



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MAYARA COSTA DOS SANTOS

Microextração líquido-líquido dispersiva aplicada à extração e pré-concentração de cobre em amostras ambientais da região de Mata Atlântica do Sul da Bahia

ILHÉUS - BAHIA

2016

MAYARA COSTA DOS SANTOS

Microextração líquido-líquido dispersiva aplicada à extração e pré-concentração de cobre em amostras ambientais da região de Mata Atlântica do Sul da Bahia

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Santa Cruz como parte de requisito para obtenção do grau de mestre em Química.

Área de Concentração: Química Analítica Aplicada

Linha de pesquisa: Desenvolvimento de métodos analíticos

Orientador: Prof. Dr. Fábio Alan Carqueja Amorim

ILHÉUS - BAHIA

2016

S237 Santos, Mayara Costa dos.

Microextração líquido-líquido dispersiva aplicada à extração e pré-concentração de cobre em amostras ambientais da região da Mata Atlântica do Sul da Bahia / Mayara Costa dos Santos. – Ilhéus, BA: UESC, 2016.

xvii, 70 f. : il.

Orientador: Fábio Alan Carqueja Amorim.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Química.

Inclui referências.

1. Extração (Química). 2. Cobre – Concentração. 3. Espectrometria de massa. 4. Água – Análise. 5. Análise foliar. 6. Química analítica. I. Título.

CDD 543.8

MAYARA COSTA DOS SANTOS

**MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA APLICADA A
EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE COBRE EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS DA REGIÃO DE MATA ATLÂNTICA DO SUL DA BAHIA**

Ilhéus, 26/ 02/ 2016.



Prof. Dr. Fábio Alan Carqueija Amorim – UESC (Orientador)
Dr. em Química Analítica - UFBA



Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva – UESC
Dr. em Química Analítica - UFBA



Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos – UESB
Dr. em Química - UFBA

Dedico esta dissertação que representa uma etapa de minha vida as pessoas que mais amo e que contribuem significativamente em minha vida: minha mãe Edileusa, meus irmãos Samara e Paulo Tarcísio, meus tios, e meus avós Euflozina e Aurino (*In memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente por nunca ter me abandonado, por nunca ter permitido que eu abandonasse a minha fé e por nunca ter me deixado fraquejar, pois quando me sinto aflita, eu apenas oro e entrego minha vida em Suas mãos, porque até hoje o Senhor nunca me abandonou.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio Alan Carqueija Amorim, pela sua disponibilidade, acompanhamento exercido durante toda execução do trabalho, e incentivo. Agradeço nem só pelas orientações, mas pela amizade, conselhos e as broncas sempre que se fez necessário.

Aos professores do programa em Pós-Graduação em Química da UESC pelos os ensinamentos.

Aos colegas do laboratório Ívero, Ohana, Vinicius, Wesley, Marina, Caynne, Júlia e Luciano, pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos e colegas de pós-graduação Madson, Pablo, José Lucas, Luana e Elielma, pela parceria e incentivos.

As amigas que Deus me presenteou nos últimos meses da pós-graduação Tatielle, Analu e Clissiane, pelos incentivos, ajuda emocional, confiança, cuidado e acima de tudo a união em todos os âmbitos de minha vida.

As amigas(os) de longas datas Leyde, Aline, Lília, Aléxia, Nívia, Samara, Ana e Rafael, que mesmo de longe sempre torcem por cada pequena vitória minha.

A CAPES pela bolsa concedida.

Aos, quiçá, não foram citados, meus sinceros agradecimentos.

É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espíritos, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.

Theodore Roosevelt

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ocupação da lavoura cacaeira na região do Sul da Bahia. Fonte: CEPLAC, 2002.	26
Figura 2: a) folhas de cacaeiro sadio, (b) folhas de cacaeiro com efeitos do ataque da Vassoura de Bruxa, (c) fruto do cacaeiro sadio, (d) fruto do cacaeiro com efeitos do ataque da Vassoura de Bruxa.	27
Figura 3: Diagrama simplificado dos principais componentes de um FAAS.	29
Figura 4: Esquema simplificado do DI-SDME e HS-SDME. (Fonte: Dionísio, M. G. G.; Batistão, M. B., et al., 2010).	31
Figura 5: Esquema simplificado da microextração coma gota orgânica solidificada (Adaptado de Ghambarian, M. et al., 2013 [41]).	32
Figura 6: Princípio da microextração em fase líquida com fibra oca: (a) de três e (b) HF-LPME de duas fases. (Adaptado de Lee, j. et al. 2008 [44]).	33
Figura 7: Princípio da microextração líquido-líquido dispersiva. (Adaptado de Moreira, B. J., et al. 2014).	34
Figura 8: Fluxograma do procedimento para extração de elementos empregando DLLME.	35
Figura 9: Diagrama simplificado do método de microextração líquido-líquido dispersiva.	40
Figura 10: Influência do tipo de solvente dispersivos e extrator para microextração líquido-líquido dispersiva.	41
Figura 11: Superfícies de respostas: (a) VE x CC x absorvância; (b) pH x VD x absorvância; (c) CC x pH x absorvância, (d) VD x pH x absorvância, (e) VE x pH x absorvância e (f) VD x VE x absorvância.	44

Figura 12: Validação do modelo: a direita, valores preditos versus resíduos e a esquerda, dos valores observados versus valores preditos.	46
Figura 13: Adição de cloreto de sódio na microextração líquido-líquido dispersiva. .	48
Figura 14: Perfil do sinal analítico e background obtidos por FAAS.....	49
Figura 15: Curva analítica de cobre aplicando o método de microextração líquido-líquido dispersiva.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações máximas de cobre em água estabelecidas pelo CONAMA	23
Tabela 2: Limites máximos tolerável de cobre em alimentos e bebidas.....	24
Tabela 3: Limites recomendados de cobre em folhas.	25
Tabela 4: Propriedades físico-químicas de solventes extratores e dispersores.....	34
Tabela 5: Diferentes níveis e experimentos em diferentes variáveis.....	36
Tabela 6: Níveis codificados (entre parênteses) e valores reais da matriz Doehlert para as quatro variáveis estudadas.....	39
Tabela 7: Valores reais, codificados (entre parênteses) e respostas da Matriz Doehlert para otimização na determinação de cobre por DLLME.	43
Tabela 8: ANOVA usando modelo quadrático a um nível de 95% de confiança.	45
Tabela 9: Valores selecionados das variáveis.....	47
Tabela 10: Aplicação do método proposto na determinação de cobre em amostras de folhas vegetais (n=3).	53
Tabela 11: Resultados obtidos na determinação de cobre em amostra de água (n=3).	54
Tabela 12: Comparação de trabalhos publicados utilizando método microextração líquido-líquido para determinação de cobre.	56
Tabela 13: Comparação de trabalhos publicados utilizando outros métodos de separação e pré-concentração para determinação de cobre.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica, do inglês: <i>Atomic absorption spectrometry</i>
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
CC	Concentração do complexante
CONAMA	Conselho nacional do meio ambiente
CRM	Materiais de referência certificado, do inglês: <i>Certified reference materials</i>
DLLME	Microextração dispersiva líquido-líquido, do inglês: <i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>
EMBRAPA	Empresa brasileira de pesquisa agropecuária
FE	Fator de enriquecimento
EPN	Extração no ponto nuvem
FAAS	Espectrometria de absorção atômica em chama, do inglês: <i>Atomic absorption spectrometry in flame</i>
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês: <i>Atomic absorption spectrometry with graphite furnace</i>
HF- LPME	Microextração em fase líquida com fibra oca, do inglês: <i>Liquid phase microextraction fiber hollow</i>
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado, do inglês: <i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente, do inglês: <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês: <i>Liquid-liquid extraction</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LPME	Microextração em fase líquida, do inglês: <i>Liquid-phase microextraction</i>
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês: <i>Relative standard deviation</i>
SDME	Microextração em gota suspensa, do inglês: <i>Single drop microextraction</i>
SPE	Extração em fase sólida, do inglês: <i>Solid phase extraction</i>

USAE -	Microextração em gota orgânica solidificada por emulsão
SFODME	assistida por ultrassom, do inglês: <i>Microextraction organic drop solidified by ultrasonic assisted emulsion</i>
TAM	2-(2-tiazoliazó)-5-dimetilaminofenol
VD	Volume do solvente dispersor
VE	Volume do solvente extrator

RESUMO

Um novo método para extração e pré-concentração de íons Cu^{2+} em meio aquoso, usando microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) seguido de quantificação por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) foi desenvolvido. A extração foi efetuada utilizando 5,0 mL de solução-amostra, 2-(2-tiazoliazó)-5-dimetilaminofenol (TAM) como agente complexante e uma mistura de tricloroetileno (solvente de extração) e metanol (solvente dispersor). As condições otimizadas, através da metodologia matriz Doehlert, para os demais parâmetros foram: pH (7,5); concentração do TAM ($0,0036 \text{ mol L}^{-1}$); volume do solvente dispersor (1,30 mL); volume do solvente extrator (50,0 μL). O método proposto viabilizou a determinação do cobre com limite de detecção de $0,77 \mu\text{g L}^{-1}$ e limite quantificação de $2,57 \mu\text{g L}^{-1}$. A precisão, calculada como desvio padrão relativo ($n=11$), foi de 7,1% e 6,9% para as concentrações de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O fator de enriquecimento e o índice de consumo foram de 166,6 e 0,030 mL, respectivamente. A exatidão foi verificada através da análise de materiais de referência certificado NIST 1515-folha de maçã e NIST 1573a- folha de tomate, além de testes de adição/recuperação de analito em amostras de água. O método demonstrou ser simples, rápido, com baixo consumo de reagentes, e foi aplicado para determinação de cobre em amostras de águas (estuarina, mineral, subterrânea, de rio, e de abastecimento público) com concentrações variando de 1,77 a $8,14 \mu\text{g L}^{-1}$, e também aplicado em amostras de folhas de plantas frutíferas da mata Atlântica: cacau (*Theobromacococa*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), jaca (*Artocarpus beterothyllus* Lam.), jambo (*Syzygium jambos*) e banana (*Musa sp*), com concentrações de $4,92 \text{ mg kg}^{-1}$, $3,86 \text{ mg kg}^{-1}$, $2,85 \text{ mg kg}^{-1}$, $4,02 \text{ mg kg}^{-1}$ e $6,79 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente.

Palavras chave: Pré-concentração, cobre, DLLME, FAAS, água, folhas.

ABSTRACT

A new method for extraction and pre-concentration of ions Cu^{2+} in aqueous medium using dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) followed by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) quantification. The extraction was performed using 5.0 mL of sample solution, 2-(2-tiazoliazolo)-5-dimethylamino phenol (TAM) as a complexing agent and a mixture of trichloroethylene (extractor solvent) and methanol (disperser solvent). The optimized conditions for the following parameters were: pH (7.5), concentration TAM ($0.0036 \text{ mol L}^{-1}$) disperser solvent volume (1.30 mL) and the extractor solvent (50.0 μL). The proposed method allows the determination of copper with a detection limit of $0.77 \mu\text{g L}^{-1}$ and quantitation limit of $2.57 \mu\text{g L}^{-1}$. The precision, calculated as relative standard deviation ($n = 11$), was of 7.1% and 6.9% for concentrations of $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$ and $50.0 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The enrichment factor and the consumption rate were 0.030 and 166.6 mL, respectively. The accuracy was verified through the analysis of the certified reference materials 1515 NIST-apple leaves and NIST 1573a-tomato leaves, and by addition/recovery of analyte in real water samples. The method is simple, fast, with low reagent consumption, and was applied for determination of copper in water samples (estuarine, mineral, groundwater, drinking, and tap water) with concentrations in the range from 1.77 to $8,14 \mu\text{g L}^{-1}$, and also applied in samples of leaves of fruitful plants from tropical forest: cocoa (*Theobroma cocoa*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), jackfruit (*Artocarpus beterophyllus* Lam), iamb (*Syzygium jambos*) and banana (*Musa* sp), with concentrations of $4.92 \mu\text{g g}^{-1}$, $3.86 \mu\text{g g}^{-1}$, $2.85 \mu\text{g g}^{-1}$, $4.02 \mu\text{g g}^{-1}$ e $6.79 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively.

Keywords: preconcentration, copper, DLLME, FAAS, water, leaves.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 Introdução.....	18
1.2 Objetivos.....	21
1.2.1 Geral.....	21
1.2.2 Específicos.....	21

CAPÍTULO II - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O elemento químico cobre.....	22
2.1.1 Ocorrência e usos.....	22
2.1.2 Exposição humana e seus efeitos tóxicos.....	22
2.1.3 Uso do cobre na lavoura cacaueteira.....	25
2.1.4 Espectrometria atômica para quantificação de cobre.....	28
2.2 Pré-concentração por extração líquido-líquido (ELL) e microextração em fase líquido (LPME)	27
2.2.1 Microextração em gota suspensa (SDME).....	28
2.2.2 Microextração em gota orgânica solidificada (SFODME).....	29
2.2.3 Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME).....	30
2.2.4 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	31
2.3 Metodologias de otimização.....	36

CAPÍTULO III – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação.....	37
3.2 Reagentes e soluções analítica.....	37
3.3 Amostragem e preparação de amostras.....	38
3.4 Otimização das variáveis.....	38
3.5 Procedimento da microextração líquido-líquido dispersiva.....	39

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização das variáveis experimentais.....	41
4.1.1 Otimização do tipo de solvente extrator e dispersor.....	41
4.1.2 Matriz Doehlert para otimização multivariada.....	42
4.2 Estudo da adição de eletrólitos.....	47
4.3 Efeito de outros íons.....	48
4.4 Características analíticas.....	49
4.4.1 Perfil do pico analítico.....	49
4.4.2 Curva analítica.....	49
4.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	49
4.4.4 Fator de pré-concentração (FE).....	51
4.4.5 Índice de consumo.....	51
4.4.6 Precisão.....	51
4.4.7 Exatidão e aplicação.....	51
4.5 Comparações entre métodos de pré-concentração para determinação de cobre.....	54

CAPÍTULO V - CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 Conclusão.....	58
5.2 Referências bibliográfica.....	59

CAPÍTULO I – Considerações iniciais

1. Introdução

Alguns elementos químicos são essenciais para a manutenção da vida, mas, dependendo da concentração destes podem tornar-se tóxicos para humanos, animais e plantas, tornando-se a determinação da quantidade cada vez mais importante. O cobre é um desses elementos que pode se tornar tóxico e é amplamente distribuída na natureza, tais como no solo, água e plantas [1]. Dependendo do tipo de planta e tratamento estabelecido para a água de consumo humano, alguns controles de vigilância estabelecem os limites toleráveis de cobre, em água e plantas entre 5-13 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5-40 mg kg^{-1} , respectivamente [2]. No entanto, o seu montante tem crescido rapidamente devido a ações antrópicas, muitas vezes causadas pelas indústrias, mineração, lixo doméstico e na agricultura com a aplicação de fungicida a base de cobre, resultando em contaminação do meio ambiente. A toxicidade aguda de cobre pode provocar vômitos, diarreia, melena, anemia hemolítica aguda, danos nos rins e no fígado, aumento da pressão arterial e distúrbios genéticos da doença de Wilson [3].

Métodos analíticos para a determinação de elementos traços em amostras de interesse ambiental e alimentício são disponíveis na literatura. Vários desses métodos estão associados às técnicas espectroanalíticas: espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [4-6].

A AAS em chama é utilizada para a determinação quantitativa de elementos (metais e alguns não metais) em uma ampla variedade de amostras, tais como, materiais biológicos (tecidos e fluídos), ambientais (águas, solos, sedimentos e plantas), alimentos, tecnológicos, dentre outros [7-9]. Entretanto, não é possível determinar diretamente elementos traço em diversos tipos de matrizes, muitas vezes devido à baixa concentração e presença de concomitantes. Desta forma faz necessário utilizar métodos de separação e pré-concentração, que são formas de pré-tratamento da amostra que eliminam as interferências inerentes a matriz e aumentam a sensibilidade para quantificação dos analitos.

1 Existem diversos tipos de técnica de pré-concentração, tais como: extração
2 em fase sólida (SPE) [10-11], extração no ponto nuvem (EPN) [12-13], co-
3 precipitação, extração líquido-líquido com solventes orgânicos (LLE) [14]. Dentre as
4 técnica de pré-concentração supracitados, a extração líquido-líquido é bem eficiente
5 na quantificação de metais traços, porém faz uso de elevadas quantidades de
6 solventes. A fim de contornar essa característica indesejada e possuir um elevado
7 fator de pré-concentração e eficiência, a técnica de microextração em fase líquida
8 (LPME) é possuidor de ótimas características e utiliza quantidades mínimas de
9 solventes (μL) [15-17]. Dentro das técnicas de LPME encontram-se a microextração
10 líquido-líquido dispersiva (DLLME) que se baseia na partição dos analitos utilizando
11 pequenas quantidades de solventes dispersor e extrator, os quais fazem parte de
12 duas fases imiscíveis uma aquosa e a outra orgânica [18-20]. Esse método tem sido
13 amplamente aplicado para a análise de amostras ambientais: água, solo,
14 sedimentos, bioindicadores; alimentos: vegetais, animais, óleos, bebidas alcoólicas e
15 não alcoólicas; biológicas: tecido animal, sangue, urina, cabelo, associado a técnicas
16 analíticas, como FAAS [21-22], GFAAS [23-24], HPLC [25-26], ICP OES [27-28].

17 O cobre é considerado essencial à nutrição humana, bem como tóxico
18 quando presente em altas concentrações. Estima-se que cerca de 75 mil toneladas
19 de cobre são liberadas para atmosfera, onde um quarto ocorre de fonte natural e as
20 demais de forma antropogênicas, é distribuído na natureza como sulfetos, arsenitos,
21 carbonatos, cloretos, sua maior parte é produzida a partir dos minérios de sulfetos
22 [29].

23 Durante o período dos anos de 1970 a 1980, a região do Sul da Bahia
24 possuía como base agrícola a cultura do cacaueteiro (*Theobroma cacao L.*), que
25 produz o fruto do cacau, utilizado na fabricação de chocolates. Porém, devido a
26 infestação do fungo patogênico (*Moniliophthora perniciosa*), fungicidas à base de
27 cobre foram usados no controle dessa praga. Esses fungicidas são aplicados em
28 folhas e frutos de diversas plantações, onde o cobre forma uma película protetora no
29 fruto impedindo a ação do fungo. Com o uso excessivo, o cobre pode ser lixiviado
30 para o solo e se acumular nas camadas superficiais onde as plantas podem
31 absorver de forma excessiva esse elemento e pode haver lixiviação para os
32 sistemas aquáticos subterrâneos e superficiais, favorecendo a um desequilíbrio
33 ambiental. Não são encontrados trabalhos publicados nos últimos cinco anos sobre

1 concentrações de cobre em água, solo ou vegetais na região Sul da Bahia, também
2 conhecida como Região Cacaueira. Dessa forma, é oportuno o desenvolvimento de
3 método analítico para determinação de cobre nas referidas amostras dessa região
4 [30-31].
5

1

2 **1.1 Objetivos**

3 **1.1.1 Geral**

4 Desenvolver uma metodologia para determinação de cobre usando a pré-
5 concentração por microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e detecção por
6 espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS).

7

8 **1.1.2 Específicos**

- 9 ➤ Otimizar as variáveis que afetam a extração: pH, concentração de
10 complexante, volume e tipo dos solventes extrator e dispersor;
- 11 ➤ Validar o método;
- 12 ➤ Quantificar cobre em amostras de águas e de folhas de plantas frutíferas da
13 região de Mata Atlântica do Sul da Bahia;
- 14 ➤ Divulgar os resultados na mídia local, no jornal da Universidade Estadual de
15 Santa Cruz e em eventos científicos;
- 16 ➤ Publicar artigo científico em periódico de relevância na área de química.

17

CAPÍTULO II – Revisão de literatura

2. Elemento químico cobre

2.1 Ocorrência e usos

O cobre é um elemento químico que possui o símbolo Cu, é classificado como elementos de transição e se encontra no grupo 11 na tabela periódica, possuidor de uma massa atômica de $63,6 \text{ g mol}^{-1}$, número atômico 29 e coloração marrom avermelhado. Este elemento foi um dos primeiros metais encontrados em formas relativamente puras. A palavra cobre veio de *cuprum*, nome romano para metal Cipriano. O seu uso marca a transição da idade da pedra para um modo de vida mais moderna, a idade dos metais [29]. Sua abundância relativa corresponde a 0,0068% da crosta terrestre. Os países que mais extraem cobre da crosta terrestre são Chile, Estados Unidos, Polônia, Zâmbia, Rússia e Peru.

Existe uma ampla aplicação desse elemento em eletrodos, ligas, manufaturas de fios e condutores, galvanoplastia, utensílios de cozinha, tubulações residenciais e para linhas de serviços, inseticidas, fungicidas, algicida e desinfetante, dentre outros [3].

2.2 Exposição humana e seus efeitos tóxicos

As principais formas de cobre em águas doces e salgadas são Cu^{+2} , $\text{Cu}(\text{HCO}_3)_2$ e $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Em águas naturais a maior fração do cobre é encontrada na forma complexada e em menor como íon livre. As concentrações em águas doces variam de 1,0 a $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$, em mar aberto encontra-se de 0,02-0,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e próximo a praias podem atingir $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ [29].

Segundo o CONAMA a água é classificada a partir do tratamento que é aplicada para o consumo humano, podendo verificar os níveis máximos permitidos na Tabela 1. Para água doce: classe I - após tratamento simplificado; classe - II após tratamento convencional; classe III - após tratamento convencional ou avançado; classe IV não destinada ao consumo humano. Já as águas salobras e salinas a classe III já não é mais destinada ao consumo humano [32].

1 Tabela 1: Concentrações máximas de cobre em água estabelecidas pelo CONAMA.

Água	Classe I	Classe II	Classe III
Doce	9,0 µg L ⁻¹	9,0 µg L ⁻¹	13,0 µg L ⁻¹
Salina	5,0 µg L ⁻¹	7,8 µg L ⁻¹	
Salobra	5,0 µg L ⁻¹	7,8 µg L ⁻¹	

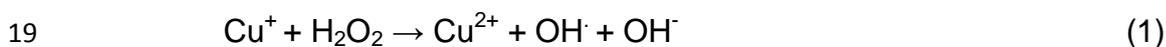
2

3 As doenças provindas do cobre devem-se ao fato da falta e do excesso no
4 organismo conhecido como hipocupremia e hipercupremia, respectivamente. A falta
5 de cobre no corpo humano pode provocar anemia, diarreia, defeitos na formação
6 dos tecidos conectivos, problemas cardíacos e de circulação, além de anomalias
7 ósseas.

8 Mesmo quando consumido em excesso pode ocasionar diversas reações em
9 seres vivos, algumas das reações são problemas neurológicos, hepáticos, nos rins,
10 psiquiátricos, hematológicos, infertilidade, musculoesqueléticos, perda da
11 integridade celular devido a produção excessiva de oxirradicais, como pode ser vista
12 através da reação 1 [33], outra bastante conhecida é a doença de Wilson,
13 caracterizada pela falta de coordenação. Desta forma deve ser ingerido de 2,0 a 5,0
14 mg de cobre em uma dieta normal de uma pessoa, sendo que só faz necessário 0,9
15 mg e a parte que excede deve ser eliminado [29].

16 Na Tabela 2 são informados limites toleráveis de cobre em alguns alimentos e
17 bebidas segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

18



20

21 O cobre por sua vez ocorre naturalmente em plantas, porém os seus níveis
22 vêm aumentando muito devido a ações antrópicas muitas vezes causados pela
23 aplicação excessiva de fungicidas cúpricos. Também faz necessário para um ótimo
24 crescimento e desenvolvimento de plantas, no entanto em altas concentrações se
25 torna tóxico as plantas e podem se estender ao homem que venha consumir os
26 frutos.

27

1 Tabela 2: Limites máximos tolerável de cobre em alimentos e bebidas [34].

Alimento	Limite máximo (mg kg⁻¹)
Bebidas alcoólicas	5,0
Compotas ou doce de frutas com caldas	10,0
Doces em massa ou em pasta	10,0
Doce de leite	10,0
Culturas agrícolas em que agrotóxico a base de cobre tenham sido autorizado, exceto cacau e café	10,0
Cacau e café	30,0
Sal	2,0
Óleos e gorduras virgens	0,4

2

3

4

A falta de cobre afeta o crescimento reprodutivo (formação de grão, sementes e frutos) muito mais que o vegetativo. O cobre em concentrações elevadas torna-se tóxico causando danos ao tecido e ao alongamento das raízes, alteração na permeabilidade da membrana e inibição do transporte de elétrons fotossintéticos [35]. Na Tabela 3 são apresentados os teores considerados adequados de cobre em folhas de vegetais, segundo a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) [36].

11

12

13

14

1 Tabela 3: Limites recomendados de cobre em folhas.

Folhas	Limite máximo (mg kg ⁻¹)
Cacau	8 – 15
Banana	6 – 30
Goiaba	20 – 40
Maçã	6 – 50
Tomate	5 – 15
Acerola	5 – 15
Melão	10 – 15
Morango	5 – 20
Uva	18 – 22
Manga	10 – 50

2

3

4 **2.3 Uso do cobre na lavoura cacaeira**

5 O cacau é de origem da região da América Central, da família das
 6 Esterculiáceas, era considerando tão valioso que os índios usavam como moeda de
 7 troca. Do fruto extrai sementes que depois de fermentadas transformam-se em
 8 amêndoas, as quais produzem o chocolate. A produção de cacau no Brasil é uma
 9 atividade dos grandes e médios produtores, onde se adaptou bem ao solo do Sul da
 10 Bahia a partir do século XVIII iniciando na cidade de Canavieiras, mas foi na cidade
 11 de Ilhéus que marcou como um ponto principal para a produção, migrando para
 12 algumas regiões circunvizinhas mostrado na Figura 1. Em 1979/1980 a produção
 13 ultrapassou 310 mil toneladas e gerou 3,0 bilhões 618 milhões de dólares [37]

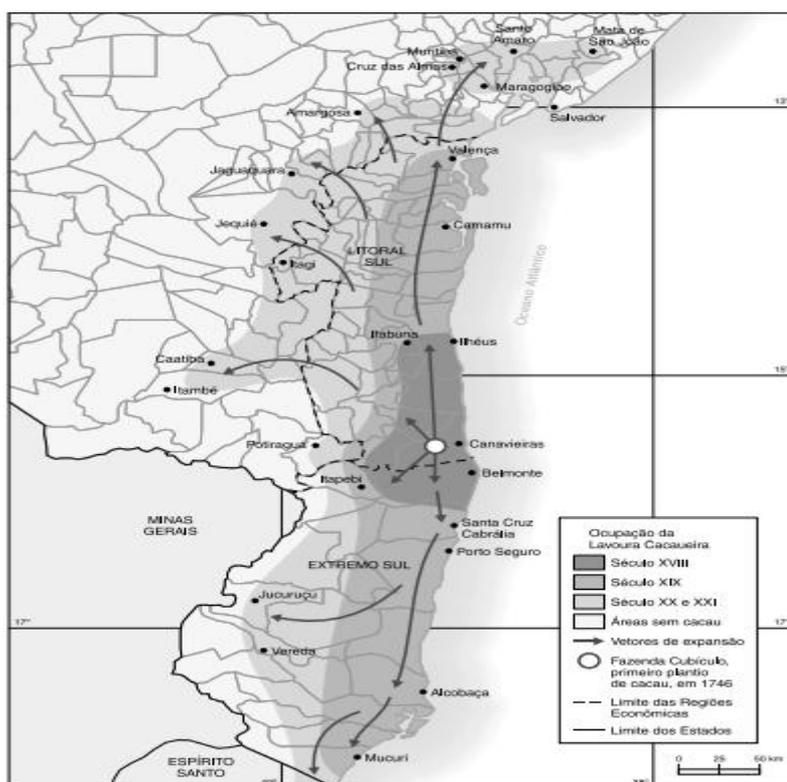


Figura 1: Ocupação da lavoura cacaeira na região do Sul da Bahia. Fonte: CEPLAC, 2002.

1

2

3

4 A planta mais abundante no Sul da Bahia por longas datas foi a monocultura
 5 cacaeira e durante muito tempo também a sustentação da região. O
 6 desenvolvimento da cultura deu-se após a construção da ferrovia que interligava as
 7 cidades produtoras do Sul da Bahia, mesmo com tanta riqueza a ideia era produzir a
 8 qualquer custo não se preocupando com os trabalhadores em relação a qualidade
 9 de vida, segurança e muito menos inclusão social, onde muitas vezes os pequenos
 10 proprietários eram mortos para que os coronéis aumentassem seus latifúndios.

11 No entanto, no final da década de 40 surge a podridão-parda no Sul da Bahia,
 12 que chegou a ter perdas de 70 a 80% anual na produção de cacau da região, tendo
 13 como característica os frutos começam a possuir uma coloração castanha após
 14 cerca de 30 horas desde a infecção. Como efeito de controle utilizou-se fungicidas,
 15 principalmente a base de cobre. As primeiras tentativas de controlar a podridão-
 16 parda por meio de uso de fungicidas cúpricos se deu no início dos anos 50 e desde

1 então esse tipo de fungicida vem se utilizando com intuito de controle e que obtêm
2 respostas satisfatórias [38].

3 Na década de 1980 a região iniciou uma crise por conta da enfermidade
4 vassoura de bruxa, com condições favoráveis a vassoura de bruxa atingiu muitos
5 produtores em um curto período. É causada por um fungo patogênico
6 cientificamente denominado de *Moniliophthora perniciosa*, foi descoberto pela
7 primeira vez no Suriname em 1895, no Sul da Bahia obteve-se um auge dessa crise
8 em 1990, trazendo um prejuízo fazendo a produção cair drasticamente, tem como
9 característica hipertrofia dos ramos com intensa brotação das gemas laterais, a
10 principal contaminação é através pelo ar e as chuvas também exercem um papel
11 importante a respeito da contaminação. Nas imagens da figura 2 são mostrados
12 alguns dos efeitos causados por tal praga [30]. Os frutos distinguem-se em dois tipos
13 de infecção: a direta, por esporos através do epicarpo e indireta, através das flores
14 infectadas.

15

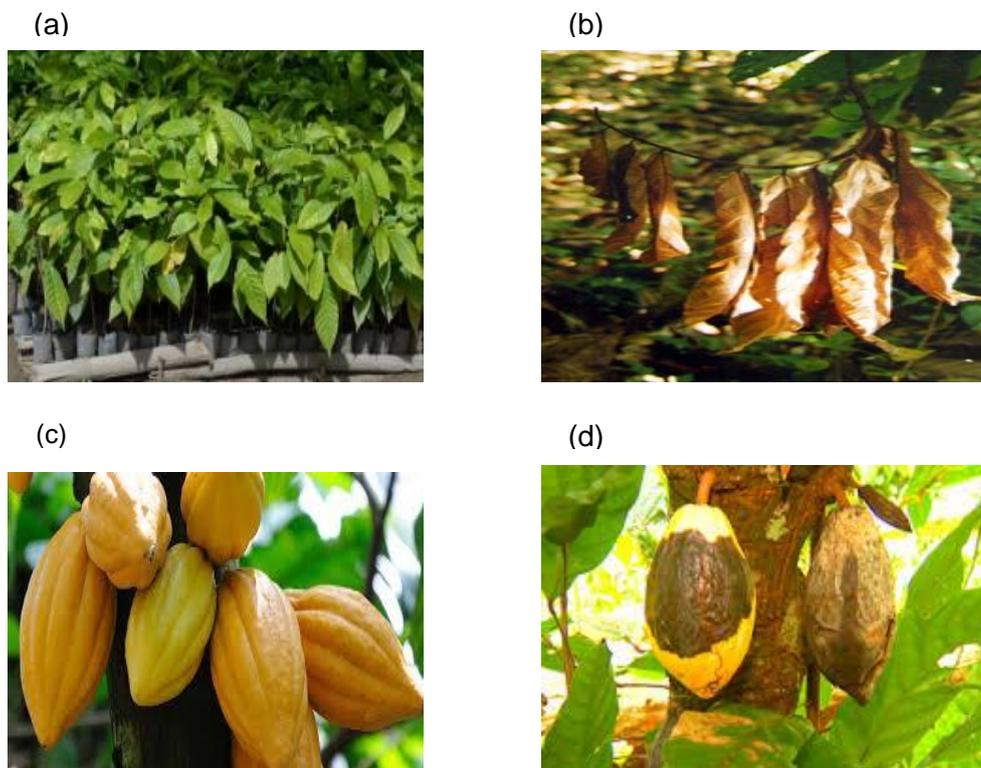


Figura 2: a) folhas de cacaueteiro sadio, (b) folhas de cacaueteiro com efeitos do ataque da Vassoura de Bruxa, (c) fruto do cacaueteiro sadio, (d) fruto do cacaueteiro com efeitos do ataque da Vassoura de Bruxa.

1 Para controlar a praga, os agricultores fizeram uso de fungicidas cúpricos. No
2 entanto, usando de forma inadequada existia e existem grandes chances de
3 contaminação ao ambiente e em seres humanos. Esses agrotóxicos ainda hoje são
4 utilizados em diversas produções agrícolas, devido o cobre apresenta propriedades
5 fungicidas, podendo em caso de uso inadequado contaminar as plantas atingidas,
6 tendo ocorrências em ir ao leite marinho e contaminar a água com concentrações
7 elevadas e posteriormente aos animais marinhos, que por sua vez são bastante
8 consumidos na região Sul da Bahia.

9 O uso de agrotóxico em diversas culturas e a presença de concentrações
10 acima do permitido em alimentos vem gerando uma preocupação a mais para os
11 consumidores e o governo que investe em ações de controle no uso de agrotóxicos.

14 **2.4 Espectrometria atômica para quantificação de cobre**

15 Técnicas espectroanalíticas como a espectrometria de absorção atômica em
16 forno grafite (GFAAS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente
17 acoplado (ICP OES), a espectrometria de massa com plasma indutivamente
18 acoplada (ICP-MS) e espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) são
19 comumente utilizadas para determinação elementar e apresenta limites de detecção
20 instrumental estimado para o cobre de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$, $0,9 \mu\text{g L}^{-1}$, $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$,
21 respectivamente [39].

22 Dentre as técnicas supracitadas a espectrometria de absorção atômica é a
23 mais amplamente utilizada, tem seu arranjo instrumental constituído de uma fonte
24 (emite o espectro do elemento de interesse), atomizador (os analitos são convertidos
25 a átomos livres), monocromador (dispersão da luz e seleção do comprimento de
26 onda a ser utilizado) e detector (mede a intensidade da radiação, transforma este
27 sinal luminoso em um sinal elétrico e o amplifica), que pode ser visualizado através
28 do diagrama simplificado da Figura 3.

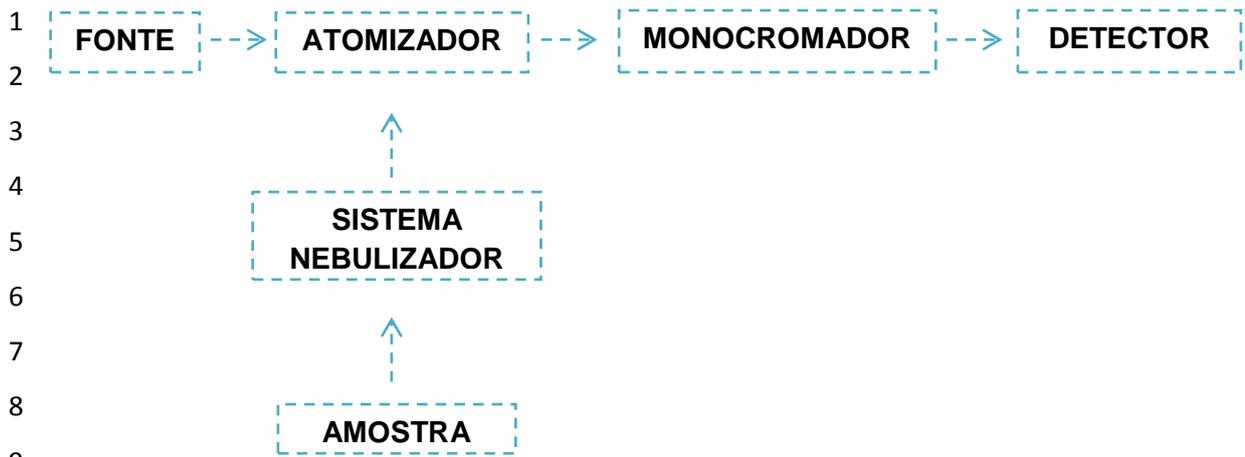


Figura 3: Diagrama simplificado dos principais componentes de um FAAS.

Para o uso da espectrometria de absorção atômica com chama na determinação de elementos em baixíssimas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$), faz necessário aplicar previamente um método de separação e pré-concentração, por possuir limites de detecção relativamente mais alto em relação às demais técnicas. Como mencionado anteriormente, o FAAS apresenta limite de detecção instrumental para o cobre de $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$, no entanto para avaliar a sensibilidade é necessário observar também a concentração característica, que é correspondente a concentração do analito para uma absorvância de 0,0044. Para o cobre a concentração característica é de aproximadamente $30 \mu\text{g L}^{-1}$ na linha 324,8 nm com chama ar-acetileno, mostrando que para determinar este analito por FAAS é necessário se trabalhar com concentrações bem acima de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ [8]. Apesar disto, o FAAS possui boas características e é bastante utilizado por apresentar: boa seletividade, relativa rapidez da análise, robustez do equipamento, facilidade de operação, baixo custo instrumental e operacional [40].

2.5 Pré-concentração por extração líquido-líquido (ELL) e microextração em fase líquida (LPME)

Um dos grandes desafios da química analítica é a etapa de pré-tratamento da amostra para análise de elementos traços. Para eliminar possíveis erros inerentes a matriz, que chega a ocasionar interferências, faz necessárias etapas de separação e

1 pré-concentração com intuito em aumentar a sensibilidade para quantificar o analito
2 através de técnicas com alto limite de detecção.

3 A ELL é um método de extração e pré-concentração de analitos que apresenta
4 algumas desvantagens como: demora no processo de extração, requer grandes
5 volumes de solventes orgânicos e perdas de analitos. Esse método se baseia na
6 transferência de analitos a partir de uma solução amostra aquosa de um solvente
7 imiscível com água. A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo
8 solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações [41].

9 Existem muitas características indesejadas que esse método possui, as quais
10 foram supracitadas. Um método para ser ideal deve possuir características como:
11 preparação deve ser rápida, fácil de usar, baixo custo e compatibilidade com uma
12 gama dos instrumentos analíticos, sendo que a tendência seja no sentido de
13 simplificação e miniaturização das etapas de preparação de amostra e a diminuição
14 da quantidade de solventes orgânicos utilizados. O método de LPME possui tais
15 características citadas anteriormente [16-42].

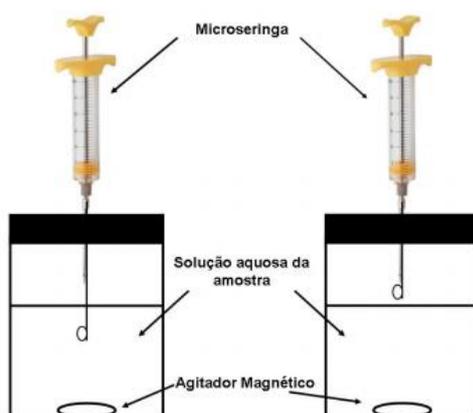
16 A LPME é um formato miniaturizado de ELL e superam muitas das desvantagens
17 que ela possui. É simples de usar, geralmente é um procedimento rápido, usa
18 volumes de solventes na faixa de μL e é caracterizada pela acessibilidade e
19 dependência de materiais amplamente disponíveis [43].

20 Para maiores melhorias, novos métodos foram desenvolvidos para analisar
21 compostos de uma natureza diferente e obter grandes fatores de enriquecimento
22 utilizando tempos relativamente curtos de extração. A LPME pode ser classificada
23 em: microextração em gota suspensa (SDME) [44], microextração em gota orgânica
24 solidificada (SFODME) [45], microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)
25 [46] e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) [47-48].

28 **2.5.1 Microextração em gota suspensa (SDME)**

29 Em 1996 Jeannot e Cantwell, desenvolveram o método de microextração em
30 gota suspensa, a partir de uma gota de solvente orgânico colocado no final da haste
31 de Teflon deixada suspensa dentro de uma solução amostra sendo agitada. Após a
32 extração, a fase orgânica foi amostrada utilizando uma microseringa e injetado em
33 um cromatógrafo a gás para análise [49].

1 Esse método por sua vez foi modificado desenvolvendo então: imersão direta
2 (DI-SDME) e *headspace* (HS-SDME). A DI-SDME consiste na extração de analitos
3 através de uma única gota orgânica fixada na ponta de uma agulha de seringa
4 imersa em uma solução amostra, conforme ilustra a Figura 4 [50].



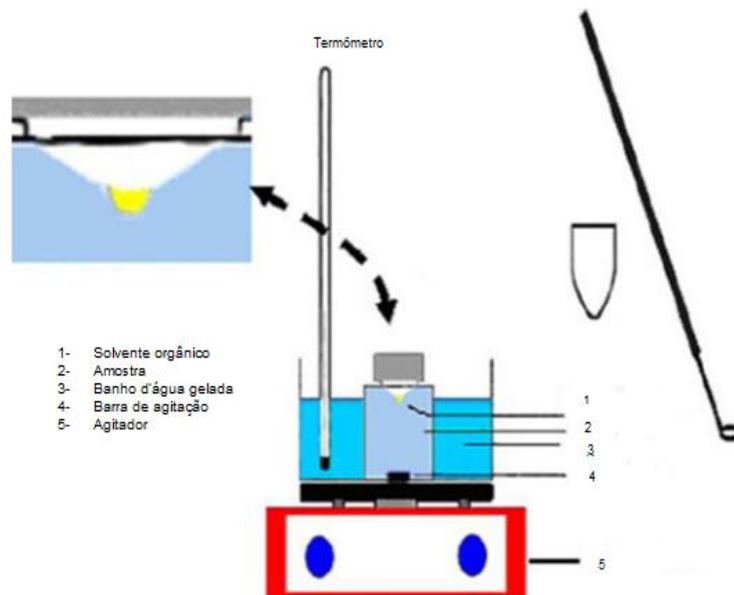
6
7 Figura 4: Esquema simplificado do DI-SDME e HS-SDME. (Fonte: Dionísio, M. G. G.;
8 Batistão, M. B., et al., 2010 [51]).

11 2.5.2 Microextração em gota orgânica solidificada (SFODME)

12 Esse método baseia-se na solidificação da gota orgânica, foi desenvolvido em
13 2007. O solvente extrator utilizado deve possuir densidade inferior que a água, ponto
14 de fusão próximo à temperatura ambiente e baixa toxicidade [52].

15 A SFODME é trabalhada da seguinte forma: cerca de 20 μL do solvente
16 extrator (solvente orgânico) é colocado na solução aquosa, por apresentar baixa
17 densidade irá permanecer na parte superior da amostra. Essa solução é agitada,
18 com intuito de aumentar o contato entre as duas soluções, e transferida para um
19 banho de gelo. O solvente orgânico é solidificado, transfere-se para um pequeno
20 tubo de vidro de fundo cônico, deixando o solvente retornar para o estado líquido e
21 então determinado por uma técnica selecionada, conforme ilustra a Figura 5 [53].

22 Para melhores resultados devem-se estudar algumas variáveis que afetam o
23 procedimento de extração de analitos por meio desse método, as quais são: o tipo e
24 volume do solvente de extração, a adição de sal, velocidade de agitação,
25 temperatura e tempo de extração.

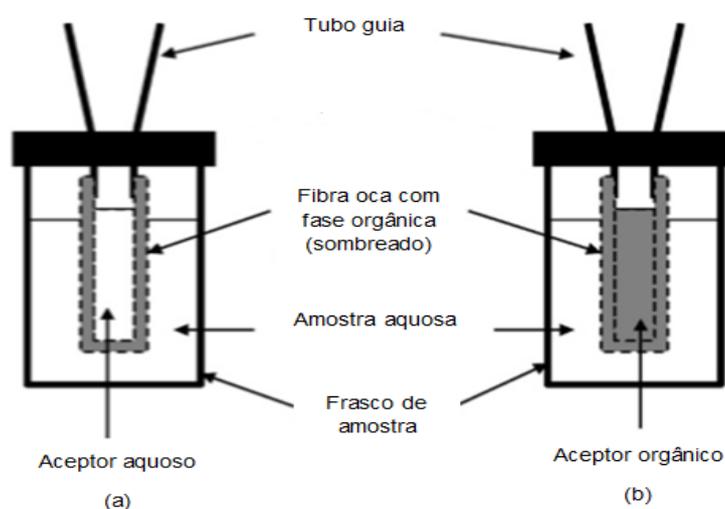


1
 2 Figura 5: Esquema simplificado da microextração com gota orgânica solidificada
 3 (Adaptado de Ghambarian, M. et al., 2013 [52]).
 4
 5

6 2.5.3 Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)

7 A HF-LPME foi iniciada por Pedersen-Bjergaard, baseia-se na extração de
 8 analitos através dos poros de uma membrana capilar porosa e hidrofóbica, onde o
 9 solvente de extração é colocado e estabilizado dentro dos poros das fibras oca e o
 10 seu lúmen é preenchido com uma fase aceptora (pode ser aquosa ou orgânica) que
 11 não entra em contato direto com a fase doadora. Após o término da extração, a fase
 12 aceptora é então analisada através de uma técnica selecionada [54].

13 Esse método pode ser utilizado tanto com 2 ou 3 fases, sendo ilustrado na
 14 Figura 6. Com 2 fases o solvente orgânico se encontra na parede porosa e dentro do
 15 lúmen da fibra oca, onde esse solvente orgânico extrai o analito da solução aquosa.
 16 Já no método que apresenta 3 fases os analitos são extraídos utilizando solvente
 17 orgânico (presente nos poros da membrana) da fase doadora (solução aquosa),
 18 transferindo para a fase aceptora (solução aquosa) que está presente no lúmen da
 19 fibra oca [55].
 20

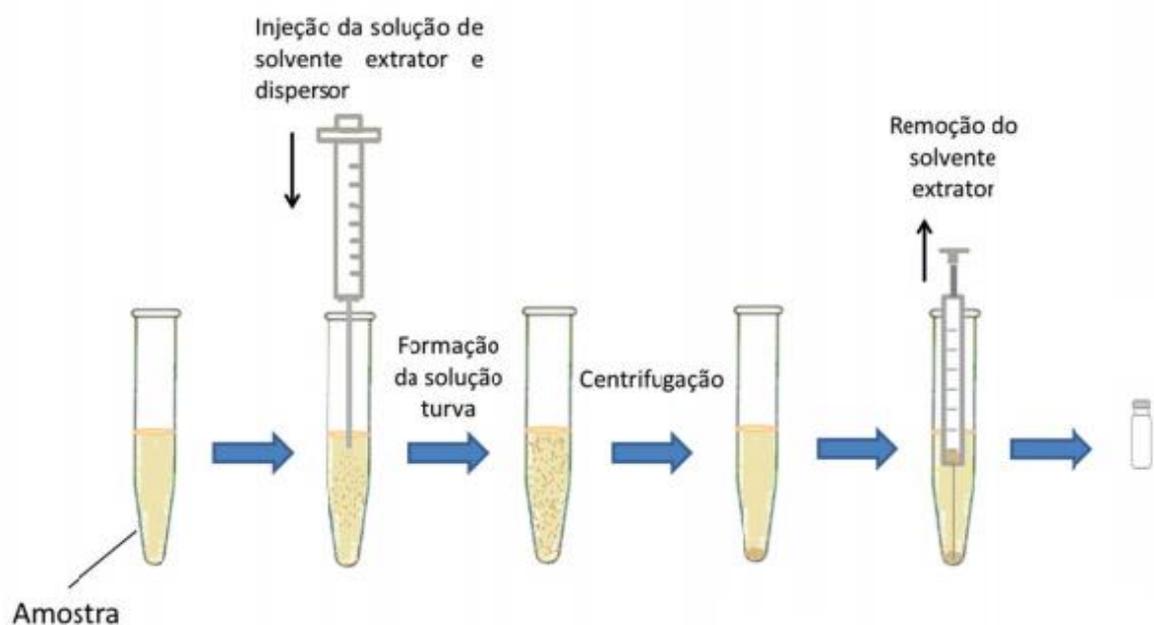


1
2 Figura 6: Princípio da microextração em fase líquida com fibra oca: (a) de três e (b)
3 HF-LPME de duas fases. (Adaptado de Lee, j. et al. 2008 [55]).

6 **2.5.4 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)**

7 A DLLME que é um método de separação e pré-concentração baseia-se na
8 partição dos analitos utilizando pequenas quantidades de solventes dispersores e
9 extratores, os quais fazem parte de duas fases imiscíveis uma aquosa e a outra
10 orgânica [48]. O princípio da DLLME foi proposto em 2006 por Rezaee e
11 colaboradores, o qual consiste na injeção de uma mistura ternária de solvente na
12 amostra aquosa, e os analitos são transferidos por partição para fase orgânica,
13 conforme ilustrado na figura 7 [56].

14 Em geral, vários requisitos têm de ser cumpridos para realizar o isolamento de
15 amostra usando DLLME. O solvente dispersante tem de ser totalmente solúvel, com
16 a fase da água e a fase orgânica. O solvente de extração tem de ter o potencial para
17 extrair analitos. Além disso, tem que ser solúvel no solvente de dispersão, enquanto
18 a sua solubilidade na água tem de ser muito baixa. E por fim, a densidade do
19 solvente de extração deve ser diferente grandemente da densidade da água, para
20 permitir a separação de fases. Na Figura 8 verifica-se o procedimento do método
21 através de um fluxograma e na Tabela 4 as propriedades físico-químicas de alguns
22 solventes utilizados [57-58].



1

2 Figura 7: Princípio da microextração líquido-líquido dispersiva. (Adaptado de
3 Moreira, B. J., et al. 2014 [59]).

4

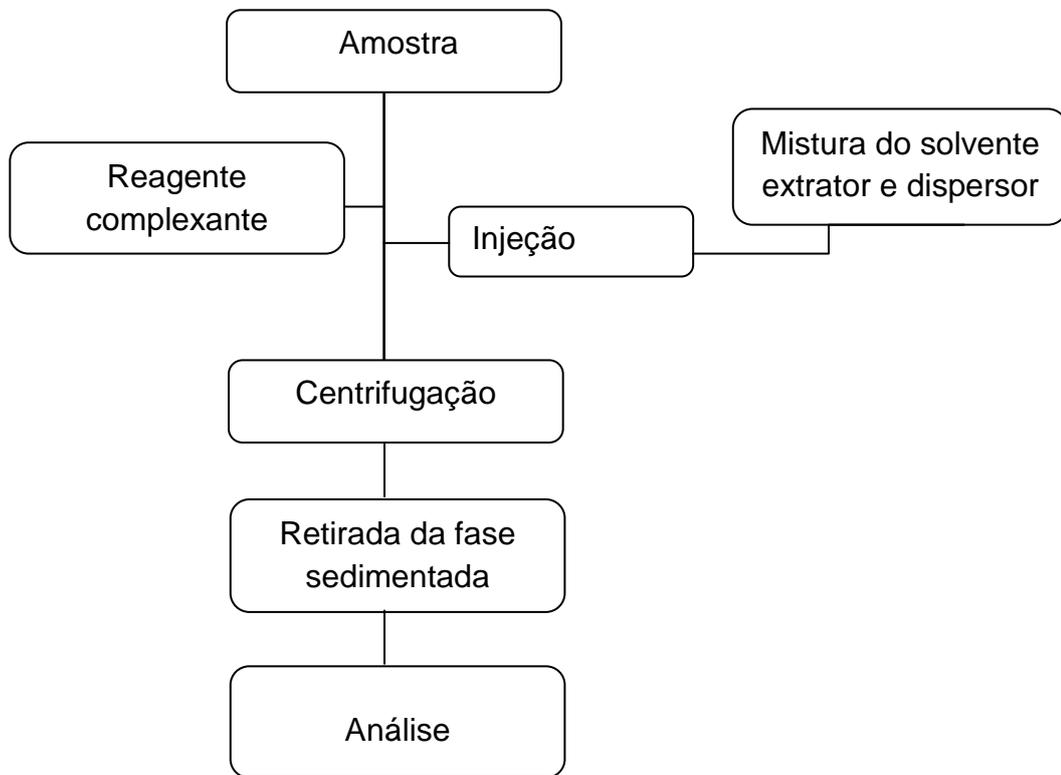
5 Tabela 4: Propriedades físico-químicas de solventes extratores e dispersores.

Solvente	Solubilidade em H₂O (g L⁻¹ a 20 °C)	Densidade (g cm⁻³ a 20 °C)	PV (mm Hg a 20 °C)
Extratores			
Tetracloreto de carbono	0,8	1,59	90
Clorofórmio	8,0	1,47	158
Diclorometano	20,0	1,33	356
1,2-Dicloroetano	8,7	1,25	65
Tolueno	0,52	0,81	22
Tricloroetileno	1,30	1,46	60
Dispersores			
Metanol	Solúvel	0,792	96
Etanol	Solúvel	0,790	44
Acetona	Solúvel	0,790	175
Acetonitrila	Solúvel	0,786	73

1 A DLLME é realizada em duas etapas, que são:

2 **I Etapa:** consiste em injetar uma mistura ternária de solvente dispersor,
3 extrator e complexante na amostra aquosa que contém o analito. Ocorrendo uma
4 turvação da solução e o solvente extrator é disperso extraíndo os analitos em gotas
5 muito finas. Devido à grande área superficial entre o solvente extrator e a amostra
6 aquosa, o equilíbrio é atingido rapidamente e a extração é independente do tempo,
7 sendo esta a principal vantagem do método [49].

8 **II Etapa:** ocorre a centrifugação da mistura e sedimentação do analito. A fase
9 sedimentada é transferida para um tubo de vidro e quantificada através da técnica
10 proposta.



27 Figura 8: Fluxograma do procedimento para extração de elementos empregando
28 DLLME.

2.6 Metodologias de otimização

Para otimização das variáveis experimentais pode fazer uso de dois tipos de metodologias, a univariada que aperfeiçoa cada variável uma de cada vez fixando as demais, que tem como aspecto negativo a grande quantidade de experimentos a serem realizados e uso de grandes quantidades de reagentes e soluções, além de não promover o estudo das interações entre as variáveis. E a multivariada, a qual trabalha com todas variáveis de uma só vez, estudando as interações entre os fatores, diminuindo os números de experimentos e conseqüentemente o tempo de execução do trabalho, por estas razões frequentemente vem se utilizando as metodologias multivariadas [60-61].

A matriz Doehlert é uma metodologia de otimização multivariada possuidoras de boas características, pois apresenta menores quantidades de experimentos, comparado a outras, além de poder estudar cada variável com níveis diferentes de acordo com sua significância, segundo observado na Tabela 5, por exemplo, um estudo com quatro variáveis elas podem ser trabalhadas com níveis de 5, 7, 7 e 3 [62].

A resposta obtida através da matriz Doehlert é analisada observando as superfícies de respostas, as quais são geradas através da função polinomial que quando igualada a zero e derivando segundo o fator de interesse obtêm-se o ponto ótimo de cada fator derivado. Já para verificar a existência de ponto de máximo, mínimo ou de sela, utiliza-se o critério de Lagrange's, que se baseia no cálculo da determinante Hessian.

Tabela 5: Diferentes níveis e experimentos em diferentes variáveis.

Variáveis	Níveis	Experimentos
2	5,3	7
3	5,7,3	13
4	5,7,7,3	21
5	5,7,7,7,3	31

CAPÍTULO III – Parte Experimental

3.1 Instrumentação

Foi utilizado para medida do analito um espectrômetro de absorção atômica com chama VARIAN, tendo como fonte de radiação lâmpadas de cátodo oco multe elementar contendo o cobre operando no comprimento de onda 324,75 nm, corrente de lâmpada de 10 mA, vazão do fluxo de aspiração da solução da amostra de 6,0 mL min⁻¹ e em todo o procedimento foi utilizado um tempo de integração de 6,0 segundos, chama de ar-acetileno com taxas de fluxo de 13,5 e 2,0 L min⁻¹, respectivamente.

Também fez uso de um medidor de pH digital modelo MB10 para as medições de pH e uma centrífuga L-700 foi usada para acelerar o processo de decantação das gotículas orgânicas dispersas na fase aquosa.

3.2 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água proveniente de um purificador de água Milli-Q[®] da Millipore[®]. Utilizou-se cloreto de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2-(2-tiazoliazó)-5-dimetilaminofenol (TAM) (Merck, Darmstadt, Germany). Toda a vidraria foi mantida em solução de ácido nítrico a 10,0% v/v durante tempo mínimo de 12 horas. As soluções de trabalho de cobre foram preparadas diariamente, diluindo-se uma solução estoque de 1000 µg mL⁻¹ (Merck). Todos os reagentes usados foram de grau analítico.

As soluções do reagente TAM foram preparadas pela dissolução de quantidades apropriadas do sólido em metanol absoluto (Merck). Os solventes acetonitrila (Vetec), tricloroetileno (Synth), metanol (Merck), etanol (Merck) e 1,2-dicloroetano (Synth) também foram usados no procedimento de microextração. O pH das soluções de metais foi ajustado com o auxílio de soluções-tampão acetato de sódio/ácido acético (pH 3,5-6,5), acetato de amônio (pH 7,0-7,5) e ácido bórico/NaOH (pH 8,0-9,5). Para estudos de exatidão, avaliou-se através do método de adição e recuperação de analito em amostra reais e pelo material de referência certificado: folha de maçã (NIST1515) e folha de tomate (NIST 1573a).

3.3 Amostragem e preparação de amostras

Os materiais de referência certificado (CRM) folhas de maçã (NIST 1515) e folhas de tomate (NIST 1573a), obtido a partir do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (Gaithersburg, MD) foi analisada para estudos de exatidão. Para a decomposição de material esta foi tratada com 0,1 g de cerca de 3,0 mL de solução de ácido nítrico concentrado (HNO_3), 2,0 mL de 30 % de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e manteve sistema de digestão. O aquecimento foi realizado em bloco digestor a 110 °C durante 3h. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, o pH da solução foi ajustado para próximo a seis com 10 % (m/v) de solução tampão de uma solução de hidróxido de sódio adequado. Após este passo, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 20,0 mL e o volume foi completado com água ultrapura.

As amostras de folhas de plantas frutíferas (jaca, cupuaçu, jambo, banana) foram coletadas em uma área de mata Atlântica no Campus da Universidade Estadual de Santa Cruz, cidade de Ilhéus, Bahia, Brasil. As folhas foram lavadas com água corrente e deionizada, secas em estufa a 60°C, trituradas, pesada 0,2 g e realizou-se o mesmo procedimento que os CRM quanto a digestão. As águas foram coletadas: mineral, água de abastecimento público e do bebedouro foram amostrada na Universidade Estadual de Santa Cruz, rio cachoeira e águas do estuário foram amostradas na região de Ilhéus, BA, Brasil. As amostras foram filtradas e adicionado 5,0 mL de tampão com pH 2,0 a fim de evitar a adsorção dos íons de cobre nas paredes dos frascos. Pelo menos uma solução em branco foi executada para cada amostra, a fim de avaliar a contaminação por cobre os reagentes utilizados.

3.4 Otimização das variáveis

Durante o procedimento de otimização do método de pré-concentração usou-se 5,0 mL de uma solução amostra com concentração de 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre. Inicialmente, de forma univariada avaliou-se o tipo de solventes extratores (Tricloroetileno e 1,2- dicloroetano) e dispersores (etanol, metanol e acetonitrila) a serem utilizados. Posteriormente, uma segunda etapa de otimização multivariada foi realizada, utilizando a matriz Doehlert para quatro variáveis independentes, a fim de

1 estimar o pH, concentração do complexante, volume do solvente dispersor e volume
2 do solvente extrator.

3 Um planejamento experimental utilizando a matriz Doehlert, envolvendo
4 triplicata no ponto central foi utilizado para a otimização das variáveis. Os fatores
5 foram estudados em diferentes níveis segundo a Tabela 6.

6

7 Tabela 6: Níveis codificados (entre parênteses) e valores reais da matriz Doehlert
8 para as quatro variáveis estudadas.

Variáveis	Níveis							
	(-1)	(-0,5)	(0)	(0,5)	(1)			
Concentração de TAM (mol L ⁻¹)	4,0 x 10 ⁻⁴	1,3 x 10 ⁻³	2,2 x 10 ⁻³	3,1 x 10 ⁻³	4,0 x 10 ⁻³			
Ph	(-0,866)	(-0,577)	(-0,289)	(0)	(0,289)	(0,577)	(0,866)	
	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	
Volume dispersor (mL)	(-0,817)	(-0,613)	(-0,204)	(0)	(0,204)	(0,613)	(0,817)	
	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	
Volume extrator (mL)	(-0,791)	(0)	(0,791)					
	0,05	0,075	0,1					

9

10 Para este planejamento experimental foi avaliado usando o sinal analítico
11 (absorvância) como resposta analítica. Os dados experimentais foram processados
12 utilizando o programa Statistica 7.0.

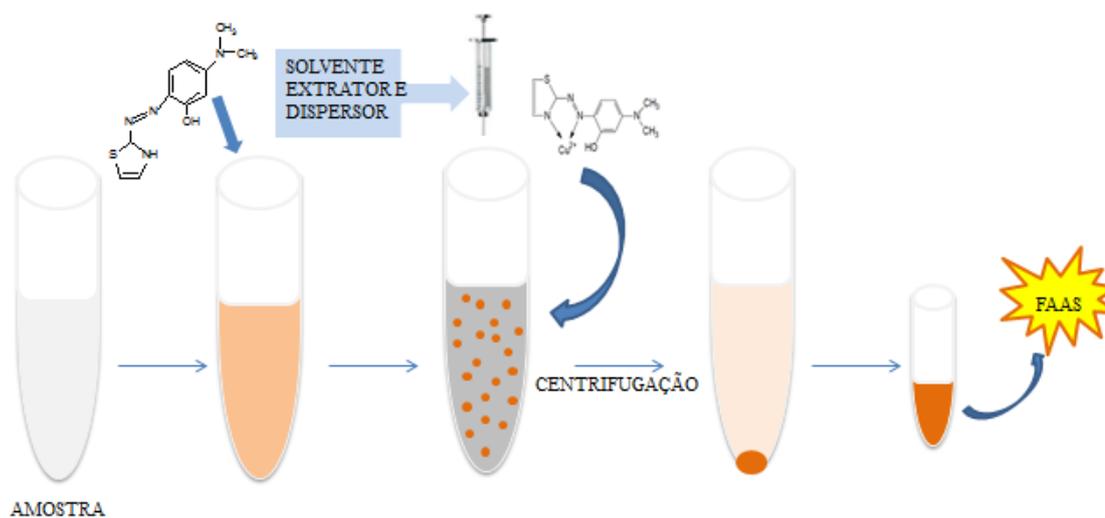
13

14

15 3.5 Procedimento da microextração líquido-líquido dispersiva

16 Utilizou-se 5,0 mL de solução ou amostra com pH ajustado para 7,5 com solução
17 tampão previamente preparada de acetato de amônia, sendo adicionado de 1,0 mL
18 de solução de cloreto de sódio 3,0 % (m/v), e em seguida o reagente complexante
19 TAM 0,0035 mol L⁻¹. Posteriormente, injetado com ajuda de uma seringa de vidro, a
20 mistura de 1,30 mL de metanol (solvente dispersivo) e 50 µL de tricloroetileno
21 (solvente extrator). Com a adição dos solventes ocorre a turvação da solução, neste
22 momento os complexos Cu²⁺-TAM são extraídos em pequenas gotículas de

1 tricloroetileno. Então, a solução foi centrifugada a 3000 rpm por 5,0 minutos e as
2 gotículas dispersas de tricloroetileno ficaram depositadas no fundo do tubo. Cerca
3 de 30 μL da fase rica foi utilizada para determinar a concentração do analito por
4 espectrometria de absorção atômica com chama, todo o procedimento simplificado
5 pode ser visualizado na Figura 9.



6
7
8
9
10

Figura 9: Diagrama simplificado do método de microextração líquido-líquido dispersiva.

CAPÍTULO IV – Resultado e Discussão

4.1 Otimização das variáveis experimentais

4.1.1 Otimização do tipo de solvente extrator e dispersor

Neste trabalho, etanol, metanol e acetonitrila foram estudados como solventes dispersivos. Tricloroetileno e 1,2- dicloroetano foram estudados como solventes extratores. As condições das demais variáveis foram de 5,0 mL de uma solução amostra com concentração de $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre, pH 7,5, concentração do reagente $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, volume de solvente extrator e dispersivo de 1,30 e 50,0 μL , respectivamente. A Figura 10 mostra os resultados obtidos com os solventes dispersivos e extratores. Analisando os resultados, pode-se verificar que o uso de metanol e tricloroetileno como solvente dispersor e extrator, respectivamente, obtiveram os maiores sinais analíticos. Desta forma, estes solventes foram adotados no preparo da mistura ternária.

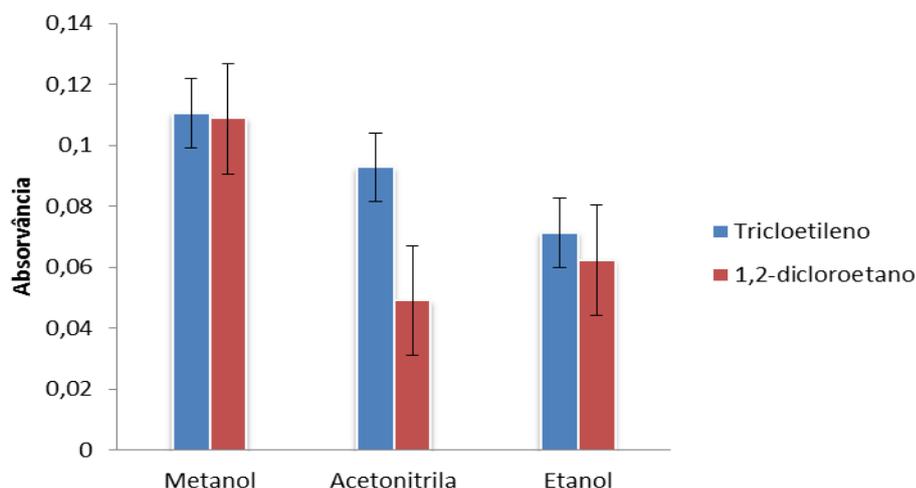


Figura 10: Influência do tipo de solvente dispersivos e extrator para microextração líquido-líquido dispersiva.

1 Dentre os solventes utilizados o que viabilizou em obter melhor sinal analítico
2 foi o tricloroetileno. A solubilidade em água do tricloroetileno e do 1,2-dicloroetano
3 são 1,28 g L⁻¹ e 8,70 g L⁻¹, respectivamente. Desta forma podemos inferir que o 1,2-
4 dicloroetano por possuir uma alta solubilidade em água ocorre uma solvatação das
5 moléculas do solute na fase aquosa impedindo a ocorrência de forma eficiente da
6 migração do analito da fase aquosa para a fase orgânica, deixando menos efetivo
7 sua extração.

10 **4.1.2 Matriz Doehlert para otimização multivariada**

11 Uma segunda etapa de otimização foi realizada aplicando a metodologia de
12 superfície de respostas, utilizando a matriz de Doehlert para quatro variáveis
13 independentes (pH, concentração do complexante, volume solvente extrator e
14 volume solvente dispersor), sendo estudadas em níveis diferentes. Essa
15 metodologia foi empregada, pois permite que o planejamento seja realizado
16 utilizando níveis diferenciados e uma quantidade menor de experimentos.

17 Os resultados obtidos experimentalmente aplicando a matriz Doehlert para as
18 quatro variáveis são apresentados na Tabela 7. A resposta foi o sinal analítico
19 (absorvância) (n=2) e os dados foram processados pelo programa Statistica 7.0. As
20 superfícies de resposta podem ser descritas pela equação geral 1. Se todos os
21 coeficientes fossem negativos teríamos ponto de máximo, se todos os coeficientes
22 fossem positivos teríamos ponto de mínimos e quando se têm alguns positivos e
23 outros negativos o ponto estacionário pode ser um ponto de sela.

25 **Equação 1.**

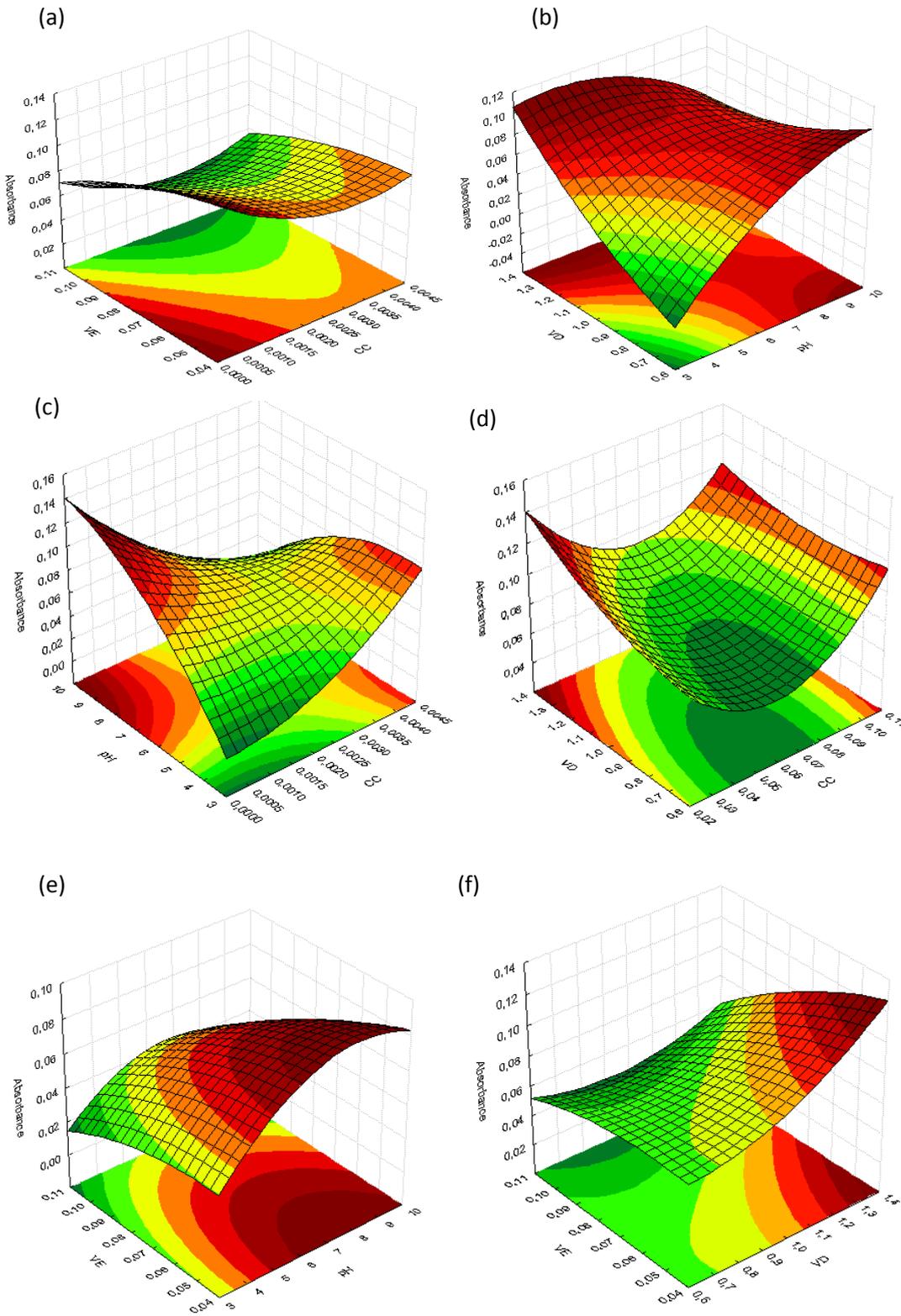
$$\begin{aligned} 26 \quad R = & 0,0700 + 0,070(\text{CC}) - 0,004(\text{CC})^2 + 0,0129(\text{pH}) - 0,0174(\text{pH})^2 + 0,0139(\text{VD}) + \\ 27 \quad & 0,0073(\text{VD})^2 - 0,0144(\text{VE}) - 0,0034(\text{VE})^2 - 0,0174(\text{CCpH}) - 0,0052(\text{CCVD}) + \\ 28 \quad & 0,0013(\text{CCVE}) - 0,0274(\text{pHVD}) - 0,0051(\text{pHVE}) - 0,0067(\text{VDVE}) \end{aligned}$$

31 Com os resultados obtidos a partir dos experimentos obtiveram-se as
32 superfícies de respostas através do tratamento dos dados, que são apresentadas na
33 Figura 11 (a, b, c, d, e, f).

- 1 Tabela 7: Valores reais, codificados (entre parênteses) e respostas da Matriz
 2 Doehlert para otimização na determinação de cobre por DLLME.

CC^a (mol L ⁻¹)	pH	VD^b (mL)	VE^c (mL)	Absorvância
2,2 x 10 ⁻³ (0)	6,5 (0)	1 (0)	0,075 (0)	0,0696/0,0692
4,0 x 10 ⁻³ (1)	6,5 (0)	1 (0)	0,075 (0)	0,0960/0,0914
3,1 x 10 ⁻³ (0,5)	9,5 (0,866)	1 (0)	0,075 (0)	0,0390/0,0380
3,12 x 10 ⁻³ (0,5)	7,5 (0,289)	1,3 (0,817)	0,075 (0)	0,0521/0,0619
3,12 x 10 ⁻³ (0,5)	7,5 (0,289)	1,1 (0,204)	0,1 (0,791)	0,0484/0,0414
4,0 x 10 ⁻⁴ (-1)	7,5 (0)	1 (0)	0,075 (0)	0,0937/0,0938
1,3 x 10 ⁻³ (-0,5)	3,5 (-0,866)	1 (0)	0,075 (0)	0,0297/0,0299
1,3 x 10 ⁻³ (-0,5)	5,5 (-0,289)	0,7 (-0,817)	0,075 (0)	0,0504/0,0640
1,3 x 10 ⁻³ (-0,5)	7,5 (-0,289)	1,1 (-0,204)	0,05 (-0,791)	0,0889/0,0876
3,12 x 10 ⁻³ (0,5)	3,5 (-0,866)	1 (0)	0,075 (0)	0,0725/0,0683
3,12 x 10 ⁻³ (0,5)	5,5 (-0,289)	0,7 (-0,817)	0,075 (0)	0,0380/0,0341
3,12 x 10 ⁻³ (0,5)	5,5 (-0,289)	1,1 (-0,204)	0,05 (-0,791)	0,0672/0,0715
1,3 x 10 ⁻³ (-0,5)	9,5 (0,866)	1 (0)	0,075 (0)	0,0898/0,0878
2,2 x 10 ⁻³ (0)	8,5 (0,577)	0,7 (-0,817)	0,075 (0)	0,1097/0,0958
2,2 x 10 ⁻³ (0)	8,5 (0,577)	0,9 (-0,204)	0,05 (-0,791)	0,0842/0,0808
1,3 x 10 ⁻³ (-0,5)	7,5 (0,289)	1,3 (0,817)	0,075 (0)	0,1243/0,1227
2,2 x 10 ⁻³ (0)	4,5 (-0,577)	1,3 (0,817)	0,075 (0)	0,0704/0,0683
2,2 x 10 ⁻³ (0)	6,5 (0)	1,2 (0,613)	0,05 (-0,791)	0,1098/0,1610
1,3 x 10 ⁻³ (-0,5)	7,5 (0,289)	1,1 (0,204)	0,1 (0,791)	0,0699/0,0695
2,2 x 10 ⁻³ (0)	4,5 (-0,577)	1,1 (0,204)	0,1 (0,791)	0,0547/0,0566
2,2 x 10 ⁻³ (0)	6,5 (0)	0,8 (-0,613)	0,1 (0,791)	0,0341/0,0380
2,2 x 10 ⁻³ (0)	6,5 (0)	1 (0)	0,075 (0)	0,0683/0,0691
2,2 x 10 ⁻³ (0)	6,5 (0)	1 (0)	0,075 (0)	0,0689/0,0673

- 3 ^a-concentração do complexante; ^b- volume solvente dispersor; ^c- volume solvente extrator.



1
2
3
4
5

Figura 11: Superfícies de respostas: (a) VE x CC x absorvância; (b) pH x VD x absorvância; (c) CC x pH x absorvância, (d) VD x pH x absorvância, (e) VE x pH x absorvância e (f) VD x VE x absorvância.

1 Aplicando o critério de Lagrange na equação global 1, é possível mostrar que
 2 as superfícies de resposta possuem ponto de sela, indicando a existência de pontos
 3 máximos em mais de uma região do domínio experimental, segundo o cálculo de
 4 determinante da Hessian.

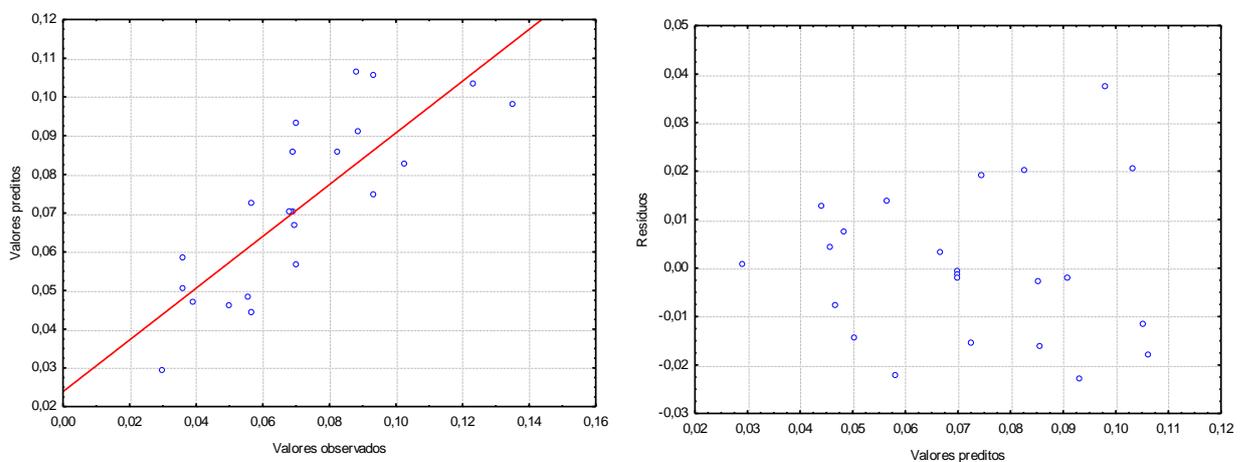
5

6 Tabela 8: ANOVA usando modelo quadrático a um nível de 95% de confiança.

	SS	Df	MS	F	p – valor
(1)CC (L)	0,000309	1	0,000309	730,447	0,001366 ⁸
CC (Q)	0,000195	1	0,000195	461,265	0,002161 ⁹
(2)pH (L)	0,001025	1	0,001025	2421,136	0,000413 ¹⁰
pH (Q)	0,000627	1	0,000627	1482,199	0,000674 ¹¹
(3)VD (L)	0,001362	1	0,001362	3216,266	0,000311 ¹²
VD (Q)	0,000163	1	0,000163	385,465	0,002584 ¹³
(4)VE (L)	0,001161	1	0,001161	2741,612	0,000365 ¹⁴
VE (Q)	0,000042	1	0,000042	98,350	0,010015 ¹⁵
1L by 2L	0,001324	1	0,001324	3128,292	0,000320 ¹⁶
1L by 3L	0,000106	1	0,000106	249,728	0,003980 ¹⁷
1L by 4L	0,000006	1	0,000006	14,752	0,061590 ¹⁸
2L by 3L	0,000912	1	0,000912	2153,248	0,000464 ¹⁹
2L by 4L	0,000022	1	0,000022	51,212	0,018973 ²⁰
3L by 4L	0,000046	1	0,000046	109,067	0,009044 ²¹
Falta de ajuste	0,005274	6	0,000879	2076,559	0,000481 ²²
Erro puro	0,000001	2	0,000000		²³
Total SS	0,015919	22			²⁴
					²⁵

26 L= linear; Q= quadrática; Df= grau de liberdade; SS= soma quadrática; MS= média quadrática; p=
 27 nível de probabilidade

1 A Tabela 8 apresenta 14 coeficientes e os termos significativos estão
2 destacados, sendo que 13 são significativos e apenas a interação CC x VE é não
3 significativo. Nesses coeficientes significativos o valor de p é menor que 0,05. No
4 entanto, neste modelo a falta de ajuste é significativo sendo justificado por
5 apresentar um valor de p (0,000481) inferior a 0,05. Assim o modelo quadrático não
6 está bem ajustado aos dados. Para efeito de avaliação da metodologia multivariada
7 segue os gráficos da Figura 12, que apresenta os valores preditos, valores
8 observados, e os resíduos.



18 Figura 12: Validação do modelo: a direita, valores preditos versus resíduos e a
19 esquerda, dos valores observados versus valores preditos.

20

21 A avaliação feita através dos valores preditos em função dos valores
22 observados indica que o modelo não está bem ajustado por não apresentar uma boa
23 correlação ($y = 0,6683x + 0,0239$), com percentual de regressão de 68%. Para os
24 valores preditos em função dos resíduos, os pontos são distribuídos aleatoriamente
25 entre os dois eixos. Entretanto, mesmo que o modelo gerado não seja ajustado o
26 suficiente para fazer previsões, ainda assim, utilizou-se as superfícies de resposta
27 para visualizar as melhores condições experimentais e realizar um experimento em
28 uma condição estabelecida, pois, desta forma reduz-se a quantidade de
29 experimentos, por não necessitar de uma nova matriz em outro domínio
30 experimental e executar uma nova otimização.

31 Foram realizados experimentos em triplicata nas condições críticas indicadas
32 pelo modelo de otimização e também nas condições estabelecidas pela análise
33 visual das superfícies de resposta. Confrontando os resultados obtidos pelas duas

1 metodologias verificou-se que o sistema apresenta melhor desempenho para as
2 condições estabelecidas pela análise visual das superfícies de resposta, conforme
3 apresentados na Tabela 9. Assim, utilizou-se o volume de solvente dispersor de 1,30
4 mL e não de 0,83 mL, pois em volumes pequenos a formação de gotículas não é
5 efetiva e estável, o que resulta na diminuição da partição do solvente extrator e por
6 consequência diminui a eficiência de extração.

7 Outro fato é o volume do solvente extrator, que foi indicado o uso de 40,0 µL
8 pela otimização com matriz de Doehlert, entretanto após a separação e
9 sedimentação a fase orgânica é retirada para análise, e com esse volume tornou-se
10 possível retirar apenas cerca de 20,0 µL da fase orgânica para análise, o que
11 resultou na diminuição da precisão e da sensibilidade.

12

13 Tabela 9: Valores selecionados das variáveis.

Variáveis	Valores críticos	Valores selecionados
pH	7,5	7,5
Concentração do complexante	0,0035 mol L ⁻¹	0,0036 mol L ⁻¹
Solvente dispersor	0,83 mL	1,30 mL
Solvente extrator	40,0 µL	50,0 µL
Absorvâncias obtidas	0,0985/0,0964/0,1008	0,124/0,1207/0,1265

14

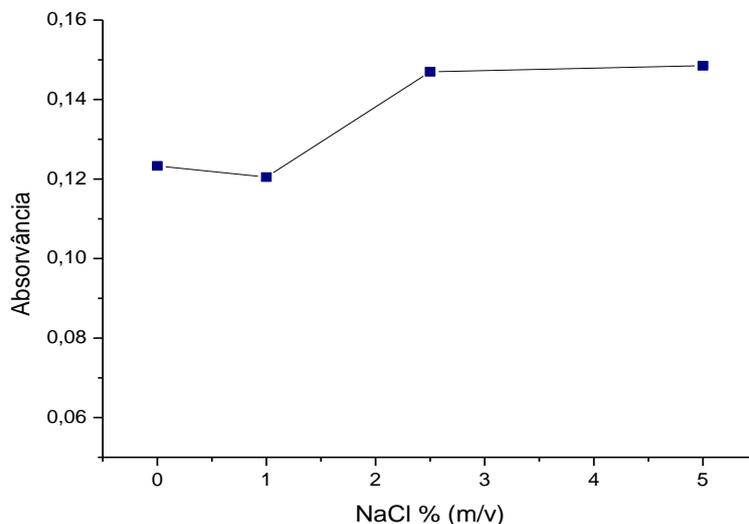
15

16 4.2 Estudo da adição de eletrólitos

17 Nesse estudo foi adicionado uma solução de cloreto de sódio (NaCl) nas
18 amostras, por favorecer o aumento da eficiência na transferência do analito para
19 fase orgânica, processo esse conhecido como “*salting out*”. Por conta da diminuição
20 da solubilidade do solvente extrator, conseqüentemente ocorre o aumento do
21 volume da fase rica.

22 A Figura 13 apresenta os resultados obtidos neste estudo, e pode-se observar
23 um aumento do sinal analítico até uma concentração de 2,5 % (m/v) de NaCl,

1 seguida de uma estabilização de ganho do sinal analítico. Assim, selecionou-se a
2 adição de NaCl em concentração de 3,0 % (m/v) em todas as amostras e padrões.



3
4 Figura 13: Adição de cloreto de sódio na microextração líquido-líquido dispersiva.

5
6

7 **4.3 Efeito de outros íons**

8 Para verificar o efeito de outros cátions de metais de transição frente a
9 seletividade da metodologia empregada, foi realizado o teste através de uma
10 amostra sintética de 5,0 mL contendo $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre e adicionado os íons Ag^+ ,
11 Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} , Al^{3+} e Mo^{2+} , com concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ para
12 cada um, e em seguida foi submetido ao procedimento proposto otimizado, em
13 quadruplicata. Os resultados obtidos mostraram que os íons não afetam
14 significativamente na determinação de cobre pelo método proposto, visto que a
15 influência sobre a alteração do sinal analítico com e sem os outros íons variou entre
16 94-109 %.

17
18

4.4 Características analíticas

4.4.1 Perfil do sinal analítico

O perfil do sinal analítico obtido após otimização foi avaliado utilizando área do pico, conforme apresentado na Figura 14, nas seguintes condições: volume da amostra 5,0 mL, 1,0 mL de NaCl 3,0 %, 1 mL de solução tampão de acetato de amônia com pH 7,5, 0,1 mL de TAM $0,0036 \text{ mol L}^{-1}$, tricloroetileno $50,0 \mu\text{L}$ e metanol $1,30 \text{ mL}$, volume utilizado na análise de $30,0 \mu\text{L}$.

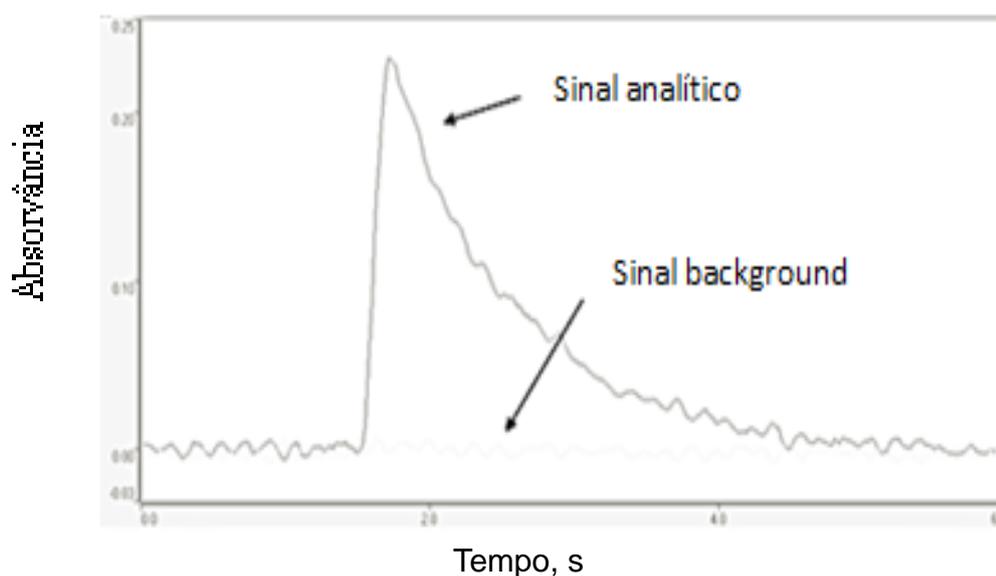
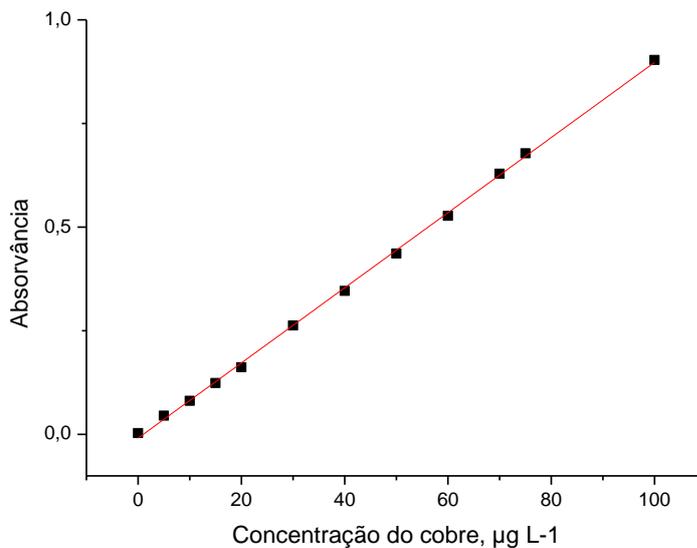


Figura 14: Perfil do sinal analítico e background obtidos por FAAS.

4.4.2 Curva analítica

Aplicando o método de DLLME, foi construída curva de calibração. Uma das curvas analíticas obtidas é apresentada na Figura 15, foi construída variando a concentração de cobre de 5 a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. A equação da reta obtida foi a seguinte: $Y = 0,0091X - 0,0088$, onde Y é o sinal analítico de absorvância, e X é a concentração de cobre em $\mu\text{g L}^{-1}$. O coeficiente de correlação desta curva foi de 0,9993 e a concentração característica de $1,45 \mu\text{g L}^{-1}$.



1

2 Figura 15: Curva analítica de cobre aplicando o método de microextração líquido-
3 líquido dispersiva.

4

5

6 **4.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação [63]**

7 O limite de detecção (LD) é a concentração mínima que um analito pode ser
8 detectado por um método, é calculado com base em três vezes o desvio padrão do
9 sinal obtido por 10 medições repetidas do branco, dividido pela inclinação da curva
10 de calibração. O LD calculado para a medida utilizando o método proposto é de 0,77
11 µg L⁻¹.

12 O limite de quantificação (LQ) é o nível acima do qual os resultados podem ser
13 obtidos com um grau específico de confiança, é calculado através de 10 vezes o
14 desvio padrão do sinal do branco (n=10) dividido pela inclinação da curva de
15 calibração e define o limite inferior do intervalo. O LQ calculado para a medida
16 utilizando o método proposto é de 2,57 µg L⁻¹.

17

18

Equação 2.

$$LD = \frac{3 \times SD_{\text{branco}}}{b} \quad LQ = \frac{10 \times SD_{\text{branco}}}{b}$$

--

1 Considerando as condições experimentais da amostra digerida, sendo 0,200
2 g de amostra e o volume final aferido para 20,0 mL, pode-se estimar um LD de 0,077
3 $\mu\text{g g}^{-1}$ e um LQ de 0,257 $\mu\text{g g}^{-1}$.

6 **4.4.4 Fator de pré-concentração (FE)**

7 Para avaliar o desempenho do método de pré-concentração é feito o estudo
8 do fator de pré-concentração. Ele pode ser calculado através da razão entre os
9 coeficientes angulares entre as curvas de calibração com e sem pré-concentração
10 onde esses resultados são baseados no aumento da resposta e não no aumento
11 verdadeiro da concentração. Outra forma de verificar seu valor teórico pode ser
12 calculada através da razão entre o volume da amostra e o volume da fase rica.
13 Dessa forma o valor encontrado para o método foi de 166,6.

16 **4.4.5 Índice de consumo**

17 Para estudo da eficiência do sistema de pré-concentração, calculou-se o
18 índice de consumo do método que é a razão entre o volume da amostra em mililitro
19 e seu fator de pré-concentração que foi encontrado de 0,030 mL, segundo pode
20 verificar através da equação a seguir.

$$22 \quad \text{IC} = \frac{V_a}{FE}$$

1 4.4.6 Precisão

2 A precisão, expressa em termos de desvio padrão relativa (RSD), é calculado
3 pela razão entre o desvio padrão de várias medidas em uma determinada
4 concentração (Sd) e a média das medidas dessa concentração (Xc), geralmente
5 expresso em percentagem.

6

7

Equação 3.

8

$$\text{RSD}\% = \frac{Sd}{Xc} \times 100$$

9 Para o método proposto, a precisão foi expressa como repetibilidade dos
10 resultados obtidos de dez determinações (RSD%, n=10) distintas, realizadas com
11 concentrações de cobre em 5,0 µg L⁻¹ e 50,0 µg L⁻¹, obtendo-se 7,1 % e 6,9 %,
12 respectivamente.

13

14

15 4.4.7 Exatidão e aplicação

16 A exatidão de um método pode ser definida como a diferença entre o valor do
17 analito determinado experimentalmente pelo o método e o valor de referência. Para
18 a avaliação da exatidão foram utilizados materiais de referência certificados NIST
19 1515-Folha de maçã e NIST 1573a-Folha de tomate. Os resultados obtidos pelo
20 método proposto e os valores certificados dos CRM's são apresentados na Tabela
21 10, juntamente com os resultados de outras amostras de folhas de árvores da
22 região. A comparação estatística utilizando o teste *t Student* não mostrou diferença
23 significativa entre os valores obtidos utilizando o procedimento desenvolvido e os
24 valores certificados a um nível de 95% de confiança ($t_{\text{tabelado}} = 4,30$; $t_{\text{calculado}} = 1,94$
25 para as folhas de maçã, e $t_{\text{calculado}} = 2,21$ em folhas de tomate).

26

27 Para avaliar a exatidão do método proposto aplicado em amostras de águas,
28 foi aplicado o teste de adição e recuperação de analito em amostras reais. Os
29 resultados apresentados na Tabela 11 mostram que o procedimento não foi afetado
30 pela composição da matriz e pode ser aplicado satisfatoriamente para a
determinação de cobre em amostras de água com diferentes características.

1 Tabela 10: Aplicação do método proposto na determinação de cobre em amostras
2 de folhas vegetais (n=3).

Amostras de folhas	Valor encontrado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Maçã, NIST 1515	$6,72 \pm 0,96$	$5,64 \pm 0,24$
Tomate, NIST 1573 ^a	$4,30 \pm 0,32$	$4,70 \pm 0,14$
Cacau	$4,92 \pm 0,40$	-----
Jaca	$2,85 \pm 0,14$	-----
Cupuaçu	$3,86 \pm 0,78$	-----
Jambo	$4,02 \pm 0,67$	-----
Banana	$6,79 \pm 0,81$	-----

3

4

5 As concentrações de cobre encontradas nas amostras de folhas estão
6 próximas da faixa de concentração recomendada pela Empresa Brasileira de
7 Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Já para as amostras de águas, todas as
8 concentrações encontram-se abaixo dos valores máximos permitidos pelo Conselho
9 Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

10

1 Tabela 11: Resultados obtidos na determinação de cobre em amostra de água (n=3).

Amostra de água	Adicionado, $\mu\text{g L}^{-1}$	Encontrado, $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperação (%)
Mineral engarrafada	0	$3,82 \pm 0,19$	-
	10	$13,40 \pm 0,29$	95,6
Abastecimento/torneira	0	$8,14 \pm 0,44$	-
	10	$18,50 \pm 1,59$	103,4
Estuarina 1 (Praia do Cristo)	0	$1,77 \pm 0,35$	-
	10	$11,22 \pm 0,27$	94,5
Estuarina 2 (Sapetinga)	0	$1,81 \pm 0,12$	-
	10	$10,91 \pm 0,05$	91,0
Estuarina 3 (Banco da Vitória)	0	$3,63 \pm 0,4$	-
Rio Cachoeira	0	$2,59 \pm 0,06$	-
Bebedouro (UESC)	0	$2,93 \pm 0,19$	-
Fonte natural (Banco da Vitória)	0	$3,36 \pm 0,56$	-

2

3

1 **4.5 Comparações entre métodos de pré-concentração para determinação de**
2 **cobre**

3 Para comparar as características analíticas do método proposto neste
4 trabalho com outros já publicados na literatura para determinação de cobre, a Tabela
5 12 apresenta alguns métodos que utilizaram DLLME e FAAS. A Tabela 13 apresenta
6 outros métodos de pré-concentração e suas características analíticas. Com essa
7 comparação, pode-se verificar que o método desenvolvido neste trabalho possui
8 boas características analíticas comparáveis com diversos métodos publicados na
9 literatura.

1 Tabela 12: Comparação de trabalhos publicados utilizando método microextração líquido-líquido para determinação de cobre.

Método e Técnica	Amostra	Extrator	Reagente	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	VA (mL)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	FE	IC (mL)	Ref.
DLLME/FAAS	Água e farinhas de cereais	CCl_4	N,N'-bis-(2-hidroxi-5-bromobenzil)-2-hidroxi-1,3-diiminopropano	---	10	0,75	20	0,5	[64]
IL-DLLME / FAAS	Vegetais, frutas e Especiaria	[BMIM][PF6]	----	100-500	10	0,17	100	0,1	[65]
IS-DLLME/FAAS	Água	Xileno	DDTP	0,16-12,0	12	0,04	560	0,02	[66]
DLLME-SFO/FAAS	Água e bebida	1-dodecanol	8-QH	0,5-300	20	0,1	122	0,16	[67]
DLLME/FAAS	Plantas, solos e águas	CCl_4	4-fenil-3- tiossemicarbazida	2-600	10	0,69	20	0,5	[68]
DLLME/FAAS	Vinho branco e tinto	$\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$	DDTC	25-100	15	6,3	250	0,06	[69]
DLLME/FAAS	Água	Clorofórmio	1-nitroso-2-naftol	---	10,5	0,95	70	0,15	[70]
SM- DLLME/FAAS	Água e cabelo humano	1-decanol/THF	PDTC	---	10	0,11	60,3	0,17	[71]
MC-DLLME/FAAS	Ambientais	Ácido decanoico	Bisoxazolina	7-350	8,5	1,6	30	0,28	[72]
DLLME/FAAS	Água	DBIK	APDC	4-20	10	1,2	310	0,03	[73]
DLLME/FAAS	Água e folhas	Tricloroetileno	TAM	2,57-100	5,0	0,77	166,6	0,03	

(Este trabalho)

2 VA: Volume da amostra; IC: Índice de Consumo; FE: Fator de enriquecimento; IL: Líquido iônico; IS: Injeção sequencial; CCl_4 : Tetracloreto de carbono; THF:
3 Tetraidrofurano; $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$: 1,2-diclorobenzeno; 8-QH: 8- hidroxiquinolina; DDTC: Ditiocarbamato de sódio; DBIK: Diisobutilcetona; APDC:Ditiocarbamato de
4 amônio e pirrolidina; TAM: 2-(2-tiazoliazó)-5-dimetilaminofenol; ; [BMIM][PF6]: Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólico; DDTP: dietilditiocarbamato de
5 amônio; PDTC: Pirrolidina ditiocarbamato de amônio.

- 1 Tabela 13: Comparação de trabalhos publicados utilizando outros métodos de
 2 separação e pré-concentração para determinação de cobre.

Método e técnica	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	VA (mL)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	FE	IC (mL)	Ref.
SPE /FAAS	1-600	100	0,2	100	1,0	[74]
SPE /FAAS	---	500	0,8	100	5,0	[75]
SPME/ CG	0,05-250	5,0	0,1	---	---	[76]
SPE / FAAS	4-400	100	1,5	50	2,0	[77]
SPE/ ICP OES	---	100	0,0125	500	0,2	[78]
SPE / FAAS	---	80	3,1	5,4	14,8	[79]
EPN / FAAS	25-200	15	1,0	30	0,5	[80]
EPN / FAAS	4,0-400	3,0	0,6	38	0,079	[81]
EPN / ETAAS	5-90	20	2,4	---	---	[82]
EPN / FAAS	0,05-50	60	0,04	88	0,68	[83]
DLLME- SFO/GFAAS	---	10	1,0	300	0,033	[84]
DLLME/FAAS (Este trabalho)	2,57-100	5,0	0,77	166,6	0,030	

- 3 CG: Cromatografia a gás; SFO: Solidificação da gota orgânica; VA: volume de amostra; FE: fator de
 4 enriquecimento; IC: índice de consumo.

5

CAPÍTULO V – Considerações Finais

5.1 Conclusão

O método proposto de DLLME combinado com FAAS foi aplicado com sucesso para a determinação de cobre em amostras de água e de folhas de plantas frutíferas, apresentando vantagens como simplicidade, baixo custo, pouca geração de resíduos, elevado fator de enriquecimento, baixos níveis de limites de quantificação, boa precisão, exatidão satisfatória, obteve-se um bom índice de consumo de 30,0 μ L e um fator de enriquecimento de 166,6.

Este método pode também ser aplicado para a determinação de cobre na análise de rotina e pode ser adaptado para a extração de outros elementos de pré-concentração em amostras de águas, folhas, frutos, bebidas alcoólicas, solo, dentre outros tipos de amostras.

Mesmo com o uso de fungicidas a base de cobre por muitos anos na região a concentração de cobre nas diversas amostras analisadas não foi significativamente diferente de valores encontrados na literatura e, para águas, foram menores que os estabelecidos pela legislação brasileira.

1 5.2 Referências bibliográficas

2

[1] SALABRE, B. **Analysis of trace elements and their physico-chemical forms in natural waters.** *Mikrochimica Acta*, v.11, p.29-37, 1991.

[2] SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes.** Embrapa Informação Tecnológica, Brasília-Brasil, 2009.

[3] VAITSMAM, D. S.; AFONSO, J. C.; DUTRA, P. B. **Para que serve os elementos químicos.** Rio de Janeiro: Interciência, 2001.

[4] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental.** 5ª Edição. São Paulo: Bookman, 2002.

[5] BUTLER, O. T.; CAIRNS, W. R. L.; COOK, J. M.; et al. **2014 atomic spectrometry update – a review of advances in environmental analysis.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 30, p. 21-63, 2015.

[6] EVANS, E. H.; PISIONERO, J.; SMITH, C. M.; et al. **Atomic spectrometry update: review of advances in atomic spectrometry and related techniques.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 29, p. 773-794, 2014.

[7] TAYLOR, A.; DAY, M. P.; HILL, S.; et al. **Atomic spectrometry update: Review of advances in the analysis of clinical and biological materials, foods and beverages.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 30, p. 542-579, 2015.

[8] WELZ B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry,** Wiley-VCH VerlagGmbH, Weinheim, Alemanha, 1999.

[9] BUTLER, O. T.; CAIRNS, W. R. L.; COOK, J. M.; et al. **2014 atomic spectrometry update – a review of advances in environmental analysis.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 30, p. 21-63, 2015.

[10] AUGUSTO, F.; HANTÃO, L.H.; MOGOLLO'N, N. G. S.; et al. **New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction.** *Analytical Chemistry*, v. 43, p.14-23, 2013.

[11] LEMOS, V. A. ; TEIXEIRA, L. S. G.; BEZERRA, M. A.; et al. **New materials for solid phase extraction of trace elements.** *Spectroscopy Reviews*, v. 43, p. 303-334, 2008.

[12] BEZERRA, M.A.; ARRUDA, M.A.S.; FERREIRA, S.L. **Cloud point extraction as procedure of separation and preconcentration for metal determination using spectroanalytical methods - a review.** *Appl Spectrosc Ver*, v. 40, p. 269-299, 2005.

[13] BEZERRA, M. de A.; FERREIRA, S. L. **Extração em ponto nuvem: princípios e aplicações em química analítica.** Vitória da Conquista. *Edições Uesb*, 2006.

[14] TSIZIN, G. I.; STATKUS, M. A.; ZOLOTOV, Y. A. **Adsorption and extraction preconcentration of trace components in flow analytical systems.** *Journal of Analytical Chemistry*, v. 70, p. 1289–1306, 2015.

[15] SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A. **Liquid-phase microextraction.** *Analytical Chemistry*, v.29, p.1-14, 2010.

[16] HU, B.; HE, M.; CHEN, B.; XIA, L.; **Liquid phase microextraction for the analysis of trace elements and their speciation.** *Spectrochimica Acta Part B*, v. 86, p. 14-30, 2013.

[17] GHAMBARIAN, M.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. **Liquid-phase microextraction based on solidified floating drops of organic solvents.** *Microchimica Acta*, v. 180, p. 519-535, 2013.

[18] ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; GRZEŚKOWIAK, T. **Dispersive liquid-liquid microextraction.** *Analytical Chemica*, v. 30, p. 1382-1399, 2011.

[19] OJEDA, C. B.; ROJAS, F. **Separation and preconcentration by dispersive liquid–liquid microextraction procedure: recent application.** *Chromatographia*, v. 74, p.651-679, 2011.

[20] MEHTA, K.; SAHOO.; P. SEN, U.; DHANYA, B, A. K.; **A single drop micro extraction and future trends.** *International Journal of ChemTech Research*, v.2, p.1638, 2010.

[21] YOUSEFI, S. R.; AHMADI, S. J. **Development a robust ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction against high concentration of salt combined with flame atomic absorption spectrometry using microsample introduction system for preconcentration and determination of cobalt in water and saline samples.** *Microchimica Acta*, v. 172, p. 75–82, 2011.

[22] SHRIVAS, K.; JAISWAL, N. K. **Dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of copper in cereals and vegetable food samples using flame atomic absorption spectrometry.** *Analytica Methods*, v. 141, p. 2263-2268, 2013.

[23] SHAMSIPUR, M.; RAMEZANI, M.; SADEGHI, M. **Preconcentration and determination of ultra trace amounts of palladium in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry.** *Microchimica Acta*, v. 166, p. 235-242, 2009.

[24] LIANG, P.; ZHAO, E. H. **Determination of trace palladium in complicated matrices by displacement dispersive liquid-liquid microextraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry.** *Microchimica Acta*, v. 174, p. 153–158, 2011.

[25] ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A. **Development of a Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Procedure for Biodegradation Studies on Nonyl phenol Propoxylates Under Aerobic Conditions.** *Journal of Surfactants and Detergents*, v.17, p.111–120, 2014.

[26] GAO, Z.; MA, X. **Speciation analysis of mercury in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography.** *Analytica Chimica Acta*, v.702, p. 50–5, 2011.

[27] SERESHTI, H.; KHOJEH, V.; SAMADI, S. **Optimization of dispersive liquid – liquid microextraction coupled with inductively coupled plasma - optical emission spectrometry with the aid of experimental design for simultaneous determination of heavy metals in natural waters.** *Talanta*, v.83, p. 885–890, 2011.

[28] YAMINI, Y.; REZAEI, M.; KHANCHI, A.; FARAJI, M.; SALEH, A. **Dispersive liquid – liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop followed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry as a fast technique for the simultaneous determination of heavy metals.** *Journal of Chromatography A*, v.1217, p. 2358–2364, 2010.

[29] AZEVEDO, F. D.; CHASIN, A. A.; DA, M. **Metais: gerenciamento da toxicidade.** Atheneu, São Paulo-Brazil, 2003.

[30] ROCHA, L. B. **A região cacauera da Bahia – dos coronéis à vassoura-de-bruxa: saga, percepção.** Editora da UESC, Ilhéus, 2008.

[31] SILVA, E. G. P. **Determinação de cobre, manganês e zinco em amostras de chocolate em pó utilizando amostragem de suspensão e detecção por espectrometria de absorção atômica com chama multielementar sequencial.** Universidade Federal da Bahia. Dissertação de mestrado, Salvador-Ba, 2006.

[32] CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. Portaria nº357, 18 de março de 2005. Disponível em:
<<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 17 de agosto de 2015.

-
- [33] SIMPSON, J. A.; CHEESEMAN, K. H.; SMITH, S. E.; DEAN, R. D. **Free-radical generation by copper ions and hydrogen peroxide stimulation by hepes buffer.** *Biochemica Journal.* v.254, p.519-523, 1988.
- [34] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº55, de 18 de novembro de 2011. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9c68b7804930f403b56bb714d16287af/CP+N%C2%BA+55+GICRA.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 28 de junho de 2015.
- [35] CHAVES, L. H. G.; MESQUITA, E. F.; ARAUJO, D. L.; et al. **Crescimento, distribuição e acúmulo de cobre e zinco em plantas de pinhão-manso.** *Revista Ciência Agronômica,* v.41, p. 167-176, 2010.
- [36] SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes.** 2ª ed. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, 2009.
- [37] CUENCA, M. A. G.; NAZÁRIO, C. C. **Importância econômica e evolução da cultura do cacau no Brasil e na região dos tabuleiros costeiros da Bahia entre 1990 e 2002 / Manuel Alberto Gutiérrez Cuenca,** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2004.
- [38] OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil.** CEPLAC/ CEPEC/SEFIT, Ilhéus, 2004.
- [39] BEZERRA, M. DE A. **Aplicação de matriz de Doehlert na otimização de um sistema de pré-concentração em linha para determinação de cobre usando Espectrometria de absorção atômica com chama.** Universidade Federal da Bahia. Dissertação de mestrado, Salvador-Ba, 2003.
- [40] NOVAES, C. G. **Aplicação de técnicas quimiométricas na otimização de métodos usando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de absorção atômica com chama**

visando a análise de amostras ambientais. Universidade Federal da Bahia. Tese de doutorado, Salvador-Ba, 2011.

[41] QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H. ; JARDIM, I. C. S. F. **Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica.** *Química Nova*, v. 24, p. 68-76, 2001.

[42] MEHTA, K.; SAHOO.; P. SEN, U.; DHANYA, B, A. K.; **A single drop micro extraction and future trends.** *International Journal of ChemTech Research*, v.2, p.1638, 2010.

[43] MAHUGO-SANTANA, C.; SOSA-FERRERA, Z.; TORRES-PADRÓN, M. E.; et al. **Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants.** *Analytical Chemistry*, v.30, p. 731–748, 2011.

[44] MIZAEI, M.; BEHZADI, M.; ABADI, N. M.; et al. **Simultaneous separation/preconcentration of ultra trace heavy metals in industrial wastewaters by dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop prior to determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 186, p. 1739–1743, 2011.

[45] CHANG, Q.; ZHANG, J.; DU, X.; et al. **Ultrasound-assisted emulsification solidified floating organic drop microextraction for the determination of trace amounts of copper in water samples,** *Front. Environ. Sci. Engin.*, v.4, p.187-195, 2010.

[46] XIA, L.; WU, Y.; HU, B.; **Hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to low-temperature electrothermal vaporization ICP-MS for trace element analysis in environmental and biological samples.** *Journal of Mass Spectrometry* , v. 42, p. 803-810, 2007.

-
- [47] BRUNA, J. M.; YOKOYA, J. M. C.; GAITANI, C. M.; **Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas.** *Scientia Chromatographica*, v.6, p.186-204, 2014.
- [48] MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; et al. **Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações.** *Scientia Chromatographica*, v.4, p. 35–51, 2012.
- [49] HU, B.; HE, M.; CHEN, B.; XIA, L. **Liquid phase microextraction for the analysis of Elements and their speciation trace.** *Spectrochimica Acta Parte B*, v.86, p. 14-30, 2013.
- [50] DADFARNIA, S.; SHABANI, A. M. H. **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.
- [51] DIONÍSIO, A. G. G.; BATISTÃO, M. B.; SANTOS, V. B.; ICERI, T. M.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. **Novas Tendências em Preparo de Amostras para Cromatografia Líquida.** *Scientia Chromatographica*, v. 2, p. .19-29, 2010.
- [52] GHAMBARIAN, M.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. **Liquid-phase microextraction based on solidified floating drops of organic solvents.** *Microchim Acta*, v.180, p.519–535, 2013.
- [53] GHAMBARIAN, M.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. **Liquid-phase microextraction based on solidified floating drops of organic solvents.** *Microchimica Acta*, v. 180, p. 519-535, 2013.
- [54] GHAMBARIAN, M.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. **Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications.** *Microchimimica Acta*, v. 177, p. 271–294, 2012.

-
- [55] LEE, J.; LEE, H. K.; RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. **Environmental and bioanalytical application of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review.** *Analytica Chimica Acta*, v. 624, p. 253-268, 2008.
- [56] REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEIN, M. M.; et al. **Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction.** *Journal of Chromatography A*, 1116 p.1–9, 2006.
- [57] NASERI, M. T.; HEMMATKHAH, P.; HOSSEINI, M. R. M.; et al. **Combination of dispersive liquid-liquid microextraction with flame atomic absorption spectrometry using microsample introduction for determination of lead in water samples.** *Analytica Chimica Acta*, v. 610, p.135–141, 2008.
- [58] EL-SHAHAWI, M.S.; AL-SAIDI, H.M.; **Dispersive liquid-liquid microextraction for chemical speciation and determination of ultra-trace concentrations of metal ions.** *Trends in Analytical Chemistry*, v. 44, p. 12-24, 2013.
- [59] MOREIRA¹, B. J.; YOKOYA, J. M. C.; GAITANI¹, C. M. **Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas.** *Scientia Chromatographica*, v. 6, p. 186-204, 2014.
- [60] FERREIRA, S. L. C.; KORN, M. D. G. A.; et al. **Application of multivariate techniques in optimization of spectroanalytical methods.** *Applied Spectroscopy Reviews*, v.42, p.475-491, 2007.
- [61] BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R.E. ; OLIVEIRA, E.P. ; et al. **Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry.** *Talanta*, v. 76, p. 965-977, 2008.
- [62] FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; et al. **Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review.** *Talanta*, v.63, p.1061-1067, 2004.

[63] THOMPSON, M.; ELLISON, S. L.; WOOD, R. **Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis.** *Pure Appl. Chem.*, v. 74, p. 835–855, 2002.

[64] KARADAS, C.; **A new dispersive liquid–liquid microextraction method for preconcentration of copper from waters and cereal flours and determination by flame atomic absorption Spectrometry.** *Water, Air, Soil Pollution*, v. 225, p. 2150-2159, 2014.

[65] **JALBANI, N.; SOYLAK M.** Ligandless ultrasonic-assisted and ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction of copper, nickel and lead in different food samples. *Food Chemistry*, v. 167, p. 433-437, 2015.

[66] ANTHEMIDIS, A. N.; IOANNOU, H-I. G. **On-line sequential injection dispersive liquid–liquid microextraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of copper and lead in water samples.** *Talanta*, v.79, p.86-91, 2009.

[67] WU, C.; ZHAO, B.; LI, Y.; et al. **Development of dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop for the sensitive determination of trace copper in water and beverage samples by flame atomic absorption spectrometry.** *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v.32, p. 829-835, 2011.

[68] ACAR, D. K.; KARA, D. **A new dispersive liquid–liquid microextraction method for the preconcentration of copper using 4-phenyl-3-thiosemicarbazide and faas detection.** *Water, Air, Soil Pollution*, v. 225, p. 1864-1872, 2014.

[69] SEEGER, S. T.; ROSA, C. F.; BIZZI, A. C.; 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*, v.105, p.136-140, 2015.

[70] CITAK, D.; TUZEN, M.; **Separation and determination of copper in bottled water samples by combination of dispersive liquid–liquid microextraction and microsample introduction flame atomic absorption spectrometry.** *Journal of AOAC International*, v.96, p.1435-1439, 2013.

[71] AYDIN, F.; YILMAZ, E.; SOYLAK, M. **Supramolecular solvent-based dispersive liquid– liquid microextraction of copper from water and hair samples.** *Rooyal Society of Chemistry*, v.5, p.40422-40428, 2015.

[72] MOKHTARI, B.; POURABDOLLAH, K. **Micellar dispersive liquid–liquid microextraction for preconcentration of Cu(II) in environmental samples.** *Arab J SciEng*, v.39, p.95-101.

[73] ANTHEMIDIS, A. N.; MITANI, C.; BALKATZOPOULOU, P.; et al. **On-line micro-volume introduction system developed for lower density than water extraction solvent and dispersive liquid–liquid microextraction coupled with flame atomic absorption spectrometry.** *Analytical Chimica Acta*, v.733, p. 34-37, 2012.

[74] MIRABI, A.; RAD, A. S.; KHODADAD, H. **Modified surface based on magnetic nanocomposite of dithiooxamide/Fe₃O₄ as a sorbent for preconcentration and determination of trace amounts of copper.** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 389, p. 130-135, 2015.

[75] ORAL, V. E.; OZDEMIR, S.; DOLAK, I.; et al. **Anoxybacillus sp. so B1– immobilized Amberlite XAD-16 for solid-phase preconcentration of Cu(II) and pb(ii) and their determinations by flame atomic absorption spectrometry.** *Bioremediation Journal*, v.19, p.139-150, 2015.

[76] FENG, J.; SUN, M.; BU, Y.; et al. **Nanostructured copper-coated solid-phase microextraction fiber for gas chromatographic analysis of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate environmental estrogens.** *Journal of separation Science*, v. 38, p. 128-133, 2015.

-
- [77] SAMADI, A.; AMJADI, M. **Magnetic Fe₃O₄ nanoparticles modified with 1-(2-thiazolylazo)-2-naphthol as a novel solid-phase extraction sorbent for preconcentration of copper (II).** *Microchimica Acta*, v. 182, p. 257 -264, 2015
- [78] GANJALI, M. R.; POURJAVID, M. R.; BABAEI, L. H-A. **Ultra-trace monitoring of copper in environmental and biological samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after separation and preconcentration by using octadecyl silica membrane disks modified by a new schiff's base.** *Química Nova*, v. 27, p. 213-217, 2004.
- [79] SANTOS, D. S. S.; KORN, M. G. A.; GUIDA, M. A. B.; et al. **Determination of copper, iron, lead and zinc in gasoline by sequential multielement flame atomic absorption spectrometry after solid phase extraction.** *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 552-557, 2011.
- [80] SILVA, S. G.; OLIVEIRA, P. V.; ROCHA, F. R. P. A. **Green analytical procedure for determination of copper and iron in plant materials after cloud point extraction.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, p. 234-239, 2010.
- [81] LIE, T.; YANG, J.; J. **Cloud point extraction and flame atomic absorption spectrometric determination for copper(II) ion in environmental samples Cloud point extraction and flame atomic absorption spectrometric determination for copper(II) ion in environmental samples.** *Journal Iran Chemical Society*, v. 12, p.367-370, 2015.
- [82] LOPEZ-GARCIA, I.; VICENTE-MARTINEZ, Y.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. **Determination of very low amounts of free copper and nickel ions in beverages and water samples using cloud point extraction assisted by silver nanoparticles.** *Analytical Methods*, v. 7, p. 3786-3792, 2015.
- [83] GOUDARZI, N. **Determination of trace amounts of copper in river and sea water samples by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) after cloud-**

point preconcentration. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, p. 1348-1352, 2007.

[84] AMIRKAVEI, M.; DADFARNIA, S.; SHABANI. A. M. H. **Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop for simultaneous separation/preconcentration of nickel, cobalt and copper prior to determination by electrothermal atomic absorption spectrometry.** *Química Nova*, v. 36, p. 63-68, 2013.