



FURG

Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE FERRO E COBRE EM VINHO POR
ESPECTROFOTOMETRIA EMPREGANDO DLLME**

Juliana Villela Maciel

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2013

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
DE FERRO E COBRE EM VINHO POR
ESPECTROFOTOMETRIA EMPREGANDO DLLME**

por

JULIANA VILLELA MACIEL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2013

Universidade Federal do Rio Grande
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
DE FERRO E COBRE EM VINHO POR
ESPECTROFOTOMETRIA EMPREGANDO DLLME**

elaborada por

JULIANA VILLELA MACIEL

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte - Orientador (FURG - RS)

Prof^a. Dr^a. Márcia Foster Mesko (UFPeI - RS)

Prof. Dr. Márcio Raimundo Milani (FURG - RS)

Rio Grande, 28 de fevereiro de 2013.

**A vida é como andar de bicicleta. Para manter
o equilíbrio, é preciso se manter em movimento.
(Albert Einstein)**

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande, pela possibilidade da execução deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Fábio Andrei Duarte**, pela incansável orientação e incentivo, pelo seu apoio e dedicação. Obrigada!

Ao Prof. Dr. **Márcio Raimundo Milani**, pela participação e sugestões no exame de qualificação e na defesa da dissertação.

A Prof^a. Dr^a. **Márcia Foster Mesko**, pela sua participação na defesa da dissertação, e pelas suas sugestões para o final deste estudo.

A Prof^a. Dr^a. **Eliana Badiale Furlong**, pelas valiosas contribuições no exame de qualificação e pelos ensinamentos enquanto professora.

Ao Prof. Dr. **Leandro Bresolin**, pela disposição e contribuições importantes para o desenvolvimento deste estudo, e pelos ensinamentos enquanto professor.

Ao Prof. Dr. **Ednei Gilberto Primel**, coordenador do Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM) pela oportunidade de realização de meus experimentos, e pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do LACOM, por toda a ajuda e apoio, e pelos momentos de descontração.

Aos colegas de mestrado, em especial à **Carol P. Ruas, Vanda A. Pereira, Maristela B. R. Cerqueira, Renata R. Moura, Tamara G. Marinho, Katlen C. T. Bandeira e Robson Simpício** pelos dias de estudos, onde construímos conhecimento e amizade.

Aos colegas **Bruno M. Soares e Éderson R. Pereira** do LACOM, pelo importante apoio, companheirismo, conhecimento compartilhado e pela grande amizade construída neste período.

Às colegas, **Sergiane S. C. Barbosa e Liziara C. Cabrera** do LACOM, pela amizade, apoio e incentivo.

Aos colegas, **Priscila L. Drehmer, Letícia Duarte, Vanessa M. L. João, Lisiane O. Silva, Fabrícia Scariot, Mônica G. Heinemann, Augusto A. Vieira e Jaime Silvestre Mandlate** do LACOM, pela amizade, apoio e companheirismo, além

do auxílio prestado nas atividades práticas que contribuíram de forma determinante para a execução deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais, da UFPel, **Lizângela R. Ferreira, Carla A. Hartwig, Marcelo G. Crizel, Isis G. Toralles, Vanize C. Costa e Natanael R. X. Pires**, pela amizade e incentivo.

Ao ex-secretário do PPGQTA **Diego G. Pereira**, pelo auxílio e disposição demonstrados nas questões da pós-graduação.

Ao meu marido, **Sérgio Ronaldo Pinho Júnior**, pelo carinho, paciência, incentivo, confiança e companheirismo.

À minha família por todo apoio, incentivo e carinho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Vinho	4
2.1.1 A produção de vinho e sua importância sócio-econômica no estado do Rio Grande do Sul.....	4
2.1.2 Composição química do vinho	6
2.1.3 Metais presentes no vinho	7
2.2 Preparo de amostra	10
2.3 Microextração líquido-líquido dispersiva	11
2.4 Técnicas empregadas para a determinação elementar em vinho	17
2.5 Planejamento experimental	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Instrumentação	22
3.2 Reagentes	23
3.3 Amostras	23
3.4 Caracterização do espectro de absorção na região do UV-Vis para os complexos de Fe e Cu	24
3.5 Otimização da DLLME	25
3.5.1 Avaliação da formação da fase sedimentada	25
3.5.2 Procedimento da DLLME para extração e pré-concentração de Fe e Cu.....	25
3.5.3 Otimização dos parâmetros da DLLME para determinação de Fe.....	26
3.5.3.1 Escolha do solvente extrator.....	26
3.5.3.2 Escolha do solvente dispersor	26
3.5.3.3 Escolha do volume solvente dispersor.....	27
3.5.3.4 Escolha do volume solvente extrator	27
3.5.3.5 Efeito do pH	27

3.5.3.6	Concentração do complexante	27
3.5.3.7	Outros parâmetros avaliados	28
3.5.4	Otimização dos parâmetros da DLLME para determinação de Cu	28
3.5.5	Planejamento fatorial completo 2^5	29
3.6	Validação do método	30
3.6.1	Curva de calibração e linearidade	30
3.6.2	Limite de detecção e quantificação	30
3.6.3	Exatidão e precisão	31
4	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	32
4.1	Análise espectrofotométrica	32
4.1.1	Estudo da região espectral e estabilidade do complexo $\text{Fe}(\text{APDC})_3$	32
4.1.2	Estudo da região espectral e estabilidade do complexo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$	34
4.2	Avaliação do processo de DLLME	36
4.2.1	Otimização da DLLME para extração de Fe em amostras de vinho	38
4.2.1.1	Seleção do solvente extrator	38
4.2.1.2	Seleção do solvente dispersor	40
4.2.1.3	Escolha do volume do solvente dispersor	41
4.2.1.4	Escolha do volume do solvente extrator	42
4.2.1.5	Efeito do pH	44
4.2.1.6	Concentração do complexante	45
4.2.1.7	Outros parâmetros	45
4.2.2	Otimização da DLLME para extração de Cu em amostras de vinho	47
4.3	Validação do método	55
4.3.1	Curva de calibração e linearidade	55
4.3.2	Limite de detecção e quantificação	57
4.3.3	Estudo da exatidão e precisão	57
4.4	Aplicação dos métodos desenvolvidos em diferentes amostras de vinho	58
5	CONCLUSÕES	61
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa das regiões vinícolas do Rio Grande de Sul (Adaptado do IBRAVIN)... 5
- Figura 2.** Etapas envolvidas no procedimento DLLME (original). 12
- Figura 3.** Fórmula estrutural do APDC. 14
- Figura 4.** Fórmula estrutural do DDTC. 14
- Figura 5.** Esquema de um espectrofotômetro de duplo feixe. (Adaptado de Higson)... 19
- Figura 6.** Etapas envolvidas no procedimento de DLLME..... 26
- Figura 7.** Espectro de absorção de uma solução de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe(III) contendo $500 \mu\text{L}$ de APDC (1% m/v) em acetonitrila (em azul) e espectro de absorção de uma solução de acetonitrila contendo $500 \mu\text{L}$ de APDC (1% m/v) (em vermelho)..... 33
- Figura 8.** Espectro de absorção de uma solução de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cada elemento contendo $500 \mu\text{L}$ de APDC (1% m/v) em acetonitrila. 34
- Figura 9.** Espectro de absorção de uma solução de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Cu(II) contendo $500 \mu\text{L}$ de DDTC (2% m/v) em acetonitrila (em laranja) e espectro de absorção de uma solução de acetonitrila contendo $500 \mu\text{L}$ de DDTC (2% m/v) (em azul)..... 35
- Figura 10.** Espectro de absorção de uma solução de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cada elemento contendo $500 \mu\text{L}$ de DDTC (2% m/v) em acetonitrila. 36
- Figura 11.** Efeito do tipo de solvente extrator na recuperação de Fe(III). Condições: volume de amostra: 5 mL, vinho diluído (1:4, v/v); 2 mg L^{-1} Fe(III); pH da amostra 3,3; APDC: $500 \mu\text{L}$ solução de 1% m/v; volume do solvente dispersor (ACN): $500 \mu\text{L}$; volume do solvente extrator: $50 \mu\text{L}$. As barras de erros representam o desvio padrão ($n = 3$). 40
- Figura 12.** Efeito do tipo de solvente dispersor na recuperação de Fe(III). Condições: volume de amostra: 5 mL, vinho diluído (1:4, v/v); 2 mg L^{-1} Fe(III); pH da amostra 3,3; APDC: $500 \mu\text{L}$ solução de 1% m/v; volume do solvente dispersor: $500 \mu\text{L}$; volume do solvente extrator (C_2Cl_4): $50 \mu\text{L}$. As barras de erros representam o desvio padrão ($n= 3$). 41
- Figura 13.** Efeito dos diferentes volumes de ACN. Condições: volume de amostra: 5 mL, vinho diluído (1:4, v/v); 2 mg L^{-1} Fe(III); pH da amostra 3,3; APDC: 500

- μL solução de 1% m/v; volume do solvente extrator (C_2Cl_4): 50 μL . As barras de erros representam o desvio padrão ($n=3$)..... 42
- Figura 14.** Efeito dos diferentes volumes de C_2Cl_4 . Condições: volume de amostra: 5 mL, vinho diluído (1:4, v/v); 2 mg L^{-1} Fe(III); pH da amostra 3,3; APDC: 500 μL solução de 1% m/v; volume do solvente dispersor (ACN): 1300 μL . As barras de erros representam o desvio padrão ($n=3$)..... 43
- Figura 15.** Efeito do pH. Condições: volume de amostra: 5 mL, vinho diluído (1:4, v/v); 2 mg L^{-1} Fe(III); APDC: 500 μL solução de 1% m/v; volume do solvente extrator (C_2Cl_4): 80 μL ; volume do solvente dispersor (ACN): 1300 μL . As barras de erros representam o desvio padrão ($n=3$). 44
- Figura 16.** Influência da concentração de APDC. Condições: volume de amostra: 5 mL, vinho diluído (1:4, v/v); 2 mg L^{-1} Fe(III); APDC: 500 μL ; volume do solvente extrator (C_2Cl_4): 80 μL ; volume do solvente dispersor (ACN): 1300 μL e pH 3,0. As barras de erros representam o desvio padrão ($n=3$). 45
- Figura 17.** Influência da concentração de sal. Condições: volume de amostra: 5 mL, vinho diluído (1:4, v/v); 2 mg L^{-1} Fe(III); APDC: 500 μL solução de 1% m/v; volume do solvente extrator (C_2Cl_4): 80 μL ; volume do solvente dispersor (ACN): 1300 μL e pH 3,0. As barras de erros representam o desvio padrão ($n=3$). 46
- Figura 18.** Superfícies de contorno que representam a recuperação de Cu (a) como uma função do pH e do volume do solvente dispersor; (b) como uma função da concentração de DDTC e do volume do solvente dispersor; (c) como uma função da concentração de NaCl e do volume do solvente dispersor; (d) como uma função do pH e da concentração de DDTC; (e) como uma função do pH e da concentração de NaCl e (f) como uma função da concentração de DDTC e de NaCl. 53
- Figura 19.** Curvas de calibração (x) preparadas no solvente (x) com adição do analito para vinho branco (x) com adição do analito para vinho tinto..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Algumas aplicações da DLLME para a extração de metais.	15
Tabela 2. Fatores/variáveis e níveis avaliados no planejamento 2^5 para a otimização da extração de Cu por DLLME.	29
Tabela 3. Avaliação da qualidade da dispersão para diferentes combinações de solventes extratores e dispersores em amostras de vinho branco (VB) e vinho tinto (VT).	37
Tabela 4. Condições otimizadas da DLLME para posterior determinação de Fe em vinho.	47
Tabela 5. Efeito do solvente extrator na DLLME utilizando ACN como solvente dispersor para posterior determinação de Cu por UV-Vis (n=3).	48
Tabela 6. Efeito do solvente dispersor na DLLME utilizando CCl_4 como solvente extrator para posterior determinação de Cu (n=3).	48
Tabela 7. Efeitos estimados das variáveis independentes na recuperação de Cu.	49
Tabela 8. Matriz do planejamento fatorial 2^5 com as recuperações (R) obtidas para Cu.	50
Tabela 9. Parâmetros da ANOVA no modo MS residual.	51
Tabela 10. Condições otimizadas da DLLME para posterior determinação de Cu em vinho.	54
Tabela 11. Resultados obtidos para a curva no solvente.	55
Tabela 12. Resultados obtidos para a curva com adição do analito.	55
Tabela 13. Resultados de LOD e LOQ (mg L^{-1}) para Fe e Cu em vinho.	57
Tabela 14. Ensaio de recuperação para Fe e Cu em amostras de vinho branco e tinto.	58
Tabela 15. Aplicação dos métodos em diferentes amostras de vinho branco e tinto. Resultados (mg L^{-1}) representam a média \pm desvio padrão, (n=3).	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAS, espectrometria de absorção atômica, do inglês *atomic absorption spectrometry*

ANOVA, análise de variância, do inglês *analysis of variance*

AC, acetona, do inglês *acetone*

ACN, acetonitrila, do inglês *acetonitrile*

APDC, pirrolidina ditiocarbamato de amônio, do inglês *ammonium pyrrolidinedithiocarbamate*

BAT, S,S-bis (2-aminobenzil-ditiogloxima) do inglês *S,S-bis(2-aminobenzyl-dithioglyoxime)*

C₂Cl₄, tetracloretileno, do inglês *tetrachlorethylene*

C₆H₄Cl₂, 1,2- diclorobenzeno, do inglês *1,2- dichlorobenzene*

C₆H₅Cl, monoclorobenzeno, do inglês *monochlorobenzene*

CCl₄, tetracloreto de carbono, do inglês *carbon tetrachloride*

CHCl₃, clorofórmio, do inglês *chloroform*

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

CRM, material de referência certificado, do inglês *certified reference material*

DIDC, 1,3,3-trimetil-2-[5-(1,3,3-trimetil-1,3-dihidro-indol-2-ilideno)-penta-1,3-dienil]-3H-indolium, do inglês *1,3,3-trimethyl-2-[5-(1,3,3-trimethyl-1,3-dihydroindol-2-ylidene)-penta-1,3-dienyl]-3H-indolium*

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

ET AAS, espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, do inglês *electrothermal atomic absorption spectrometry*

EtOH, etanol, do inglês *ethanol*

F AAS, espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *flame atomic absorption spectrometry*

[Hmin][PF₆], 1-hexil-3-metil imidazol hexafluorofosfato, do inglês *1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate*

[Hmin][Tf₂N], 1-hexil-3-metil imidazol bis(trifluormetilsulfonil)imida, do inglês *1-hexyl-3-methylimidazolium bis(trifluormethylsulfonyl)imide*

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

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

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

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

LOD, limite de detecção, do inglês *limit of detection*

LOQ, limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeOH, metanol, do inglês *methanol*

Na-DDTC, dietilditiocarbamato de sódio, do inglês *sodium diethyldithiocarbamate*

PAN, 1-(2-piridilazo) 2-naftol, do inglês *1-(2-pyridylazo)-2-naphthol*

RSD, desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*

SDME, microextração em gota suspensa, do inglês *single drop microextraction*

THF, tetrahidrofurano, do inglês *tetrahydrofuran*

TMK, 4,4'-bis(dimetilamino)tiobenzofenona, do inglês 4,4'-bis(dimethylamino)thiobenzophenone

UV-Vis, ultravioleta e visível, do inglês *ultraviolet-visible*

RESUMO

Título: Desenvolvimento de Método para Determinação de Ferro e Cobre em Vinho por Espectrofotometria Empregando DLLME

Autor: Juliana Villela Maciel

Orientador: Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte

Este trabalho propõe o desenvolvimento de métodos de preparo de amostra empregando a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para a extração e pré-concentração de Fe e Cu em vinho, seguido da determinação espectrofotométrica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis). Nas extrações por DLLME, a complexação de Fe e Cu foi feita com pirrolidina ditiocarbamato de amônio (APDC) e dietilditiocarbamato de sódio (DDTC), respectivamente. Para a DLLME, foi usada uma mistura apropriada de pequenos volumes de dois solventes, um extrator e outro dispersor, a qual foi rapidamente injetada na amostra aquosa, ocorrendo à formação de uma dispersão e a extração praticamente instantânea dos analitos. Na otimização da DLLME para extração de Fe foram avaliados alguns parâmetros como, tipo de solvente extrator (C_2Cl_4 , 80 μL) e dispersor (acetonitrila, 1300 μL) e seus volumes, pH (3,0), concentração do APDC (1%, m/v), adição de NaCl (0,02 mol L^{-1}) e tempo de extração. Para extração de Cu foi aplicado um planejamento fatorial completo 2^5 para avaliar a influência de cinco variáveis independentes: volume dos solventes dispersor (acetonitrila, 1600 μL) e extrator (CCl_4 , 60 μL), concentração de DDTC (2%, m/v), pH (3,0) e concentração de NaCl. Após a otimização das condições para Fe, a curva de calibração com adição de analito foi linear entre 0,2 e 2,5 mg L^{-1} para vinho branco ($R^2 = 0,9985$) e para vinho tinto ($R^2 = 0,9988$). Para Cu, a curva de calibração com adição de analito foi linear entre 0,05 e 1,0 mg L^{-1} para vinho branco ($R^2 = 0,9995$) e para vinho tinto ($R^2 = 0,9986$). Os limites de quantificação foram de 0,75 e 0,37 mg L^{-1} para Fe e Cu, respectivamente. A exatidão foi avaliada utilizando ensaio de recuperação, as quais variaram entre 96% e 112%, com desvio padrão relativo inferior a 8%. Os métodos foram aplicados para 5 amostras de vinho branco e 5 amostras de vinho tinto, obtendo-se concentrações entre 1,3 e 5,3 e entre 2,5 e 4,4 mg L^{-1} para Fe e entre 0,4 e 1,5 e entre 0,9 e 2,5 mg L^{-1} para Cu, respectivamente. Os métodos desenvolvidos para a extração e pré-concentração de Fe e Cu em vinhos por DLLME e quantificação por UV-Vis mostraram-se adequados, em termos de linearidade, exatidão e precisão.

Palavras-chave: Microextração líquido-líquido dispersiva; Ferro; Cobre; Vinho; UV-Vis.

ABSTRACT

Title: Development of a Method for the Determination of Iron and Copper in Wine by Spectrophotometry Employing DLLME

Author: Juliana Villela Maciel

Advisor: Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte

This work proposes the development of sample preparation methods using dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) for the extraction and preconcentration of Cu and Fe in wine, followed by spectrophotometric determination in ultraviolet-visible (UV-Vis) region. For extractions by DLLME, complexation of Fe and Cu was carried out with ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (APDC) and sodium diethyldithiocarbamate (DDTC), respectively. For DLLME, an appropriate mixture of small volumes of solvents (extractor and disperser) was used, which was quickly injected in the sample. A cloudy solution was observed, with instantaneous extraction of the analytes. For the optimization of DLLME for subsequent Fe determination, some parameters were evaluated, such as the type and volume of extractor (C_2Cl_4 , 80 μL) and disperser (acetonitrile, 1300 μL) solvents, pH (3.0), concentration of APDC (1%, w/v), addition of NaCl (0.02 mol L^{-1}) and extraction time. For Cu extraction, a 2^5 full factorial design was applied to evaluate the influence of five independent variables: volume of disperser (acetonitrile, 1600 μL) and extractor (CCl_4 , 60 μL) solvents, DDTC concentration (2%, w/v), pH (3.0) and NaCl concentration. For Fe, the calibration curves (with standard addition) were linear from 0.2 to 2.5 mg L^{-1} for white wine ($R^2 = 0.9985$) and red wine ($R^2 = 0.9988$). For Cu, the calibration curves (with standard addition) were linear between 0.05 and 1.0 mg L^{-1} for white wine ($R^2 = 0.9995$) and red wine ($R^2 = 0.9986$). The limits of quantification were 0.75 and 0.37 mg L^{-1} for Fe and Cu, respectively. The accuracy was evaluated by spiking recovery, with recoveries ranging from 96% to 112%, and relative standard deviation below 8%. The methods were applied to five samples of white wine and five samples of red wine and concentrations ranged from 1.3 to 5.3 and 2.5 to 4.4 mg L^{-1} for Fe, and from 0.4 to 1.5 and 0.9 to 2.5 mg L^{-1} for Cu, respectively. The methods for extraction and preconcentration of Fe and Cu in wines by DLLME and quantification by UV-Vis were suitable in terms of linearity, accuracy and precision.

Keywords: Dispersive liquid-liquid microextraction; Iron; Copper; Wine; UV-Vis.

1 INTRODUÇÃO

O vinho é uma bebida consumida mundialmente, sendo apreciado desde o surgimento das primeiras civilizações.^{1,2} A qualidade do vinho bem como suas características organolépticas estão diretamente relacionadas à sua composição química. Cabe salientar, que a maior parte do conteúdo total de metais encontrados no vinho tem origem natural e reflete a geoquímica dos solos onde são cultivadas as vinhas. Esses metais apresentam concentrações características influenciadas pela maturação da uva, sua variedade, tipo de solo e as condições climáticas durante o seu crescimento.³ Além disso, a presença de metais pode estar associada à contaminação externa da videira durante o crescimento ou durante diferentes fases na elaboração do vinho (desde a colheita até o envase). Além disso, as contaminações podem ser provocadas pela utilização de fertilizantes, através da poluição ambiental ou nas etapas de produção do vinho.⁴

O consumo de vinho pode contribuir para a ingestão de elementos essenciais, tais como Fe e Cu, porém estes devem ser monitorados, pois em concentrações elevadas podem se tornar tóxicos a saúde humana. Além disso, estes elementos desempenham um papel importante na estabilidade do vinho e, se encontrados em quantidades excessivas, podem produzir turbidez e precipitações que alteram o seu aspecto, aroma e sabor.^{2,5}

Nas técnicas que empregam a determinação de elementos traço, existem fatores que merecem atenção, principalmente com respeito ao preparo da amostra, sendo essa responsável pela maior fonte de erros na sequência analítica.⁶ A determinação direta de elementos traço em vinhos pode ser uma alternativa aos métodos de preparo de amostra convencionais. Entretanto, podem ser encontradas dificuldades devido às baixas concentrações e ao efeito de matriz causado na etapa de determinação. Desta forma, etapas como extração e pré-concentração tornam-se necessárias quando a

¹ Tariba, B.; *Biol. Trace Elem. Res.* 144 (2011) 143-156.

² Kostic *et al.*; *J. Serb. Chem. Soc.* 75 (2010) 1701-1709.

³ Álvarez *et al.*; *J. Food Compos. Anal.* 20 (2007) 391-395.

⁴ Pohl, P.; *Trac-Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 941-949.

⁵ Catarino *et al.*; *Ciência Téc. Vitiv.* 18 (2003) 65-76.

⁶ Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R., *Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana*, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

concentração do analito está abaixo ou próxima ao limite de detecção (LOD).⁷ De maneira geral, as principais vantagens da pré-concentração são a miniaturização, redução no consumo de solventes e a melhoria na seletividade de extração.

Dentre os diversos métodos de pré-concentração utilizados para posterior determinação de metais, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) tem sido bastante empregada nos últimos anos em amostras aquosas e ambientais.^{8,9} Mesmo sendo um método recente,¹⁰ diversos estudos comprovam sua eficiência na extração de compostos orgânicos^{11,12} e metais.^{13,14} Entretanto, não existem trabalhos na literatura relatando a extração de Fe e Cu em vinhos utilizando a DLLME.

A DLLME é um método utilizado no preparo de amostras, baseado em um sistema ternário de extração por solvente e é usualmente empregado com o propósito de isolar um ou mais analitos presentes em diferentes matrizes aquosas.¹⁵ A extração ocorre por meio de uma mistura apropriada de pequenos volumes de dois solventes (um extrator e outro dispersor), a qual é rapidamente injetada na amostra aquosa, ocorrendo à formação de uma dispersão, com a extração praticamente instantânea dos analitos. Do ponto de vista econômico e ambiental, a DLLME apresenta vantagens em relação aos métodos convencionais de extração, pois é rápida, de baixo custo, de fácil operação, apresenta um grande fator de enriquecimento e consome pequenos volumes de solvente orgânico.

Para a quantificação elementar, as técnicas espectrométricas têm sido amplamente utilizadas. A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) é bastante utilizada devido ao baixo custo relativo, fácil operação e boa seletividade. Entretanto, a determinação de elementos traço em vinho nem sempre é adequada devido à reduzida sensibilidade quando comparada às técnicas de plasma. A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) também são empregadas com sucesso devido à capacidade multielementar e aos baixos LODs. Além disso, a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET

⁷ Dadfarnia *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 658 (2010) 107-119.

⁸ Baliza *et al.*; *Microchem. J.* 93 (2009) 220-224.

⁹ Shokoufi e Hamdamali, *Anal. Chim. Acta* 681 (2010) 56-62.

¹⁰ Rezzae *et al.*, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1-9.

¹¹ Martins *et al.*, *Sci. Chromatogr.* 4 (2012) 29-45.

¹² Caldas *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 665 (2010) 55-62.

¹³ Gharehbaghi e Shemirani, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 423-428.

¹⁴ De la Calle *et al.*; *Talanta* 84 (2011) 109-115.

¹⁵ Rezzae *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342-2357.

AAS) combinada à DLLME também tem sido reportada na literatura.^{16,17} No entanto, técnicas que fornecem alta sensibilidade, também possuem custo relativamente elevado como, por exemplo, ICP OES e ICP-MS. Neste sentido, a espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) tem sido combinada com sucesso à DLLME, sendo utilizada para determinação de metais em diversas amostras, tais como água,¹⁸ urina,¹⁹ chá,²⁰ etc. Suas vantagens quando comparada às técnicas citadas anteriormente são o baixo custo, simplicidade de operação e rapidez.

Desta forma, este trabalho propõe o desenvolvimento de dois métodos de preparo de amostra empregando DLLME, para determinação de Fe e Cu em vinho, utilizando a espectrofotometria de absorção molecular (UV-Vis) para quantificação dos analitos.

¹⁶ Anthemidis e Ioannou, *Anal. Chim. Acta* 668 (2010) 35-40.

¹⁷ Nasari *et al.*; *Talanta* 75 (2008) 56-62.

¹⁸ Skrlíková *et al.*; *Microchem. J.* 99 (2011) 40-45.

¹⁹ Ezoddin *et al.*; *J. Anal. Chem.* 65 (2010) 153-158.

²⁰ Wen *et al.*; *Microchem. J.* 97 (2011) 249-254.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Vinho

2.1.1 A produção de vinho e sua importância sócio-econômica no estado do Rio Grande do Sul

O vinho é uma bebida derivada exclusivamente da fermentação alcoólica de uva madura e fresca ou de suco de uva fresca, de grande significância social e econômica.²¹ Inicialmente, esta bebida foi usada como uma substância capaz de provocar alterações mentais durante cerimônias religiosas em tempos antigos.²² Entretanto, com o passar dos anos, a bebida tornou-se um item praticamente indispensável na dieta humana.

A produção de vinho passou a fazer parte da história do Brasil a partir da chegada dos primeiros administradores portugueses, destacando-se o governador Martin Afonso de Souza, na capitania de São Vicente, em 1532.

No Rio Grande do Sul, a produção de vinho está diretamente relacionada ao início da colonização italiana na Serra Gaúcha (entre 1870 e 1875), pois os colonos tinham o hábito de elaborar vinhos de mesa para consumo próprio. Com a intensificação da chegada de imigrantes no final do século XIX e início do século XX, houve um aumento da produção de vinho em toda a região Sul. Porém, a industrialização e comercialização de vinhos se desenvolveram somente a partir das últimas três décadas do século XX, com a instalação das primeiras multinacionais nesse setor.²³

No Brasil, o estado do Rio Grande do Sul se destaca entre os demais estados brasileiros pela qualidade da uva produzida que se destina à elaboração de vinhos. Neste estado, são obtidos vinhos finos, tintos e brancos, além de vinhos de mesa,

²¹ Aquarone, E. *Biotecnologia: Alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. 1ª Ed. rev., São Paulo: Edgard Blücher, 1990.

²² Johnson, H. *A História do vinho*. 1ª Ed. São Paulo: Companhia das Letras, 1999.

²³ Mello, C. E. C. *Presença do vinho no Brasil: um pouco de História*. 1ª Ed. São Paulo: Editora de Cultura Ltda, 2007.

representando 90% da produção nacional. O restante é produzido nas regiões Sudeste e Nordeste do país.²⁴

A consolidação desse desempenho teve início a partir da década de 90, com o uso de novas tecnologias para a produção de vinho. Assim, o crescimento de investimentos neste setor resultou em um aumento qualitativo dos vinhos produzidos na região sul do Brasil. Essas mudanças qualitativas incluíram as indústrias vinícolas no mercado internacional, com o reconhecimento de vários países, como Alemanha, Argentina, Bélgica, Chile, França, Itália, Portugal, entre outros.

As áreas de produção de vinho no Rio Grande do Sul estão distribuídas em quatro regiões: Campos de Cima da Serra, Serra Gaúcha, Serra do Sudeste e Campanha, conforme destacadas no mapa da Figura 1.²⁵



Figura 1. Mapa das regiões vinícolas do Rio Grande de Sul (Adaptado do IBRAVIN²⁵).

De acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2011 houve um aumento de 13% na produção de uvas no Brasil. Além disso, o Rio Grande do Sul apresentou um aumento de 19% na produção de uvas no período entre 2008 e 2011. Em 2011, também houve um aumento de 0,51% na área plantada e 0,88% na área colhida. Em relação a produção no ano de 2010, os vinhos de mesa tiveram aumento de 4,1%, enquanto os vinhos finos sofreram redução de 6,6%.

²⁴ Mello, L. M. R. *Viticultura brasileira. Panorama 2011*. Embrapa Uva e Vinho, 2012.

²⁵ IBRAVIN, Instituto Brasileiro do Vinho. Regiões Produtoras. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php> acessado em: 15 de Janeiro de 2013.

2.1.2 Composição química do vinho

O conhecimento da composição química do vinho permite compreender melhor os fenômenos que afetam a maturação da uva, a elaboração do vinho e sua conservação.²¹ Do ponto de vista químico, o vinho é composto principalmente por uma mistura de água e álcool etílico, contendo uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos.²⁶ Os principais compostos que o constituem são, açúcares, alcoóis, ácidos orgânicos, sais minerais e orgânicos, compostos fenólicos, compostos nitrogenados e compostos aromáticos.^{27,28}

O teor de açúcar presente no vinho é proveniente da uva, sendo a frutose e a glicose os principais açúcares constituintes da uva. Na fermentação do vinho, a maioria das leveduras fermenta preferencialmente a glicose. Devido a isso, os vinhos fermentados apresentam uma fração maior de frutose do que glicose. A uva contém ainda uma pequena concentração de açúcares não fermentáveis, os quais estão presentes no vinho, como pentoses (principalmente arabinose e xilose).²¹

Entre os compostos voláteis presentes no vinho, o álcool etílico é o mais abundante variando entre 8 e 19% (v/v).²⁵ Outros alcoóis podem ser encontrados, tais como metílico, isobutílico, isoamílico, hexílico, feniletílico, entre outros. Entretanto, comparados ao etanol, estes alcoóis estão presentes em baixas concentrações.²¹

Os principais ácidos orgânicos presentes no vinho são os ácidos tartárico, málico e cítrico, provenientes da uva, além dos ácidos succínico, láctico e acético, provenientes da fermentação. Sua acidez fixa é formada principalmente pelos ácidos tartárico, málico, láctico, succínico e cítrico. Entretanto, a acidez volátil é constituída de ácidos voláteis, sendo o acético o principal componente. A boa qualidade do vinho está relacionada ao baixo teor de acidez volátil. Os principais sais inorgânicos que podem ser encontrados nos vinhos são cloreto, fosfato, sulfato e sulfito. Entre os principais sais orgânicos, destacam-se o tartarato, o malato e o lactato.²¹

Cabe destacar que, os compostos fenólicos presentes nos vinhos são de extrema importância, pois são estes compostos que conferem aos vinhos a coloração e o sabor.²¹ Os polifenóis são sintetizados pela videira quando esta é submetida a um

²¹ Aquarone, E. *Biotecnologia: Alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. 1ª Ed. rev., São Paulo: Edgard Blücher, 1990.

²⁶ Pessanha *et al.*; *Spectrochim. Acta Part B* 65 (2010) 504-507.

²⁷ Grindlay *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 691 (2011) 18-32.

²⁸ Borges, E. P. *ABC Ilustrado da Vinha e do Vinho*. 2ª Ed. São Paulo: Mauad, 2008.

estresse do tipo biótico (ataque de fungos) ou abiótico (falta de água, radiação UV ou variação de temperatura).²⁹ Alguns fatores são importantes para a definição do perfil fenólico nos vinhos, tais como, variedade da uva, safra, região de cultivo, práticas vitícolas, maturação e condições climáticas.³⁰ A concentração encontrada desses compostos em vinho é, geralmente, inferior a 1 g L⁻¹.²⁷ Por outro lado, os compostos nitrogenados podem ser encontrados em concentrações entre 1 e 3 g L⁻¹.²¹ Entre esses compostos, destacam-se as proteínas, os polipeptídios e os aminoácidos. Adicionalmente, podem ser encontrados outros compostos como ésteres, aldeídos e cetonas. Os ésteres podem ser formados durante a fermentação pelas leveduras, pelas bactérias lácticas e acéticas e, também, durante o envelhecimento em barril de madeira.

2.1.3 Metais presentes no vinho

Além dos compostos citados acima, o vinho contém alguns metais que podem ser provenientes de fontes naturais ou por contaminação externa.¹ A composição elementar do vinho depende de diversas variáveis como, tipo de uva, características do solo e condições ambientais e pode ser alterada devido à contaminação por diversas fontes durante o processo de fabricação.^{31,32} A determinação da composição elementar em vinhos é de extrema relevância por diferentes razões. Do ponto de vista toxicológico, o vinho é uma importante fonte de metais essenciais e não-essenciais, os quais podem ser prejudiciais se ingeridos em concentrações suficientemente elevadas (ex: As, Cd e Pb).³³ Por outro lado, elementos como Fe e Cu são essenciais aos seres humanos e estão relacionados diretamente com a atividade metabólica de enzimas, as quais catalisam reações fisiológicas importantes. Entretanto, em casos de ingestão intencional ou acidental de elevadas concentrações destes elementos, podem causar dores abdominais, náuseas, tonturas, cefaléias, taquicardia, dificuldade respiratória,

¹ Tariba, B.; *Biol. Trace Elem. Res.* 144 (2011) 143-156.

²¹ Aquarone, E. *Biotecnologia: Alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. 1ª Ed. rev., São Paulo: Edgard Blücher, 1990.

²⁷ Grindlay *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 691 (2011) 18-32.

²⁹ Bertagnolli *et al.*; *Braz. J. Pharm. Sci.* 43 (2007) 71-77.

³⁰ Mamede e Pastore, *B CEPPA* 22 (2004) 233-252.

³¹ Iglesias *et al.*; *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 219- 225.

³² Jakubowski *et al.*; *Fresenius J. Anal. Chem.* 364 (1999) 424- 428.

³³ Barbaste *et al.*; *Food Addit. Contam.* 20 (2003) 141-148.

insuficiência hepática e renal, entre outros.^{34,35} A dose diária recomendada destes minerais é variável, dependendo da faixa etária. Visando a proteção da saúde, foram estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) quantidades que devem ser consumidas diariamente para atender às necessidades nutricionais. Para a ingestão diária destes elementos em adultos, o valor recomendado para Fe é 14 mg dia⁻¹ e para Cu é 0,9 mg dia⁻¹.³⁶ Em relação à estabilidade dos vinhos, Fe e Cu desempenham um papel importante nas reações de oxi-redução, porém quando presentes em quantidades excessivas, estes elementos podem produzir alterações químicas conhecidas como casse férica e casse cúprica, cujos efeitos são determinantes sobre as propriedades organolépticas, justificando assim, o monitoramento da concentração destes elementos.^{21,37}

A origem de Fe nos vinhos deve-se essencialmente a fontes naturais, sendo associada à natureza do solo e da própria casta. Entretanto, materiais e equipamentos utilizados no processo de produção, armazenamento e conservação do vinho, também podem contribuir para o aumento da concentração deste metal. Além disso, a quantidade de Fe precipitado no mosto pode variar de acordo com as reações de oxi-redução, durante e após a fermentação. O Fe presente no vinho pode ser encontrado nos estados de oxidação ferroso [Fe(II)] e férrico [Fe(III)]. Quando conservados em locais fechados, protegidos da circulação de ar, o Fe encontra-se na forma de Fe(II), que é solúvel no vinho. Por outro lado, quando o vinho é exposto ao ar, o Fe(II) é facilmente oxidado a Fe(III).³⁸ O Fe(III) encontra-se, em grande parte na forma de sais complexos estáveis, além de uma pequena fração na forma de íon Fe(III). Os complexos formados com o Fe(III) são insolúveis nos vinhos, como por exemplo, o FePO₄ (sal esbranquiçado) que ocasiona a casse branca, no caso dos vinhos brancos. No entanto, o Fe(III) também pode ser complexado com compostos fenólicos ocasionando a casse azul, que ocorre nos vinhos tintos. Segundo o Ministério da

²¹ Aquarone, E. *Biotecnologia: Alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. 1ª Ed. rev., São Paulo: Edgard Blücher, 1990.

³⁴ WHO, World Health Organization. *Copper: Environmental Health Criteria 200*, Geneva, 1998.

³⁵ WHO, World Health Organization. *Guidelines for Drinking - Water Quality*, Geneva, 1996.

³⁶ ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br> acessado em: 18 de Janeiro de 2013.

³⁷ Lara *et al.*; *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 293-297.

³⁸ Pohl, P., Prusisz, B.; *Talanta* 77 (2009) 1732-1738.

Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a concentração máxima permitida de Fe em bebidas alcoólicas é de 15 mg L⁻¹.³⁹

Por outro lado, a origem de Cu nos vinhos se dá principalmente pela adição de CuSO₄ no processo de vinificação e também pela própria constituição da uva. O contato do vinho com materiais de cobre, latão ou bronze, durante o processo de conservação, pode gerar um aumento na concentração de Cu. A precipitação de Cu se dá, em grande parte, no decorrer da fermentação sob forma de sulfetos insolúveis, os quais são eliminados com os resíduos.²¹ O Cu também pode atuar como catalisador da oxidação do Fe, facilitando a ocorrência da casse férrica.⁴⁰ Segundo o MAPA, a concentração máxima permitida de Cu em bebidas alcoólicas é de 1,0 mg L⁻¹, porém acima de 0,5 mg L⁻¹ pode ocasionar graves problemas de instabilidade, mesmo em vinhos engarrafados há algum tempo, causando a casse cúprica.^{5,39}

A variação das concentrações de alguns metais como Ca, K, Cd, Mn, Pb e Zn em diferentes vinhos pode ser atribuída ao uso de agrotóxicos durante o cultivo da uva. Além disso, a poluição ambiental próxima aos vinhedos também pode aumentar a concentração de alguns elementos no produto final.⁴¹ No caso de vinhedos situados próximos a rodovias ou áreas industriais, a concentração de Cd e Pb tende a ser mais elevada. Entretanto, a presença de alguns metais em vinho também pode estar associada à contaminação externa da videira durante seu crescimento ou durante as fases de elaboração do vinho (desde a colheita até o engarrafamento). A partir da adição de diferentes compostos durante a etapa de produção, bem como por equipamentos de processo, onde o longo contato do vinho com materiais como alumínio, latão, vidro, aço inox, madeira, entre outros, são fontes habituais de Al, Cd, Cr, Cu, Fe e Zn.⁴²

Desta forma, é importante destacar que ocorre uma eliminação parcial natural dos metais presentes no vinho durante o processo de fermentação, por precipitação sob a forma de sais orgânicos e/ou sulfetos, ou absorção e adsorção por leveduras e bactérias.²¹

⁵ Catarino *et al.*; *Ciência Téc. Vitiv.* 18 (2003) 65-76.

²¹ Aquarone, E. *Biotecnologia: Alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. 1ª Ed. rev., São Paulo: Edgard Blücher, 1990.

³⁹ MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, Secretaria de defesa agropecuária. Portaria nº 259, de 31 de maio de 2010. Diário Oficial da União, seção 1, jun. 2010.

⁴⁰ Pohl e Sergiel, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 9378-9384.

⁴¹ Bentlin *et al.*; *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (2011) 327-336.

⁴² Catarino *et al.*; *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 158- 165.

2.2 Preparo de amostra

A etapa de preparo de amostra tem despertado o interesse de muitos pesquisadores nas últimas décadas, sendo ainda, um ponto crítico dos procedimentos analítico. A baixa concentração de alguns analitos, a grande quantidade de potenciais interferentes e a incompatibilidade da matriz da amostra com a técnica instrumental são as principais razões para este tipo de pesquisa. Na maioria dos métodos, o preparo da amostra é um passo inevitável, tendo grande influência na qualidade (sensibilidade, seletividade, exatidão e precisão) do resultado analítico.⁷ Além disso, o preparo da amostra é, frequentemente, considerado como uma das partes mais importantes e, também, mais demoradas da análise química para grande parte das amostras. Desta forma, existe a necessidade de um constante desenvolvimento nesta área, influenciado também, pelo amplo desenvolvimento das técnicas de detecção e pela necessidade atingir menores LODs e, conseqüentemente, a necessidade de trabalhar em menor nível de contaminação.⁴³ Ademais, um método de preparo de amostra eficiente deve ser simples, rápido, utilizar pequenos volumes de reagentes, permitir preparo simultâneo de um número apreciável de amostras e, finalmente, permitir que os resultados sejam exatos e precisos.⁴⁴

De maneira geral, métodos de preparo de amostras com alto teor de matéria orgânica e posterior determinação elementar são baseados no aquecimento da amostra na presença de agentes oxidantes. Este tipo de procedimento ocasiona, inevitavelmente, a diluição da amostra, o que não é desejado no caso de analitos em baixas concentrações.

Para a determinação elementar em vinhos, alguns métodos de preparo de amostra têm sido amplamente empregados, tais como a digestão assistida por micro-ondas (MAD),⁴⁵ a digestão assistida por micro-ondas com radiação ultravioleta (MADUV)⁴⁶ ou a simples diluição da amostra.⁴⁷ Com aplicação destes métodos de digestão é possível reduzir significativamente interferências espectrais e não-espectrais. Entretanto, a maior parte dos procedimentos de decomposição por via

⁷ Dadfarnia *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 658 (2010) 107-119.

⁴³ Florian e Knapp, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1515- 1520.

⁴⁴ Krug, J. F. *Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*. 1ª Ed. rev., Piracicaba, 2010.

⁴⁵ Lopez *et al.*; *Sci. Total Environ.* 220 (1998) 1-9.

⁴⁶ Almeida e Vasconcelos, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3012-3023.

⁴⁷ Kékedy-Nagy *et al.*; *Acta Chim. Slov.* 57 (2010) 912-915.

úmida envolvem mais tempo de execução e, normalmente, requerem equipamentos de maior porte e custo, bem como maior atenção e experiência do analista para a obtenção de resultados satisfatórios.

A determinação de metais em vinho apresenta dificuldades inerentes a todas as determinações analíticas, devido às baixas concentrações. Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de métodos de preparo de amostra eficientes, que possibilitem detecção em nível traço. Nesse sentido, os químicos analíticos vêm aprimorando os métodos convencionais na busca de métodos com maior rapidez, baixo custo e que dispendem de menores quantidades de solventes.⁴⁸

Assim, métodos de microextração estão sendo desenvolvidos com a finalidade de suprir certas desvantagens existentes em métodos tradicionais como, por exemplo, a extração líquido-líquido (LLE) que além de ser demorada, exige uma grande quantidade de solventes orgânicos tóxicos, prejudicando o meio ambiente.⁴⁹

Desta forma, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) tem sido considerada como uma alternativa para a pré-concentração de compostos orgânicos e inorgânicos a partir de matrizes aquosas.⁵⁰ Na literatura podem ser encontrados alguns trabalhos relacionados à utilização da DLLME para extração e pré-concentração de compostos orgânicos em vinhos.^{51,52,53} No entanto, até o momento, não há trabalhos publicados utilizando a DLLME para a extração e pré-concentração de metais em vinho.

2.3 Microextração líquido-líquido dispersiva

A DLLME pode ser considerada como uma versão miniaturizada da LLE, pois requer pequenos volumes (da ordem de microlitros) de solventes.⁵⁰ A DLLME está baseada na dispersão de um solvente extrator (imiscível com água) e um solvente dispersor (miscível em água e no solvente extrator) em uma solução aquosa, o que proporciona uma grande área de contato entre a fase aquosa (amostra) e o solvente extrator.¹⁰ É importante ressaltar que a DLLME foi desenvolvida com o propósito de

¹⁰ Rezzae *et al.*, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1-9.

⁴⁸ Anthemidis, A. N., Ioannou, K. G.; *Talanta* 79 (2009) 86-91.

⁴⁹ Yousefi, S. R., Ahmadi, S. J.; *Microchim. Acta* 172 (2011) 75-82.

⁵⁰ Grzésekowiak, A.; Grzésekowiak, T.; *Trac-Trends Anal. Chem* 30 (2011) 1382-1399.

⁵¹ Pizarro *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1576-1584.

⁵² Rodríguez-Cabo *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6603-6611.

⁵³ Campillo *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7323-7330.

extrair e pré-concentrar compostos orgânicos. No entanto, atualmente é crescente o número de artigos publicados relacionados ao desenvolvimento da DLLME para extração e pré-concentração de compostos inorgânicos.⁵⁰

As etapas do procedimento de DLLME estão mostradas na Figura 2. Uma mistura apropriada do solvente dispersor e do solvente extrator é injetada rapidamente, com auxílio de uma seringa, na solução aquosa. Após leve agitação, é formada uma dispersão com microgotas. As microgotas consistem do solvente extrator juntamente com o analito já extraído. Posteriormente a centrifugação, ocorre a coalescência, formando uma fase sedimentada, a qual é retirada com o auxílio de uma seringa e após, é efetuada a quantificação dos analitos pela técnica mais apropriada.

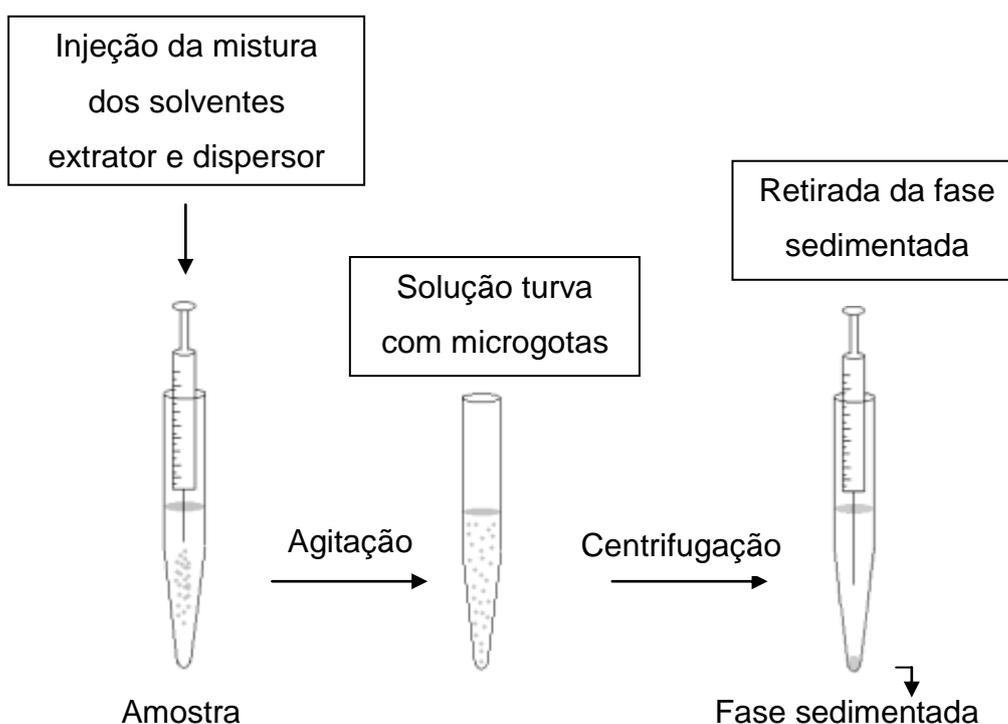


Figura 2. Etapas envolvidas no procedimento DLLME (original).

⁵⁰ Grzésekowiak, A.; Grzésekowiak, T.; *Trac-Trends in Anal. Chem* 30 (2011) 1382-1399.

Do ponto de vista econômico e ambiental, as vantagens da DLLME em relação aos métodos convencionais de extração com solvente são a simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, fácil manipulação, baixo consumo de solventes orgânicos, alta recuperação e alto fator de enriquecimento. Além disso, a DLLME é compatível com uma variedade de técnicas analíticas tais como, cromatografia,⁵⁴ AAS,⁵⁵ ICP OES,⁵⁶ ICP-MS⁵⁷ e espectrofotometria UV-Vis.²⁰

Cabe destacar que o processo de extração por DLLME é influenciado por alguns parâmetros, tais como, volume e tipo de solventes extrator e dispersor, tempo de extração, efeito da adição de sal e pH. Além disso, para a extração de metais, é necessário que o analito seja quantitativamente complexado com uma molécula orgânica anteriormente à etapa de extração, o que aumenta a afinidade entre o analito e o solvente extrator.⁵⁸

Os agentes complexantes podem ser substâncias orgânicas cíclicas ou acíclicas, contendo átomos de oxigênio, nitrogênio, enxofre, entre outros. Além disso, podem possuir elétrons livres, ou seja, pares eletrônicos não compartilhados. De acordo com a posição desses heteroátomos, obtém-se uma conformação que apresenta uma cavidade, permitindo a entrada de íons metálicos, resultando na formação do complexo. Os íons que possuem carga positiva são atraídos pelos pares eletrônicos livres, dispostos simetricamente em relação à cavidade, se ligando ao composto devido à ação de forças eletrostáticas. O complexo formado transporta os íons de um meio para outro devido às mudanças em suas propriedades físicas e através de meios adequados (solventes).⁵⁹

Dentre os principais quelantes empregados, os ditiocarbamatos se destacam, por formar quelatos estáveis com vários cátions metálicos sendo, portanto, comumente utilizados em sistemas de pré-concentração para determinação de metais em diferentes matrizes.⁴⁸ Suas propriedades estão diretamente ligadas à presença de dois átomos de enxofre, doadores de elétrons, que na maioria das vezes, estão coordenados ao metal. São estes átomos que determinam a natureza das ligações com

²⁰ Wen *et al.*; *Microchem. J.* 97 (2011) 249-254.

⁵⁰ Grzésekowiak, A.; Grzésekowiak, T.; *Trac-Trends Anal. Chem* 30 (2011) 1382-1399.

⁵⁴ Jia *et al.*; *Spectrochim. Acta Part B* 66 (2011) 88-92.

⁵⁵ Naseri *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 610 (2008) 135-141.

⁵⁶ Sereshti *et al.*; *Talanta* 83 (2011) 885-890.

⁵⁷ Jia *et al.*; *Microchim. Acta* 171 (2010) 49-56.

⁵⁸ Jahromi *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 305-311.

⁵⁹ Lin, W. O.; Neto, J. T. X. B.; *Química Nova* 21 (1998) 630-634.

os metais, bem como sua estabilidade após a complexação. A formação dos complexos depende da cinética da reação e concentração das espécies envolvidas, principalmente do complexante. A estabilidade dos complexos de ditiocarbamatos é extremamente dependente do pH.⁶⁰

O agente complexante pirrolidina ditiocarbamato de amônio (APDC), mostrado na Figura 3, é cíclico e possui a fórmula molecular ($C_5H_{12}N_2S_2$). Este quelante é utilizado como complexante e coprecipitante de inúmeros íons metálicos como As, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Ge, Mo, Ni, Pb, Sb, Sn, Tl, V e Zn, entre outros.^{61,62,63,64} Este ditiocarbamato é comumente utilizado em sistemas de extração para subsequente determinação de metais em diferentes matrizes.

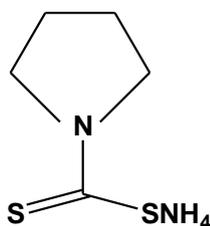


Figura 3. Fórmula estrutural do APDC.

O dietilditiocarbamato de sódio (DDTC) é um agente complexante acíclico que possui fórmula molecular ($C_5H_{10}NS_2Na$), mostrada na Figura 4. O DDTC é um ditiocarbamato classicamente empregado em extrações de Cu.⁶⁵ O DDTC forma complexos com aproximadamente 30 íons, e a sequência de estabilidade para os principais complexos é $Hg > Ag > Cu > Ni > Co > Bi > Pb > Cd > Zn > Mn$.⁶⁶

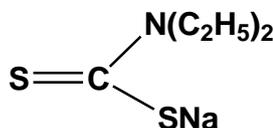


Figura 4. Fórmula estrutural do DDTC.

⁶⁰ Hulanicki, A.; *Talanta* 75 (1967) 1371-1392.

⁶¹ Saracoglu *et al.*; *Acta Chim Slov* (2003) 807-814.

⁶² Rivas *et al.*; *Spectrochim. Acta Part B* 64 (2009) 329-333.

⁶³ Hemmatkhah *et al.*; *Microchim. Acta* 166 (2009) 69-75.

⁶⁴ Sun e Sun, *Anal Lett* 40 (2007) 2391-2404.

⁶⁵ Sandell, E. B. *Colorimetric determination of trace of metals*. New York: Interscience Publishers, 1959.

⁶⁶ Perrin, D. D. *Chemical Analysis: masking and desmasking of chemical reactions*. USA: Willey-Interscience, 1970.

Além dos ditiocarbamatos, outros agentes quelantes podem ser utilizados, sendo que alguns estão mostrados na Tabela 1, juntamente com outros parâmetros importantes da DLLME.

Tabela 1. Algumas aplicações da DLLME para a extração de metais.

Analito	Amostra	Solvente extrator	Solvente dispersor	Agente quelante	Técnica	Ref.
As(III) e As V)	Água	CCl ₄	Metanol	APDC	ET AAS	[67]
Ag	Cabelo humano, água e plantas	CCl ₄	Metanol	Na-DDTC	ET AAS	[68]
Cr VI)	Água	([Hmin][PF ₆])	-	APDC	ET AAS	[69]
Cd e Pb	Água	Xileno	Metanol	APDC	ET AAS	[16]
Cu	Água	Acetato de isopentila + CCl ₄	Metanol	DIDC	UV-Vis	[18]
Pb e Cd	Água	([Hmin][PF ₆])	Etanol	Na-DDTC	F AAS	[70]
Cu	Água	([Hmin][Tf ₂ N])	Acetona	TMK	F AAS	[71]
Cu	Água	CCl ₄	Acetona	BAT	ET AAS	[72]

A seleção de um solvente extrator apropriado é um dos parâmetros mais importantes na DLLME. O solvente extrator deve possuir a capacidade de extração dos analitos e não causar interferência na etapa de detecção. Além disso, deve apresentar imiscibilidade na fase aquosa (amostra), hidrofobicidade e densidade maior que a água, a fim de facilitar a sedimentação após a etapa de centrifugação. Na extração de metais em águas por DLLME, dentre os solventes extratores mais utilizados destacam-se tetracloreto de carbono, clorofórmio, monoclorobenzeno, diclorobenzeno e tetracloroetileno, porém a maioria desses solventes são tóxicos e voláteis a temperatura ambiente.

¹⁶ Anthemidis, A. N., Ioannou, K. G.; *Anal. Chim. Acta* 668 (2010) 35-40.

¹⁸ Skrlíková *et al.*; *Microchem. J.* 99 (2011) 40-45.

⁶⁷ Liang *et al.*; *Microchim. Acta* 166 (2009) 47-52.

⁶⁸ Liang, P., Peng, L.; *Microchim. Acta* 168 (2010) 45-50.

⁶⁹ Chen *et al.*; *Talanta* 81 (2010) 176-179.

⁷⁰ Yousefi, S. R., Shemirani, F.; *Anal. Chim. Acta* 669 (2010) 25-31.

⁷¹ Khani *et al.*; *Desalination* 266 (2011) 238-243.

⁷² Hashemi *et al.*; *J. Chin. Chem. Soc.* 57 (2010) 111-117.

Adicionalmente, líquidos iônicos também têm sido utilizados para a extração de compostos orgânicos⁷³ e inorgânicos,⁷⁴ evitando a utilização de solventes tóxicos, tais como hidrocarbonetos clorados. Os líquidos iônicos são considerados menos poluentes para a atmosfera e menos perigosos para o usuário, que os solventes halogenados, pois não são tóxicos, não são inflamáveis e a sua volatilidade é quase nula.⁷⁵ No entanto, o desempenho de extração desses solventes diminui significativamente em amostras que apresentam elevada concentração de sal, sendo assim necessário a adição de um íon comum para diminuir a solubilidade do líquido iônico na fase aquosa.⁴⁹ Além disso, trabalhos recentes tem sugerido o emprego de solventes extratores menos densos que a água para a extração de compostos orgânicos e metais.⁷⁶

Após a escolha do tipo de solvente extrator, o seu volume também deve ser otimizado, o qual deve ser suficiente para extrair todo o analito do meio aquoso. No entanto, é recomendado utilizar o menor volume possível com a finalidade de aumentar o fator de pré-concentração.

O principal parâmetro na escolha do solvente dispersor é a sua miscibilidade na fase orgânica (solvente extrator) e na fase aquosa (amostra). A necessidade destas características limita ao uso de solventes como metanol, etanol, acetonitrila e acetona. Além disso, o volume do solvente dispersor deve ser otimizado, pois a variação do volume pode influenciar na eficiência de extração, ou seja, para baixos volumes desse solvente a dispersão, do solvente extrator não é adequada e a solução turva não se forma completamente. Por outro lado, para volumes elevados do solvente dispersor, a solubilidade dos analitos em água é aumentada, afetando a eficiência de extração.

O tempo de extração também deve ser avaliado, sendo definido como o intervalo entre a injeção da mistura dos solventes (extrator e dispersor) na fase aquosa antes da etapa de centrifugação. Na maioria dos trabalhos publicados, o tempo de extração não influencia na eficiência de extração, isso pode ser justificado pela rápida transferência dos analitos para a fase orgânica, atingindo o estado de equilíbrio quase que instantaneamente, resultando em um tempo de extração muito curto.

⁴⁹ Yousefi, S. R., Ahmadi, S. J.; *Microchim. Acta* 172 (2011) 75-82.

⁷³ Ravelo-Pérez *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7336- 7345.

⁷⁴ Berton, P., Wuilloud, R. G.; *Anal. Chim. Acta* 662 (2010) 155-162.

⁷⁵ Aguilera-Herrador *et al.*; *Trac-Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 602-616.

⁷⁶ Kocúrová *et al.*; *Microchem. J.* 102 (2012) 11-17.

A eficiência de extração na DLLME ainda pode ser aumentada quando é feita a adição de sal (por exemplo, NaCl) antes da extração, promovendo a transferência do analito para a fase orgânica, diminuindo a solubilidade na fase aquosa. Em outras palavras, a adição de uma determinada quantidade de sal na amostra pode diminuir a solvatação das moléculas do analito, devido a solvatação preferencial das moléculas de sal pela água e a polaridade do analito, aumentando a eficiência de extração.⁷⁷ Desta forma, o efeito da adição de sal também é um parâmetro que pode ser avaliado.

O pH da amostra e a concentração do complexante também influenciam na extração de metais utilizando a DLLME, visto que o pH afeta diretamente na formação do complexo metal-quelante.

2.4 Técnicas empregadas para a determinação elementar em vinho

A determinação da composição elementar de vinhos tem sido proposta utilizando uma grande variedade de técnicas analíticas tais como cromatográficas,⁷⁸ eletroquímicas⁷⁹ e espectrométricas.⁸⁰ A determinação de elementos em nível traço e ultratraço em vinhos por meio de técnicas espectrométricas é rotineiramente executada em muitos laboratórios analíticos. Além disso, muitos trabalhos ainda têm sido publicados neste campo todos os anos.^{81,82,83} Dentre as técnicas mais utilizadas, destacam-se a ET AAS, ICP OES, ICP-MS e a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS).⁸⁴

A técnica de ET AAS, em particular, possui algumas características atraentes, como a eliminação da matriz durante a etapa de pirólise, aliada ao uso de modificadores químicos. Mesmo com as vantagens relacionadas à técnica de ET AAS, a literatura dedicada à determinação de elementos traço e ultratraço em vinhos está voltada principalmente para a técnica de ICP-MS devido aos baixos LODs, ampla faixa dinâmica e capacidade multielementar.^{31,75}

³¹ Iglesias *et al.*; *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 219- 225.

⁷⁷ Birjandi *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1193 (2008) 19- 25.

⁷⁸ Mato *et al.*; *Food Res. Int.* 38 (2005) 1175-1188.

⁷⁹ Yamasaki *et al.*; *Talanta* 98 (2012) 14-18.

⁸⁰ Catarino *et al.*; *Talanta* 70 (2006) 1073-1080.

⁸¹ Bigöl *et al.*; *Czech J. Food Sci.* 28 (2010) 213-216.

⁸² Dessuy *et al.*, *Talanta* 85 (2011) 681-686.

⁸³ Fiket *et al.*; *Food Chem.* 126 (2011) 941-947.

⁸⁴ Karadjova *et al.*; *Microchim. Acta* 147 (2004) 39-43.

Entretanto, diferentes critérios devem ser definidos para selecionar a técnica apropriada para determinada aplicação. Na determinação de elementos traço e ultratraço em vinhos, os principais parâmetros que devem ser levados em consideração são: *i*) concentração do analito, *ii*) número de analitos a serem determinados e *iii*) possíveis interferências causadas na etapa de quantificação.²⁷

Apesar das técnicas acima citadas, apresentarem muitas vantagens, há algumas desvantagens como o alto custo de aquisição da instrumentação, de operação e de manutenção. Uma alternativa interessante para superar estes inconvenientes é a utilização da espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis.⁸⁵ Esta técnica vem sendo empregada há mais de 40 anos para a identificação e determinação quantitativa de muitas espécies moleculares orgânicas e inorgânicas. Além disso, seu uso se justifica por apresentar algumas vantagens como, robustez, rapidez na análise e custo relativamente baixo.⁸⁵

A técnica de espectrofotometria de absorção molecular é baseada no fenômeno produzido pela absorção molecular em solução, causada por transições eletrônicas por ocasião de absorção de energia quantizada na região do UV-Vis. O processo de absorção ocorre quando um feixe de radiação monocromática incide em uma solução que contém uma espécie absorvente, onde parte da energia radiante é absorvida e a outra é transmitida. A razão da potência radiante do feixe transmitido (P) pela potência radiante do feixe incidente (P_o) é conhecida como transmitância (T).⁸⁶

²⁷ Grindlay *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 691 (2011) 18-32.

⁸⁵ Abadi *et al.*; *Talanta* 99 (2012) 1-12.

⁸⁶ Pavia, D. L., *et al.* *Introdução à espectroscopia*. Trad. Pedro Barros, 4ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

Na Figura 5, estão mostrados os principais componentes de um espectrofotômetro de duplo feixe.

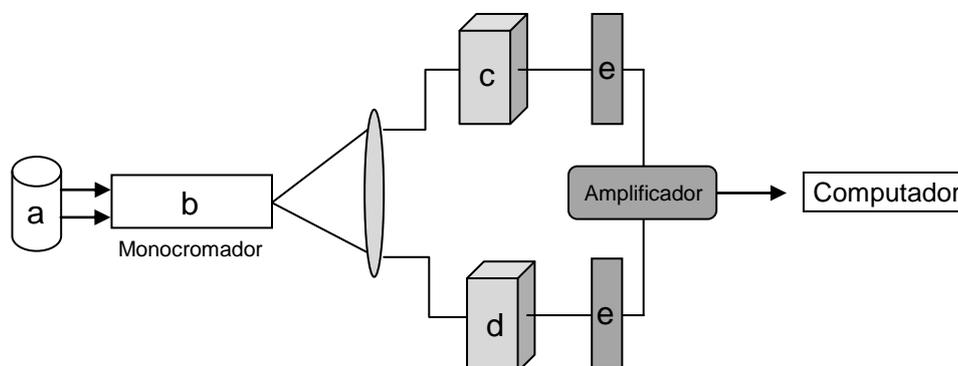


Figura 5. Esquema de um espectrofotômetro de duplo feixe. (Adaptado de Higson⁸⁷)

Conforme mostrado no esquema da Figura 5, dois feixes de radiação de igual intensidade (a) e dois fotomultiplicadores (e) são utilizados para registrar e subtrair os valores de linha de base dos espectros. Um dos feixes irradia a cubeta que contém a amostra (c) e o outro irradia a cubeta que contém apenas o solvente (d). Os dois espectros são registrados simultaneamente à medida que o comprimento de onda é variado no intervalo desejado. O espectro da linha de base é então subtraído do espectro que corresponde à amostra (analito), e assim é obtido um espectro UV-Vis.⁸⁵

Quando a técnica de UV-Vis é utilizada, algumas precauções devem ser tomadas como: *i*) os dois feixes de luz devem apresentar a mesma intensidade, *ii*) as duas cubetas devem possuir a mesma absorvidade e, por essa razão, precisam ser da mesma fabricação e mesmo tipo, *iii*) o solvente deve ser exatamente o mesmo nas duas cubetas e *iv*) os fototransdutores devem possuir a mesma sensibilidade.

Devido às limitações de sensibilidade de métodos que empregam detecção espectrofotométrica, torna-se necessário o uso de etapas preliminares para separação e concentração dos analitos. Nessa perspectiva, a técnica de UV-Vis vem sendo combinada com o método de DLLME para extração e pré-concentração de íons metálicos em diferentes amostras aquosas.⁸⁵ Cabe destacar que a maioria das determinações feitas por UV-Vis necessitam que o analito seja dissolvido em um

⁸⁵ Abadi *et al.*; *Talanta* 99 (2012) 1-12.

⁸⁷ Higson, S. P.J. *Química Analítica*. Trad. Mauro Silva. São Paulo: McGraw-Hill, 2009.

solvente, geralmente água. No entanto, a DLLME requer um solvente aprótico, devido à fase sedimentada ser composta por solvente orgânico.²⁰

Um dos primeiros trabalhos utilizando a DLLME combinada com a espectrofotometria UV-Vis, foi proposto por Gharehbaghi *et al.*,⁸⁸ para a determinação e pré-concentração de níveis traço de cobalto em amostras de água de torneira e de rio. Neste trabalho foi utilizado clorofórmio (solvente extrator), etanol (solvente dispersor) e 1-(2-piridilazo) 2-naftol (PAN) como agente quelante. O fator de enriquecimento e o limite de detecção foram de 125 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Tabrizi,⁸⁹ propôs um método para a especiação de Fe em diferentes amostras de água, seguido da determinação espectrofotométrica. O procedimento foi baseado na complexação de Fe(II) com 1,10-fenantrolina e subsequente formação de um íon-associativo com o ânion pícrico. Em seguida, foi feita a extração por DLLME, obtendo-se LOD da ordem de 7,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. A concentração de Fe(III) foi obtida através da subtração entre o Fe total e o Fe(II).

Wen *et al.*,²⁰ propuseram um método para a determinação de Cd e Cu em amostras de água e alimentos, onde a complexação de Cd e Cu foram feitas com ditizona e DDTC, respectivamente. As quantificações foram feitas por UV-Vis com fator de enriquecimento e LOD de 3458 e 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cd e 10 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cu, respectivamente.

2.5 Planejamento experimental

Como visto anteriormente, o desenvolvimento de um método analítico pode envolver um grande número de etapas, como o tratamento preliminar das amostras, a extração e a determinação dos analitos. Por isso, torna-se necessário avaliar, de forma rápida e segura, as informações a respeito das diferentes variáveis que influenciam significativamente o experimento, especialmente o preparo da amostra.

O planejamento fatorial combinado à análise de superfície de resposta é uma importante ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre os experimentos, minimizando assim o empirismo associado a técnicas

²⁰ Wen *et al.*; *Microchem. J.* 97 (2011) 249-254.

⁸⁸ Gharehbaghi *et al.*; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 88 (2008) 513-523.

⁸⁹ Tabrizi A. B.; *J. Hazard. Mater.* 183 (2010) 688-693.

de otimização sob forma univariada.⁹⁰ Além disso, o planejamento de experimentos reduz o número de ensaios ou repetições, podendo melhorar a qualidade dos resultados obtidos após o experimento.⁹¹

Experimentos ou tratamentos delineados a partir de planejamentos fatoriais envolvem a combinação entre os níveis (N) de dois ou mais fatores (k). Fatores são as variáveis independentes e os níveis são os limites inferior e superior que compreendem a faixa de estudo, fixada a partir do conhecimento prévio das variáveis com base na literatura. A variável dependente ou variável resposta é a variável a ser otimizada e esta depende exclusivamente do comportamento das variáveis independentes.

Quando todas as combinações possíveis entre os níveis de cada fator são feitas, o planejamento fatorial é dito completo. Entretanto, quando o número de experimentos pode ser limitado a partir de uma operação matemática (construção de uma matriz identidade), o delineamento passa a ter um menor número de experimentos, proporcionando informações tão seguras quanto às de um planejamento fatorial completo. Neste caso, o delineamento passa a ser um planejamento fatorial fracionado, o qual pode ser muito útil na seleção dos níveis ou fatores em estudo. Nos casos em que o número de fatores é superior a quatro e, principalmente, em situações onde não se tem o conhecimento do comportamento dos fatores em estudo, uma estratégia sequencial de planejamentos pode ser mais adequada. Neste caso, inicialmente aplica-se um planejamento fatorial fracionado para avaliar os efeitos das variáveis estudadas (triagem de variáveis) e, em seguida, são selecionadas as variáveis significativas e os melhores níveis de cada variável. Cabe destacar que um planejamento fatorial completo pode ser aplicado apenas com as variáveis significativas a fim de atingir o(s) valor(es) ótimo(s) da(s) variável(eis) dependente(s) avaliada(s).⁹¹

⁹⁰ Box et al.; *Statistics for experimenters: An introduction to designs, data analysis and model building*. John Wiley & Sons, 1978.

⁹¹ Rodrigues, M. I.; lemma, A. F.; *Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos*. Cárita editora, 2005.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

As medidas foram feitas empregando um espectrofotômetro UV-Vis de duplo feixe (Shimadzu, modelo UV-2550, Japão), equipado com duplo monocromador e cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico.

Foi utilizado um pHmetro digital (Hanna, modelo pH21, Brasil) com eletrodo de vidro combinado, sensor de temperatura e com resolução de 0,01 unidades de pH. Para agitação e homogeneização das soluções foi utilizado um agitador tipo vórtex (B. Braun Biotech International, modelo Certomat MV, Alemanha). Na etapa de separação das fases durante o procedimento de DLLME foi utilizada uma centrífuga Centribio (modelo 80-2B, Brasil) com capacidade para 12 tubos de 15 mL e velocidade máxima de rotação de 4000 rpm.

Todos os procedimentos de pesagem foram feitos em uma balança analítica de precisão (Bioprecisa, modelo FA2104N, Brasil), com resolução de 0,0001 g e capacidade máxima de 210 g. Para pipetagem das soluções foram utilizados micropipetadores automáticos com capacidade variável de 10 a 1000 µL (Labmate, Polônia). Para a injeção das misturas dos solventes no método de DLLME foi utilizada uma seringa com capacidade de 2,5 mL (Hamilton, USA).

Para o preparo de soluções e lavagem das vidrarias foi utilizada água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação (Millipore, modelo Milli-Q Direct-Q UV3®, Alemanha), com resistividade de 18,2 MΩ cm⁻¹.

O tratamento dos dados referentes à otimização da DLLME foi feito com o auxílio do programa Statistica, versão 8.0 (Copyright® 1984-2007, Statsoft Inc.). As demais avaliações estatísticas (testes *t-student* e *Tukey-Kramer*) foram feitas com auxílio do programa InStat, versão 3.0 (Copyright 1992-1998 GraphPad Software Inc., Microsoft Corporation). Para comparação de duas médias foi usado o teste *t-student*. Para a comparação de três ou mais médias foi utilizado o teste de *Tukey-Kramer*, com um nível de confiança de 95%.

3.2 Reagentes

As soluções de referência aquosas foram preparadas a partir da diluição de soluções estoque de 1000 mg L^{-1} de Fe e Cu em HNO_3 5% v/v (Merck). Para a calibração do instrumento, as soluções foram preparadas diariamente a partir da diluição sucessiva das soluções estoque.

O pirrolidina ditiocarbamato de amônio (Sigma-Aldrich, Brasil) utilizado como agente quelante para complexação de Fe foi preparado em água ultrapura. O complexante dietilditiocarbamato de sódio (Sigma-Aldrich, Brasil), utilizado para complexação de Cu, foi preparado em etanol grau HPLC (J.T.Baker). Como solventes extratores foram avaliados monoclorobenzeno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$, $d = 1,11 \text{ g mL}^{-1}$), 1,2-diclorobenzeno ($\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$, $d = 1,31 \text{ g mL}^{-1}$), tetracloreto de carbono (C_2Cl_4 , $d = 1,62 \text{ g mL}^{-1}$), clorofórmio (CHCl_3 , $d = 1,48 \text{ g mL}^{-1}$) e tetracloreto de carbono (CCl_4 , $d = 1,59 \text{ g mL}^{-1}$) (Vetec). Como solventes dispersores, foram avaliados metanol (MeOH, $d = 0,792 \text{ g mL}^{-1}$), etanol (EtOH, $d = 0,789 \text{ g mL}^{-1}$), acetona (AC, $d = 0,791 \text{ g mL}^{-1}$), acetonitrila (ACN, $d = 0,786 \text{ g mL}^{-1}$) e tetrahidrofurano (THF, $d = 0,889 \text{ g mL}^{-1}$) grau HPLC (J.T.Baker).

A vidraria utilizada e outros materiais comuns de laboratório foram descontaminados por imersão em uma solução de HNO_3 20% (v/v) (Merck) durante 24 h e, posteriormente, lavados com água ultrapura. O material volumétrico foi posteriormente seco à temperatura ambiente enquanto que o material não volumétrico foi seco em uma estufa a $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3 Amostras

Foram utilizadas amostras de vinho branco e tinto provenientes da região sul do Brasil. Os critérios utilizados para a escolha dos vinhos foram definidos a partir do consumo popular, associado aos preços que variaram entre R\$ 5,00 e 10,00. As amostras de vinho branco e tinto foram identificadas como VB1, VB2, VB3, VB4, VB5 e VT1, VT2, VT3, VT4, VT5, respectivamente. Para o desenvolvimento do método foram utilizadas duas amostras, uma de vinho branco (VB1) e uma de vinho tinto (VT1). Após as garrafas serem abertas, as amostras utilizadas na otimização foram condicionadas em tubos de polipropileno de 50 mL e armazenadas na ausência de luz e sob

refrigeração (4 °C). Para a quantificação de Fe e Cu nas demais amostras, a determinação foi feita logo após a garrafa ser aberta. O pH das amostras foi ajustado com soluções de HCl e NaOH 0,1 mol L⁻¹ (Merck).

3.4 Caracterização do espectro de absorção na região do UV-Vis para os complexos de Fe e Cu

Inicialmente, foi feito um estudo prévio sem a extração por DLLME. Os espectros de absorção dos diferentes complexos foram obtidos através da adição do elemento em meio de solvente. O complexo Fe(APDC)₃ foi obtido em uma concentração de 1,0 mg L⁻¹ de Fe(III) em 4,5 mL de acetonitrila e 0,5 mL da solução de APDC (1,0%, m/v). O complexo Cu(DDTC)₂ foi obtido em uma concentração 1,0 mg L⁻¹ de Cu(II) em 4,5 mL de acetonitrila e 0,5 mL da solução de DDTC (2,0%, m/v). Os brancos foram obtidos, sob as mesmas condições acima descritas, porém sem a adição dos analitos. Através destes experimentos, foi possível determinar o comprimento de onda de máxima absorção de cada complexo. Os espectros de absorção das soluções de referência foram utilizados para confirmar a identidade das bandas espectrais nas amostras e também como um parâmetro de eficiência de extração durante o desenvolvimento do método.

Alguns íons interferentes podem reduzir a eficiência de extração ou reagir com o complexante causando interferências espectrais. Desta forma, foram feitas varreduras com possíveis interferentes (Mn²⁺, Ni²⁺, Sn²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺, Cr³⁺, Cu²⁺ e Fe³⁺). Para isso, foram feitos testes tanto para o APDC (1,0%, m/v) quanto para o DDTC (2,0%, m/v), utilizando uma solução de 1,0 mg L⁻¹ de cada elemento em 4,5 mL de acetonitrila e 0,5 mL da solução do complexante.

Adicionalmente, foi feito um monitoramento da absorbância em função do tempo para avaliar o tempo mínimo necessário de formação dos complexos Fe(APDC)₃ e Cu(DDTC)₂, bem como suas estabilidades em meio de solvente. Este monitoramento foi feito por UV-Vis em um intervalo de 0 a 60 min. Os espectros de absorção dos complexos formados foram obtidos no intervalo entre 190 e 800 nm.

3.5 Otimização da DLLME

Para o desenvolvimento deste estudo, foi necessária a diluição de 5 vezes das amostras de vinho em água ultrapura. Todos os ensaios para o desenvolvimento do método foram feitos utilizando amostras de vinho branco. Após os parâmetros otimizados, o método foi aplicado a amostras de vinho tinto sob as mesmas condições.

A concentração adicionada dos analito para os procedimentos de DLLME para Fe e Cu, foram de 2,0 e 1,0 mg L⁻¹, respectivamente.

3.5.1 Avaliação da formação da fase sedimentada

Inicialmente, foi feito um estudo preliminar para avaliar a formação (ocorrência, quantidade e qualidade) da fase sedimentada na matriz, a partir da mistura de diferentes solventes extratores e dispersores encontrados na literatura. Entre os solventes mais densos que a água, foram avaliados como extratores C₆H₅Cl, C₆H₄Cl₂, C₂Cl₄, CHCl₃ e CCl₄ e estes foram combinados com diferentes dispersores, tais como MeOH, EtOH, ACN, AC e THF.

3.5.2 Procedimento da DLLME para extração e pré-concentração de Fe e Cu

O procedimento geral da DLLME está mostrado na Figura 6. Cabe destacar que o procedimento empregado foi o mesmo tanto para a posterior determinação de Fe quanto para a determinação de Cu. Para a extração e pré-concentração dos analitos por DLLME, uma mistura apropriada de solventes extrator e dispersor (etapa 1) foi injetada rapidamente em 5 mL de amostra, contendo o analito e uma quantidade adequada do complexante (etapa 2). Em seguida, foi observada uma dispersão na solução após leve agitação manual (etapa 3). Após a centrifugação (3 min, 3000 rpm), pode ser observada a coalescência do solvente extrator (etapa 4) e a fase aquosa pode ser removida (etapa 5). Alternativamente, a fase sedimentada pode passar por uma etapa de lavagem (etapa 6). Em seguida, a fase aquosa é novamente removida (etapa 7) e a fase sedimentada diluída em 3 mL de acetonitrila (etapa 8) para subsequente determinação por UV-Vis (etapa 9).

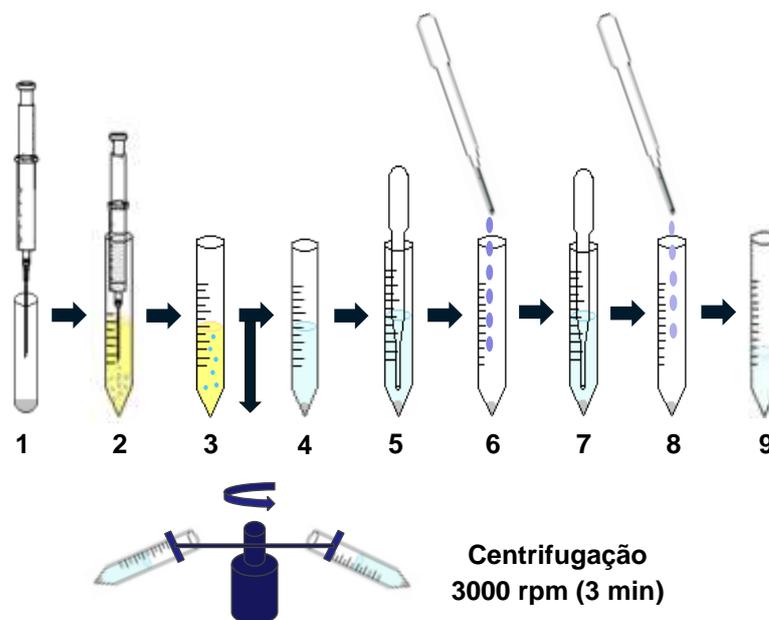


Figura 6. Etapas envolvidas no procedimento de DLLME.

3.5.3 Otimização dos parâmetros da DLLME para determinação de Fe

3.5.3.1 Escolha do solvente extrator

A escolha do solvente extrator adequado é considerada essencial para a eficiência de extração no procedimento da DLLME. Este solvente deve apresentar algumas características, como ser capaz de extrair o analito e ter baixa miscibilidade em água.

Neste trabalho, foram avaliados apenas solventes mais densos que a água, dentre eles, C_6H_5Cl , $C_6H_4Cl_2$, C_2Cl_4 e CCl_4 . O efeito destes solventes sobre a eficiência de extração foi investigado utilizando 50 μL de cada solvente contendo 500 μL de solvente dispersor em 5 mL de amostra.

3.5.3.2 Escolha do solvente dispersor

Para a escolha do solvente dispersor, a principal característica a ser considerada é a sua miscibilidade na fase orgânica (solvente extrator) e na fase aquosa (amostra). Desse modo, foram estudados como solventes dispersores MeOH, EtOH, ACN, AC e THF. O efeito destes solventes sobre a eficiência de extração na DLLME foi investigado

utilizando 500 μL de cada solvente contendo 50 μL do solvente extrator previamente selecionado.

3.5.3.3 Escolha do volume solvente dispersor

A variação no volume de solvente dispersor influencia no volume de fase sedimentada. Para avaliar o efeito do volume do solvente dispersor na extração, foram feitos experimentos contendo diferentes volumes do solvente selecionado no item 3.5.3.2, variando entre 200 e 1500 μL , com intervalos de 100 μL .

3.5.3.4 Escolha do volume solvente extrator

Para a escolha do volume do solvente extrator, foram feitos experimentos contendo diferentes volumes do solvente selecionado no item 3.5.3.1, variando entre 20 e 160 μL , com intervalos de 20 μL .

3.5.3.5 Efeito do pH

O efeito do pH na DLLME tem um papel importante para a formação do complexo e subsequente extração. A influência do pH na extração foi investigada pela variação entre pH 2,0 e 4,0, com intervalos de 0,2 unidades de pH. O ajuste do pH foi feito com soluções de HCl 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 0,1 mol L⁻¹. O estudo foi feito utilizando os parâmetros da DLLME previamente otimizados.

3.5.3.6 Concentração do complexante

Para avaliar o efeito da concentração de APDC na eficiência de extração do analito, foi adicionado um volume fixo de 500 μL das soluções contendo diferentes concentrações de APDC, variando entre 0,1 e 3,0% (m/v), utilizando os parâmetros da DLLME previamente otimizados.

3.5.3.7 Outros parâmetros avaliados

O efeito da adição de sal também deve ser estudada, uma vez que influencia na separação das fases. Para investigar este parâmetro, vários experimentos foram feitos com adição de diferentes concentrações de NaCl (entre 0,0 e 0,05 mol L⁻¹) na solução aquosa utilizando as condições previamente otimizadas.

Na DLLME, o tempo de extração é definido como o intervalo entre a injeção da mistura entre o solvente extrator e o dispersor antes da etapa de centrifugação. Desta forma, o tempo de extração foi estudado entre 0,5 e 5 min, utilizando os parâmetros otimizados anteriormente.

3.5.4 Otimização dos parâmetros da DLLME para determinação de Cu

Os parâmetros estudados no desenvolvimento do método para a extração e pré-concentração de Fe em vinho utilizando a DLLME, foram feitos na forma univariada. Neste sentido, é pertinente o desenvolvimento de um método para a determinação de Cu, pois assim como o Fe, este elemento também desempenha um papel importante na estabilidade dos vinhos. Desta forma, neste trabalho também foi desenvolvido um estudo para extração de Cu em vinho utilizando a DLLME, porém com auxílio da metodologia de superfície de resposta (SRM) para otimização das condições de extração.

Inicialmente, foi estudado de forma univariada o tipo de solvente extrator (C₆H₅Cl, C₆H₄Cl₂, C₂Cl₄, CHCl₃ e CCl₄) e o tipo de dispersor (MeOH, EtOH, ACN e AC). A partir de uma pesquisa feita na literatura e com base nas condições otimizadas para o método desenvolvido para Fe, foram fixadas algumas condições como volume solvente dispersor (1300 µL), volume de solvente extrator (80 µL), pH 5, NaCl 10% (m/v) e uma solução de DDTTC 1,5% (m/v) como agente quelante. Para a otimização das variáveis (volume dos solventes extrator e dispersor, concentração de DDTTC, pH e concentração de NaCl), foi feito um planejamento fatorial completo 2⁵ (composto por 32 experimentos e 3 pontos centrais), a fim de estabelecer as melhores condições para a extração e pré-concentração de Cu por DLLME.

3.5.5 Planejamento fatorial completo 2⁵

Como a DLLME está sendo proposta pela primeira vez para a extração e pré-concentração de Cu em vinho, inicialmente foi aplicado um planejamento fatorial completo 2⁵ para avaliar a influência de cinco variáveis independentes: volume dos solventes dispersor e extrator, concentração de DDTC, pH e concentração de NaCl. A variável resposta foi representada na forma de recuperação de Cu, obtida pela determinação de Cu por UV-Vis. Na Tabela 2, estão mostradas as faixas de estudo para a otimização da extração de Cu por DLLME.

Tabela 2. Fatores/variáveis e níveis avaliados no planejamento 2⁵ para a otimização da extração de Cu por DLLME.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Volume do solvente dispersor (µL)	1000	1300	1600
Volume do solvente extrator (µL)	60	80	100
pH	3	5	7
Concentração do DDTC (%)	1,0	1,5	2,0
Concentração de NaCl (%)	0,0	5,0	10,0

Para avaliar a validade dos modelos de superfície de resposta, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), através de um teste F de Fisher, com nível de confiança de 95%. O modelo foi simplificado em situações onde os termos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

Adicionalmente, foi feito o cálculo dos desvios relativos do modelo, representados pela razão entre a diferença entre os valores preditos e observados e os valores observados pelo experimento, conforme a equação (1).⁹¹

$$DR = \frac{Y - \hat{Y}}{Y} \times 100 \quad (1)$$

onde DR representa o desvio relativo (%), Y o valor de recuperação observado pelo experimento e \hat{Y} o valor de recuperação predito pelo modelo.

⁹¹ Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F.; Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. Cárita editora, 2005.

3.6 Validação do método

Para a validação do método proposto foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: curva de calibração, linearidade, LOD, limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão.

3.6.1 Curva de calibração e linearidade

Entende-se por linearidade a capacidade de um método em mostrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.⁹² Para avaliar a linearidade do método por UV-Vis, foi construída uma curva de adição de analito (passando por todo o processo de DLLME) nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,4; 2,0 e 2,5 mg L⁻¹ para Fe e nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 mg L⁻¹ para Cu. Cabe salientar, que cada ponto foi avaliado em triplicata. Da mesma forma, para fins de comparação e avaliar o efeito de matriz na quantificação de ambos analitos, foram preparadas curvas de calibração em acetonitrila (solvente) nas mesmas concentrações, sem passar pela DLLME.

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

3.6.2 Limite de detecção e quantificação

O LOD é definido como a concentração mínima do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, enquanto que o LOQ é a concentração mínima que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis.⁹² O LOD e o LOQ foram estimados através da curva de calibração com adição do analito.

⁹² INMETRO, Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQCGCRE- 008, 2007. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf acessado em: 18 de janeiro de 2013.

3.6.3 Exatidão e precisão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.⁹³

A exatidão pode ser avaliada através de ensaios de recuperação, permitindo comparar valores esperados com valores observados pela aplicação do método. No entanto, este parâmetro também pode ser avaliado a partir de comparação entre técnicas distintas, comparação com métodos oficiais ou através do uso de materiais de referência certificados (CRM).

A precisão é um termo geral utilizado para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.⁹²

A exatidão dos métodos desenvolvidos para determinação de Fe e Cu foi avaliada através de ensaios de recuperação. A precisão foi avaliada utilizando como critério o RSD entre as medidas. Para cada ensaio de recuperação, os experimentos foram feitos com $n = 5$, com três leituras de cada ponto.

⁹² INMETRO, Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQCGCRE- 008, 2007. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf acessado em: 18 de janeiro de 2013.

⁹³ BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 junho 2003. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm acessado em: 23 de janeiro de 2013.

4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1 Análise espectrofotométrica

A extração de íons metálicos por DLLME requer a formação prévia de um complexo suficientemente hidrofóbico que possa ser extraído em um pequeno volume de solvente orgânico, no qual o fator de pré-concentração desejado possa ser obtido. Antes de avaliar as variáveis que afetam o procedimento de extração, foi estudado o efeito da complexação de Fe(III) e Cu(II) utilizando APDC e DDTC como agentes quelantes, respectivamente.

4.1.1 Estudo da região espectral e estabilidade do complexo Fe(APDC)₃

O complexo formado com o cátion metálico Fe e o agente quelante APDC foi caracterizado por espectrofotometria UV-Vis. Após a adição do complexante (APDC 1%, m/v) em acetonitrila, contendo 1,0 mg L⁻¹ de Fe(III), percebeu-se a formação de uma solução ligeiramente escura (esverdeada). Na Figura 7 estão mostrados os espectros de absorção da solução de Fe(III) após a complexação com APDC (procedimento descrito no item 3.4.1), o que permite identificar os comprimentos de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx.}}$).

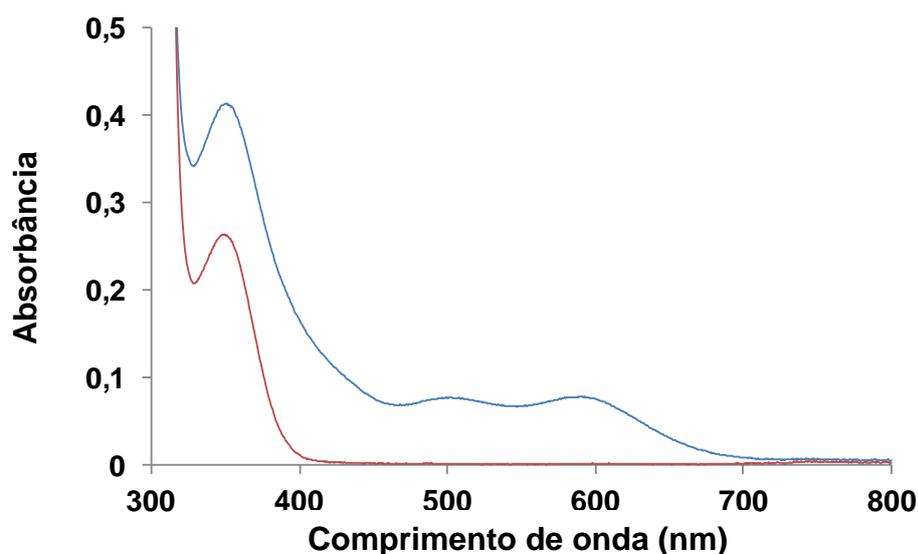


Figura 7. Espectro de absorção de uma solução de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe(III) contendo $500 \mu\text{L}$ de APDC (1% m/v) em acetonitrila (em azul) e espectro de absorção de uma solução de acetonitrila contendo $500 \mu\text{L}$ de APDC (1% m/v) (em vermelho).

Como pode ser observado na Figura 7, a banda de absorção em 354 nm é característica do APDC em meio de acetonitrila. Após a adição de Fe(III) ocorre o surgimento de duas novas bandas, uma em 499 nm e a outra em 587 nm, evidenciando a formação do complexo $\text{Fe}(\text{APDC})_3$.

Também é possível observar que ocorre um efeito hipercrômico na banda de 354 nm, que pode ser justificado pela interação do complexante com o solvente e/ou com o metal. Cabe destacar que alguns íons interferentes podem reduzir a eficiência de extração ou apresentar bandas de absorção na mesma região do complexo $\text{Fe}(\text{APDC})_3$. Na Figura 8, estão mostrados os resultados para os possíveis interferentes na determinação de Fe(III) por UV-Vis. A região de 499 nm apresentou absorvidade semelhante à região de 587 nm, entretanto a região de 499 nm é mais propícia a interferências espectrais, especialmente quando Cu está presente na solução. Neste sentido, o comprimento de onda de 587 nm foi selecionado.

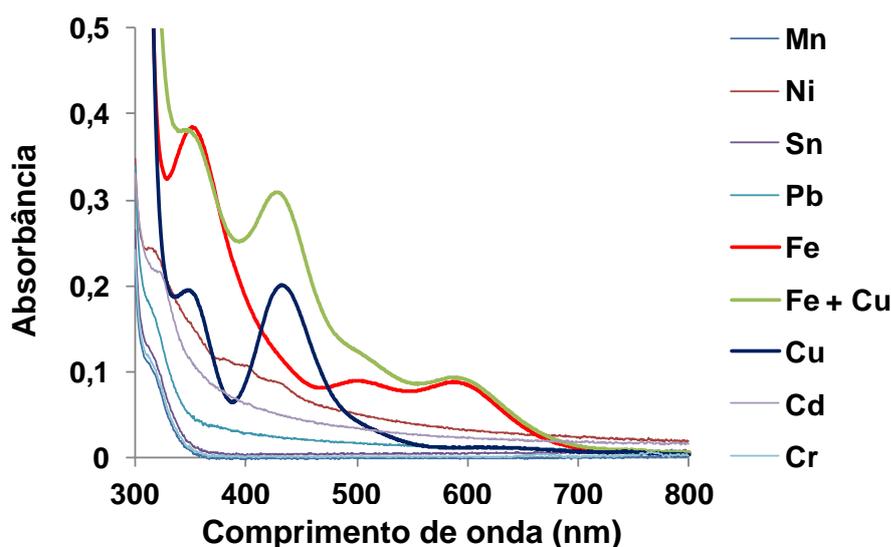


Figura 8. Espectro de absorção de uma solução de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cada elemento contendo $500 \text{ }\mu\text{L}$ de APDC (1% m/v) em acetonitrila.

Para avaliar o tempo mínimo necessário para a formação do complexo e sua estabilidade em acetonitrila, foi feita a complexação do metal (item 3.4.1) seguido do monitoramento da absorvância em função do tempo, no comprimento de onda de 587 nm . Após os experimentos, foi possível observar que a reação de complexação entre APDC e Fe(III) atinge o equilíbrio instantaneamente, o que possibilita o uso deste complexante em procedimentos de extração utilizando DLLME, pois do ponto de vista analítico, é um tempo suficientemente curto. Outro fator importante é que a estabilidade do complexo não sofreu alteração durante 60 min de monitoramento.

4.1.2 Estudo da região espectral e estabilidade do complexo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$

Na Figura 8, é possível observar que o complexo de Cu(II) com APDC absorve intensamente na região entre 400 e 500 nm . Porém, ocorre um efeito hipercrômico nesta região quando Fe está presente na solução. Devido a isso, não foi possível utilizar o APDC para complexação de Cu nos estudos posteriores. Desta forma, foi avaliado o emprego de DDTC, por ser um complexante comumente utilizado em extração de Cu.

O complexo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ também foi caracterizado por UV-Vis. Foi observado que a solução contendo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Cu(II) ficou ligeiramente amarelada após a adição do complexante (DDTC, 2% m/v) em acetonitrila. Na Figura 9 estão mostrados

os espectros de absorção da solução de Cu após a complexação com DDTC (procedimento descrito no item 3.4.1), sendo possível identificar o comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$).

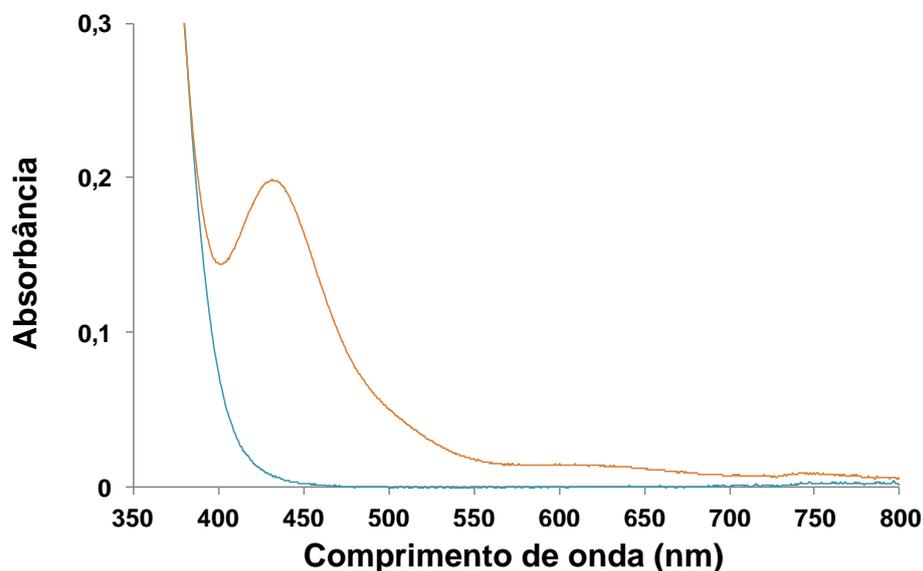


Figura 9. Espectro de absorção de uma solução de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Cu(II) contendo $500 \mu\text{L}$ de DDTC (2% m/v) em acetoneitrila (em laranja) e espectro de absorção de uma solução de acetoneitrila contendo $500 \mu\text{L}$ de DDTC (2% m/v) (em azul).

Como pode ser observado na Figura 9, o espectro de absorção do complexante no solvente não apresenta nenhuma banda de absorção na faixa entre 350 e 800 nm. No entanto, após a adição de Cu(II) ocorre o surgimento de uma banda intensa, na região de 432 nm. Com isso, foi possível comprovar que em 432 nm ocorre a formação do complexo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$. Neste sentido, o comprimento de onda de 432 nm foi selecionado para a determinação de Cu. Em um trabalho desenvolvido por Uddin *et al.*⁹⁴ também foi observado o surgimento de uma banda intensa do complexo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$, porém em 435 nm. Cabe salientar que alguns íons interferentes podem reduzir a eficiência de extração ou apresentar bandas de absorção na mesma região do complexo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$. Na Figura 10, estão mostrados os resultados para os diferentes interferentes.

⁹⁴ Uddin *et al.*; *Chemosphere* 90 (2013) 366-373.

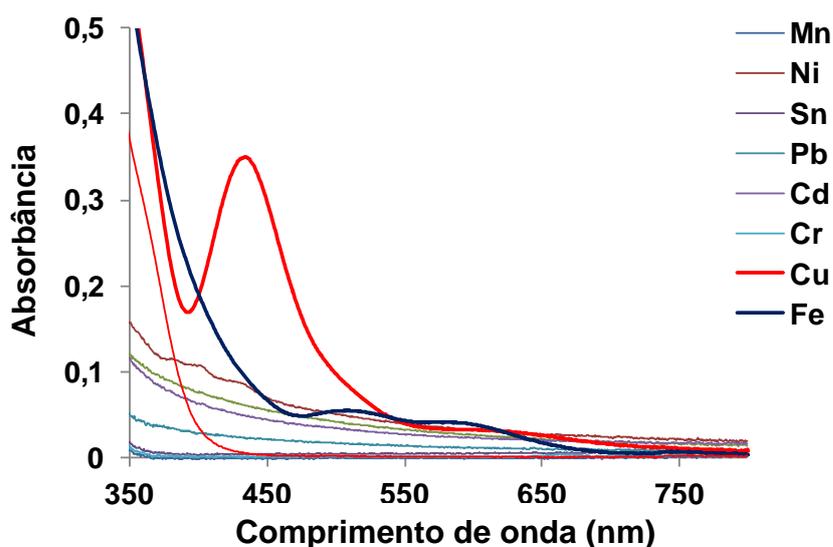


Figura 10. Espectro de absorção de uma solução de 1,0 mg L⁻¹ de cada elemento contendo 500 µL de DDTC (2% m/v) em acetonitrila.

Em termos de interferência espectral, nenhum dos possíveis interferentes absorve na mesma região espectral do complexo Cu(DDTC)₂. Para avaliar o tempo mínimo necessário para a formação do complexo e sua estabilidade em acetonitrila, foi feita a complexação do metal (item 3.4.1) e, após rápida homogeneização, foi feito o monitoramento da absorbância em função do tempo, no λ de 432 nm.

A reação de complexação entre DDTC e Cu(II) atinge o equilíbrio instantaneamente, o que possibilita a utilização deste na DLLME. Também foi possível perceber que a estabilidade do complexo não sofreu alteração durante 60 min de monitoramento.

4.2 Avaliação do processo de DLLME

Na primeira fase do estudo foi feito um teste para avaliar a qualidade da dispersão e possível formação da fase sedimentada nos vinhos branco e tinto, a partir da mistura de diferentes solventes extratores e dispersores. O procedimento foi feito através da injeção rápida, com auxílio de uma seringa, da mistura do solvente extrator (80 µL) e dispersor (500 µL), em 5 mL de vinho branco e tinto. No momento da injeção, uma solução turva foi formada e as microgotas do solvente extrator foram dispersas na

fase aquosa. Após a centrifugação (3 minutos a 3000 rpm), foi possível observar a sedimentação das microgotas no fundo do tubo cônico (capacidade de 15 mL).

Os resultados para avaliação da formação de fase sedimentada pela combinação de diferentes solventes extratores (C_6H_5Cl , $C_6H_4Cl_2$, C_2Cl_4 , $CHCl_3$ e CCl_4) e dispersores (MeOH, EtOH, ACN, AC e THF) está mostrada na Tabela 3.

Tabela 3. Avaliação da qualidade da dispersão para diferentes combinações de solventes extratores e dispersores em amostras de vinho branco (VB) e vinho tinto (VT).

Solvente dispersor	Solvente extrator									
	C_6H_5Cl		$CHCl_3$		$C_6H_4Cl_2$		C_2Cl_4		CCl_4	
	VB	VT	VB	VT	VB	VT	VB	VT	VB	VT
MeOH	Instável	Fraca	Instável	Instável	Boa*	Boa*	Boa*	Boa*	Boa*	Boa*
EtOH	Boa*	Boa*	Instável	Fraca	Boa**	Boa**	Boa**	Boa**	Boa	Boa
ACN	Boa	Boa	Boa**	Boa**	Boa	Boa*	Boa	Boa	Boa	Boa*
AC	Instável	Instável	Fraca	Fraca	Boa	Boa*	Instável*	Instável*	Boa	Boa
THF	Boa	Boa	Boa	Fraca	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa

* presença de precipitado branco em torno da fase sedimentada.

** presença de muito precipitado branco em torno da fase sedimentada.

A dispersão foi classificada como boa quando foi formada uma emulsão fina após a injeção dos solventes, provocando uma turvação homogênea na fase aquosa que se manteve estável por alguns segundos, formando um sistema bifásico após a centrifugação. A dispersão foi classificada como fraca quando a solução aquosa continuou límpida (homogênea), mesmo depois da injeção dos solventes orgânicos e após a etapa de centrifugação, a solução permaneceu em uma única fase. A dispersão foi considerada como instável quando se formou uma emulsão com reduzido número de microgotas após a injeção dos solventes, sendo possível visualizar um sistema bifásico após a centrifugação.

As combinações de solventes que deram origem às dispersões boas ou instáveis foram selecionadas para os experimentos seguintes, pois em quaisquer destes casos ocorre dispersão e, portanto, é possível extrair o analito, mesmo com presença de precipitado. A estabilidade da dispersão não é um fator decisivo na eficiência de extração, pois a transferência do analito entre as fases ocorre quase que instantaneamente devido à grande superfície de contato entre as fases. Já no caso da

dispersão fraca, não ocorre a formação de emulsão, portanto não é possível a extração do analito.

Dentre os solventes de extração avaliados os que apresentaram boas dispersões, em ambos os vinhos, para todas as combinações testadas, foram $C_6H_4Cl_2$, C_2Cl_4 e CCl_4 . O C_2Cl_4 apresentou boas dispersões com a maior parte dos solventes de dispersão, exceto com a acetona.

De acordo com a avaliação da qualidade da dispersão produzida através das combinações estudadas, o $CHCl_3$ não foi selecionado para os ensaios subsequentes, pois apresentou dispersões fracas e instáveis com quase todos os solventes de dispersão exceto na combinação com a acetonitrila, que resultou em uma dispersão boa, porém com uma fase sedimentada com muito precipitado em volta.

Devido ao vinho apresentar grande quantidade de sólidos dissolvidos (açúcares, ácidos, fenóis e sais minerais) durante esses experimentos foi possível observar formação de precipitado em torno da fase sedimentada na maioria das combinações avaliadas. Para solucionar este problema, foi feita a diluição da amostra e percebeu-se uma diminuição na quantidade de precipitado. Desta forma, o desenvolvimento de estudos posteriores foi feito com uma diluição de 5 vezes das amostras de vinho com água ultrapura.

4.2.1 Otimização da DLLME para extração de Fe em amostras de vinho

4.2.1.1 Seleção do solvente extrator

A utilização de solventes extratores halogenados na DLLME é uma prática comum, e esta escolha pode ser atribuída a algumas características como a baixa solubilidade em água e por apresentarem maior densidade que a água, onde a fase orgânica acaba sedimentando no fundo do frasco, facilitando a separação das fases.¹⁸ Por outro lado, apesar de serem solventes com maior toxicidade do que os solventes não halogenados, as quantidades utilizadas são normalmente inferiores a 100 μ L.^{89,95} Desta forma, as consequências ambientais da sua utilização são reduzidas, em

¹⁸ Skrlíková *et al.*; *Microchem. J.* 99 (2011) 40- 45.

⁸⁹ Tabrizi A. B.; *J. Hazard. Mater.* 183 (2010) 688-693.

⁹⁵ Mohammadi *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 653 (2009) 173-177.

comparação com a manipulação dos mesmos solventes em volumes elevados, como é o caso da extração líquido-líquido clássica.

Os solventes extratores avaliados ($C_6H_4Cl_2$, CCl_4 , C_6H_5Cl e C_2Cl_4) possuem propriedades físicas diferentes como densidade e solubilidade em água. Cabe destacar que essas duas propriedades podem afetar diretamente no equilíbrio e na separação de fases, bem como na partição dos analitos entre a fase orgânica e a fase aquosa.

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

As recuperações obtidas para o $C_6H_4Cl_2$, CCl_4 , C_6H_5Cl e C_2Cl_4 estão mostradas na Figura 13. Cabe destacar que dentre os quatro solventes clorados testados o C_2Cl_4 apresentou maior recuperação (48%) e menor RSD (2,1%), quando comparado com os demais solventes, sob as mesmas condições fixadas. Sendo assim, o C_2Cl_4 foi selecionado para os experimentos subsequentes.

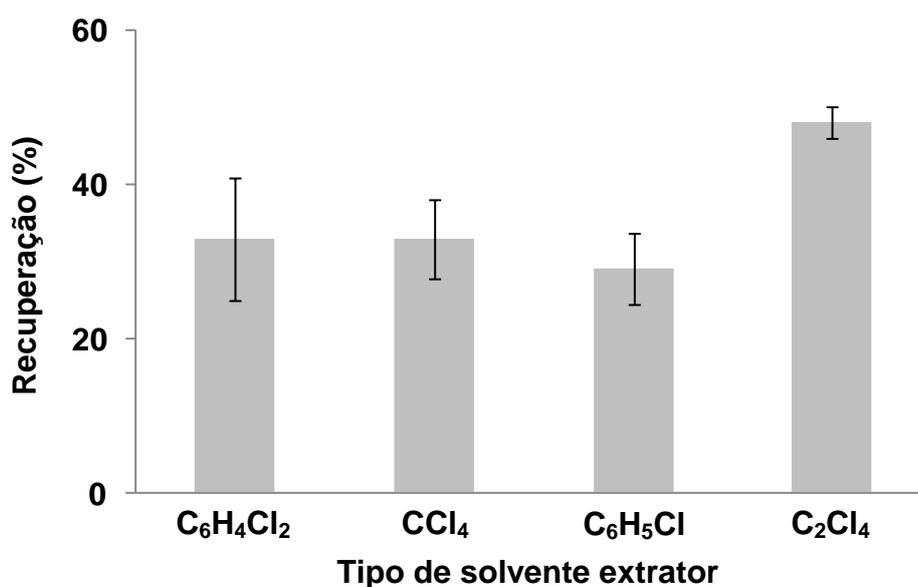


Figura 11. Efeito do tipo de solvente extrator na recuperação de Fe(III). Condições: volume de amostra: 5 mL, vinho diluído (1:4, v/v); 2 mg L⁻¹ Fe(III); pH da amostra 3,3; APDC: 500 µL solução de 1% m/v; volume do solvente dispersor (ACN): 500 µL; volume do solvente extrator: 50 µL. As barras de erros representam o desvio padrão (n = 3).

4.2.1.2 Seleção do solvente dispersor

O principal parâmetro na escolha do solvente dispersor é a sua miscibilidade na fase orgânica (solvente extrator) e na fase aquosa (amostra). Devido a estas características, os solventes dispersores selecionados para este estudo foram AC, ACN, EtOH, MeOH e THF. Ambos os solventes possuem características polares e capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio com moléculas de água.

Na Figura 14, estão mostradas as recuperações para estes solventes. Cabe destacar que dentre os solventes dispersores avaliados a acetonitrila apresentou maior recuperação (48%) e menor RSD (2,1%), quando comparado com os demais. Apesar da recuperação relativamente satisfatória, o metanol apresentou RSD de 8%, fato que pode ser explicado pelo aumento da linha espectral durante a obtenção do espectro. Sendo assim, a acetonitrila foi selecionada para os experimentos subsequentes.

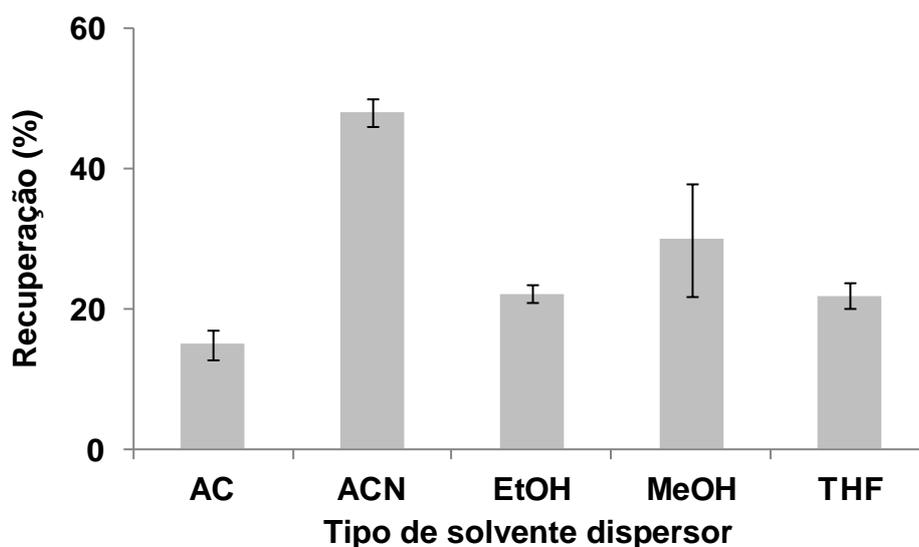


Figura 12. Efeito do tipo de solvente dispersor na recuperação de Fe(III). Condições: volume de amostra: 5 mL, vinho diluído (1:4, v/v); 2 mg L⁻¹ Fe(III); pH da amostra 3,3; APDC: 500 µL solução de 1% m/v; volume do solvente dispersor: 500 µL; volume do solvente extrator (C₂Cl₄): 50 µL. As barras de erros representam o desvio padrão (n= 3).

Na literatura encontram-se dezenas de artigos em que a DLLME utiliza acetonitrila como solvente dispersor, entretanto, a maioria destes trabalhos estão relacionados com a determinação de compostos orgânicos.^{96,97}

Recentemente, alguns trabalhos têm reportado a utilização da acetonitrila como solvente dispersor na DLLME para a extração e pré-concentração de elementos, como Cu, Zn, Pd e B em amostras de água.^{98,99,100} Entretanto, não foi encontrado nenhum trabalho na literatura em que foi utilizada acetonitrila como solvente dispersor na DLLME para a extração e pré-concentração de Fe.

4.2.1.3 Escolha do volume do solvente dispersor

Após a escolha da ACN como solvente dispersor, vários experimentos foram feitos com o objetivo de otimizar o volume a ser utilizado. Este parâmetro é importante

⁹⁶ Li *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 615 (2008) 96-103.

⁹⁷ Fu *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 632 (2009) 289-295.

⁹⁸ Asadollahi *et al.*; *Current Anal Chem* 8 (2012) 373-381.

⁹⁹ Majidi, B., Shemirani, F.; *Talanta* 93 (2012) 245-251.

¹⁰⁰ Rusnakova *et al.*; *Talanta* 85 (2011) 541-545.

na DLLME, pois em volumes pequenos de solvente dispersor a formação das microgotas pode não ser efetiva, dificultando a partição do solvente extrator e diminuindo a eficiência de extração. Quando o volume de solvente dispersor aumenta, dois processos competitivos podem ocorrer: *i*) aumento na solubilidade dos analitos na fase aquosa, conduzindo para uma diminuição da partição dos compostos polares nas microgotas do extrator e *ii*) aumento na eficiência de extração causado pelo aumento no volume da fase de acetonitrila particionada. Como pode ser observado na Figura 15, a eficiência de extração é aumentada com o aumento do volume de acetonitrila até o volume de 1300 μL . Os resultados indicam que não há diferença estatisticamente significativa (teste de *Tukey-Kramer*) na eficiência de extração utilizando volumes maiores. Assim, 1300 μL foi escolhido como o volume ótimo do solvente dispersor.

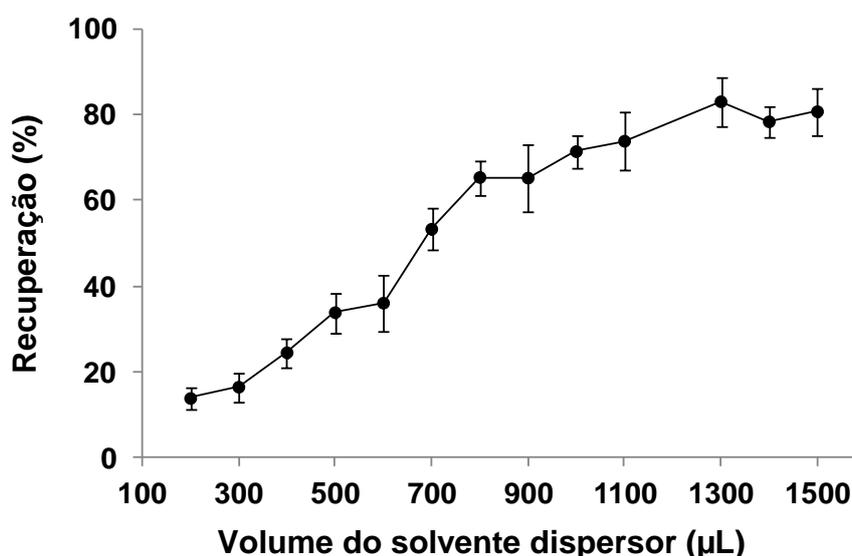


Figura 13. Efeito dos diferentes volumes de ACN. Condições: volume de amostra: 5 mL, vinho diluído (1:4, v/v); 2 mg L⁻¹ Fe(III); pH da amostra 3,3; APDC: 500 μL solução de 1% m/v; volume do solvente extrator (C_2Cl_4): 50 μL . As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).

4.2.1.4 Escolha do volume do solvente extrator

A influência do volume do solvente de extração na eficiência da DLLME foi avaliada através de uma série de ensaios nos quais foram utilizadas soluções contendo diferentes volumes de C_2Cl_4 (entre 20 e 160 μL) e acetonitrila como solvente dispersor.

Na Figura 16 está mostrada a recuperação de Fe(III) em função do volume de solvente extrator.

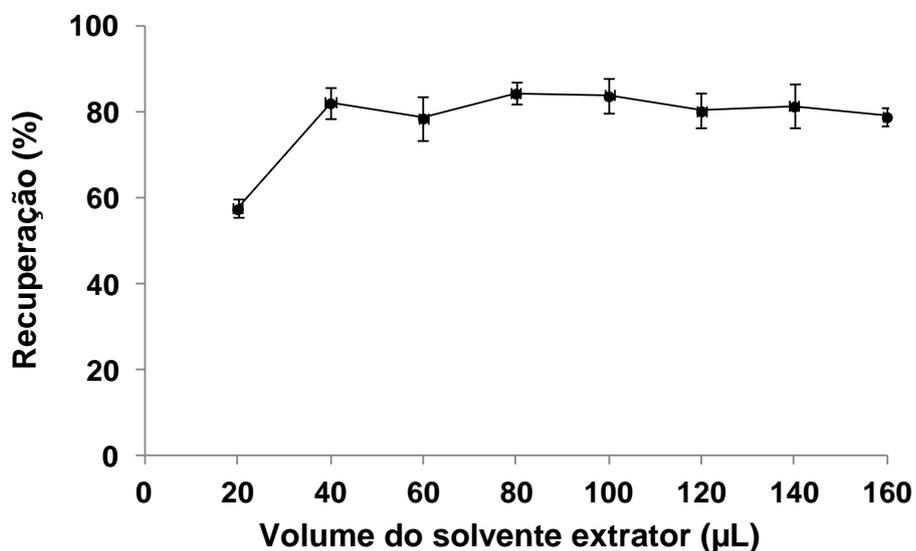


Figura 14. Efeito dos diferentes volumes de C_2Cl_4 . Condições: volume de amostra: 5 mL, vinho diluído (1:4, v/v); 2 mg L⁻¹ Fe(III); pH da amostra 3,3; APDC: 500 µL solução de 1% m/v; volume do solvente dispersor (ACN): 1300 µL. As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).

Na faixa de volume de solvente extrator entre 40 e 160 µL, as recuperações não apresentaram diferença significativa (teste de *Tukey-Kramer*). Usando 40 µL de C_2Cl_4 as recuperações foram superiores a 82%, mas o volume da fase sedimentada é muito pequeno, o que dificulta o manuseio. Mesmo sendo um volume reduzido de solvente orgânico a não utilização deste é justificada, pois pode acarretar em erros sistemáticos. Ao utilizar 20 µL de C_2Cl_4 , são observadas recuperações insatisfatórias, da ordem de 57%. Este comportamento pode ser explicado pela baixa eficiência de extração causada pela insuficiência de C_2Cl_4 . Deste modo, 80 µL foi escolhido para os demais experimentos por apresentar recuperações e RSDs satisfatórios, da ordem de 84 e 2%, respectivamente.

4.2.1.5 Efeito do pH

O efeito do pH na DLLME tem um papel importante na formação do complexo com hidrofobicidade suficiente para subsequente extração. O efeito do pH na extração de Fe(III) por DLLME foi investigado pela variação do pH entre 2,0 e 4,0. Na Figura 17 podem ser observadas as recuperações obtidas em função de diferentes valores de pH. Para valores inferiores a pH 3,0, a eficiência da extração não foi efetiva, o que pode ser explicado pela possível protonação do APDC (agente quelante). Em valores superiores a pH 3,0, a banda de absorção começa a diminuir, provavelmente devido a competição dos íons OH^- , formando hidróxi-complexos. Em outras palavras, para elevados valores de pH, a hidrólise acaba gerando espécies hidroxiladas cuja sua proporção depende do pH. Assim, o pH 3,0 foi selecionado para estudos posteriores por apresentar melhor eficiência de extração. O valor de pH ótimo encontrado para o método proposto foi igual ao selecionado no trabalho desenvolvido por Paleologos *et al.*¹⁰¹ que utilizaram o mesmo complexo por extração em ponto nuvem.

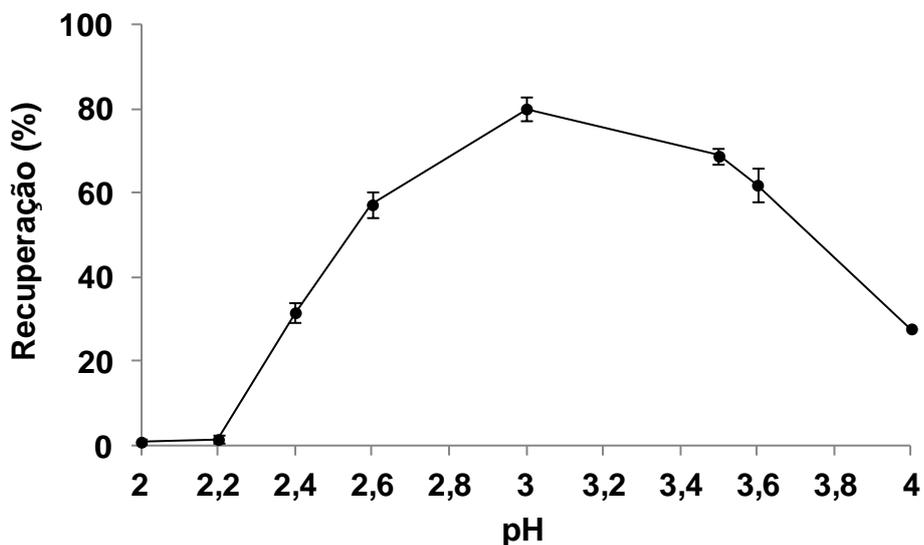


Figura 15. Efeito do pH. Condições: volume de amostra: 5 mL, vinho diluído (1:4, v/v); 2 mg L^{-1} Fe(III); APDC: 500 μL solução de 1% m/v; volume do solvente extrator (C_2Cl_4): 80 μL ; volume do solvente dispersor (ACN): 1300 μL . As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).

¹⁰¹ Paleologos *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 241-248.

4.2.1.6 Concentração do complexante

A influência da concentração de APDC foi avaliada na faixa entre 0,1 e 3,0%. As soluções de APDC com diferentes concentrações foram preparadas em água ultrapura e cada solução foi adicionada à amostra antes da injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor. Os resultados obtidos para cada solução estão mostrados na Figura 18. As recuperações aumentam até concentrações de APDC de 1% (m/v) e começam a diminuir a partir de 1,5% (m/v), mantendo-se constante até 3% (m/v). Cabe salientar que para concentrações acima de 2% (m/v) foi observado um aumento da linha espectral, o qual pode ser atribuído à incompleta dissolução do APDC, causando espalhamento da radiação. Deste modo, uma solução de APDC 1% (m/v) foi considerada adequada para os próximos estudos.

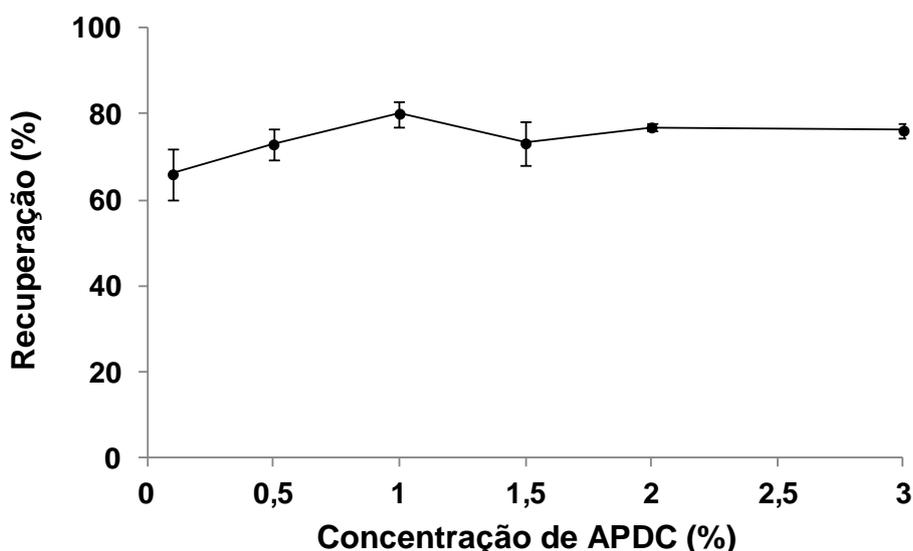


Figura 16. Influência da concentração de APDC. Condições: volume de amostra: 5 mL, vinho diluído (1:4, v/v); 2 mg L^{-1} Fe(III); APDC: $500 \text{ }\mu\text{L}$; volume do solvente extrator (C_2Cl_4): $80 \text{ }\mu\text{L}$; volume do solvente dispersor (ACN): $1300 \text{ }\mu\text{L}$ e pH 3,0. As barras de erros representam o desvio padrão ($n=3$).

4.2.1.7 Outros parâmetros

O efeito da adição de sal na eficiência de extração de Fe foi avaliado através da adição de diferentes concentrações de NaCl (entre 0,0 e $0,05 \text{ mol L}^{-1}$). Como pode ser visto na Figura 19, as recuperações aumentam até $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ e começam a diminuir

mantendo-se constante até 0,05 mol L⁻¹ de NaCl. Deste modo, 0,02 mol L⁻¹ de NaCl foi considerado necessário e utilizado nos experimentos subsequentes.

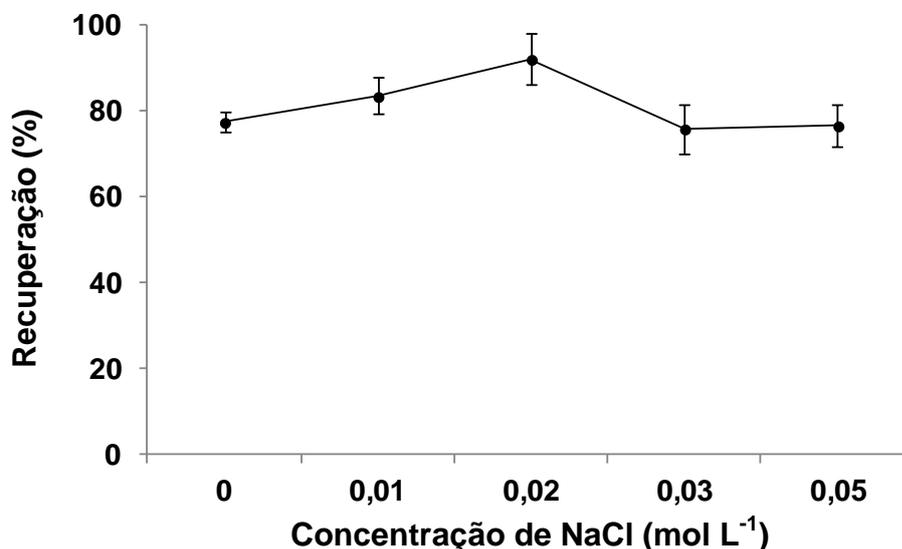


Figura 17. Influência da concentração de sal. Condições: volume de amostra: 5 mL, vinho diluído (1:4, v/v); 2 mg L⁻¹ Fe(III); APDC: 500 µL solução de 1% m/v; volume do solvente extrator (C₂Cl₄): 80 µL; volume do solvente dispersor (ACN): 1300 µL e pH 3,0. As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).

O efeito do tempo de extração do analito na DLLME foi avaliado inicialmente entre 0,5 e 5 min, onde foram encontradas recuperações entre 94 e 96%, demonstrando que não houve diferença significativa (teste de *Tukey-Kramer*) entre as médias e que a eficiência de extração é independente do tempo. Isso indica que a extração na DLLME ocorre em poucos segundos, ou seja, o tempo total de extração é extremamente curto, sendo esta uma das principais vantagens do método. A área superficial entre o solvente extrator e a fase aquosa é um dos fatores que pode justificar essa vantagem em relação a outros métodos de extração, como a LLE e microextração em gota suspensa (SDME). Na DLLME, a área superficial entre o solvente extrator e a fase aquosa é extremamente grande, o que facilita a transferência dos analitos da fase aquosa (amostra) para a fase extratora. Diversos trabalhos podem ser encontrados na literatura, onde o tempo de extração na DLLME é inferior a 5 min.^{89,102}

⁸⁹ Tabrizi A. B.; J. Hazard. Mater. 183 (2010) 688-693.

¹⁰² Liang et al.; *Talanta* 77 (2009) 1854-1857.

Na Tabela 4 estão mostradas as condições otimizadas da DLLME para extração e pré-concentração de Fe em amostras de vinho.

Tabela 4. Condições otimizadas da DLLME para posterior determinação de Fe em vinho.

Parâmetros	Valores
Volume da amostra	5 mL
Tipo e volume do solvente extrator	C ₂ Cl ₄ , 80 µL
Tipo e volume do solvente dispersor	ACN, 1300 µL
pH	3,0
Concentração do complexante (APDC)	1,0%, 500 µL
Concentração de NaCl	0,02 mol L ⁻¹

Para a extração e pré-concentração de Fe em vinho por DLLME, uma mistura de C₂Cl₄ (80 µL) e ACN (1300 µL) foi injetada rapidamente em 5 mL de amostra (diluída 5 vezes), juntamente com 500 µL de uma solução de 1,0% (m/v) de APDC. Em seguida, foi observada uma dispersão após leve agitação manual. Após a etapa de centrifugação (3 min, 3000 rpm), o solvente extrator coalesce e a fase aquosa pode ser removida. Alternativamente, a fase sedimentada passa por uma etapa de lavagem com 3 mL de água ultrapura a temperatura ambiente. Em seguida, a fase aquosa é novamente removida e a fase sedimentada diluída em 3 mL de acetonitrila para subsequente determinação por UV-Vis em 587 nm.

4.2.2 Otimização da DLLME para extração de Cu em amostras de vinho

Para a otimização da DLLME, todos os ensaios foram feitos utilizando amostras de vinho branco após a adição de 1,0 mg L⁻¹ de Cu. Como este elemento encontra-se em baixas concentrações no vinho, não foi possível fazer a diluição das amostras. Após a otimização da DLLME, o método foi aplicado em amostras de vinho tinto utilizando as mesmas condições otimizadas para o vinho branco.

Inicialmente, foram avaliados de forma univariada o tipo de solvente extrator (C₂Cl₄, CHCl₃, CCl₄, C₆H₅Cl e C₆H₄Cl₂) e o tipo de dispersor (ACN, EtOH, MeOH e AC). Durante este estudo, algumas condições foram fixadas, como volume de solvente dispersor (1300 µL), volume de solvente extrator (80 µL), pH 5,0, concentração de NaCl

(10%, m/v) e o volume (500 μ L) de uma solução de DDTc (1,5%, m/v). A otimização do tipo de solvente extrator e dispersor foi feita considerando o maior sinal de absorvância obtido por UV-Vis (432 nm) após a DLLME. Na Tabela 5, estão mostrados os valores de absorvância para os tipos de solventes extratores avaliados.

Tabela 5. Efeito do solvente extrator na DLLME utilizando ACN como solvente dispersor para posterior determinação de Cu por UV-Vis (n=3).

Solvente extrator	Absorvância média	RSD (%)
C ₂ Cl ₄	0,293	11
CHCl ₃	0,274	9
CCl ₄	0,309	2
C ₆ H ₅ Cl	0,288	7
C ₆ H ₄ Cl ₂	0,259	26

Como pode ser observado na Tabela 5, os solventes selecionados apresentam valores similares de absorvância em 432 nm, porém com considerável diferença nos valores de RSD. Cabe destacar que, para este experimento foi utilizado acetonitrila como solvente dispersor. Os solventes CHCl₃, C₆H₅Cl e C₆H₄Cl₂ apresentaram dificuldades na manipulação da fase sedimentada e, por isso, não foram selecionados para os ensaios subsequentes. Solventes como C₂Cl₄ e CCl₄ apresentaram os maiores sinais de absorvância, 0,293 e 0,309, respectivamente. Entretanto, CCl₄ foi selecionado para os estudos seguintes por apresentar o menor valor de RSD (2%) quando comparado com C₂Cl₄ (11%).

Após a escolha do CCl₄ como solvente extrator, foi feito o mesmo procedimento para a escolha do solvente dispersor. Na Tabela 6, estão mostrados os valores de absorvância média (432 nm) para os tipos de solventes dispersores avaliados.

Tabela 6. Efeito do solvente dispersor na DLLME utilizando CCl₄ como solvente extrator para posterior determinação de Cu (n=3).

Solvente dispersor	Absorvância média	RSD (%)
ACN	0,309	2
EtOH	0,270	1
MeOH	0,297	6
AC	0,261	3

Os solventes MeOH e ACN apresentaram os maiores sinais de absorvância, 0,297 e 0,309, respectivamente. Entretanto, ACN foi selecionada para os ensaios seguintes, por apresentar o menor valor de RSD (2%), quando comparada com MeOH (6%).

Após a escolha do CCl₄ como solvente extrator e ACN como solvente dispersor foi aplicado um planejamento fatorial completo 2⁵ para estabelecer as condições ótimas para extração de Cu, estudando as seguintes variáveis: volume dos solventes dispersor e extrator, concentração de DDTC, pH e concentração de NaCl. Os experimentos foram feitos após adição de 1,0 mg L⁻¹ de Cu nas amostras de vinho e a recuperação de Cu foi considerada como variável resposta.

Na Tabela 7, estão mostrados os efeitos principais e interação entre as variáveis estudadas, utilizando um modelo quadrático, com 95% de nível de confiança. As faixas de estudo foram escolhidas com base em estudos prévios e estão mostradas na Tabela 2 (item 3.5.4.1.).

Tabela 7. Efeitos estimados das variáveis independentes na recuperação de Cu.

Fatores	Cu		
	Efeito	Erro padrão	p-valor
Média	117,8	2,56	0
(1) Volume do solvente dispersor - ACN (μL)	- 34,9	5,35	0,000004
(2) Volume do solvente extrator - CCl ₄ (μL)	- 0,97	1,56	0,54
(3) pH	7,76	1,56	0,000103
(4) Concentração de DDTC (%)	6,96	1,56	0,000315
(5) Concentração de NaCl (%)	4,43	1,56	0,011080
(1) x (5)	-3,4	1,62	0,044811

Como pode ser observado na Tabela 7, a maioria das variáveis apresentam efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) sobre a recuperação de Cu, com exceção do volume de solvente extrator.

O volume do solvente dispersor apresentou um efeito negativo, mostrando que a variação de 1000 μL para 1600 μL proporcionou uma diminuição de 35% na recuperação de Cu. Este efeito negativo e altamente significativo mostrou que existe uma tendência em aumentar a recuperação de Cu utilizando os volumes mais baixos

de acetonitrila. As variáveis pH, concentração de DDTc e concentração de NaCl, mostraram um efeito positivo na extração de Cu de 7,7; 6,9 e 4,4%, respectivamente, mostrando que a recuperação pode ser aumentada em até 7,7% utilizando os valores no planejamento fatorial para estas variáveis. Na Tabela 8, estão mostrados os valores de recuperação de Cu após a aplicação do planejamento. As recuperações foram calculadas de acordo com a equação (1).

Tabela 8. Matriz do planejamento fatorial 2^5 com as recuperações (R) obtidas para Cu.

SD* solvente dispersor (ACN)

Tratamento	Volume SD* (μ L)	Volume SE** (μ L)	pH	Concentração de DDTc (%)	Concentração de NaCl (%)	R Cu (%) Observada	R Cu (%) Predita	Desvio relativo do modelo (%)
1	-1 (1000)	-1 (60)	-1 (3)	-1 (1,0%)	-1 (0%)	87,4	88,26	1,0
2	1 (1600)	-1 (60)	-1 (3)	-1 (1,0%)	-1 (0%)	89,2	91,66	2,8
3	-1 (1000)	1 (100)	-1 (3)	-1 (1,0%)	-1 (0%)	91,9	88,26	4,0
4	1 (1600)	1 (100)	-1 (3)	-1 (1,0%)	-1 (0%)	93,7	91,66	2,2
5	-1 (1000)	-1 (60)	1 (7)	-1 (1,0%)	-1 (0%)	92,8	96,02	3,5
6	1 (1600)	-1 (60)	1 (7)	-1 (1,0%)	-1 (0%)	97,3	99,42	2,2
7	-1 (1000)	1 (100)	1 (7)	-1 (1,0%)	-1 (0%)	98,2	96,02	2,2
8	1 (1600)	1 (100)	1 (7)	-1 (1,0%)	-1 (0%)	105,4	99,42	5,7
9	-1 (1000)	-1 (60)	-1 (3)	1 (2,0%)	-1 (0%)	95,5	95,22	0,3
10	1 (1600)	-1 (60)	-1 (3)	1 (2,0%)	-1 (0%)	99,1	98,62	0,5
11	-1 (1000)	1 (100)	-1 (3)	1 (2,0%)	-1 (0%)	97,7	95,22	2,5
12	1 (1600)	1 (100)	-1 (3)	1 (2,0%)	-1 (0%)	101,4	98,62	2,7
13	-1 (1000)	-1 (60)	1 (7)	1 (2,0%)	-1 (0%)	109,5	102,98	6,0
14	1 (1600)	-1 (60)	1 (7)	1 (2,0%)	-1 (0%)	105,4	106,38	0,9
15	-1 (1000)	1 (100)	1 (7)	1 (2,0%)	-1 (0%)	100	102,98	3,0
16	1 (1600)	1 (100)	1 (7)	1 (2,0%)	-1 (0%)	106,3	106,38	0,1
17	-1 (1000)	-1 (60)	-1 (3)	-1 (1,0%)	1 (10%)	98,6	96,08	2,6
18	1 (1600)	-1 (60)	-1 (3)	-1 (1,0%)	1 (10%)	94,1	92,68	1,5
19	-1 (1000)	1 (100)	-1 (3)	-1 (1,0%)	1 (10%)	99,5	96,08	3,4
20	1 (1600)	1 (100)	-1 (3)	-1 (1,0%)	1 (10%)	87,4	92,68	6,0
21	-1 (1000)	-1 (60)	1 (7)	-1 (1,0%)	1 (10%)	103,2	103,84	0,6
22	1 (1600)	-1 (60)	1 (7)	-1 (1,0%)	1 (10%)	113,1	100,44	11,2
23	-1 (1000)	1 (100)	1 (7)	-1 (1,0%)	1 (10%)	93,7	103,84	10,8
24	1 (1600)	1 (100)	1 (7)	-1 (1,0%)	1 (10%)	105,1	100,44	4,4
25	-1 (1000)	-1 (60)	-1 (3)	1 (2,0%)	1 (10%)	105,9	103,04	2,7
26	1 (1600)	-1 (60)	-1 (3)	1 (2,0%)	1 (10%)	100,5	99,64	0,9
27	-1 (1000)	1 (100)	-1 (3)	1 (2,0%)	1 (10%)	108,6	103,04	5,1
28	1 (1600)	1 (100)	-1 (3)	1 (2,0%)	1 (10%)	93,7	99,64	6,3
29	-1 (1000)	-1 (60)	1 (7)	1 (2,0%)	1 (10%)	117,1	110,8	5,4
30	1 (1600)	-1 (60)	1 (7)	1 (2,0%)	1 (10%)	105,4	107,4	1,9
31	-1 (1000)	1 (100)	1 (7)	1 (2,0%)	1 (10%)	109,1	110,8	1,6
32	1 (1600)	1 (100)	1 (7)	1 (2,0%)	1 (10%)	106,8	107,4	0,6
33	0 (1300)	0 (80)	0 (5)	0 (1,5%)	0 (5%)	122,5	117	4,5
34	0 (1300)	0 (80)	0 (5)	0 (1,5%)	0 (5%)	115,3	117	1,5
35	0 (1300)	0 (80)	0 (5)	0 (1,5%)	0 (5%)	115,8	117	1,0

SE** solvente extrator (CCl_4)

Como pode ser visto na Tabela 8, dentre as condições estudadas, foram obtidas recuperações entre 87 e 123%. O RSD dos experimentos, calculado através dos pontos centrais, foi de 3%. Para verificar a validade das superfícies de resposta, foi utilizada a ANOVA (95% de nível de confiança), através de um teste F de *Fisher*, no modo MS residual. Para isso, foi feito um ajuste dos dados experimentais através de um modelo quadrático e as interações dos termos lineares. Os termos sem significância estatística foram omitidos dos modelos de regressão. Além disso, foi feito o cálculo dos desvios relativos do modelo de regressão para verificar a validade das superfícies de resposta e seus modelos de regressão.

O modelo de regressão está representado pela equação (4):

$$R_{Cu} = 117,86 - 17,47 V_{SD}^2 + 3,88 \text{ pH} + 3,48 C_{DDTC} + 2,21 C_{NaCl} - 1,7 V_{SD} C_{NaCl} \quad (4)$$

onde R_{Cu} representa a recuperação de Cu; V_{SD} representa o volume do solvente dispersor; pH representa o pH do meio de extração; C_{DDTC} representa a concentração do complexante (% m/v) e C_{NaCl} representa a concentração de NaCl (%).

Na Tabela 9, estão mostrados os parâmetros calculados para a ANOVA.

Tabela 9. Parâmetros da ANOVA no modo MS residual.

Fontes de Variação	Cu				
	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	1957,27	5	391,45	18,62	2,54
Erro = resíduo	609,79	29	21,02		
Total	2567,06	34			

SQ: soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática; F_{cal}: valor de F calculado; F_{tab}: valor de F tabelado.

A partir da ANOVA (teste F de *Fisher*) é possível observar que o modelo de regressão foi significativo e preditivo com coeficiente de determinação (R^2) de 0,76, indicando que 34% da variação total não podem ser explicadas pelo modelo. O valor de F calculado foi maior que o valor de F tabelado, onde a razão entre o F_{cal}/F_{tab} foi de 7,3. Este resultado mostrou que o modelo de regressão pode ser considerado significativo e preditivo, ou seja, o modelo pode representar os dados experimentais. Além disso, também foram calculados, através da equação (1), os desvios relativos do modelo de

regressão. Estes resultados estão mostrados na Tabela 9. Pode-se perceber que os desvios relativos estão abaixo de 10% para a maioria dos tratamentos. A boa concordância entre os valores preditos e observados, juntamente com o resultado positivo da ANOVA, permitiram plotar as superfícies de contorno, possibilitando a análise dos dados de uma forma global. Na Figura 20, estão mostradas as superfícies de contorno que representam a recuperação de Cu como uma função das variáveis significativas [volume de solvente dispersor (V_{SD}), pH, concentração do complexante (C_{DDTC}) e concentração de NaCl (C_{NaCl})].

Pode-se observar que existem regiões destacadas que correspondem à recuperação de Cu em torno de 100%. Nas Figuras 20a, 20b e 20c está mostrada a recuperação de Cu como uma função das variáveis V_{SD} x pH; V_{SD} x C_{DDTC} e V_{SD} x C_{NaCl} , respectivamente. Nessas condições, o pH, a concentração de DDTC e a concentração de NaCl, apresentaram pouca variabilidade entre os resultados. Entretanto a variável V_{SD} apresentou, em todas as combinações, recuperações de 100% nos níveis -1 (1000 μ L) e 1 (1600 μ L). Nas Figuras 20d e 20e, estão mostrados o comportamento das variáveis pH x C_{DDTC} e pH x C_{NaCl} . Nestas condições foi possível observar que o pH e a concentração do complexante não apresentaram, nos níveis estudados, variabilidade nos resultados. Porém, na interação entre pH x C_{NaCl} , percebeu-se que em valores de pH abaixo de 5,0 não houve variação nos resultados, enquanto que a concentração de NaCl, não apresentou diferença nas recuperações observadas.

No entanto, na Figura 20f foi possível observar que a interação entre C_{DDTC} x C_{NaCl} apresentou recuperações na faixa de 100% na região que compreende o nível -1 (1,0%) de concentração de DDTC e nível -1 (0%) de concentração de NaCl. Analisando os desvios relativos do modelo para estas condições (tratamento 2, 3 e 4 da Tabela 8), as recuperações foram de 89 a 94% com desvios relativos do modelo de 2 a 4%.

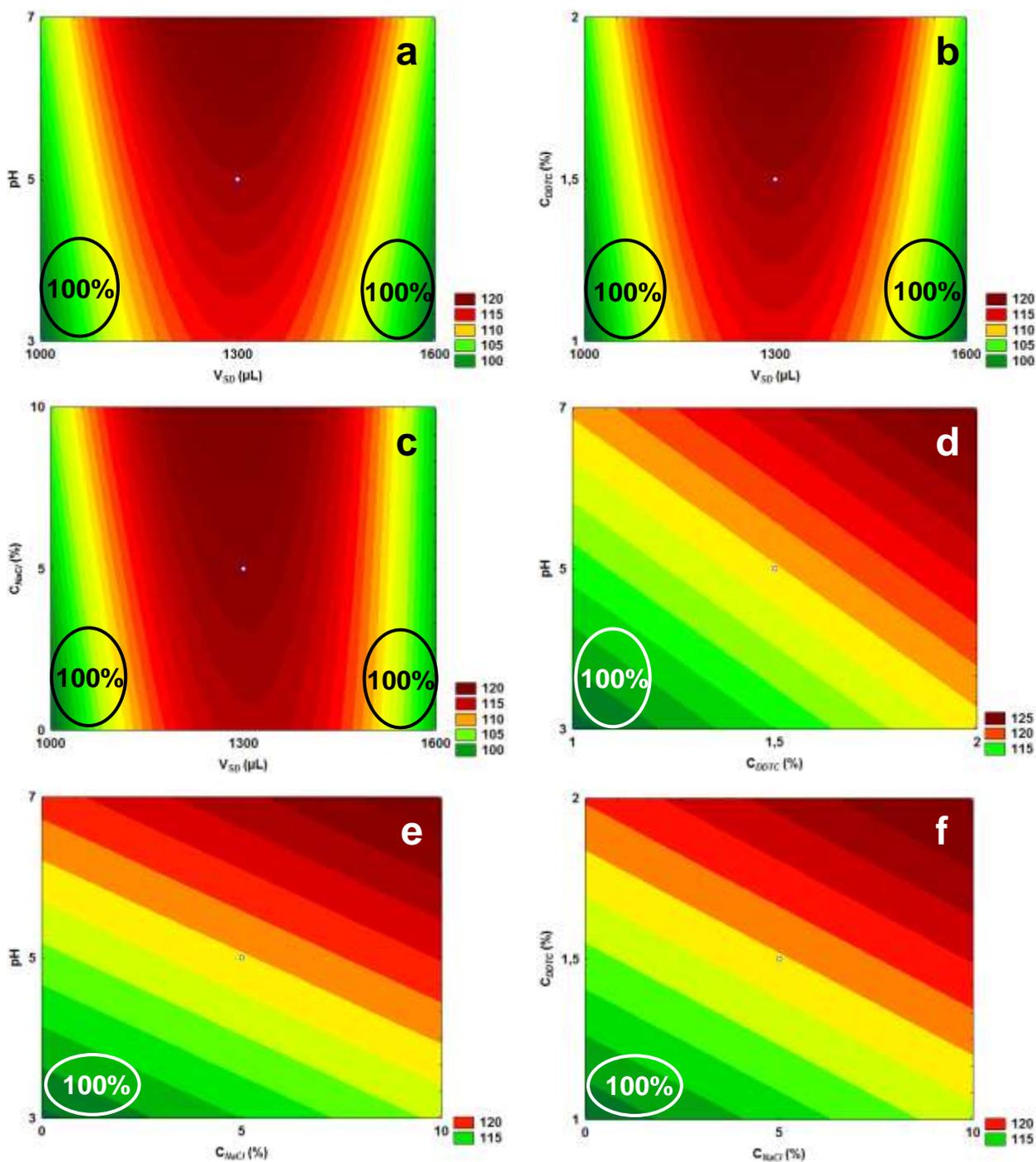


Figura 18. Superfícies de contorno que representam a recuperação de Cu (a) como uma função do pH e do volume do solvente dispersor; (b) como uma função da concentração de DDTC e do volume do solvente dispersor; (c) como uma função da concentração de NaCl e do volume do solvente dispersor; (d) como uma função do pH e da concentração de DDTC; (e) como uma função do pH e da concentração de NaCl e (f) como uma função da concentração de DDTC e de NaCl.

Cabe destacar que, através da análise da Tabela 8 e das superfícies de contorno, existem outras condições na qual a recuperação de Cu foi satisfatória. Para a escolha da melhor condição, foram fixadas as variáveis pH (3,0) e concentração de NaCl (0%) no nível de estudo -1, pois através das superfícies de contorno foi possível observar que essas duas variáveis, na maioria das interações, apresentam recuperações em torno de 100%. Apesar das condições 2, 3 e 4 (Tabela 8) apresentarem recuperações satisfatórias de 89, 92 e 94%, respectivamente, estas não foram selecionadas. Através da análise dos tratamentos foi observado que nas mesmas condições, variando apenas os níveis da concentração de DDTc, as recuperações foram maiores utilizando a concentração de DDTc no nível +1 (2% m/v). Considerando esse fato, o tratamento 10 foi escolhido como condição ótima do processo de DLLME, por apresentar recuperação de 99% e desvio relativo do modelo de 0,5%, além de menor consumo de solvente extrator.

Na Tabela 10 estão mostradas as condições otimizadas da DLLME para extração e pré-concentração de Cu em amostras de vinho.

Tabela 10. Condições otimizadas da DLLME para posterior determinação de Cu em vinho.

Parâmetros	Valores
Volume da amostra	5 mL
Tipo e volume do solvente extrator	CCl ₄ , 60 µL
Tipo e volume do solvente dispersor	ACN, 1600 µL
pH	3,0
Concentração do complexante (DDTC)	2,0%, 500 µL

Para a extração e pré-concentração de Cu em vinho por DLLME, uma mistura de CCl₄ (60 µL) e ACN (1600 µL) foi injetada rapidamente em 5 mL de amostra (diluída 5 vezes), juntamente com 500 µL de uma solução de 2,0% (m/v) de DDTc. Em seguida, foi observada uma dispersão após uma leve agitação manual. Após a etapa de centrifugação (3 min, 3000 rpm), o solvente extrator coalesce e a fase aquosa pode ser removida. Alternativamente, a fase sedimentada passa por uma etapa de lavagem com 3 mL de água ultrapura a temperatura ambiente. Em seguida, a fase aquosa é novamente removida e a fase sedimentada diluída em 3 mL de acetonitrila para subsequente determinação por UV-Vis em 432 nm.

4.3 Validação do método

4.3.1 Curva de calibração e linearidade

Para avaliar a linearidade foi feito um estudo com dois tipos de curvas de calibração, uma no solvente e outra com adição do analito. A linearidade foi estudada em uma faixa de 0,2 a 2,5 mg L⁻¹ para o Fe e 0,05 a 1,0 mg L⁻¹ para Cu.

Na Tabela 11, estão mostradas as equações e os coeficientes de correlação para as curvas no solvente e na Tabela 12 as equações e os coeficientes de correlação para as curvas com adição de analito.

Tabela 11. Resultados obtidos para a curva no solvente.

Complexo	Faixa linear (mg L ⁻¹)	Equação da reta	R ²
Fe(APDC) ₃	0,2 - 2,5	y = 0,0749x + 0,002	0,998
Cu(DDTC) ₂	0,05 - 1,0	y = 0,2055x + 0,0073	0,998

Tabela 12. Resultados obtidos para a curva com adição do analito.

Curva	Faixa linear (mg L ⁻¹)	Equação da reta	R ²
Fe	VB*	y = 0,0626x + 0,0004	0,998
	VT**	y = 0,0557x + 0,0009	0,998
Cu	VB*	y = 0,174x - 0,0005	0,998
	VT**	y = 0,1508x - 0,0005	0,998

*VB : vinho branco

**VT: vinho tinto

Os resultados mostraram que o instrumento responde linearmente, independente da forma de calibração, pois tanto a curva analítica preparada no solvente quanto a curva de adição de analito (adicionado na matriz antes da DLLME), apresentaram linearidade nos intervalos de concentração estudados com pequena dispersão entre os dados. Um coeficiente de determinação linear igual ou superior a 0,99 é considerado adequado para linearidade da curva de calibração.¹⁰³

¹⁰³ Green, J. M.; *Anal. Chem.* 68 (1996) 305-309.

Através da comparação do coeficiente angular das duas curvas pode-se verificar que há uma influência dos componentes da matriz no sistema de detecção. Cabe destacar que as curvas foram preparadas no mesmo dia a fim de minimizar o efeito da variação da resposta que é observada quando as medições são feitas em dias diferentes. Na Figura 21, estão mostradas as curvas de calibração preparadas com adição do analito para ambos os vinhos e no solvente. Para uma melhor comparação visual da inclinação entre as curvas, na curva com adição do analito foi feita uma subtração da concentração do analito já existente na amostra. Como pode ser observado, as curvas apresentam boa linearidade para Fe, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9991, 0,9985 e 0,9988 para as curvas preparadas no solvente, com adição de analito para vinho branco e adição de analito para vinho tinto, respectivamente. Para Cu a linearidade também foi adequada, com R^2 de 0,9997, 0,9995 e 0,9986 para as curvas preparadas no solvente, com adição de analito para vinho branco e adição de analito para vinho tinto, respectivamente.

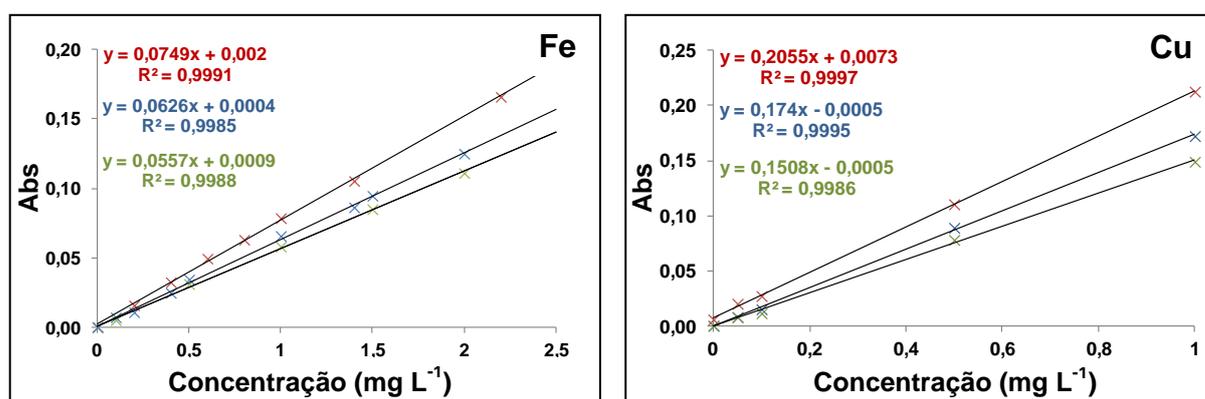


Figura 19. Curvas de calibração (x) preparadas no solvente (x) com adição do analito para vinho branco (x) com adição do analito para vinho tinto.

Pode-se perceber que a inclinação da curva no solvente, para ambos os analitos, é maior em comparação com a curva de adição do analito. Através da comparação da resposta analítica entre as curvas, é evidente que para ambos os elementos há efeito de matriz.

O efeito de matriz pode ser calculado através da relação entre as inclinações das curvas preparadas no solvente e com adição de analito. Para Fe, as curvas preparadas nos vinhos branco e tinto apresentaram um efeito de matriz de 16% e 26%, respectivamente, ou seja, em ambas as curvas o efeito de matriz resultou em uma

supressão de sinal. De maneira similar, para Cu foi observada uma supressão de sinal de 15% para a curva no vinho branco e 27% para a curva no vinho tinto.

É importante salientar que não existe discussão na literatura a respeito do efeito de matriz por UV-Vis. Portanto, a fim de minimizar os efeitos de matriz as quantificações para ambos os elementos, foram feitas através de curvas preparadas com adição do analito na matriz.

4.3.2 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos a partir da curva de adição de analito. Na Tabela 13, estão listados os valores de LOD e LOQ do instrumento (UV-Vis) e do método utilizando DLLME para Fe e Cu.

Tabela 13. Resultados de LOD e LOQ (mg L^{-1}) para Fe e Cu em vinho.

Elemento		Instrumental		Método	
		LOD	LOQ	LOD	LOQ
Fe	VB*	0,06	0,20	0,18	0,61
	VT**	0,07	0,25	0,23	0,75
Cu	VB*	0,13	0,44	0,08	0,26
	VT**	0,04	0,12	0,11	0,37

*VB : vinho branco

**VT: vinho tinto

Os limites de detecção e quantificação, instrumental e do método, apresentaram valores diferentes, pois foi considerada a diluição e pré-concentração da amostra na etapa do preparo. Os valores dos limites de detecção e quantificação para os métodos desenvolvidos estão abaixo dos limites máximos estabelecidos pela legislação, para Fe (15 mg L^{-1}) e Cu (1 mg L^{-1}) em vinhos.

4.3.3 Estudo da exatidão e precisão

Devido à falta de material de referência certificado para Fe e Cu em vinho, a exatidão e precisão dos métodos foram avaliadas através do ensaio de recuperação e RSD. Para isto, foram realizados ensaios de recuperação ($n=5$) nas concentrações de

0,5 e 1,5 mg L⁻¹ para Fe e 0,05 e 0,5 mg L⁻¹ para Cu, adicionados antes do processo de DLLME. As recuperações foram calculadas a partir das concentrações adicionadas antes da extração e das concentrações obtidas após a extração, utilizando a curva de adição de analito.

Os resultados obtidos nos ensaios de recuperação (Tabela 14), utilizando os procedimentos otimizados para Fe e Cu, apresentam valores entre 98 e 108% e entre 96 e 112%, respectivamente, comprovando a confiabilidade dos métodos.

Tabela 14. Ensaios de recuperação para Fe e Cu em amostras de vinho branco e tinto.

Vinho	Fe (mg L ⁻¹)				Cu (mg L ⁻¹)			
	Adicionado	Encontrado	R (%)	RSD (%)	Adicionado	Encontrado	R (%)	RSD (%)
Branco	0,5	0,54 ± 0,02	108	3,7	0,05	0,049 ± 0,003	98	6,1
	1,5	1,54 ± 0,08	102	5,2	0,5	0,52 ± 0,04	104	7,7
Tinto	0,5	0,52 ± 0,04	101	7,7	0,05	0,056 ± 0,003	112	5,3
	1,5	1,47 ± 0,09	98	6,1	0,5	0,48 ± 0,02	96	4,2

4.4 Aplicação dos métodos desenvolvidos em diferentes amostras de vinho

Os métodos foram aplicados em cinco amostras de vinho branco e cinco amostras de vinho tinto, onde a quantificação foi feita com curvas de adição de analito para Fe e Cu, em ambos os vinhos. Na Tabela 15, podemos visualizar os valores encontrados por UV-Vis para Fe e Cu após a extração por DLLME.

Tabela 15. Aplicação dos métodos em diferentes amostras de vinho branco e tinto. Resultados (mg L⁻¹) representam a média ± desvio padrão, n=3.

Amostra	Fe	Cu
VB1	1,30 ± 0,05	0,4 ± 0,01
VB2	5,20 ± 0,12	1,4 ± 0,04*
VB3	5,3 ± 0,12	1,5 ± 0,07*
VB4	2,3 ± 0,14	0,8 ± 0,02
VB5	2,0 ± 0,07	0,9 ± 0,02
VT1	3,0 ± 0,08	0,9 ± 0,04
VT2	3,5 ± 0,08	1,4 ± 0,06*
VT3	4,4 ± 0,21	2,5 ± 0,08*
VT4	3,9 ± 0,11	1,4 ± 0,02*
VT5	2,5 ± 0,05	1,5 ± 0,02*

*concentração acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira.

Devido às curvas de adição de analito dos vinhos brancos, apresentarem a mesma inclinação, foi possível fazer a quantificação de diferentes amostras do mesmo tipo através de uma única curva preparada com adição do analito. Esse comportamento também foi observado para as curvas com adição do analito em diferentes vinhos tintos.

Nos vinhos analisados foram encontradas diferentes concentrações de Fe e Cu, isso pode ser justificado pela diversidade de fatores que influenciam na composição do vinho.

Os níveis de concentração de Cu, em seis amostras de vinho, apresentaram valores acima dos limites máximos (1,0 mg L⁻¹) permitidos pela legislação.³⁹ Entretanto, as concentrações de Fe em todas as amostras analisadas, encontram-se abaixo do limite máximo (15,0 mg L⁻¹) permitido pela legislação.³⁹

O procedimento de extração e pré-concentração mostrou-se bastante rápido e simples quando comparado aos demais métodos empregados na literatura, uma vez que estes além de serem mais demorados, necessitam de ácidos oxidantes para o preparo da amostra, além de apresentarem custo relativamente alto e necessidade de um operador capacitado. Assim, os métodos desenvolvidos apresentaram algumas

vantagens como, simplicidade na operação, custo relativamente baixo e reduzido consumo de solventes, gerando menores quantidades de resíduos.

Adicionalmente, os métodos desenvolvidos neste trabalho apresentaram resultados satisfatórios que combinado às vantagens acima citadas, podem ser utilizados em pesquisa e análises de rotina. Neste sentido, os métodos desenvolvidos podem contribuir como alternativa para o monitoramento de Fe e Cu em amostras de vinho.

Tendo em vista que os vinhos analisados neste trabalho são oferecidos ao consumidor em diversos estabelecimentos comerciais, os resultados desta pesquisa trazem subsídios para que os órgãos de controle e fiscalização na área de saúde pública adotem uma postura mais rigorosa no que diz respeito ao controle de metais em vinhos.

³⁹MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, Secretaria de defesa agropecuária. Portaria n° 259, de 31 de maio de 2010. Diário Oficial da União, seção 1, jun. 2010.

5 CONCLUSÕES

Dois novos métodos de preparo de amostra utilizando a DLLME combinado com espectrofotometria molecular foram desenvolvidos para extração e pré-concentração de Fe e Cu em amostras de vinho branco e tinto. Os métodos foram baseados na complexação do Fe e do Cu com os respectivos ditiocarbamatos, APDC e DDTC. Através dos resultados apresentados ao longo deste trabalho, pode-se concluir que os métodos desenvolvidos para Fe e Cu, mostraram-se adequados para determinação por UV-Vis, os quais foram determinados espectrofotometricamente em 587 e 432 nm, respectivamente.

O método desenvolvido é baseado na extração e pré-concentração de Fe e Cu após a complexação com APDC (1% m/v) e DDTC (2% m/v), respectivamente. Para a extração de Fe, uma mistura apropriada de acetonitrila (solvente dispersor, 1300 μL) e tetracloretileno (solvente extrator, 80 μL) foi injetada rapidamente na amostra (5x diluída), contendo APDC (1% m/v) e 0,02 mol L^{-1} de NaCl. Após a centrifugação (3 min, 3000 rpm) a fase aquosa foi removida e a fase sedimentada submetida a uma etapa de lavagem, em seguida a fase aquosa é novamente removida e a fase sedimentada diluída em 3 mL de ACN para subsequente determinação a 587 nm.

A utilização de um planejamento experimental para o desenvolvimento do método de Cu resultou em uma diminuição significativa no número de experimentos, permitindo estudar combinações que não seriam possíveis variando um parâmetro por vez com os demais fixados. Com isso, pode ser observada uma considerável redução do tempo e do custo vinculado às etapas de otimização.

Para a extração de Cu, foram feitos os mesmos procedimentos descritos para o Fe, sendo utilizado acetonitrila como solvente dispersor (1600 μL) e tetracloreto de carbono como solvente extrator (60 μL). A mistura desses solventes foi injetada rapidamente na amostra (sem diluição), contendo DDTC (2% m/v). A determinação foi feita a 432 nm.

Os métodos desenvolvidos apresentam algumas vantagens como, simplicidade na operação, custo relativamente baixo e reduzido consumo de solventes, gerando menores quantidades de resíduos.

Adicionalmente, os métodos desenvolvidos neste trabalho apresentaram resultados satisfatórios em termos de linearidade, exatidão e precisão, que combinado

às vantagens acima citadas, podem ser utilizados em pesquisa e análises de rotina. Neste sentido, os métodos desenvolvidos podem contribuir como alternativa para o monitoramento de Fe e Cu em amostras de vinho.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tariba, B. Metals in Wine - Impact on Wine Quality and Health Outcomes. *Biol. Trace Elem. Res.* 144 (2011) 143-156.
2. Kostic, D.; Mitic, S.; Miletic, G.; Despotovic, S.; Zarubica, A. The concentrations of Fe, Cu and Zn in selected wines from South- East Serbia. *J. Serb. Chem. Soc.* 75 (2010) 1701-1709.
3. Álvarez, M.; Moreno, I. M.; Jos, Á. M.; Carneán, A. M.; Gonzáles, A. G. Study of mineral profile of Montilla-Moriles “fino” wines using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry methods. *J. Food Compos. Anal* 20 (2007) 391-395.
4. Pohl, P. What do metals tell us about wine?. *Trac-Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 941-949.
5. Catarino, S.; Pinto, D.; Curvelo-Garcia, A.S. Validação e comparação de métodos de análise em espectrofotometria de absorção atômica com chama para doseamento de cobre e ferro em vinhos e aguardentes. *Ciência Téc. Vitiv* 18 (2003) 65-76.
6. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R., Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.
7. Dadfarnia, S.; Shabani, A. M. H. Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals – A review. *Anal. Chim. Acta* 658 (2010) 107-119.
8. Baliza, P. X.; lemos, V. A.; Teixeira, L. S. G. A procedure for determination of cobalt in water samples after dispersive liquid – liquid microextraction. *Microchem. J.* 93 (2009) 220-224.
9. Shokoufi, N., Hamdamali, A. Laser induced-thermal lens spectrometry in combination with dispersive liquid-liquid microextraction for trace analysis. *Anal. Chim. Acta* 681 (2010) 56-62.

10. Rezzae, M.; Assadi, Y.; Hosseini, M. M.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid – liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1-9.
11. Martins, M. L.; Primel, E. G.; Caldas, S. S.; Prestes, O. D.; Adaime, M.; Zanella, R. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): Fundamentos e aplicações. *Sci Chromatogr* 4 (2012) 29-45.
12. Caldas, S. S.; Costa, F. P.; Primel, E. G. Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta* 665 (2010) 55-62.
13. Gharehbaghi, M., Shemirani, F. Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction and enhanced spectrophotometric determination of molybdenum (VI) in water and plant leaves samples by FO-LADS. *Food Chem. Toxicol* 49 (2011) 423-428.
14. De la Calle, I.; Pena-Pereira, F.; Cabaleiro, N.; Lavilla, I.; Bendicho, C. Ion pair-based dispersive liquid-liquid microextraction for gold determination at PPB level in solid samples after ultrasound-assisted extraction and Waters by electrothermal-atomic absorption spectrometry. *Talanta* 84 (2011) 109-115.
15. Rezzae M.; Yamini, Y.; Faraji, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342-2357.
16. Anthemidis, A. N., Ioannou, K. G. Development of a sequential injection dispersive liquid-liquid microextraction system for electrothermal atomic absorption spectrometry by using a hydrophobic sorbent material: Determination of lead and cadmium in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 668 (2010) 35-40.
17. Naseri, M. T.; Hosseini, M. R. M.; Assadi, Y.; Kiani, A. Rapid determination of lead in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta* 75 (2008) 56-62.
18. Skrlíková, J.; Andruch, V.; Balogh, I. S.; kocúrová, L.; Nagy, L.; Bazel, Y. A novel, environmentally friendly dispersive liquid-liquid microextraction procedure for the determination of copper. *Microchem. J.* 99 (2011) 40- 45.
19. Ezoddin, M.; Shemirani, F.; Jamali, M. R. Fiber optic-linear array detection

- spectrophotometry in combination with dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration and determination of copper. *J. Anal. Chem.* 65 (2010) 153- 158.
20. Wen, X.; Yang, Q.; Yan, Z.; Deng, Q. Determination of cadmium and copper in water and food samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with UV – vis spectrophotometry. *Microchem. J.* 97 (2011) 249-254.
 21. Aquarone, E. Biotecnologia: Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. 1ª Ed. rev., São Paulo: Edgard Blücher, 1990.
 22. Johnson, H. A História do vinho. 1ª Ed. São Paulo: Companhia das Letras, 1999.
 23. Mello, C. E. C. Presença do vinho no Brasil: um pouco de História. 1ª Ed. São Paulo: Editora de Cultura, 2007.
 24. Mello, L. M. R. Vitivinicultura brasileira. Panorama 2011. Embrapa Uva e Vinho, 2012.
 25. IBRAVIN, Instituto Brasileiro do Vinho. Regiões Produtoras. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php> acessado em: 15 de Janeiro de 2013.
 26. Pessanha, S.; Carvalho, M. L.; Becker, M.; Bohlen, A. V. Quantitative determination on heavy metals in different stages of wine production by Total Reflection X-ray fluorescence and Energy Dispersive X-ray Fluorescence: Comparison on two vineyards. *Spectrochim. Acta Part B* 65 (2010) 504-507.
 27. Grindlay., G.; Mora, J.; Gras, L.; Loos-Vollebregt, M. T.C. de. Atomic spectrometry methods for wine analysis: A critical evaluation and discussion of recent applications. *Anal. Chim. Acta* 691 (2011) 18-32.
 28. Borges, E. P. ABC Ilustrado da Vinha e do Vinho. 2ª Ed. São Paulo: Mauad, 2008.
 29. Bertagnolli, S. M. M.; Rossato, S. B.; Silva, V. L.; Cervo, T.; Sautter, C. K.; Hecktheuer, L. H.; Penna, N. G. Influência da maceração carbônica e da irradiação ultravioleta nos níveis de trans-resveratrol em vinhos de uva cabernet sauvignon. *Braz. J. Pharm. Sci.* 43 (2007) 71-77.
 30. Mamede, M. E. O.; Pastore, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e

- ação antiloxidante. B CEPPA 22 (2004) 233-252.
31. Iglesias, M.; Besalú, E.; Anticó, E. Internal Standardization – Atomic Spectrometry and Geographical Pattern Recognition Techniques for the Multielement Analysis and classification of Catalonian Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 219- 225.
 32. Jakubowski, N.; Brandt, R.; Stuewer, D. Analysis of wines by ICP MS: Is the pattern of the rare earth elements a reliable fingerprint for the provenance? *Fresenius J. Anal. Chem.* 364 (1999) 424- 428.
 33. Barbaste, M.; Medina, B.; Perez-Trujillo, JP. Analysis of arsenic, lead and cadmium in wines from the Canary Islands, Spain, by ICP MS. *Food Addit. Contam.* 20 (2003) 141-148.
 34. WHO, World Health Organization. Copper: Environmental Health Criteria 200, Geneva, 1998.
 35. WHO, World Health Organization. Guidelines for Drinking-Water Quality, Geneva, 1996.
 36. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br> acessado em: 18 de Janeiro de 2013.
 37. Lara, R.; Cerruti, S.; Salonia, J. A.; Olsina, R. A.; Martinez, L. D. Trace element determination of Argentine wines using ETAAS and USN-ICP-OES. *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 293-297.
 38. Pohl, P., Prusisz, B. Application of tandem column solid phase extraction and flame atomic absorption spectrometry for the determination of inorganic and organically bound forms of iron wine. *Talanta* 77 (2009) 1732-1738.
 39. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, Secretaria de defesa agropecuária. Portaria nº 259, de 31 de maio de 2010. Diário Oficial da União, seção 1, jun. 2010.
 40. Pohl, P., Sergiel, I. Evaluation of the Total Content and the Operationally Defined Species of Copper in Beers and Wines. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 9378-9384.
 41. Bentlin, F. R. S.; Pulgati, F. H.; Dressler, D. P. Elemental analysis of wines from South America and their classification according to country. *J. Braz.*

- Chem. Soc.* 22 (2011) 327-336.
42. Catarino, S.; Madeira, M.; Monteiro, F.; Rocha, F.; Curvelo-Garcia, A. S.; Bruno, S. R. Effect of bentonite characteristics on the elemental composition of wine. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 158- 165.
 43. Florian, D.; Knapp, G. High-Temperature, Microwave-Assisted UV Digestion: A Promising Sample Preparation Technique for Trace Element Analysis. *Anal. Chem.* 73 (2001) 1515- 1520.
 44. Krug, J. F. Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1^a Ed. rev., Piracicaba, 2010.
 45. Lopez, F. F.; Cabrera, C.; Lorenzo, M. L.; Lopez, M. C. Aluminium levels in wine, beer and other alcoholic beverages consumed in Spain. *Sci. Total Environ.* 220 (1998) 1-9.
 46. Almeida, C. M. R.; Vasconcelos, M. T.S.D. Lead Contamination in Portuguese Red Wines from the Douro Region: from the Vineyard to the Final Product. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3012-3023.
 47. Kékedy-Nagy, L.; Zsigmond, A. R.; Cordos, E. Quantification of the Rubidium in Beverage Products Micro Samples by Platinum-wire Loop in Flame Atomization Atomic Emission Spectrometry. *Acta Chim. Slov.* 57 (2010) 912-915.
 48. Anthemidis, A. N.; Ioannou, K. G. On-line sequential injection dispersive liquid-liquid microextraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of copper and lead in water samples. *Talanta* 79 (2009) 86-91.
 49. 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. *Microchim. Acta* 172 (2011) 75-82.
 50. Grzésekowiak, A.; Grzésekowiak, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. *Trac-Trends Anal. Chem* 30 (2011) 1382-1399.
 51. Pizarro, C.; Sáens-González, C.; Pérez-del-Notario, N.; González-Sáiz, J. M. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the

- simultaneous determination of the main compounds causing cork taint and Brett character in wines using gas chromatography – tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1576-1584.
52. Rodríguez-Cabo, T.; Rodríguez, I.; Ramil, M.; Cela, R. Dispersive liquid – liquid microextraction using non-chlorinated, lighter than water solvents for gas chromatography – mass spectrometry determination of fungicides in wine. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6603-6611.
53. Campillo, N.; Vinãs, P.; Cacho, J. I.; Peñalver, R.; Hernandez-Córdoba, M. Evaluation of dispersive liquid – liquid microextraction for the simultaneous determination of chlorophenols and haloanisoles in wines and cork stoppers using gas chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7323-7330.
54. Jia, X.; Han, Y.; Liu, X.; Duan, T.; Chen, H. Speciation of mercury in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B* 66 (2011) 88-92.
55. Naseri, M. T.; Hemmatkhah, P.; Hosseini, M. R. M.; Assadi, Y. Combination of dispersive liquid-liquid microextraction with flame atomic absorption spectrometry using microsample introduction for determination of lead in water samples. *Anal. Chim. Acta* 610 (2008) 135-141.
56. 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* 83 (2011) 885-890.
57. Jia, X.; Han, Y.; Liu, X.; Duan, T.; Chen, H. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with flow injection inductively coupled plasma mass spectrometry for simultaneous determination of cadmium, lead and bismuth in water samples. *Microchim. Acta* 171 (2010) 49-56.
58. Jahromi, E. Z.; Bidari, A.; Assadi, Y.; Hosseini, M. R. M.; Jamali, M. R. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry Ultra trace determination of cadmium in water samples. *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 305-311.

59. Lin, W. O.; Neto, J. T. X. B. Agentes complexantes: Podante, coronante e criptante classificação e nomenclatura. *Química Nova* 21(1998) 630-634.
60. Hulanicki, A. Complexation reactions of dithiocarbamates. *Talanta* 75 (1967) 1371-1392.
61. Saracoglu, S.; Soylak, M.; Elci, L. Preconcentration of Cu(II), Fe(III), Ni(II), Co(II) and Pb(II) ions in some manganese salts with solid phase extraction method using chromosorb-102 resin. *Acta Chim. Slov.* 50 (2003) 807-814.
62. Rivas, R. E.; López-García, I.; Hernández-Córdoba, M. Speciation of very low amounts of arsenic and antimony in Waters using dispersive liquid-liquid microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B* 64 (2009) 329-333.
63. Hemmatkhan, P.; Bidari, A.; Jafarvand, S.; Hosseini, M. R. M.; Assadi, Y. Speciation of Chromium in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and flame atomic absorption spectrometry. *Microchim. Acta* 166 (2009) 69-75.
64. Sun, Y.; Sun, M. Determination of 42 trace elements in seawater by inductively coupled plasma mass spectrometry after APDC chelate co-precipitation combined with iron. *Anal Lett* 40 (2007) 2391-2404.
65. Sandell, E. B. Colorimetric determination of trace of metals. New York: Interscience Publishers, 1959
66. Perrin, D. D. Chemical Analysis: masking and desmasking of chemical reactions. USA: Willey-Interscience, 1970.
67. Liang, P.; Peng, L.; Yan, P. Speciation of As(III) and As(V) in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction separation and determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchim. Acta* 166 (2009) 47-52.
68. Liang, P., Peng, L. Determination of silver(I) ion in water samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry after preconcentration with dispersive liquid-liquid microextraction. *Microchim. Acta* 168 (2010) 45-50.
69. Chen, H.; Du, P.; Chen, J.; Hu, S.; Li, S.; Liu, H. Separation and preconcentration system based on ultrasonic probe-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction for determination trace amount of

- chromium(VI) by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta* 81 (2010) 176-179.
70. Yousefi, S. R., Shemirani, F. Development of a robust ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction against high concentration of salt for preconcentration of trace metals in saline aqueous samples: Application to the determination of Pb and Cd. *Anal. Chim. Acta* 669 (2010) 25-31.
71. Khani, R.; Shemirani, F.; Majidi, B. Combination of dispersive liquid-liquid microextraction and flame atomic absorption spectrometry for preconcentration and determination of copper in water samples. *Desalination* 266 (2011) 238-243.
72. Hashemi, P.; Hosseini, S. M.; Kakanejadifard, A.; Azimi, G.; Zohrehvand, S. Dispersive liquid-liquid microextraction of Cu(II) using a Novel dioxime for its highly sensitive determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J. Chin. Chem. Soc.* 57 (2010) 111-117.
73. Ravelo-Pérez, L. M.; Hernández-Borges, J.; Asensio-Ramos, M.; Rodríguez-Delgado, M. Á. Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7336- 7345.
74. Berton, P., Wuilloud, R. G. Highly selective ionic liquid-based microextraction for sensitive trace cobalt determination in environmental and biological samples. *Anal. Chim. Acta* 662 (2010) 155-162.
75. Aguilera-Herrador, E.; Lucena, R.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. The roles of ionic liquids in sorptive microextraction techniques. *Trac-Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 602-616.
76. Kocúrová, L.; Balogh, I. S.; Sandrejová, J.; Andruch, V. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter water. A review. *Microchem. J.* 102 (2012) 11-17.
77. Birjandi, A. P.; Bidari, A.; Rezaei, F.; Hosseini, M. R. M.; Assadi, Y. Speciation of butyl and phenyltin compounds using dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-flame photometric detection. *J. Chromatogr. A*, 1193 (2008) 19-25.
78. Mato, I.; Suárez-luque, S.; Huidobro, J. F. A review of the analytical methods

- to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Res. Int.* 38 (2005) 1175-1188.
79. Yamasaki, A.; Oliveira, J. A. B. P.; Duarte, A. C.; Gomes, M. T. S.R. An insight into the adsorption and electrochemical processes occurring during the analysis of copper and lead in wines, using an electrochemical quartz crystal nanobalance. *Talanta* 98 (2012) 14-18.
80. Catarino, S.; Curvelo-Garcia, A. S.; Sousa, R. B. Measurements of contaminant elements of wines by inductively coupled plasma-mass spectrometry: A comparison of two calibration approaches. *Talanta* 70 (2006) 1073-1080.
81. Bigöl, M.; Yentür, G.; Er, B.; Öktem, B. Determination of some heavy metal levels in soft drinks from Turkey using ICP-OES method. *Czech J. Food Sci.* 28 (2010) 213-216.
82. Dessuy, M.B.; Vale, M. G. R.; Welz, B.; Borges, A. R.; Silva, M. M.; Martelli, P. B. Determination of cadmium and lead in beverages after leaching from pewter cups using graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta* 85 (2011) 681-686.
83. Fiket, Z.; Mikac, N.; Kniewald, G. Arsenic and other trace elements in of eastern Croatia. *Food Chem.* 126 (2011) 941-947.
84. Karadjova, I.; Arpadjan, S.; Cvetkovic, J.; Stafilov, T. Sensitive method for trace determination of mercury in wines using electrothermal atomic absorption spectrometry. *Microchim. Acta* 147 (2004) 39-43.
85. Abadi, M. D. M.; Ashraf, N.; Chamsaz, M.; Shemirani, F. An overview of liquid phase microextraction approaches combined with U-VIS spectrophotometry. *Talanta* 99 (2012) 1-12.
86. Pavia, D. L., et al. Introdução à espectroscopia. Trad. Pedro Barros, 4^a ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
87. Higson, S. P.J. Química Analítica. Trad. Mauro Silva. São Paulo: McGraw-Hill, 2009.
88. Gharehbaghi, M.; Shemirani, F.; Baghdadi, M. Dispersive liquid-liquid microextraction and spectrophotometric determination of cobalt in water sample. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 88 (2008) 513-523.

89. Tabrizi A. B. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for iron speciation and determination in different water sample. *J. Hazard. Mater.* 183 (2010) 688-693.
90. Box et al.; Statistics for experimenters: An introduction to designs, data analysis and model building. John Wiley & Sons, 1978.
91. Rodrigues, M. I.; Lemma, A. F.; Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. Cárita editora, 2005.
92. INMETRO, Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQCGCRE-008, 2007. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQCGCRE8_02.pdf acessado em: 18 de janeiro de 2013.
93. BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 junho 2003. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm acessado em: 23 de janeiro de 2013.
94. Uddin, M. N.; Salam, Md. A.; Hossain, M. A. Spectrophotometric measurement of Cu(DDTC)₂ for the simultaneous determination of zinc and copper. *Chemosphere* 90 (2013) 366-373.
95. Mohammadi, S. Z.; Afzali, D.; Baghelani, Y. M. Ligandless-dispersive liquid-liquid microextraction of trace amount of copper ions. *Anal. Chim. Acta* 653 (2009) 173-177.
96. Li, Y.; Wei, G.; Hu, J.; Liu, X.; Zhao, X.; Wang, X. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by reversed phase-high performance liquid chromatography for the determination of polybrominated diphenyl ethers at trace levels in landfill leachate and environmental water samples. *Anal. Chim. Acta* 615 (2008) 96-103.
97. Fu, L.; Liu, X.; Hu, J.; Zhao, X.; Wang, H.; Wang, X. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. *Anal. Chim. Acta* 632 (2009) 289-295.

98. Asadollahi, T.; Shabani, A. M. H.; Dadfarnia, S.; Ghasemi, J. Application of chemometrics methods for the simultaneous of zinc and copper after preconcentration and separation by liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop coupled to flow injection spectrophotometry. *Current Anal Chem* 8 (2012) 373-381.
99. Majidi, B., Shemirani, F. Solvent-based de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction of palladium in environmental samples and determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta* 93 (2012) 245-251.
100. Rusnakova, L.; Andruch, V.; Balogh, I.; Skrlíková, J. A dispersive liquid-liquid microextraction procedure for determination of boron in water after ultrasound-assisted conversion to tetrafluoroborate. *Talanta* 85 (2011) 541-545.
101. Paleologos, E. K.; Giokas, D. L.; Tzouwara-Karayanni, S. M.; Karayannis, M. I. Micelle mediated methodology for the determination of free and bound iron in wines by flame atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 241-248.
102. Liang, P.; Zhao, E.; Li, F. Dispersive liquid-liquid microextraction preconcentration of palladium in water samples and determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta* 77 (2009) 1854-1857.
103. Green, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem.* 68 (1996) 305-309.