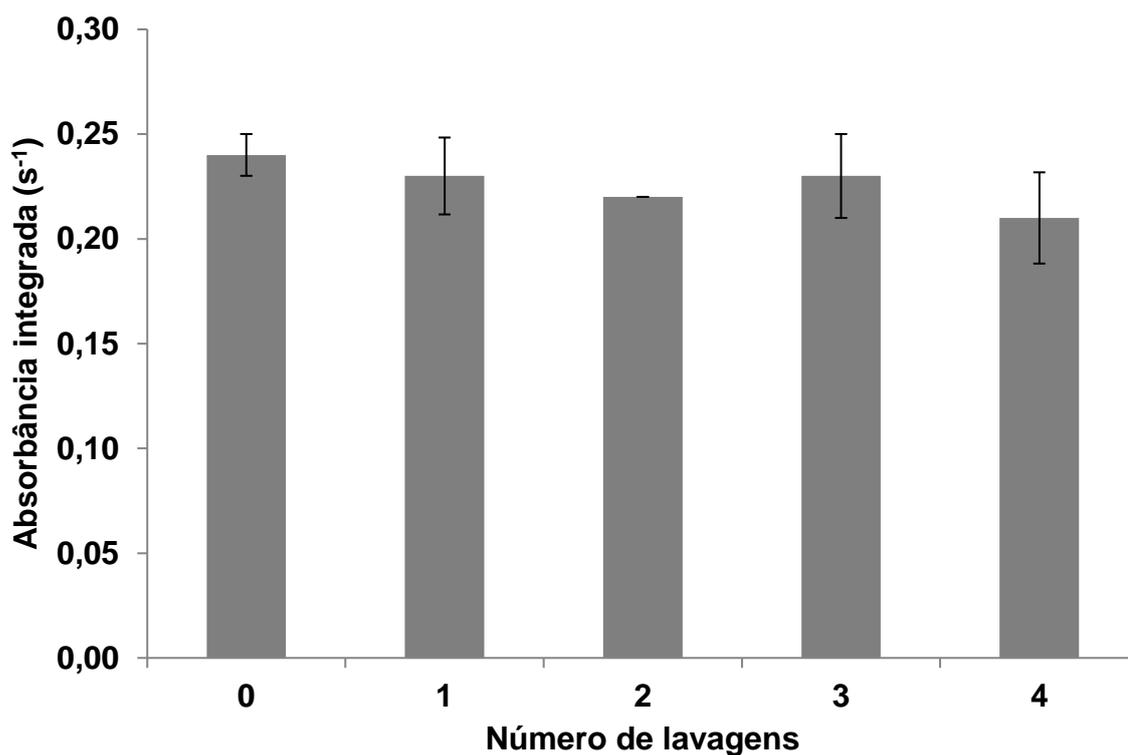
De acordo com o resultado apresentado na Figura 7, concentrações de 0,04, 0,06, 0,08 e 0,10  $\text{mol L}^{-1}$  aparentemente apresentaram maiores valores de absorbância integrada em comparação as menores concentrações de sal. Isso pode ser explicado pois, conforme a literatura (Fayazi *et al.*, 2011; Maciel *et al.*, 2014; Zedan *et al.*, 2023), a adição de sal pode aumentar a eficiência da extração, uma vez que reduz a solubilidade do complexo na fase aquosa, favorecendo a transferência do analito para a fase orgânica. No entanto, a adição em excesso de sal pode levar à formação de emulsões ou aumentar a viscosidade da solução aquosa, dificultando a separação das fases.

Entretanto, como não houve diferença entre os resultados, foi escolhida a condição sem adição de NaCl, diminuindo o número de etapas do método.

#### 4.7. NÚMERO DE LAVAGENS

De acordo com a literatura (Seeger *et al.*, 2015), pode ser necessária uma etapa de lavagem do extrato com a água ultrapura para remover eventual material sólido oriundo da matriz, o que pode causar interferências na etapa de determinação. Portanto, no desenvolvimento desse estudo, para avaliação do número de etapas de lavagem, foram avaliados 0, 1, 2, 3 e 4 etapas de lavagens. Cabe salientar que durante a otimização dos parâmetros da DLLME, sempre foram aplicadas duas etapas de lavagem, de acordo com o procedimento previamente descrito na literatura para amostra de cerveja (Silveira *et al.*, 2022). Os resultados obtidos na otimização do efeito de número das etapas de lavagem estão mostrados na Figura 8.

Figura 8 – Efeito do número de etapas de lavagem após a extração por DLLME. Condições experimentais: 10 mL de cerveja, 75  $\mu\text{L}$  de diclorobenzeno como solvente extrator, 500  $\mu\text{L}$  de complexante e 5 min de centrifugação. As barras de erros representam o desvio padrão ( $n = 7$ ).



Fonte: (Autor, 2023).

A otimização da etapa de lavagem é necessária, porque a lavagem inadequada pode levar a resultados imprecisos e não confiáveis, devido à contaminação do extrato por resíduos de solventes orgânicos e interferentes. Por outro lado, a lavagem

excessiva pode resultar em perda de analito (Seeger *et al.*, 2015, Jeannot e Cantwell, 1996).

De acordo com os resultados mostrados na Figura 8, os valores não apresentaram diferença significativa (ANOVA), não sendo necessária uma etapa adicional de lavagem.

Após a otimização das condições de extração de Fe em cerveja por DLLME, foram estabelecidas as melhores condições de extração, as quais estão mostradas na Tabela 2.

Tabela 3 – Condições escolhidas para extração de Fe por DLLME

| Parâmetros                       | Condições                                     |
|----------------------------------|---|
| Tipo de solvente extrator        | C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> |
| Volume de solvente extrator (µL) | 75  |
| Volume de amostra (mL)           | 10  |
| Concentração de APDC (% m/v)     | 0,5   |
| pH                               | Não requer ajuste                             |
| Adição de sal                    | Não requer adição                             |
| Etapas de lavagem                | Não requer etapas                             |

Fonte: (Autor, 2023)

#### 4.8. APLICAÇÃO E DESEMPENHO DO MÉTODO DLLME/F AAS

Os parâmetros de mérito de um método analítico são medidos para avaliar o desempenho do método. Dentre os parâmetros mais comuns estão a sensibilidade, linearidade, LOD e LOQ, seletividade, precisão e exatidão. Na extração por DLLME, esses parâmetros podem ser afetados por diversos fatores, como a escolha do tipo e volume do solvente extrator, volume de amostra, concentração e tipo de complexante, o pH da amostra, adição de sal na amostra e o número de etapas de lavagem.

Para calibração do equipamento, foi preparada uma curva de calibração externa com concentração entre 0,05 e 0,25 mg L<sup>-1</sup> em água ultrapura, a partir de uma solução estoque de 10 mg L<sup>-1</sup> de Fe(III). Foi possível a obtenção de um coeficiente de correlação satisfatório ( $R^2 > 0,99$ ), mostrando uma boa linearidade na faixa de concentração utilizada. Vale ressaltar que a curva de calibração foi submetida ao procedimento completo de DLLME.

Para avaliar a exatidão e a precisão, foi aplicado um método de referência (decomposição por MAD e determinação de Fe por ICP-OES), a partir da decomposição das 3 amostras de cerveja, como mostrado na Tabela 3. Os valores de absorbância foram convertidos utilizando a equação da reta obtendo então os valores em concentração para calcular o LOD e LOQ do método. Assim, o LOD, calculado como 3 vezes o desvio padrão somado à média do branco foi de  $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . O LOQ, calculado como 10 vezes o desvio padrão somado à média do branco foi de  $9,0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Os resultados obtidos de LOD e LOQ neste trabalho são similares aos de alguns métodos baseados na extração e pré-concentração encontrados na literatura (Pereira *et al.*, 2013) para determinação de Fe em amostra de água, onde os valores de LOD e LOQ obtidos foram de  $6,1$  e  $18,3 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

Para aplicação do método DLLME/F AAS proposto, foram analisadas 3 amostras, as quais também foram usadas para obtenção dos valores comparativos empregando MAD e detecção de Fe por ICP-OES, para fins de avaliação da exatidão. Os resultados estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 4 – A determinação de Fe por ICP-OES após MAD ( $n = 3$ ) e por F AAS após DLLME ( $n = 7$ ). Os resultados ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) expressam a média  $\pm$  desvio padrão.

| <b>Amostra</b> | <b>MAD/ICP-OES</b> | <b>DLLME/F AAS</b> |
|----------------|--------------------|--------------------|
| Cerveja 1      | $57,2 \pm 5,4$     | $68,2 \pm 5,6$     |
| Cerveja 2      | $89,3 \pm 2,7$     | $93,7 \pm 12,3$    |
| Cerveja 3      | $54,5 \pm 2,1$     | $59,7 \pm 3,2$     |

Fonte: (Autor, 2023).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, após aplicação do método proposto DLLME/F AAS para as 3 amostras, foi possível obter exatidão adequada em comparação com o método de referência, de acordo com as diretrizes de validação (AOAC, 2002; ICH, 2002) (critérios aceitáveis 75 a 120% e 80 a 120%, respectivamente), com uma concordância que varia entre 104 e 119%. É importante salientar que em outros estudos foram encontradas diferentes concentrações de Fe em cerveja, todas inferiores a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , independentemente das marcas ou dos países (Pohl, 2008). Portanto, os resultados encontrados neste trabalho estão de

acordo com os relatados na literatura. Além disso, o método proposto tornou possível alcançar um LOQ adequado ( $9,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

O método proposto apresenta as vantagens como, simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, alta recuperação, alto fator de pré-concentração e menores riscos operacionais, por usar baixo volume de solventes orgânicos clorados.

## 5. CONCLUSÃO

A extração e pré-concentração de Fe por DLLME/F AAS utilizando o complexante APDC é um método eficiente e promissor para a determinação de Fe em amostra de cerveja. O método apresenta vantagens significativas, como simplicidade, rapidez e baixo custo para a extração de Fe. Além disso, a DLLME é menos impactante ao meio ambiente, pois utiliza quantidades mínimas (poucos microlitros) de solventes clorados.

Apesar de muitos trabalhos reportados na literatura mostrarem que o pH do meio influencia de forma significativa na eficiência de extração, neste trabalho o pH não teve influência. Além disso, o método desenvolvido mostrou boa precisão e exatidão, além de baixos valores de LOQ, permitindo seu uso em análises de rotina para determinação de Fe em amostras de cerveja e matrizes similares, sendo que o método proposto atendeu a legislação de acordo com a literatura (Pohl, 2008; Filik e Giray, 2012).

Por fim, o método de DLLME seguido da determinação de Fe por F AAS tem mostrado grande potencial para a determinação precisa e confiável de Fe em amostras complexas, podendo ser considerado um método importante para a análise química em diversas áreas, incluindo a ciência ambiental, biológica e de alimentos, apresentando boa precisão e exatidão. Por outro lado, um ponto crucial é a utilização da DLLME como um método que permite a pré-concentração, onde a fase sedimentada (extrato) pode ser manipulada de acordo com a técnica de determinação.

## REFERÊNCIAS

- Almendral, M. J. *et al.*, Determination of iron in tap and waste water using liquid-liquid extraction in a flow-injection system. **Microchimica Acta**. v. 147 p. 117-123 (2004).
- Al-Saidi, H. M.; Emara, A. A. The recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration and determination of inorganic analytes. **Journal of Saudi Chemical Society**. v. 18 p. 745-761 (2014).
- Association of official analytical chemistry (AOAC). Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and Botanicals. (2002).
- Bhatia, K. Neurodegeneração with brain iron accumulation disorders: **Handbook Journal Neurology**. v. 258 p. 8-8 (2011).
- Campillo, N. *et al.* Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of chlorophenols and haloanisoles in wines and cork stoppers using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1217 p. 7323-7330(2010).
- Chatzimitakos, T. *et al.* Exploring the feasibility of cloud-point extraction for bioactive compounds recovery from food by products: A review. **Biomass**. v. 3 p. 306-322 (2023).
- Chirayil, C. J. *et al.* Instrumental techniques for the characterization of nanoparticles, in: Thermal and rheological measurement techniques for nanomaterials characterization. **College of Engineering, Kottayam, India**. (2017)
- Citak, D.; Tuzen, M.; Soylak, M. Simultaneous coprecipitation of lead, cobalt, copper, cadmium, iron and nickel in food samples with zirconium (IV) hydroxide prior to their flame atomic absorption spectrometric determination. **Food and Chemical Toxicology**. v. 47 p. 2302-2307 (2009).
- Cornelis, R. *et al.* Handbook of elemental speciation II: Species in the environment, food, medicine & occupational health. **John Wiley & Sons**. v. 13 (2003).
- Dadfarnia, S., Haji Shabani, A. M., Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals-A review. **Analytica Chimica Acta**. v. 658 p. 107-119 (2010).
- Dmitrienko, S.G. *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction of organic compounds: An overview of reviews. **Journal of Analytical Chemistry**. v. 75 p. 867-884 (2020).

Domínguez, I. *et al.* Extraction of benzene from aliphatic compounds using commercial ionic liquids as solvents: Study of the liquid-liquid equilibrium at T = 298.15 K. **Journal of Chemical Engineering**. v. 56 p.3376-3383 (2011).

Fayazi, M.; Afzali, D.; Mostafavi, A. Pre-concentration procedure using dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of bismuth by flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry Spectrometry**. v. 26 p. 2064-2068 (2011).

Feist, B.; Mikula, B. Preconcentration of heavy metals on activated carbon and their determination in fruits by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Food Chemistry**. v. 147 p. 302-306 (2014).

Filik, H.; Giray, D. Cloud point extraction for speciation of iron in beer samples by spectrophotometry. **Food Chemistry**. v. 130 p. 209-213 (2012).

Gharehbaghi, M. Shemirani, F. Baghdadi, M. Dispersive liquid-liquid microextraction and spectrophotometric determination of cobalt in water samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**. v. 88 p. 513-523 (2008).

Giokas, D. L. *et al.* Single-sample cloud point determination of iron, cobalt and nickel by flow injection analysis flame atomic absorption spectrometry-application to real samples and certified reference materials. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 16 p. 521-526 (2001).

Grieken, R. V. Preconcentration methods for the analysis of water by x-ray spectrometric techniques. **Analítica Química Acta**. v. 143 p. 3-34 (1982).

Grzésekowiak, A.; Grzésekowiak, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. **TrAC-Trends in Analytical Chemistry**. v. 30 p. 1382-1399 (2011).

Haider, L. Inflammation, iron, energy failure, and oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis. Review Article. **Hindawi**. v. 10 p.725370 (2015).

Hilson, S. P. J. Química Analítica. McGraw-Hill. Trad. Mauro Silva. 9ª Editora. São Paulo. **Mcgraw Hill**. p. 451 (2009).

Ibrahim, W. A. W. *et al.* Application of solid-phase extraction for trace elements in environmental and biological samples. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. v. 44 p. 233-254 (2014).

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia e Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos - **DOQ-CGCRE**. v. 008. (2007).

International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of analytical procedures Q2 (R2). **ICH Harmonised Guideline**. (2002).

International Conference on Harmonised ICH tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1). **International Conference on Harmonization** (1994).

Jahromi, E. Z. *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry: Ultra trace determination of cadmium in water samples. **Analytica Chimica Acta**. v. 585 p. 305-311 (2007).

Jamil, L. A. Optimization of new sample preparation technique for the determination of methadone and codeine in plasma sample by GC-FID. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 31 p. 580-588 (2020).

Jeannot, M. A.; Cantwell, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical Chemistry**. v. 68 p. 2236–2240 (1996).

Kanchi, S.; Singh, P.; Bisetty, K. Dithiocarbamates as hazardous remediation agent: A critical review on progress in environmental chemistry for inorganic species studies of 20th century. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 7 p.1878-5352 (2014).

Keukeleirc, D., Fundamentals of beer and hop chemistry. **Quimica Nova**. v. 23 p. 108-112 (2000).

Khani, R.; Shemirani, F.; Majidi, B. Combination of dispersive liquid-liquid microextraction and flame atomic absorption spectrometry for preconcentration and determination of copper in water samples. **Desalination**. v. 266 p. 238-243. (2011).

Komjarova, I.; Blust, R. Comparison of liquid-liquid extraction, solid-phase extraction and co-precipitation preconcentration methods for the determination of cadmium, copper, nickel, lead and zinc in seawater. **Analytica Chimica Acta**. v. 576 p. 221-228 (2006).

Kozak, J. *et al.* Simple flow injection method for simultaneous spectrophotometric determination of Fe(II) and Fe(III). **Analytica Chimica Acta**. v. 702 p. 213-217 (2011).

Kremling, K.; Petersen, H. APDC-MIBK extraction system for determination of copper and iron in 1 cm<sup>3</sup> of sea-water by flameless atomic-absorption spectrometry. **Analytical Chimica Acta**. v. 70 p. 35-39 (1974).

Krug, F. J.; Rocha, F. R. P. Métodos de preparo de amostras para análise elementar. 2. Edição. São Paulo. **Sociedade Brasileira de Química**. p. 590 (2019).

Leão, P. R. P. *et al.* Beer. Sample decomposition using a reflux system for the monoelementar determination by F AAS/AES and multielementar determination by MIP-OES. **Brazilian Journal Campinas**. v. 21 p. 2017062 (2018).

Maciel, J. V. *et al.* Feasibility of microwave-induced combustion for trace element determination in *engraulis anchoita* by ICP-OES. **Food Chemistry**. v. 145 p. 927-931 (2014).

Maciel, J. V. *et al.* Simple and fast method for iron determination in white and red wines using dispersive liquid-liquid microextraction and ultraviolet-visible spectrophotometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 62 p. 8340-8345. (2014).

Makwana, M.; Hati, S. Fermented beverages and their health benefits, in: Fermented Beverages: 1<sup>st</sup> Edition. **The Science of Beverages**. v. 5 (2019).

Martins, M. L. *et al.* Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): Fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**. v. 4 p. 35-51 (2012).

McElhaney, *et al.* Granzyme B: Correlates with protection and enhanced CTL response to influenza vaccination in older adults. **Vaccine**. v. 27 p. 2418-2425 (2009).

Mello, P. A. *et al.* Sample preparation methods for subsequent determination of metals and non-metals in crude oil - A review. **Analyca Chimica Acta**. v. 746 p. 15-36 (2012).

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 Chemical Society**. v. 55 p. 369-376 (2008).

Moreira, B. J. *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME): Principles, innovations and biological applications. **Scientia Chromatographica**. v. 6 p. 186-204 (2014).

Nascimento, L. B. *et al.* Iron and Neurodegeneration: From Cellular Homeostasis to Disease. **Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 128647 p. 8 (2012).

Naseri, M. T. *et al.* Rapid determination of lead in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**. v. 75 p. 56-62 (2008).

Neto, D. M. C. *et al.* Conceitos químicos envolvidos na produção da cerveja: Uma revisão. **Revista Virtual de Química**. v. 12 p. 120-147 (2020).

Paiva, D. L. Introdução à espectroscopia. Trad. Pedro Barros, 4<sup>a</sup> edição. **São Paulo**. p. 716 (2010).

Pereira, E. R. *et al.* Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for iron extraction and preconcentration in water samples with different salinities. **Analytical Methods**. v. 5, p. 2273-2280 (2013).

Pereira, J. S. F. *et al.* Determination of metals and metalloids in light and heavy crude oil by ICP-MS after digestion by microwave-induced combustion. **Microchemical Journal**. v. 96 p. 4-11 (2010).

Pinheiro, F.C.; Barros, A.I.; Nóbrega, J. A. Evaluation of dilute-and-shoot procedure for determination of inorganic impurities in liquid pharmaceutical samples by ICP-OES. **Microchemical Journal**. v. 146 p. 948-956 (2019).

Pohl, P. Determination and fractionation of metals in beer. A review. **Food Additives and Contaminants**. v. 25 p. 693-703 (2008).

Polak, J.; Bartoszek, M.; Stanimirova, I. A study of the antioxidant properties of beers using electron paramagnetic resonance. **Food Chemistry**. v. 141 p. 3042-3049. (2013)

Poole, C. F.; Poole, S. K. Principles and practice of solid-phase extraction, in: Comprehensive Sampling and Sample Preparation: **Analytical Techniques for Scientists**. v. 37 p. 341-387 (2012).

Quigley, A.; Cummins, W.; Connolly, D. Dispersive liquid-liquid microextraction in the analysis of milk and dairy products: A review. **Journal of Chemistry**. v. 12 p. 40401665 (2016).

Rezaee, M. *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal Chromatography A**. v. 1116 p. 1-9 (2006).

Ribani, M. *et al.* Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**. v. 27 p.77-780 (2004).

Ribeiro, E. S. *et al.* Produção de cerveja e análise sensorial: um referencial teórico, in: Ciência e tecnologia de alimentos: Pesquisa e práticas contemporâneas. 1ª Ed. São Paulo. **Editores científicos digitais**. (2021).

Rosa, N. A.; Afonso, J. C. A Química da Cerveja. **Química Nova**. v. 37 p. 98-105 (2015).

Salvador, M. J. *et al.* Quality control of commercial tea by x-ray Fluorescence. **X-Ray Spectrometry**. v. 31 p. 141–144 (2002).

Sant'Ana, O. D. *et al.* Solid phase extraction of Cu(II) as diethyldithiocarbamate (DDTC) Complex by polyurethane foam. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 14 p. 728-733 (2003).

Seeger, T. S. *et al.* Feasibility of dispersive liquid-liquid microextraction for extraction and preconcentration of Cu and Fe in red and white wine and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**. v. 105 p. 136-140 (2015).

Silveira, J. R. K. *et al.* Copper determination in beer by flame atomic absorption spectrometry after extraction and preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction. **Microchemical Journal**. v. 184 p. 108181 (2023).

Soós, Á. *et al.* Microwave-assisted sample preparation of hungarian raw propolis in quartz vessels and element analysis by ICP-OES and ICP-MS for geographical identification. **Talanta**. v. 233 p. 122613 (2021).

Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R., Fundamentos de química analítica. Tradução da 8ª edição norte-americana. São Paulo-SP. **Editora Thomson**. P. 999 (2006).

Spietelun, A. *et al.* Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. **Talanta**. v. 119 p. 34-45 (2014).

Starowicz, M. Food and nutritional analysis | Sample preparation. **Encyclopedia of Analytical Science**. v. 3 p. 465-470 (2019).

Tabrizi, A.B. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for iron speciation and determination in different water samples. **Journal Hazardous Materials**. v. 183 p. 688-693 (2010).

Teixeira, A. P. C. *et al.* Iron: A versatile element to produce materials for environmental applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 23, p 1579-1593 (2012).

Trumbo, P. *et al.* Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 101 p. 294-301 (2001).

Urkude, R.; Dhurvey, V.; Kochhar, S. Pesticide Residues in Beverages, in: Quality Control in the Beverage Industry: **The Science of Beverages**. v. 17 p. 529-560 (2019).

Viñas, P. *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction in food analysis. A critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 406 p. 2067-2099 (2014).

Wang, M. *et al.* Effects of pressurized liquid extraction with dimethyl sulfoxide on the recovery of carotenoids and other dietary valuable compounds from the microalgae spirulina, chlorella and phaeodactylum tricornutum. **Food Chemistry**. v. 405 p. 134885 (2023).

Welz, B.; Sperling, M. Atomic absorption spectrometry. 3<sup>rd</sup> edition. **Wiley-VCH** (1999).

Wong, C. Iron deficiency anaemia. **Pediatrics and Child Health**. v. 27 p. 527-529 (2017).

Zedan, H. E.; Mortada, W. I.; Khalifa, M. E. Microextraction procedures for preconcentration of Fe(III) in water and food samples prior to colorimetric detection: Comparative study. **Journal of the Iranian Chemical Society**. v. 20 p. 645-653 (2023).

Williams, W. B.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**. v. 28 p. 25-30 (1995).