



**Universidade Federal da Bahia**  
**Instituto de Química**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**



**Métodos de microextração em fase líquida para a determinação  
espectrométrica de mercúrio em amostras de frutos do mar e  
óleo de peixe**

**Rebeca Moraes Menezes**

**Salvador**  
**2018**

**Rebeca Moraes Menezes**

**Métodos de microextração em fase líquida para a determinação  
espectrométrica de mercúrio em amostras de frutos do mar e  
óleo de peixe**

**Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Química  
da Universidade Federal da Bahia.**

**Orientador: Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos**

**Salvador**

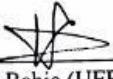
**2018**

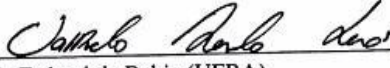
TERMO DE APROVAÇÃO

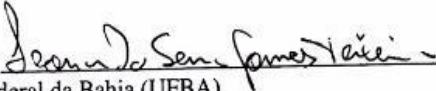
REBECA MORAES MENEZES

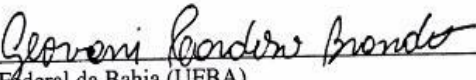
“Métodos de microextração em fase líquida para a determinação espectrométrica de mercúrio em amostras de frutos do mar e óleo de peixe”

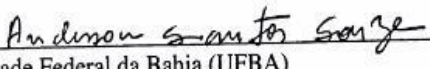
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos   
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos   
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira   
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Geovane Cardoso Brandão   
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Anderson Santos Souza   
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 05 de julho de 2018.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MORAES MENEZES, REBECA  
Métodos de microextração em fase líquida para a  
determinação espectrométrica de mercúrio em amostras  
de frutos do mar e óleo de peixe / REBECA MORAES  
MENEZES. -- Salvador, 2018.  
89 f. : il

Orientador: Walter Nei Lopes dos Santos.  
Tese (Doutorado - Programa de pós-graduação em  
química) -- Universidade Federal da Bahia,  
Universidade Federal da Bahia, 2018.

1. líquido iônico. 2. microextração em fase líquida.  
3. mercúrio. 4. frutos do mar. 5. óleo de peixe. I.  
Lopes dos Santos, Walter Nei. II. Título.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos é apenas uma gota de água do mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

*Madre Teresa de Calcutá*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Deus altíssimo por se fazer presente em todos os momentos da minha trajetória. Eu sinto!

A minha mãe Maria Cristina e minha irmã Renata Moraes por apoiarem todas as minhas decisões e amor incondicional dedicado a mim. E ao meu sobrinho Pedro que chegou para alegrar mais ainda os nossos dias e reforçar o nosso amor. Vocês são a minha vida!

Agradeço a família do coração que a vida me deu. Isabel Cristina, Djalma Menezes, Carolina, Renata e Rafael Vasconcelos, vocês foram sem sombra de dúvidas essenciais nessa jornada. E com o coração tomado de gratidão, em especial a Rafael, por todos os momentos compartilhados e por sempre acreditar que sou capaz. Eu amo muito cada um de vocês.

Agradeço ao Prof. Dr. Walter Nei pela orientação e confiança concedida e por ter me apoiado ao longo desses quatro anos. E ao Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos, pela dedicação, ensinamentos diários e apoio incondicional em minha vida acadêmica. Gratidão eterna!

Aos colegas de laboratório da UESB e UNEB, em especial: Analú, Luana, Leane, Jeferson, Márcio e Washington (LQA) e Viviane, Jamile, Laiana, Celeste, Gabriela, Bruna e Daniel Levi (GPDQA). Obrigada por tornarem os dias que pudemos compartilhar juntos mais agradáveis.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma durante o desenvolvimento deste trabalho, em especial: FAPESB e Universidade Federal da Bahia (UFBA).

## RESUMO

As tendências atuais em Química Analítica estão conduzindo ao desenvolvimento de métodos que proporcionem a miniaturização e a redução na geração de compostos nocivos ao meio ambiente. Neste trabalho, foram propostos dois métodos para a pré-concentração de mercúrio empregando a microextração líquido-líquido com líquido iônico e controle de temperatura assistida por vortex (TC-IL-LPME) e microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante (DLLME-SFOD). Em ambos os métodos, a detecção foi realizada empregando-se espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS) e o reagente pirrolidina ditiocarbamato de amônio (APDC) foi utilizado como agente complexante para o  $\text{Hg}^{2+}$ . O método de TC-IL-LPME desenvolvido consiste na dispersão do líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio ( $[\text{Bmim}][\text{PF}_6]$ ) na fase aquosa por agitação vigorosa em vortex, seguido de aquecimento em um banho-maria e resfriamento em banho de gelo. Após centrifugação, a fase enriquecida foi dissolvida em solução ácida para redução da viscosidade, e o mercúrio foi quantificado nesta mistura. Sob condições otimizadas, o método apresentou limite de detecção de  $0,045 \mu\text{g L}^{-1}$ , limite de quantificação de  $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$  e fator de enriquecimento igual a 54. O método foi aplicado na determinação de mercúrio em amostras de óleo de peixe. No método empregando a DLLME-SFOD, o solvente orgânico 1-dodecanol foi utilizado como extrator do complexo Hg-APDC. A dispersão do solvente orgânico em finas gotículas foi promovida pelo solvente dispersor etanol e agitação magnética. Em seguida, a gota foi congelada para facilitar a sua remoção. Após a dissolução com ácido nítrico, o teor de mercúrio foi determinado. Uma bomba peristáltica introduziu ar atmosférico para carrear o vapor de mercúrio gerado. Sob condições otimizadas, o método apresentou limite de detecção e quantificação de  $0,067 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $0,22 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. O método foi aplicado na determinação de mercúrio em peixes e molusco. Os dois métodos foram aplicados com sucesso na pré-concentração de mercúrio em amostras de alimentos e se apresentam como alternativas versáteis, ecológicas e muito eficientes.

Palavras-chave: líquido iônico; microextração em fase líquida; mercúrio, vapor frio; frutos do mar; óleo de peixe

## ABSTRACT

Current trends in analytical chemistry are leading to the development of methods that provide miniaturization and reduction in the generation of compounds harmful to the environment. In this work, two methods were proposed for the pre-concentration of mercury using temperature controlled-ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction and vortex-assisted (TC-IL-LPME) and liquid-liquid dispersive microextraction with the solidification of the floating organic drop (DLLME-SFOD). In both methods, detection was performed using cold vapor atomic absorption spectrometry (CV AAS), and the ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (APDC) reagent was used as a complexing agent for  $\text{Hg}^{2+}$ . The developed TC-IL-LPME method consists in dispersing the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ( $[\text{Bmim}][\text{PF}_6]$ ) in the aqueous phase by vigorous vortexing, followed by heating and cooling in an ice bath. After centrifugation, the enriched phase was dissolved in an acid solution to reduce viscosity, and the mercury was quantified in this mixture. Under optimized conditions, the method had a detection limit of  $0.045 \mu\text{g L}^{-1}$ , a limit of quantification of  $0.15 \mu\text{g L}^{-1}$  and an enrichment factor of 54. The method was applied to the determination of mercury in fish oil samples. In the method using DLLME-SFOD, 1-dodecanol was used as extraction solvent of the Hg-APDC complex. The dispersion of the organic solvent in fine droplets was promoted by the solvent dispersant ethanol and magnetic stirring. The drop was then frozen to facilitate removal. After dissolution with nitric acid, the mercury content was determined. Under optimized conditions, the method showed a limit of detection and quantification of  $0.067 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $0.22 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. The method was applied to the determination of mercury in fish and crustacean. The two methods were successfully applied in the preconcentration of mercury in food samples and presented as versatile, ecological and very efficient alternatives.

Keywords: ionic liquid; liquid-phase microextraction; mercury; cold vapor; seafood; fish oil



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cátions mais comuns na composição dos líquidos iônicos.....	20
Figura 2. Métodos derivados da microextração líquido-líquido convencional.....	22
Figura 3. Procedimento experimental esquemático adotado.....	23
Figura 4. Diagrama expandido do processo de extração empregando HF-ILLPME.....	25
Figura 5. Etapas envolvidas no procedimento experimental por IL-DLLME assistida por vortex para a determinação de mercúrio em amostras de urina não digeridas.....	31
Figura 6: Diagrama esquemático do método de microextração líquido líquido assistido por vortex à base de nanofluidos de zinco (ZnO-NF VA-LLME).....	32
Figura 7. Diagrama do sistema em linha com análise por injeção em fluxo combinado com espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (FI-CV AAS). ....	33
Figura 8. Diagrama esquemático do procedimento de IL-DLLME com formação de solvente <i>in situ</i> .....	35
Figura 9. Ilustração esquemática da microextração de mercúrio em fase sólida empregando líquido iônico específico. ....	39
Figura 10. Diagrama ilustrativo das etapas envolvidas na microextração em fase sólida dispersiva baseada em líquido iônico assistida por ultrassom (US-D-IL- $\mu$ -SPE).....	40
Figura 11. Ilustração esquemática do método de pré-concentração de mercúrio em óleo de peixe.....	47
Figura 12: Estrutura do reagente orgânico pirrolidina ditiocarbamato de amônio (APDC) utilizado para a complexação da espécie Hg(II) no sistema de pré-concentração proposto.....	48
Figura 13: Influência do pH na extração e pré-concentração de mercúrio (II).....	49
Figura 14: Efeito do volume do agente complexante APDC 0,1%. ....	50
Figura 15: Estrutura do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio.....	50
Figura 16: Efeito da quantidade do líquido iônico [Bmim][PF <sub>6</sub> ] utilizado como solvente extrator na pré-concentração de mercúrio. ....	51
Figura 17: Influência do tempo de agitação em vortex. ....	52
Figura 18: Efeito da temperatura de aquecimento do banho-maria na pré-concentração. ....	53
Figura 19: Efeito do volume do diluente utilizado na solubilização do líquido iônico. Volume da microgota: 60 $\mu$ L; .....	54
Figura 20: Efeito do volume de reagente redutor na geração de vapor frio de mercúrio. ....	55
Figura 21: Influência do volume do separador gás/líquido na geração de vapor frio.....	57
Figura 22: Efeito do tempo de reação sob agitação magnética para geração de vapor frio de mercúrio.....	57
Figura 23: Vazão do gás de nitrogênio utilizado para carrear o vapor de mercúrio em CV AAS. ....	58
Figura 24: Alargamento do pico proporcionado por baixa vazão (a); Formado do pico gerado por vazões igual e/ou superior a 3,57 mL s <sup>-1</sup> (b). ....	59
Figura 25: Curva analítica utilizando o método de microextração líquido-líquido proposto.....	61

Figura 26: Curva analítica para medida direta de mercúrio .....	61
Figura 27: Ilustração esquemática do método de pré-concentração de mercúrio em frutos do mar. ....	70
Figura 28: Influencia do uso do agitador magnético na etapa de microextração dispersiva líquido-líquido. ....	71
Figura 29: Influência do tipo de diluente utilizado para dissolução da gota orgânica solidificada. ....	72
Figura 30: Gráfico de Pareto dos efeitos para as variáveis estudadas em DLLME-SFOD .....	74
Figura 31: Superfície de resposta (a) e curvas de níveis (b), para a otimização de QD e QS. ....	75
Figura 32: Superfície de resposta (a) e curvas de níveis (b), para a otimização de pH e TA.	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características de métodos para determinação de espécies de mercúrio envolvendo IL-SDME e HF-ILLPME.....	26
Tabela 2: Características de métodos para determinação de espécies de mercúrio envolvendo IL-DLLME.....	36
Tabela 3: Características de métodos para determinação de mercúrio envolvendo IL-SPME...	41
Tabela 4: Condições otimizadas para o método de microextração baseado em líquido iônico proposto.....	59
Tabela 5: Efeito de ânions coexistentes na extração de mercúrio.....	60
Tabela 6: Efeito de cátions coexistentes na extração de mercúrio.....	60
Tabela 7: Resultados obtidos a partir do material de referência certificada BCR-060.....	63
Tabela 8: Resultados obtidos a partir da determinação de mercúrio em amostras reais.....	63
Tabela 9: Níveis das variáveis no planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> .....	73
Tabela 10: Matriz e resultados do planejamento fatorial de dois níveis para determinação de Hg <sup>2+</sup> em DLLME-SFOD.....	73
Tabela 11: Matriz do primeiro planejamento Doehlert para a DLLME-SFOD.....	75
Tabela 12: Matriz do segundo planejamento Doehlert para a DLLME-SFOD.....	76
Tabela 13: Principais parâmetros analíticos do método proposto.....	77
Tabela 14: Quantidades toleráveis de outros íons na determinação de mercúrio (II) pelo método de microextração proposto.....	78
Tabela 15: Resultados obtidos a partir do material de referência certificada ERM-278.....	78
Tabela 16: Resultados obtidos a partir da determinação de mercúrio em amostras de frutos do mar.....	79

## LISTA DE SIGLAS

**[A336][TS]** - Tiosalicilato de tricapril metilamônio

**APDC** - Pirrolidina ditiocarbamato de amônio; (Do inglês: ammonium pyrrolidine dithiocarbamate)

**[BMIM][BF<sub>4</sub>]** – Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio

**[C4MIM][PF<sub>6</sub>]** ou **[BMIM]PF<sub>6</sub>]** – Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio

**[C6MIM][PF<sub>6</sub>]** – Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio

**[C8MIM][PF<sub>6</sub>]** - Hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazólio

**CV AFS** - Espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio; (Do inglês: Cold vapour atomic fluorescence spectroscopy)

**CV AAS** - Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio; (Do inglês: Cold vapour atomic absorption spectrometry)

**CG** - Cromatografia gasosa

**CYPHOS®IL101** - Cloreto de trihexil(tetradecil)fosfônio; (Do inglês: trihexyl(tetradecyl)phosphonium chloride)

**DLLME** - Microextração líquido-líquido dispersiva; (Do inglês: dispersive liquid-liquid microextraction)

**F AAS** - Espectrometria de absorção atômica com chama; (Do inglês: Flame atomic absorption spectrometer)

**GF AAS** - Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite; (Do inglês: graphite furnace atomic absorption spectrometer)

**HF-LPME** - Microextração em fase líquida de fibra oca; (Do inglês: hollow fiber-based liquid phase microextraction)

**[HMIM][NTF<sub>2</sub>]** - Bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-hexil-3-metilimidazólio

**HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência; (Do inglês: High performance liquid chromatography)

**LI** – Líquido iônico / **IL**- Líquido ionico (Do inglês: ionic liquid)

**ICP-MS** - Espectrometria de massa com plasma com plasma indutivamente acoplado; (Do inglês; Inductively coupled plasma mass spectrometry)

**ICP OES** - Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; (Do inglês: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)

**LLE** - Extração líquido-líquido; (Do inglês: Liquid–liquid extraction)

**LPME** - Microextração em fase líquida; (Do inglês: Liquid-phase microextraction)

**ME** - Microextração

**PTFE** - Politetrafluoretileno

**SD-LPME** - Microextração em fase líquida de gota única; (Do inglês: single drop liquid phase microextraction)

**SPE** – Extração em fase sólida; (Do inglês: solid phase extraction)

**SPME** – Microextração em fase sólida; (Do inglês: solid phase microextraction)

**TSIL PTFE SPME** - Politetrafluoretileno revestido com líquido iônico específico para a microextração em fase sólida

**UV-CV AAS** – Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio induzida por ultravioleta

**US-D-IL- $\mu$ -SPE** - Microextração em fase sólida dispersiva baseada em líquido iônico assistida por ultrassom

**VOC's** - Compostos orgânicos voláteis; (Do inglês: volatile organic compounds)

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>6</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>11</b>
<i>LPME - Microextração em fase líquida; (Do inglês: Liquid-phase microextraction)</i> .....	13
<i>ME - Microextração</i> .....	13
<i>PTFE - Politetrafluoretileno</i> .....	13
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>16</b>
<b>1.0. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME).....	17
1.1.2 MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (LPME).....	18
1.1.3 LÍQUIDOS IÔNICOS.....	20
<b>1.2 IL-LPME NA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE MERCÚRIO</b> .....	<b>22</b>
1.2.1 MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA DE GOTA ÚNICA BASEADA EM LÍQUIDO IÔNICO (IL-SDME).....	22
1.2.2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA DE FIBRA OCA BASEADO EM LÍQUIDO IÔNICO (HF-ILLPME).....	24
1.2.3 MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA BASEADA EM LÍQUIDO IÔNICO (IL-DLLME).....	27
1.2.3.1 <i>IL-DLLME convencional</i> .....	27
1.2.3.2 <i>IL-DLLME com temperatura controlada e LI aplicado a extração no ponto nuvem</i> .....	29
1.2.3.3 <i>IL-DLLME assistida por vortex, ultrassom ou micro-ondas</i> .....	30
1.2.3.4 <i>IL-DLLME in situ</i> .....	34
<b>1.3 IL-SPME NA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE MERCÚRIO</b> .....	<b>38</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>42</b>
<b>2.0. OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
<b>2.1. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>43</b>
2.1.1. MATERIAIS UTILIZADOS.....	43
2.1.2 REAGENTES.....	44
2.1.3 INSTRUMENTAÇÃO E PREPARO DE SOLUÇÕES.....	44
2.1.3.1 <i>Instrumetação</i> .....	44
2.1.3.2 <i>Preparo da solução de APDC 0,1% (m/v)</i> .....	45
2.1.3.3 <i>Preparo das soluções tampão</i> .....	45
2.1.3.4 <i>Preparo da solução de SnCl<sub>2</sub> 5% (m/v)</i> .....	45
2.1.3.5 <i>Digestão da amostra certificada</i> .....	46
2.1.3.6 <i>Digestão da amostra real</i> .....	46
<b>2.2. MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO BASEADA EM LÍQUIDO IÔNICO E CONTROLE DE TEMPERATURA ASSISTIDA POR VORTEX PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM ÓLEO DE PEIXE</b> .....	<b>46</b>
<b>2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
2.3.1. INFLUÊNCIA DO PH.....	48
2.3.2. EFEITO DO VOLUME DE REAGENTE COMPLEXANTE APDC.....	49
2.3.3. INFLUÊNCIA DO VOLUME DE LÍQUIDO IÔNICO.....	50
2.3.4. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE AGITAÇÃO EM VORTEX.....	52

2.3.5	EFEITO DA TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO .....	53
2.3.6.	INFLUÊNCIA DO DILUENTE .....	54
2.3.7.	INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE AGENTE REDUTOR .....	55
2.3.8.	INFLUÊNCIA DO VOLUME DO SEPARADOR GÁS/LÍQUIDO .....	56
2.3.9.	EFEITO DO TEMPO DE REAÇÃO PARA GERAÇÃO DE VAPOR QUÍMICO .....	57
2.3.10	EFEITO DA VAZÃO DO GÁS DE ARRASTE .....	58
2.3.11	RESUMO DAS CONDIÇÕES APÓS OTIMIZAÇÃO .....	59
<b>2.4.</b>	<b>VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....</b>	<b>59</b>
2.4.1.	SELETIVIDADE .....	60
2.4.2	LINEARIDADE .....	61
2.4.3	LIMITE DE DETECÇÃO.....	62
2.4.4	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	62
2.4.5.	FATOR DE ENRIQUECIMENTO .....	62
2.4.6	ÍNDICE DE CONSUMO .....	62
2.4.7	EXATIDÃO.....	63
2.4.8	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS.....	63
<b>2.5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>65</b>	
<b>3.0. OBJETIVOS.....</b>	<b>66</b>	
<b>3.1. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>66</b>	
3.1.1	MATERIAIS UTILIZADOS .....	66
3.1.2	REAGENTES .....	67
3.1.3	INSTUMENTAÇÃO E PREPARO DE SOLUÇÕES.....	67
3.1.3.1	<i>Instrumentação.....</i>	67
3.1.3.2	<i>Preparo da solução de APDC 0,1% (m/v).....</i>	68
3.1.3.3	<i>Preparo das soluções tampão.....</i>	68
3.1.3.4	<i>Solução tampão cloreto (pH 1,0 - 3,0).....</i>	68
3.1.3.5	<i>Solução tampão acetato de sódio (pH 4,0 - 5,0).....</i>	68
3.1.3.6	<i>Preparo da solução de SnCl<sub>2</sub> 5% (m/v).....</i>	68
3.1.3.7	<i>Digestão da amostra certificada.....</i>	69
3.1.3.8	<i>Digestão da amostra real.....</i>	69
<b>3.2. MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COM SOLIDIFICAÇÃO DA GOTA ORGÂNICA FLUTUANTE (DLLME-SFOD) PARA EXTRAÇÃO DE MERCÚRIO EM FRUTOS DO MAR .....</b>	<b>70</b>	
<b>3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>	
3.3.1.	OTIMIZAÇÃO UNIVARIADA.....	71
3.3.1.1.	<i>Influência da agitação magnética após procedimento de microextração dispersiva .....</i>	71
3.3.1.2.	<i>Efeito do tipo de diluente.....</i>	72
3.3.2.	OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA.....	72
<b>3.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....</b>	<b>77</b>	
3.4.1	ESTUDO DE INTERFERENTES.....	77
3.4.2	EXATIDÃO.....	78
3.4.3.	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS.....	78
<b>3.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>79</b>	
<b>4.0 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>	

# Capítulo 1



## 1.0. INTRODUÇÃO

Dentro do conceito de Química Verde, na qual busca-se evitar o uso de substâncias nocivas, o desenvolvimento de processos que minimizem a quantidade de resíduos que são gerados em procedimentos químicos e a substituição de solventes que emitem compostos orgânicos voláteis (VOC's), tem recebido grande destaque nos últimos anos com a finalidade de reduzir o impacto sobre o meio ambiente e a exposição humana a substâncias perigosas [1-3]. Uma das maneiras que os pesquisadores, em Química Analítica, encontraram, foi a miniaturização das técnicas de extração/separação [4-6]. Técnicas miniaturizadas possuem como principais vantagens a grande diminuição e/ou não utilização de solventes orgânicos voláteis, facilidade de operação, pequenas quantidades de amostras necessárias, possibilidade de automação, relativo baixo custo e o não comprometimento da análise química, uma vez que o preparo da amostra também inclui a sua compatibilização com a técnica analítica que fornecerá os dados químicos [7-12]. A noção de miniaturização em extração foi introduzida e colocada em prática em 1990 por Pawliszyn e Arthur [13]. Nos dias atuais, o termo microextração (ME) é normalmente utilizado para denominar metodologias que utilizam pequenos volumes de solventes (até 0,1 mL), ou quando se utilizam pequenas massas de algum adsorvente (até 5 mg), apesar de alguns trabalhos relatarem o uso de 10 mg, para a extração de analitos ou espécies interferentes em amostras líquidas ou gasosas, também de volume reduzido (normalmente de 5-10 mL). Desta maneira, de acordo com o estado físico do extrator, os métodos de ME são divididos em microextração em fase sólida (SPME) e microextração em fase líquida (LPME).

### 1.1. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

Oriunda da extração em fase sólida (SPE), na técnica de microextração em fase sólida, o processo de extração e pré-concentração baseia-se na partição dos analitos entre a fase extratora e a matriz [14, 15]. Após a imersão direta da fase sólida na solução amostra (extração direta) ou exposição a uma fase de vapor acima da solução (extração indireta) "*headspace*", inicia-se um processo de transferência de massa até que um estado de equilíbrio seja

estabelecido [16]. Desta forma, a quantidade de analito extraída será proporcional a afinidade do analito pela fase extratora em relação à matriz. A SPME possui como principais vantagens a eliminação no uso de solventes tais como são necessários em outros processos, redução no tempo de extração, grande possibilidade de automatização e a capacidade em proporcionar bons resultados para uma ampla faixa de concentração dos mais diversos tipos de analitos. A SPME está em pleno avanço, contínuo desenvolvimento e consolidação quanto os seus modos de aplicação.

Uma nova abordagem desta técnica, denominada por microextração em fase sólida dispersiva (D- $\mu$ -SPE) vem sendo empregada na extração e pré-concentração de analitos orgânicos e inorgânicos [17, 18]. O princípio da técnica consiste na dispersão de alguns microgramas da fase sólida na solução de amostra e a separação por centrifugação promovendo a interação imediata dos analitos com a fase sólida [19, 20]. É considerado um método simples, econômico e fácil de executar, pois essa abordagem permite uma interação rápida e uniforme do sorvente com os analitos de interesse e, portanto, encurta o tempo de preparo da amostra em comparação com uma SPE clássica. A cinética da transferência de massa entre a fase doadora e a fase extratora ainda pode ser auxiliada por fontes externas de energia, tais como o ultrassom [18], diminuindo o tempo de extração e aumentando a eficiência da técnica.

### 1.1.2 MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (LPME)

A microextração líquido-líquido é derivada do consolidado procedimento de extração líquido-líquido (LLE) convencional. Porém, este procedimento de pré-tratamento de amostras miniaturizados requer apenas alguns microlitros de solvente para extrair/pré-concentrar diferentes tipos de analitos nos mais variados tipos de matrizes. Também apresentam como vantagens, a simplicidade de operação, rapidez, não possuem custo elevado, alta recuperação e alto fator de enriquecimento e não possuem muitos problemas quanto a transferência de massa do analito [7, 12, 21-23].

Após o seu surgimento, a LPME obteve grande destaque na comunidade científica e atualmente pode ser dividido em três classes principais: microextração em fase líquida de gota única (SD-LPME) [11],

microextração em fase líquida de fibra oca (HF-LPME) [24] e a mais recente microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) [25].

A técnica de extração SD-LPME tem como princípio a extração do analito de interesse, presente em uma fase doadora (líquida ou gasosa), para uma gota formada por um solvente extrator. A gota extratora é geralmente formada por uma seringa ou tubo de PTFE. Quando a gota é formada e mantida dentro de uma fase doadora aquosa, é denominada por microextração em fase líquida por imersão direta (DI-SDME). Se a gota extratora é suspensa acima da solução da amostra para extrair analitos voláteis e semi-voláteis a técnica é denominada por microextração com gota suspensa “headspace” (HS-SDME). Uma nova modalidade baseada no princípio da microextração em fase líquida de gota única é a microextração com gota orgânica solidificada (SFODME). Neste método de pré-concentração um solvente orgânico com um ponto de fusão próximo à temperatura ambiente é utilizado como solvente extrator. Após o solvente ser adicionado à solução aquosa e a extração ser finalizada, um banho de gelo é empregado para o solvente orgânico ser solidificado. Desta maneira, é facilmente removido e, após fundir-se à temperatura ambiente, a fase rica é utilizada para determinação dos analitos.

A HF-LPME é baseada na imobilização de uma fase extratora nos poros de uma membrana oca porosa e o preenchimento com alguns microlitros de uma solução receptora (aquosa ou orgânica) do interior da membrana. A membrana preenchida é, então, inserida numa fase doadora (solução de amostra). Dessa forma, os analitos são extraídos para a fase extratora e migram para a solução receptora. A fase enriquecida é então recolhida com o auxílio de uma microseringa e levada para detecção. Como a fase doadora não entra em contato direto com a fase receptora, a técnica permite aplicação de agitação constante durante a extração, diferente da SD-LPME.

Por fim, a DLLME tem como fundamento a formação de um sistema ternário de solventes. O sistema é obtido pela injeção rápida de uma mistura composta por um solvente extrator (imiscível em água) e solvente dispersor (miscível em água e no solvente extrator) na fase aquosa contendo o analito. A microextração é então baseada na dispersão do solvente extrator em pequenas gotículas, com grande área superficial, promovendo uma eficiente extração das espécies de interesse.

Como resultado desta nova tendência, atualmente existem diversas modificações e, conseqüentemente, tem surgido diferentes abordagens de métodos de LPME derivados das três classes principais [26-32].

### 1.1.3 LÍQUIDOS IÔNICOS

Relatado como um novo solvente químico verde, surgem os líquidos iônicos (LIs). Definidos como uma classe de sais orgânicos, esses compostos iônicos possuem ponto de fusão inferior a 100°C. As estruturas químicas dessas substâncias, geralmente, são formadas por diferentes tipos de ânions orgânicos e inorgânicos, combinados com cátions orgânicos. Essa característica confere uma imensa possibilidade de combinações e conseqüentemente uma enorme variedade de líquidos iônicos que podem ser produzidos com as mais diferentes propriedades físicas e químicas, razão pela qual o LI ser designado por alguns autores pelo uso do termo “*designer solvents*” [33-35]. Os cátions orgânicos que, comumente, constituem os líquidos iônicos, pertencem as classes ilustradas na Figura 1. Porém, por possuírem características mais favoráveis, tais como maior facilidade de síntese, os líquidos iônicos constituídos por cátions orgânicos do tipo polialquilimidazólio proporcionam maior interesse e, conseqüentemente, são mais largamente estudados pela comunidade científica [36, 37].

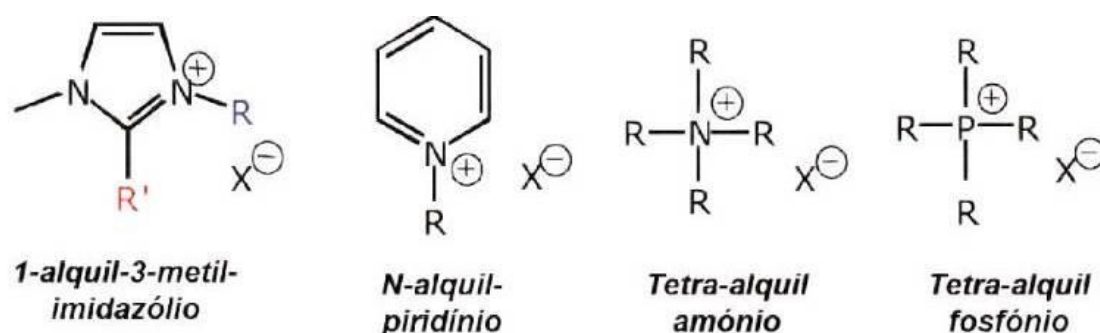


Figura 1. Cátions mais comuns na composição dos líquidos iônicos.

Desta maneira, os líquidos iônicos apresentam diversas vantagens em relação aos solventes convencionais. Algumas das principais vantagens são a quase inexistente pressão de vapor, elevada condutividade iônica, capacidade

de solubilizar compostos orgânicos, inorgânicos e polímeros, estabilidade térmica e química elevada, possibilidade de uso em vácuo, alternativa aos solventes orgânicos prejudiciais ao meio ambiente, e, principalmente, pela possibilidade de ser “criado e/ou modulado” de acordo com a combinação adequada do cátion e do ânion, conferindo uma nova substância com propriedades, como viscosidade, densidade, solubilidade, entre outras, otimizadas, para desempenhar o papel desejado no processo [38, 39]. Esses fatos tornam os líquidos iônicos uma promissora alternativa em substituição aos solventes orgânicos convencionais. Sua aplicação vem sendo desenvolvida nas mais variadas áreas de pesquisas, como a farmacêutica, biotecnologia, eletroquímica, síntese orgânica, energia e combustíveis e a química analítica. A utilização dos LI na química analítica, nos últimos anos, tornou-se bastante promissora devido sua eficiência em métodos de extração e separação [38-42].

Devido as suas atraentes propriedades, que conferem um aumento na seletividade, sensibilidade e eficiência na extração de uma vasta gama de analitos, tem ganhado destaque em técnicas miniaturizadas utilizadas no preparo de amostra, tais como os diferentes tipos de microextração líquido-líquido [43-45]. Esse destaque deve-se aos relatos de aplicações de líquidos iônicos em procedimentos compatíveis com diferentes técnicas analíticas, como a cromatografia gasosa (CG) [46], cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [47], espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) [48], espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) [49], espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) [50], espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [51], e a espectrofotometria de absorção molecular UV/VIS [52].

Além das características extraordinárias citadas acima, devido a capacidade de síntese a partir de um grande número de cátions e ânions, os líquidos iônicos já possuem uma nova tendência: a formulação dos líquidos iônicos de tarefa específica (TSILs). Essa nova geração de LI é baseada na junção de um grupo funcional, seletivo a um determinado analito, ao cátion ou ânion do LI. Esta nova característica tem gerado grande interesse entre pesquisadores de uma grande variedade de áreas, e alguns TSILs vem sendo

explorados principalmente em microextração como solventes de extração para a determinação de mercúrio [53, 54].

## 1.2 IL-LPME NA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE MERCÚRIO

A microextração líquido-líquido com líquidos iônicos como solventes extratores pode ser realizada sob diferentes modos de extração, assim como a microextração líquido-líquido convencional (Figura 2).

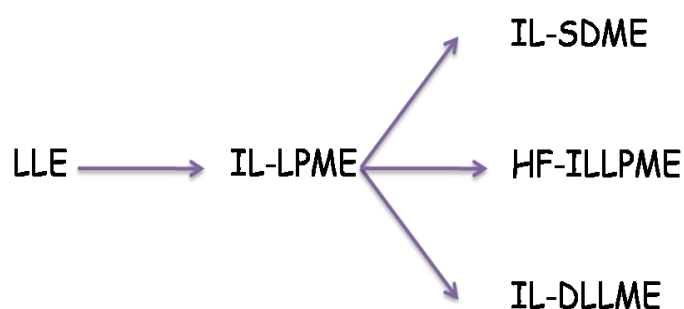


Figura 2. Métodos derivados da microextração líquido-líquido convencional.

O uso de LIs nas diferentes abordagens da LPME, para o tratamento de amostras, vem sendo desenvolvidos.

### 1.2.1 Microextração em fase líquida de gota única baseada em líquido iônico (IL-SDME)

Um procedimento rápido, com quantidade mínima de extrator, baseado em IL-SDME com imersão direta foi desenvolvido para a separação e pré-concentração de espécies orgânicas de mercúrio, tais como o  $\text{MeHg}^+$ ,  $\text{EtHg}^+$ ,  $\text{PhHg}^+$  e a espécie inorgânica  $\text{Hg}^{2+}$ , e aplicado com sucesso em amostras de águas [55]. A especiação foi realizada utilizando-se uma pequena quantidade do líquido iônico hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio,  $[\text{C6MIM}][\text{PF6}]$ , para a formação da microgota para a qual os analitos foram extraídos, após complexação com ditizona. A separação das substâncias presentes na microgota foi feita por um cromatógrafo líquido de alta eficiência. Para eliminar

e/ou impedir a interferência por outros possíveis íons metálicos, empregou-se EDTA junto a fase móvel.

Outra metodologia, derivada da microextração de gota única, empregou a microextração por gota única headspace e fez o uso de líquido iônico para a extração e pré-concentração de espécies de mercúrio a nível de traço [56]. Uma ilustração do procedimento utilizado nesse trabalho citado é mostrada na Figura 3. Deu-se início ao procedimento analítico com a geração de vapor frio (CV) *in situ* proporcionado pela redução do  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{Hg}^0$  e oxidação dos organomercúrios. O vapor de mercúrio gerado foi, então, extraído para a gota de LI situada acima da solução de amostra. O teor de Hg encontrado em amostras de água do mar, tecidos de peixe, cabelo e vinho foi determinado por GF AAS.

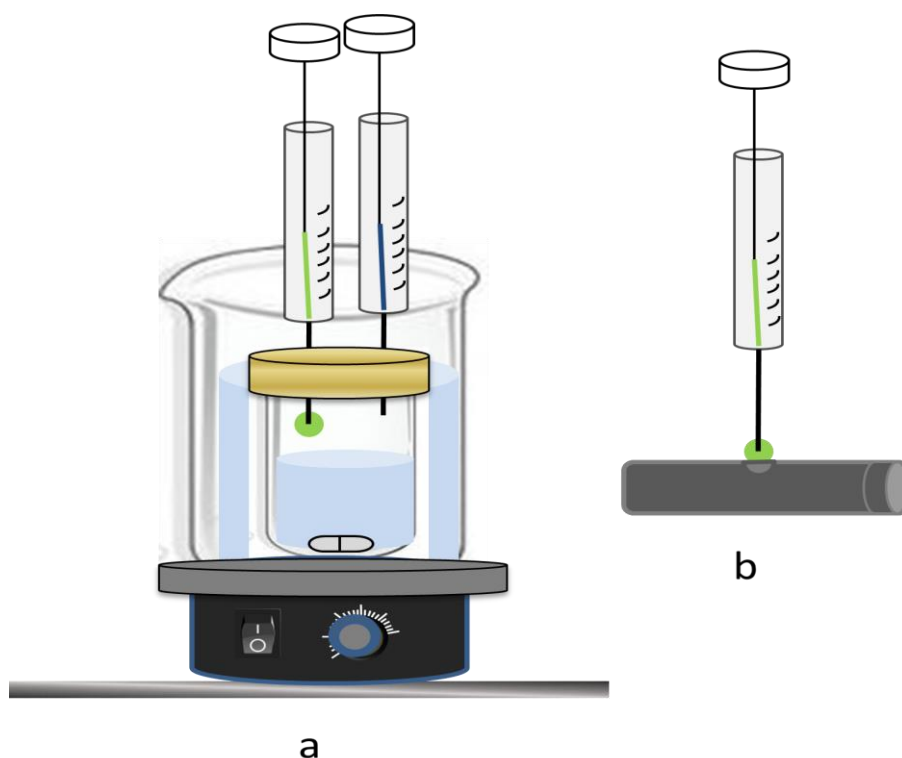


Figura 3. Procedimento experimental esquemático adotado. Geração de vapor (a). Etapa de extração do vapor de mercúrio (b). Introdução da micro gota de LI enriquecida com mercúrio em tubo de grafite para posterior análise em ETAAS (c). Ilustração adaptada da referência 56.

### 1.2.2 Microextração em fase líquida de fibra oca baseado em líquido iônico (HF-ILLPME)

Devido as características peculiares dos líquidos iônicos, o emprego dos mesmos em técnicas analíticas de baixa sensibilidade, como a espectrofotometria de absorção molecular UV-VIS, mostra-se bastante satisfatório. Foi proposto um método de HF-LPME combinado com espectrofotometria UV-Vis para a determinação de Hg [57]. Segundo os autores, o líquido iônico ([C6MIM][PF6]) foi adicionado à solução de amostra que continha mercúrio e reagente complexante. A extração foi realizada mantendo a peça de fibra oca completamente imersa e sob agitação magnética na solução do analito. Posteriormente, alguns microlitros do extraído foi diluído com etanol e adicionado a uma cubeta de quartzo e levado para detecção. O desempenho analítico da determinação espectrofotométrica foi melhorado significativamente com o uso dessa metodologia para aplicação em matrizes de águas fluviais e industriais. O método proposto oferece muitas vantagens, dentre as quais os autores destacam: simplicidade, alta sensibilidade, ampla praticidade e pouco desperdício.

Em outra pesquisa, o líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [C4MIM][PF6] foi empregado como solvente extrator e ditizona como líquido de membrana para pré-concentração de monometilmercúrio (MMHg) e mercúrio inorgânico (IHg) em amostras de águas ambientais [58]. Uma ilustração esquemática do procedimento de extração é mostrada na Figura 4. Uma mistura de LI com ditizona foi imobilizada nos poros da membrana de prolipropileno, formando uma membrana líquida suportada, após o interior da fibra oca ser preenchido com 25 µL de solução de L-cisteína (solução receptora). Os analitos foram, então, extraídos da fase doadora (amostra) para a membrana de líquido iônico e em seguida migraram para a fase receptora. Após a extração, a fase receptora foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS).



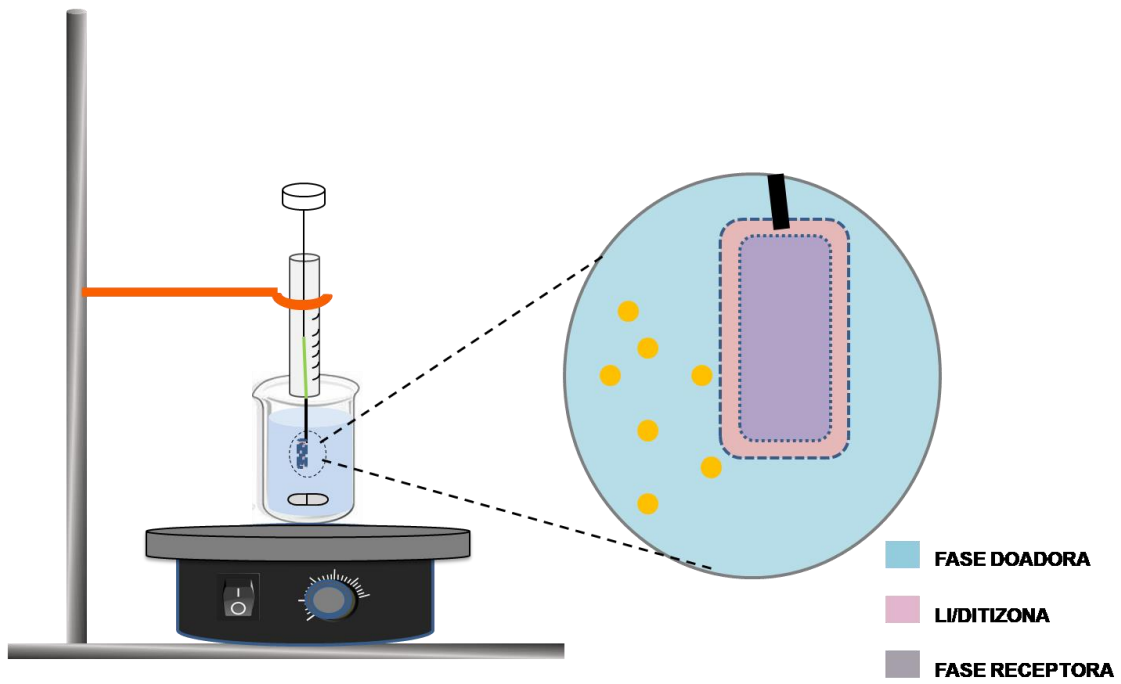


Figura 4. Diagrama expandido do processo de extração empregando HF-ILLPME. Ilustração adaptada da referência 58.

As principais características dos métodos de microextração em fase líquida e gota única, descritos acima, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Características de métodos para determinação de espécies de mercúrio envolvendo IL-SDME e HF-ILLPME.

Espécie	Técnica	Extrator	Complexante	EF	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Deteção	Amostra	Ref
MeHg <sup>+</sup>	IL-SDME	[C6MIM][PF6]	Ditizona	27	1,0	HPLC	Águas	[55]
EtHg <sup>+</sup>				31	1,6			
PhHg <sup>+</sup>				11	7,1			
Hg <sup>+2</sup>				3	22,8			
Hg (total)	CV-ILAHS- SDME	CYPHOS®IL101- KmnO <sub>4</sub>	—	75	0,01	ETAAS	Água do mar Cabelo Tecidos de peixe Vinho	[56]
Hg <sup>+2</sup>	HF-ILLPME	[C6MIM][PF6]	Ditizona	120	0,2	UV/VIS	Águas	[57]
MeHg <sup>+</sup>	HF-ILLPME	[C4MIM][PF6]	Ditizona	1620	0,0003	HPLC-ICP	Águas	[58]
Hg <sup>+2</sup>				1540	0,0009	MS		

EF: fator de enriquecimento; LD: limite de detecção;

### 1.2.3 Microextração líquido-líquido dispersiva baseada em líquido iônico (IL-DLLME)

O método de IL-DLLME pode ser executado de maneiras diferentes. Atualmente, na literatura, já foram introduzidos quatro modos principais para a execução da metodologia com a utilização dos LI. O primeiro modo é a IL-DLLME convencional. O segundo modo é a IL-DLLME com a temperatura controlada. É relatado também a IL-DLLME assistida por ultrassom, micro-ondas ou por vortex e por fim a IL-DLLME in-situ.

#### 1.2.3.1 *IL-DLLME convencional*

A microextração dispersiva baseada em líquido iônico convencional é baseada na mistura ternária de componentes (extrator, complexante e solvente dispersivo), em que o LI será utilizado como solvente extrator em substituição aos solventes orgânicos voláteis convencionais. Os analitos são extraídos para a gotícula de LI e as fases imiscíveis separadas por centrifugação. A mistura é comumente agitada manualmente e não faz-se necessário nenhuma etapa extra, sendo considerado, então, o modo mais simples de IL-DLLME.

Um método baseado na IL-DLLME convencional foi desenvolvido para extração de espécies de mercúrio e arsênio em amostras de sangue humano [59]. No procedimento, foi empregado um micro-ondas equipado com lâmpada UV para decompor mais rapidamente os organomercúrios presentes na solução de amostra, em íons Hg (II). Então, por diferença matemática, o mercúrio orgânico foi quantificado. Para a microextração, uma fase ternária composta por uma mistura dos LI [BMIM][PF<sub>6</sub>] e [BMIM][BF<sub>4</sub>], como extrator, dissulfeto de tetraetilíuram (TETD) como reagente quelante e acetona como solvente dispersivo, foi utilizada. Após a etapa de pré-concentração, foi necessária uma reextração dos analitos com solução ácida, devido a grande viscosidade dos LI's utilizados. O mercúrio total, em nível de traço, foi quantificado por espectrometria de absorção atômica equipado com um módulo para injeção em fluxo com geração de vapor frio (FI-CV AAS). O método desenvolvido mostrou-se preciso e reprodutivo e a vantagem de não possuir um pré-tratamento de amostra complexo.

A utilização do tiosalicilato de tricapril metilamônio ([A336][TS]) como líquido iônico específico (TSIL) foi proposto como solvente de extração em DLLME [53]. O método TSIL-DLLME e determinação por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) foi aplicado na determinação de traços de mercúrio e cádmio na planta *Dracaena Sanderiana* com o intuito de investigar a capacidade de captação desses analitos pela planta próxima a rios contaminados. Destaca-se nesta pesquisa algumas modificações na etapa de pré-concentração. Uma solução metanólica do TSIL (composto por LI e  $\text{CCl}_4$ ) foi responsável pela formação de gotículas muito pequenas de [A336][TS] /  $\text{CCl}_4$  dispersas na solução aquosa, extraíndo eficientemente os analitos. Os autores destacam que a fase sedimentada foi seca em um forno a  $50^\circ\text{C}$ . Posteriormente, o resíduo foi diluído em solução ácida, sonificado, diluído em água destilada e quantificado por ICP OES. O uso do TSIL na etapa de microextração foi otimizado utilizando uma metodologia de superfície de resposta e considerado adequado para extração dos analitos de interesse.

Outra pesquisa empregou ditizona, [C8MIM][PF6] e acetona como reagente complexante, extrator e solvente dispersor, respectivamente, na microextração dispersiva líquido líquido [60]. Como resultado de uma dispersão eficiente, uma solução turva foi observada ao ser adicionado o LI na solução de amostra. O método desenvolvido foi aplicado com sucesso para a especiação de mercúrio em amostras de águas ambientais. Nesse estudo, o uso da IL-DLLME combinada com HPLC acoplado a espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidreto (HG-AFS), possibilitou a pré-concentração, especiação e detecção simultânea de quatro espécies de Hg, o que torna o método bastante atraente.

De maneira semelhante, outros pesquisadores também vêm explorando as potencialidades da técnica de separação HPLC para especiação de diferentes formas mercuradas, unida a eficiência da microextração dispersiva. Em um procedimento com a finalidade de extrair espécies de Hg em amostras líquidas de cosméticos [61], uma mistura de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) com o LI [C6MIM][PF6], em proporção otimizada, foi empregada com sucesso na dispersão e extração dos analitos. O uso do  $\text{CH}_3\text{OH}$  possibilitou a dissolução das finas gotículas, aumentando a superfície de contato do LI com as espécies

investigadas na etapa de pré-tratamento da amostra. Metanol foi novamente empregado para a solubilização da fase sedimentada, com o intuito de diminuir a viscosidade do LI, além da compatibilidade como fase móvel na coluna de separação que foi acoplada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.

A combinação de IL-DLLME com HPLC-DAD também foi empregado em um trabalho que envolveu a determinação de mercúrio (II), metilmercúrio e fenilmercúrio em água de torneira, água do rio e de lago [62]. O uso do líquido iônico na microextração tornou o método altamente eficiente e apesar da necessidade de solubilização da fase sedimentada com metanol, possibilitou um grande aumento na sensibilidade da técnica de detecção.

Um método de pré-concentração envolvendo microextração dispersiva líquido-líquido convencional baseada em líquido iônico utilizada em conjunto com a espectrometria de absorção molecular UV/Vis foi relatado pela primeira vez [52]. Neste estudo, além da fase ternária, o surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) foi empregado como agente antiaderente, impedindo que o LI ficasse retido nas paredes do tubo de centrifuga. Os autores ilustraram o efeito do SDS como o agente antiaderente no artigo. O LI enriquecido com  $Hg^{2+}$  foi diluído com etanol e a absorvância foi medida à 575 nm. O artigo destaca a simplicidade da metodologia e o uso de um sistema de detecção de relativo baixo custo comparado com outras técnicas de detecção, como FAAS e ICP OES.

#### *1.2.3.2 IL-DLLME com temperatura controlada e LI aplicado a extração no ponto nuvem*

Foi empregada a DLLME com temperatura controlada baseada no líquido iônico [C8MIM][PF<sub>6</sub>], para pré-concentração de mercúrio. Nesse trabalho, foi proposta a reciclagem do LI [63]. Após a etapa de microextração, o  $Hg^{2+}$  extraído no LI foi reduzido a  $Hg^0$  com ácido fórmico e analisado por CV-AFS. Depois da quantificação do analito, o tubo de ensaio foi levado para centrifugação e o LI reaproveitado. O procedimento analítico proposto neste trabalho requereu 2 horas de agitação à 50 °C, porém os autores destacam que o método foi aplicado com sucesso na remoção de mercúrio e é uma

estratégia rentável e ambientalmente amigável, uma vez que o LI pode ser reutilizado, reduzindo drasticamente a quantidade de resíduos.

No ano de 2008, uma pesquisa desenvolveu um novo procedimento de microextração utilizando líquido iônico. O método baseado no princípio da extração em ponto nuvem, foi denominado por microextração de agregação induzida pelo frio (CIAME) [64]. Neste método, uma mistura contendo dois tipos de LÍ's foi utilizada como solvente extrator e Triton X-114 como agente antiaderente. O procedimento de extração é baseado em aquecimento, agitação e resfriamento. Finalmente, a fase de LI enriquecida foi dissolvida em solução de etanol e transferida para uma célula de quartzo. A absorvância foi medida a 570 nm em espectrometria de absorção molecular UV/Vis. O método foi aplicado para a quantificação de mercúrio em amostras de águas.

#### 1.2.3.3 *IL-DLLME assistida por vortex, ultrassom ou micro-ondas*

A microextração líquido-líquido dispersiva baseada em líquido iônico assistida por ultrassom, micro-ondas, vortex ou qualquer outra fonte de energia externa facilita a mistura das fases imiscíveis e, conseqüentemente, a dispersão do líquido iônico na solução aquosa, favorecendo a formação de microgotículas mais eficientes para a extração do analito. Neste processo, pode ocorrer o aumento da temperatura no tubo de extração, devido a vigorosa agitação, proporcionando também maior eficiência ao método.

Um trabalho propôs a utilização da IL-DLLME assistida por vortex para a determinação de mercúrio em amostras de urina não digeridas [31]. Um tubo de ensaio contendo a amostra, o reagente pirrolidina ditiocarbamato de amônio (APDC) e LI insolúvel na fase aquosa foi submetido a vigorosa agitação em vortex. Subseqüentemente, as fases foram separadas por centrifugação. Após o enriquecimento do LI com o analito a partir da microextração, foi necessário uma reextração do analito para uma solução ácida para que, então, o mercúrio fosse analisado por voltametria de onda quadrada de redissolução anódica (SWASV) utilizando eletrodo impresso de carbono modificado com nanopartículas de ouro (SPCnAuEs) como transdutores eletroquímicos para

determinação de mercúrio. Uma representação esquemática do procedimento adotado é ilustrada na Figura 5.

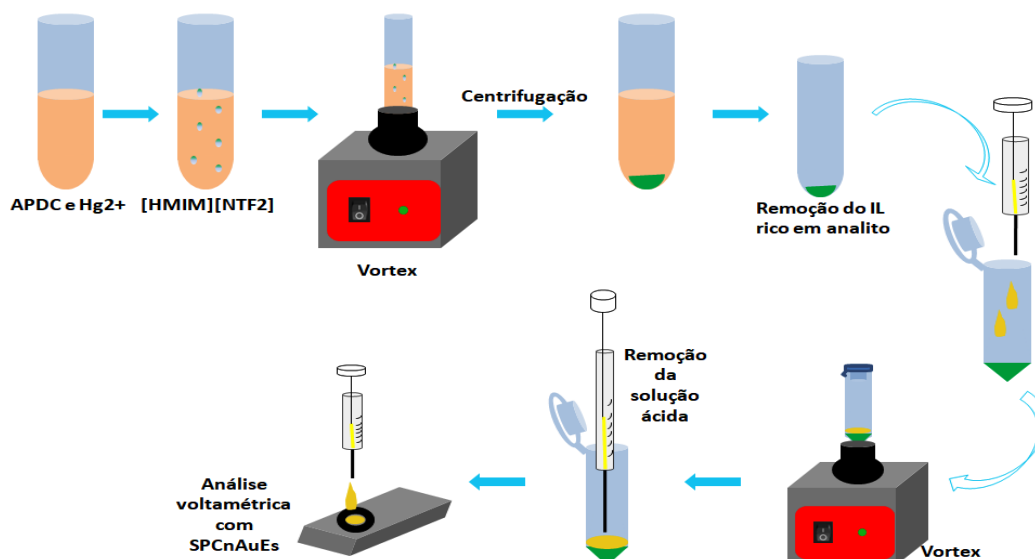


Figura 5. Etapas envolvidas no procedimento experimental por IL-DLLME assistida por vortex para a determinação de mercúrio em amostras de urina não digeridas. Ilustração adaptada da referência 31.

Segundo os responsáveis por essa nova abordagem, uma grande vantagem dessa metodologia, além da utilização da matriz sem tratamento prévio para a IL-DLLME, é a utilização do SPCnAuEs explorando as propriedades do ouro como um material de alta afinidade para o mercúrio.

Outra proposta, empregando a IL-DLLME assistida por vortex, combinou suas vantagens com a utilização de nanofluidos de zinco para desenvolver o método que foi denominado por microextração líquido-líquido assistido por vortex à base de nanofluidos de zinco (ZnO-NF VA-LLME) e foi empregado na extração de mercúrio inorgânico (Hg<sup>2+</sup>) em amostras aquosas [65], (Figura 6).

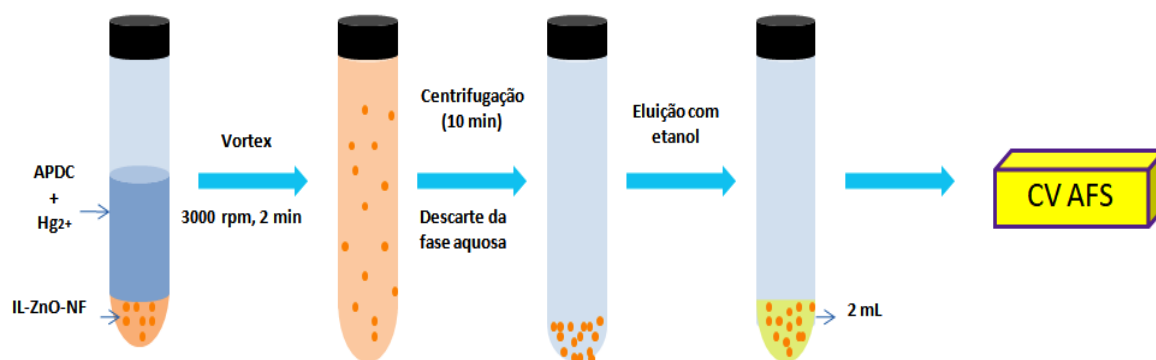


Figura 6: Diagrama esquemático do método de microextração líquido-líquido assistido por vortex à base de nanofluidos de zinco (ZnO-NF VA-LLME). Ilustração adaptada da referência 65.

De acordo com os autores, os nanofluidos de zinco foram preparados, caracterizados e dispersos no LI [C6MIM][PF6] e utilizados como solvente de extração do complexo Hg-APDC. Após agitação vigorosa em vortex, centrifugação e diluição em etanol, a espécie de Hg foi determinada diretamente por espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV AFS). Os autores destacam que as características mais importantes do sistema são: ausência de solvente dispersivo adicional, simplicidade, rapidez, eficácia, baixo consumo de amostra e ambientalmente correta.

Outro sistema, também assistido por vortex, foi desenvolvido para a especiação e pré-concentração de mercúrio em matrizes de sedimentos [66]. Os autores realizaram o processo de microextração em duas etapas. A primeira etapa do procedimento é baseada na formação do complexo de ditizona com o analito, após vigorosa agitação em vortex. Uma fina suspensão é formada e separada por centrifugação da fase aquosa. Na segunda etapa, o LI [C6MIM][PF6] é adicionado a fase aquosa e minúsculas gotículas são formadas extraíndo eficientemente o analito complexado, após ser submetido novamente a intensa agitação. Para análise em cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (HPLC-CV AFS), o LI enriquecido foi diluído com metanol. O uso do vortex em duas etapas tornou o método mais sensível, devido o maior contato entre as fases líquidas e, conseqüentemente, maior transferência de massa, aumentando a eficiência da microextração.



Outro estudo [67], também trouxe sua contribuição utilizando a IL-DLLME como procedimento na avaliação do nível de exposição ao mercúrio por trabalhadores em uma indústria petroquímica no Irã. Os pesquisadores compararam os resultados dos sujeitos expostos e não expostos a esse ambiente de trabalho. Uma reextração do analito extraído no líquido iônico foi realizada com ácido nítrico, e o teor de Hg em amostras de sangue e urina foi quantificado por CV AAS.

Um sistema em linha com análise por injeção em fluxo combinado com espectrometria de absorção atômica com vapor frio (FI-CV AAS) (Figura 7) foi desenvolvido para dosagem de mercúrio em águas naturais após IL-DLLME [68]. Neste trabalho, os autores destacam o uso do vortex tanto para auxiliar no enriquecimento do LI, quanto para reextrair o analito em solução acidificada. Combinações deste tipo tornam o método bastante eficiente.

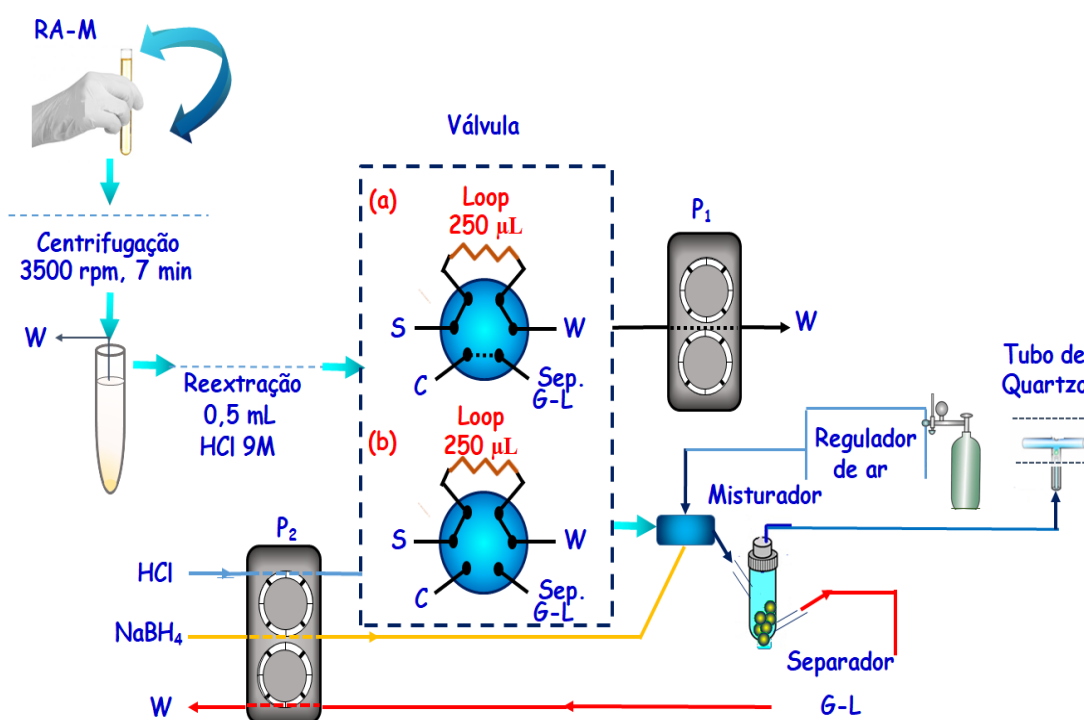


Figura 7. Diagrama do sistema em linha com análise por injeção em fluxo combinado com espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (FI-CV AAS). Ilustração adaptada da referência 68.

Um método empregando um líquido iônico específico (TSIL) como extrator foi desenvolvido para a determinação de espécies de mercúrio em águas [54]. Uma sonda ultrassônica de titânio foi empregada para dispersar o líquido iônico tiosalicilato de metiltriocetilamônio, para extração dos analitos nas

gotículas. Posteriormente, a fase enriquecida foi dissolvida em etanol e o teor de mercúrio foi medido por CV AAS. O uso da sonda ultrassônica eliminou a necessidade de qualquer solvente dispersor, o que torna o método bastante viável.

#### 1.2.3.4. IL-DLLME *in situ*

De maneira geral, a microextração dispersiva baseada em líquido iônico *in situ* baseia-se na reação de metátese entre um LI hidrofílico e um reagente de permuta iônica. Dessa maneira, o LI torna-se hidrofóbico e extrai os analitos contidos na solução aquosa. A reação e o processo de extração, em condições ideais, acontecem em um tempo curto e apresenta alta eficiência de extração.

No ano de 2009, foi apresentado a primeira descrição do método de IL-DLLME *in situ* [69], com o objetivo de determinar Hg (II) em soluções salinas. Neste sistema, Hg (II) foi complexado com 4,4'-Bis-dimetilamino-benzofenona (TMK) como agente quelante. Para a reação de metátese, utilizaram hexafluorofosfato de sódio (Na-PF<sub>6</sub>) como reagente de permuta aniônica e [C6MIM][BF<sub>4</sub>] como LI hidrofílico inicial. Uma solução turva composta por minúsculas gotículas do LI [C6MIM][PF<sub>6</sub>] hidrofóbico foi formada e os analitos foram extraídos. Os autores denominaram a técnica de microextração de formação de solvente *in situ* (ISFME) e o relataram como bastante simples, rápido e eficiente na extração de analitos em amostras complexas, tais como águas com concentrações muito altas de sal. De maneira semelhante, uma nova abordagem foi empregada para determinação de mercúrio em amostras de água [70]. O método combinou as vantagens do SPCnAuEs com a IL-DLLME *in situ* e reextração ácida do analito (Figura 8).

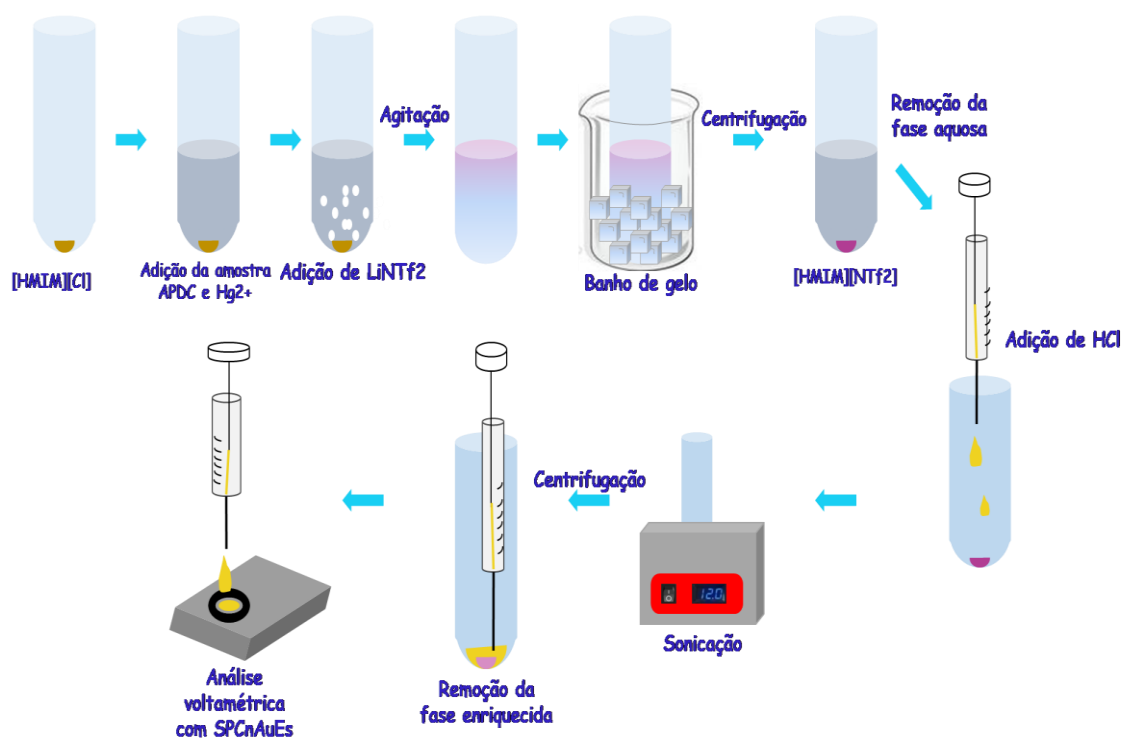


Figura 8. Diagrama esquemático do procedimento de IL-DLLME com formação de solvente *in situ*.

Ilustração adaptada da referência 70.

O mercúrio complexado com APDC foi extraído da solução da amostra para o LI  $[Hmim][NTf_2]$  formado *in situ* a partir da reação de metátese do sal de troca iônica  $LiNTf_2$  com o LI  $[Hmim][Cl]$ . Um banho de ultrassom foi utilizado para auxiliar o procedimento de reextração do mercúrio para uma solução aquosa de  $HCl$ , e posteriormente detectado por voltametria.

Um resumo dos principais parâmetros e reagentes utilizados nos trabalhos descritos nesta seção, encontra-se na Tabela 2. Os baixos limites de detecção e compatibilidade com diferentes tipos de matrizes são algumas das vantagens da utilização de líquidos iônicos na microextração líquido-líquido dispersiva.

Tabela 2. Características de métodos para determinação de espécies de mercúrio envolvendo IL-DLLME.

Espécie	Técnica	Extrator	Dispensor	Complexante	EF	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Deteção	Amostra	Ref
Hg <sup>2+</sup>	IL-DLLME	[BMIM]PF6] / [BMIM][BF4]	Acetona	TETD	6,6	0,03	FI-CV AAS	Sangue humano	[59]
Hg <sup>2+</sup>	TSIL-DLLME	[A336][TS]/CCl4	Metanol	—	—	0,28	ICP AES	Planta	[53]
Hg <sup>2+</sup>						0,031			
MeHg <sup>+</sup>	IL-DLLME	[C8MIM][PF6]	Acetona	Ditizona	25	0,016	HPLC-HG-AFS	Águas	[60]
EtHg <sup>+</sup>						0,024			
PhHg <sup>+</sup>						0,092			
Hg <sup>2+</sup>					760	0,0013			
MeHg <sup>+</sup>	IL-DLLME	[C6MIM][PF6]	Metanol	APDC	115	0,0072	HPLC-ICP MS	Cosméticos	[61]
EtHg <sup>+</sup>					235	0,0054			
Hg <sup>2+</sup>					107	0,32			
MeHg <sup>+</sup>	IL-DLLME	[C6MIM][PF6]	Metanol	Ditizona	114	0,96	HPLC-DAD	Águas	[62]
PhHg <sup>+</sup>					106	1,91			
Hg <sup>2+</sup>	IL-DLLME	[HMIM][NTF <sub>2</sub> ]	Acetona	TMK	18,8	3,9	UV/VIS	Águas	[52]
Hg <sup>2+</sup>	TC-IL-DLLME	[C8MIM][PF6]	—	1-metilimidazol	—	—	CV AFS	Águas	[63]
Hg <sup>2+</sup>	CIAME	[C6MIM][PF6] / [HMIM][NTf <sub>2</sub> ]	Banho termostático	TMK	35	0,3	UV/Vis	Águas	[64]
Hg <sup>2+</sup>	VA-IL-DLLME	[HMIM][NTF <sub>2</sub> ]	Vortex	APDC	20-31	0,5-1,5	SWASV	Urina	[31]

Continua na próxima página

Continuação da Tabela 2

Hg <sup>2+</sup>	VA-IL-DLLME	[C6MIM][PF6]/ ZnO-NF	Vortex	APDC	190	0,019	CV AFS	Águas	[65]
MeHg <sup>+</sup>						0,037			
EtHg <sup>+</sup>	VA-IL-DLLME	[C6MIM][PF6]	Vortex	Ditizona	—	0,061	HPLC-CV AFS	Sedimento	[66]
Hg <sup>2+</sup>						0,042			
OrgHg InHg	VA-IL-DLLME	—	Vortex	APDC	5	0,06	CV AAS	Sangue e urina	[67]
Hg <sup>2+</sup>	VA-IL-DLLME	[C4MIM][PF6]	Vortex	Br-PADAP	36	0,0023	(FI) CV AAS	Águas	[68]
Hg <sup>2+</sup>	TSIL-USA-	TSM	Sonda		310	0,03			
CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup>	DLLME		ultrassônica	—	200	0,40	CV AAS	Águas	[54]
Hg <sup>2+</sup>	DLLME <i>in situ</i>	[C6MIM][PF6]	—	TMK	37	0,7	UV/VIS	Águas salinas	[69]
Hg <sup>2+</sup>	DLLME <i>in situ</i>	[Hmim][NTf <sub>2</sub> ]	—	APDC	25	0,2	Voltametria empregando SPCnAuEs	Águas	[70]

EF: fator de enriquecimento; LD: limite de detecção; CIAME: microextração de agregação induzida pelo frio; TSIL-USA-DLLME: microextração dispersiva baseada em líquido iônico específico assistido por ultrassom ; TSM: tiosalicilato de metiltriocetilamônio; TMK: 4,4'-Bis-dimetilamino-benzofenona; TC-IL-DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva baseada em líquido iônico com temperatura controlada.

### 1.3 IL-SPME NA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE MERCÚRIO

O emprego de fases sólidas baseadas em líquidos iônicos surge com o intuito de expandir a aplicabilidade da microextração em fase sólida. As vantagens do uso de LIs como uma nova alternativa em revestimentos de sorventes devem-se as características física e químicas dessas substâncias promovendo a capacidade de extração de vários analitos. Dessa maneira, sistema miniaturizados contendo sólidos suportados por LIs receberam recentemente atenção como uma tecnologia potencialmente eficaz para a remoção de mercúrio. Algumas características dos métodos para determinação de mercúrio envolvendo IL-SPME, que serão discutidos a seguir, estão listados na Tabela 3.

Pesquisas recentes trazem contribuições acerca da aplicação da IL-SPME na pré-concentração de mercúrio. O líquido iônico específico, tiosalicilato de metiltrioctilamônio ([N1888][TS]) foi utilizado como um revestimento em tubo de PTFE para microextração em fase sólida [71]. Neste procedimento, o tubo utilizado como suporte sólido foi previamente tratado para facilitar a deposição do líquido iônico na superfície do mesmo, uma vez que, a eficiência da impregnação e consequente estabilidade do LI no suporte depende estritamente da superfície. A Figura 9 apresenta uma representação do sistema de TSIL PTFE SPME.

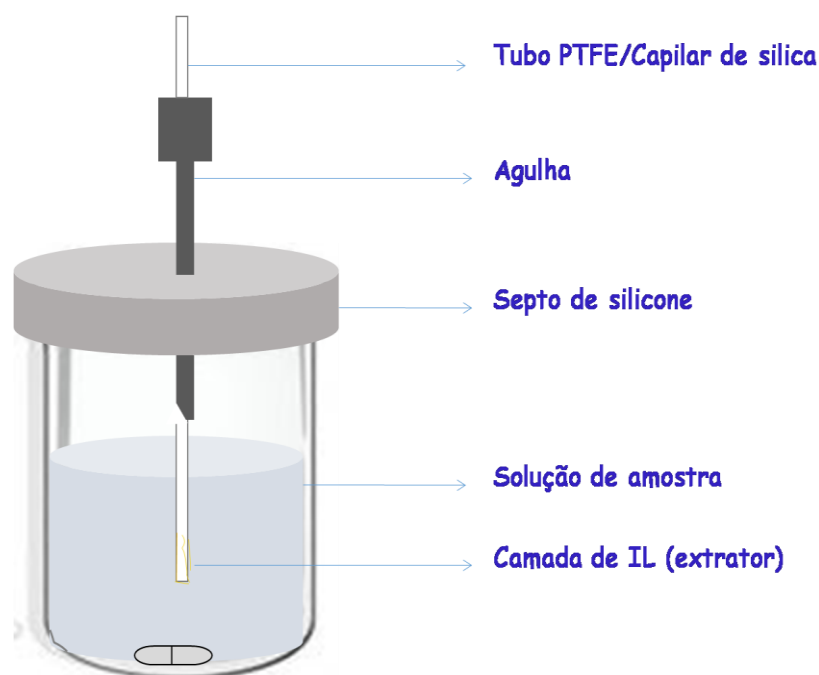


Figura 9. Ilustração esquemática da microextração de mercúrio em fase sólida empregando líquido iônico específico. Ilustração adaptada da referência 71.

Os autores salientam que o dispositivo de extração foi cuidadosamente estudado para que um menor volume do solvente extrator fosse depositado na fibra, a fim de se obter fatores de pré-concentração adequados, sem que houvesse a necessidade da utilização de agentes complexantes. O procedimento utilizando tubo de PTFE revestido com líquido iônico específico para a microextração em fase sólida (TSIL PTFE SPME) combinado com espectrometria de absorção atômica com geração química de vapor frio (CV AAS) e geração de vapor frio induzida por UV (UVCVAAS) foi empregado para quantificar o teor de mercúrio em amostras de solo. A extração foi realizada com a imersão direta da fibra impregnada em um sistema vedado contendo a solução de mercúrio sob agitação magnética. Os pesquisadores relataram que a fase rica em mercúrio foi dissolvida em etanol.

Uma pesquisa recente trouxe a nova técnica de D- $\mu$ -SPE aplicada na extração e pré-concentração de espécies de mercúrio em águas e sangue de caprino. Nesse trabalho, a etapa de pré-tratamento da amostra foi realizada por microextração em fase sólida dispersiva baseada em líquido iônico assistida por ultrassom (US-D-IL- $\mu$ -SPE) [72]. Nessa abordagem, uma mistura do LI, disperso em acetona, com grafeno nanoporoso funcionalizado com grupo

carboxila (NG-COOH) foi injetada na solução amostra. A Figura 10 ilustra o procedimento adotado.

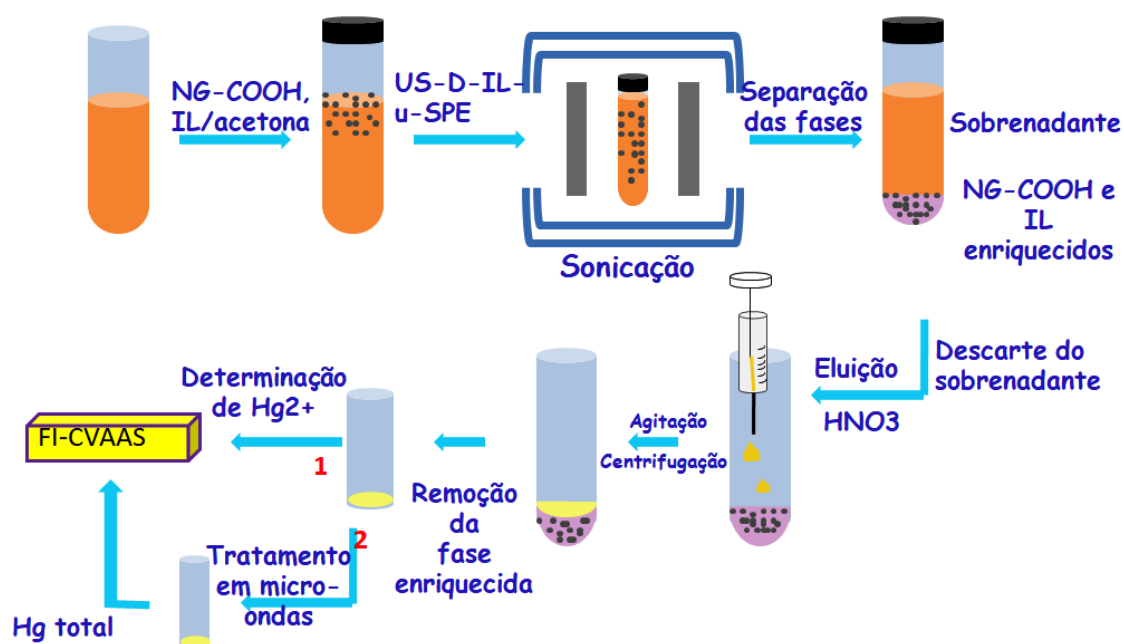


Figura 10. Diagrama ilustrativo das etapas envolvidas na microextração em fase sólida dispersiva baseada em líquido iônico assistida por ultrassom (US-D-IL- $\mu$ -SPE). Ilustração adaptada da referência 72.

O LI foi utilizado como agente de captura do grafeno nanoporoso funcionalizado com grupo carboxila. (NG-COOH / IL) contendo os analitos de interesse facilitando a separação entre as fases sólida e aquosa. Após eluição ácida, os teores das espécies de mercúrio foram quantificados por FI-CV AAS.



Tabela 3. Características de métodos para determinação de mercúrio envolvendo IL-SPME.

<b>Espécie</b>	<b>Técnica</b>	<b>Extrator</b>	<b>Deteção</b>	<b>EF</b>	<b>LD (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Ref</b>
$\text{Hg}^{+2}$	TSIL PTFE SPME	[N1888][TS]	CV AAS	21	0,04	Solo	[71]
			UV CV AAS	—	0,09		
$\text{Hg}^{+2}$ , $\text{MeHg}^{+}$ e $\text{EtHg}^{+}$ convertidos à $\text{Hg}^{+2}$	US-D-IL- $\mu$ -SPE	NG- COOH/[C6MIM][ PF6]	FI-CV AAS	10,2	0,010	Água	[72]
				10,4	0,0098	Sangue caprino	

EF: fator de enriquecimento; LD: limite de deteção;

## Capítulo 2

Microextração líquido-líquido baseada em líquido iônico e controle de temperatura assistida por vortex para determinação de mercúrio em óleo de peixe

## **2.0. Objetivos**

### 2.0.1. Objetivo geral

Desenvolver estratégia analítica miniaturizada baseada em líquido iônico para pré-concentração de mercúrio em suplemento alimentar e determinação por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio.

### 2.0.2. Objetivos específicos

2.0.2.1. Determinar o teor de mercúrio em amostras de óleo de peixe comercializadas por diferentes marcas;

2.0.2.2. Desenvolver método de microextração baseado em líquido iônico para extração de mercúrio;

2.0.2.3. Validar o método analítico desenvolvido obtendo-se os seus parâmetros de mérito;

## **2.1. Parte experimental**

### 2.1.1. Materiais utilizados

- Ultrapurificador de água, Elga - modelo Purelab Classic;
- Balanças analíticas, Shimadzu - modelo AY 220;
- Medidor de pH, Quimis - modelo Q400AS;
- Tubos de silicone de variados diâmetros;
- Tubos capilares de Teflon;
- Bomba peristáltica, Watson Marlow Pumps;
- Agitador magnético, Fisatom, BR;
- Micropipetas (Transferpette Digital - Brand, RB704174, RB704178; Sealpette, ER 33832; Kacil S;
- Ponteiras (Brand, 18170, 18266, 702533);

- Termômetro;
- Vidraria convencional, mantida em solução de HNO<sub>3</sub> a 10% v/v durante a noite para descontaminação. Enxaguadas com água ultra pura;

### 2.1.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico.

- Solução padrão de Hg 1000 µg/mL<sup>-1</sup> (Fluka)
- Ácido nítrico a 65% (m/m) (MERCK);
- Ácido clorídrico a 37% (m/m) (MERCK);
- Etanol a 99% (v/v) (MERCK);
- Cloreto de potássio P. A. (VETEC);
- Cloreto de amônio P. A. (VETEC);
- Hidróxido de amônio P. A. (MERCK);
- Hidróxido de sódio (QUIMEX);
- Borato de sódio (SYNTH);
- Acetato de sódio anidro (SYNTH);
- Ácido acético glacial (MERCK);
- Pirrolidina ditiocarbamato de amônio – APDC (SYNTH);
- Ácido acético (MERCK);
- Cloreto estanoso (SYNTH);
- Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio, [Bmim][PF<sub>6</sub>] (SIGMA);

### 2.1.3 Instrumentação e preparo de soluções

#### 2.1.3.1 Instrumentação

Um sistema de geração de vapor frio baseado em um misseparador gás/líquido foi desenvolvido e acoplado a um espectrômetro de absorção atômica modelo AAnalyst400 Perkin Elmer (Shelton, EUA) equipado com uma cela de quartzo em T, de 18,0 cm de comprimento e diâmetro interno de 0,7 cm.. Uma lâmpada de descarga sem eletrodo (EDL) Perkin Elmer (Shelton, EUA) para mercúrio foi utilizada como fonte de radiação e o sinal analítico foi obtido por meio de um microcomputador equipado com o software WinLab32. Um agitador vortex modelo LabDancer, um banho de aquecimento, um agitador

magnético (Fisatom, BR) e um cilindro de gás de nitrogênio, também foram utilizados. A digestão do material de referência certificado e das amostras reais foi realizada usando uma bomba de digestão ácida Parr (Moline, EUA, modelo 4781).

#### 2.1.3.2 Preparo da solução de APDC 0,1% (m/v)

Em um balão volumétrico de 100 mL foi adicionado 0,1 g do reagente orgânico pirrolidina ditiocarbamato de amônio. Posteriormente, pequenos volumes de etanol P.A foram adicionados ao balão, mantendo-o sobre constante agitação manual. Após total homogeneização, a solução estava pronta para ser utilizada nos experimentos.

#### 2.1.3.3 Preparo das soluções tampão

Foram preparadas diferentes soluções tampão com diferentes valores de pH. Os tampões acetato, amoniacal, cloreto e fosfato, foram preparados com água ultrapura, todos com a concentração final de 1,0 mol/L. A solução tampão borato foi preparada com a concentração final de 0,1 mol/L. As soluções foram preparadas possibilitando o estudo de pH na faixa de 1-10.

#### 2.1.3.4 Preparo da solução de SnCl<sub>2</sub> 5% (m/v)

Foi solubilizado, sob aquecimento, 2,5 gramas de cloreto estano em ácido clorídrico concentrado. A solução foi transferida para um balão volumétrico e aferida para 50 mL. A concentração final de HCl foi de 2,4 mol L<sup>-1</sup> para o preparo da solução de SnCl<sub>2</sub> a 5% (m/v). Uma nova solução era preparada para cada dia de trabalho experimental.

### 2.1.3.5 Digestão da amostra certificada

Amostra certificada de BCR-060, *Lagarosiphon major* (*Aquatic plant*), proveniente do Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Geel, Belgium), foi digerida utilizando a metodologia de abertura de amostra por via úmida. Uma massa de, aproximadamente, 0,1 gramas de amostra foi adicionada a um copo de PTFE juntamente com 1,5 mL de ácido nítrico concentrado e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio. A mistura foi submetida à aquecimento em estufa por um período de 6 h à 110 °C. Após arrefecimento, o pH das amostras foi ajustado com solução diluída de NaOH. Em seguida, adicionou-se solução tampão apropriado e aferiu-se com água ultrapura até o volume final de 25,0 mL.

### 2.1.3.6 Digestão da amostra real

Amostras de cápsulas gelatinosas contendo óleo de peixe rico em ômega 3, vendidos como suplemento alimentar, de diferentes marcas foram adquiridas em farmácias da cidade de Jequié, Bahia, Brasil. Foram pesados, aproximadamente, 0,1 g do óleo de peixe (retirado da cápsula) e transferidos para o copo de uma bomba de digestão ácida. Posteriormente, 0,5 mL de peróxido de hidrogênio e 1,5 mL de ácido nítrico 65% foram adicionados. A armadura da bomba foi fechada e o sistema mantido em uma estufa a 110°C durante 6,0 h. Após o arrefecimento até à temperatura ambiente, o pH do digerido foi ajustado com solução diluída de NaOH. A solução-amostra foi transferida para um balão volumétrico de 25,0 mL, então solução tampão foi adicionada e o volume aferido com água ultrapura. As amostras preparadas por este procedimento foram, então, submetidas ao procedimento de pré-concentração. Brancos de reagentes também foram preparados.

## **2.2. Microextração líquido-líquido baseada em líquido iônico e controle de temperatura assistida por vortex para determinação de mercúrio em óleo de peixe**

O método de pré-concentração desenvolvido e otimizado foi realizado da seguinte maneira: em tubos de ensaio de fundo cônico, foram adicionados 5,0

mL de uma solução de  $\text{Hg}^{2+}$  na concentração  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ , e o pH foi ajustado com adição da solução tampão adequada. Em seguida, foram adicionados, ao tubo de ensaio, volumes ótimos do reagente APDC e do líquido iônico, responsáveis pela complexação Hg-APDC e extração do complexo formado, respectivamente. O tubo de ensaio foi, então, levado para agitação constante em vortex. Em seguida, a mistura foi submetida a banho de aquecimento com temperatura previamente controlada, posteriormente foi resfriada em banho de gelo e levada a centrifugação para que houvesse a separação de fases. O líquido iônico rico em analito foi retirado com o auxílio de uma micropipeta e adicionado ao misseparador gás/líquido e solubilizado em ácido nítrico a 70% (v/v). Posteriormente, o misseparador gás/líquido foi levado para o sistema de introdução de amostra e, em linha, foi adicionado o redutor  $\text{SnCl}_2$  (5%). O minisseparador foi acoplado ao espectrômetro de absorção atômica através de capilares de teflon e tubos de silicone.

Em seguida, um agitador magnético foi empregado para facilitar a mistura e promover maior geração de vapor químico dentro do minisseparador gás/líquido e, por fim, nitrogênio gasoso foi utilizado como o gás de arraste do vapor frio de mercúrio para o espectrômetro de absorção atômica. Desta maneira, o  $\text{Hg}^{2+}$  foi determinado por CV AAS. A Figura 11 ilustra as etapas envolvidas no método proposto.

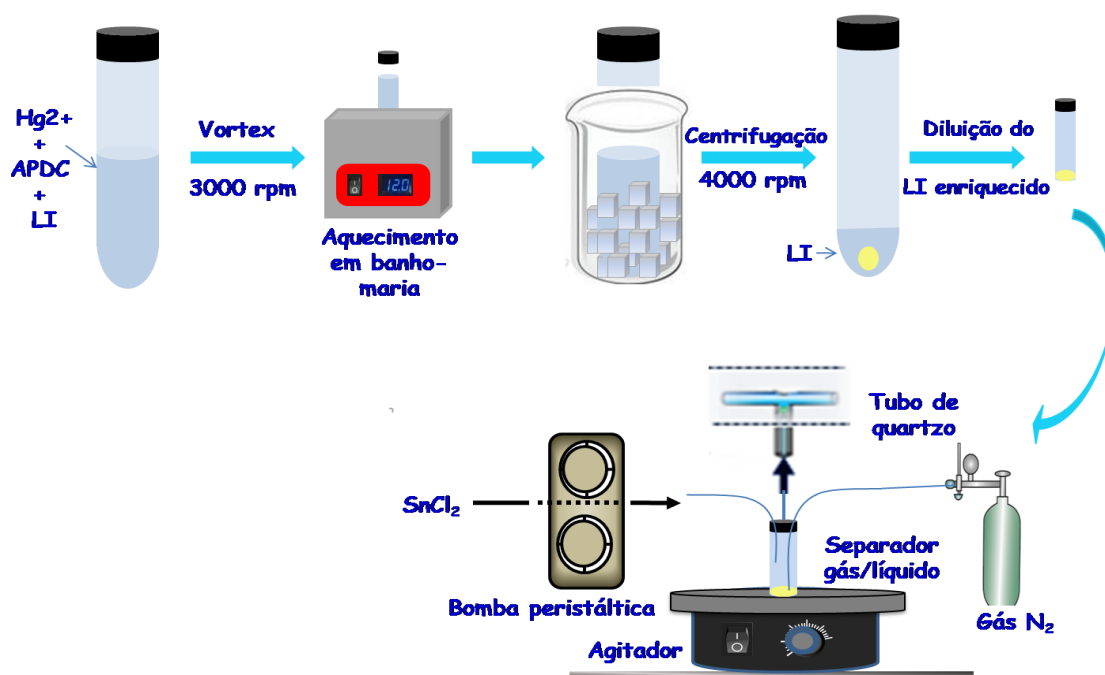


Figura 11. Ilustração esquemática do método de pré-concentração de mercúrio em óleo de peixe.

### 2.3. Resultados e discussão

Foram estudados e otimizados de forma univariada os principais parâmetros que poderiam influenciar a microextração em fase líquida baseada em líquido iônico com temperatura controlada para a determinação de mercúrio. Para todos os estudos, a concentração de mercúrio utilizada foi fixada em  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 2.3.1. Influência do pH

O agente complexante pirrolidina ditiocarbamato de amônio (Figura 12) forma complexos estáveis com uma variedade de cátions metálicos. Entretanto, para que esses complexos sejam formados de uma maneira eficiente e esta estabilidade seja alcançada, o complexo deve possuir uma cinética favorável. Com isso, é muito importante estudar qual a melhor faixa de pH, na qual ocorre a maior formação do complexo, uma vez que a formação do complexo entre o APDC e o cátion de mercúrio é, também, influenciada pelo potencial hidrogeniônico presente no meio.

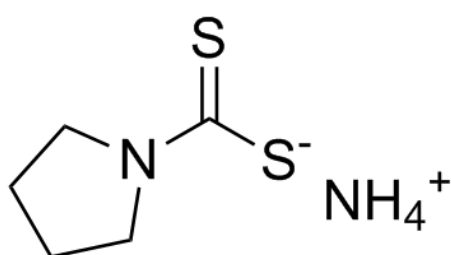


Figura 12: Estrutura do reagente orgânico pirrolidina ditiocarbamato de amônio (APDC) utilizado para a complexação da espécie Hg(II) no sistema de pré-concentração proposto.

Desta maneira, avaliou-se o efeito do pH na eficiência da extração em uma faixa de 1-10. A Figura 13 apresenta a influência do pH na extração e pré-concentração de mercúrio.



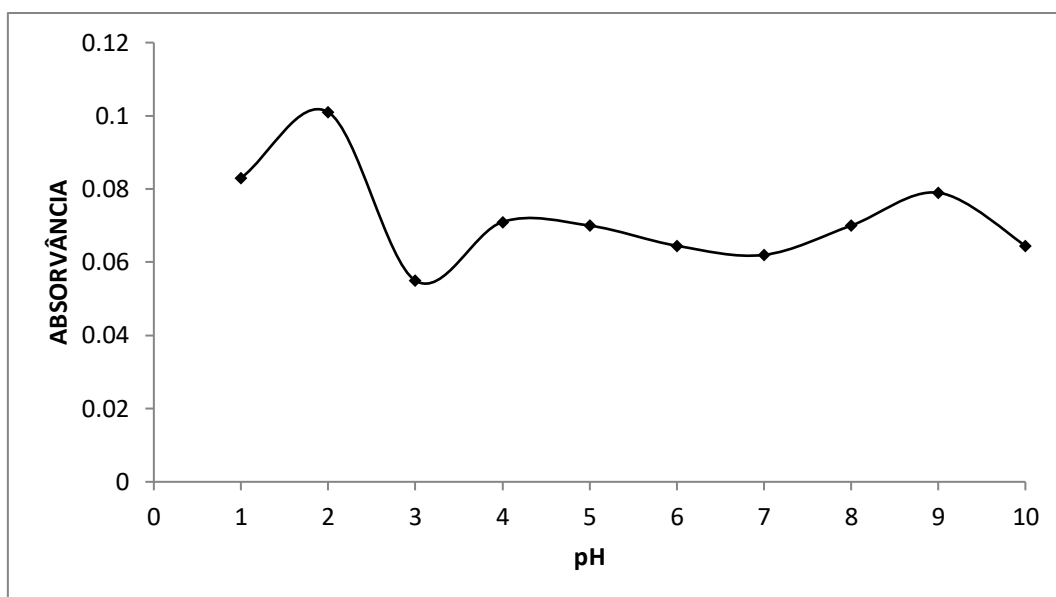


Figura 13: Influência do pH na extração e pré-concentração de mercúrio (II).

Os resultados obtidos evidenciam que o máximo de extração foi obtida em pH 2,0, indicando a formação do complexo e, conseqüentemente, uma grande extração da espécie de interesse em elevada acidez. Pode-se observar, também, que a variação no sinal analítico entre os valores de pH na faixa de 4-10 é bem pequena e evidencia a possibilidade de extração do complexo  $\text{Hg}^{2+}/\text{APDC}$  em uma ampla faixa de pH. Nos experimentos posteriores, uma solução de tampão KCl/HCl 2,0 foi utilizada para ajustar o pH das amostras.

### 2.3.2. Efeito do volume de reagente complexante APDC

O volume da solução 0,1% (m/v) do reagente complexante utilizado na microextração foi estudado. Este parâmetro foi avaliado na faixa de 0, onde nenhum volume de APDC foi adicionado, a 500  $\mu\text{L}$  (Figura 14).

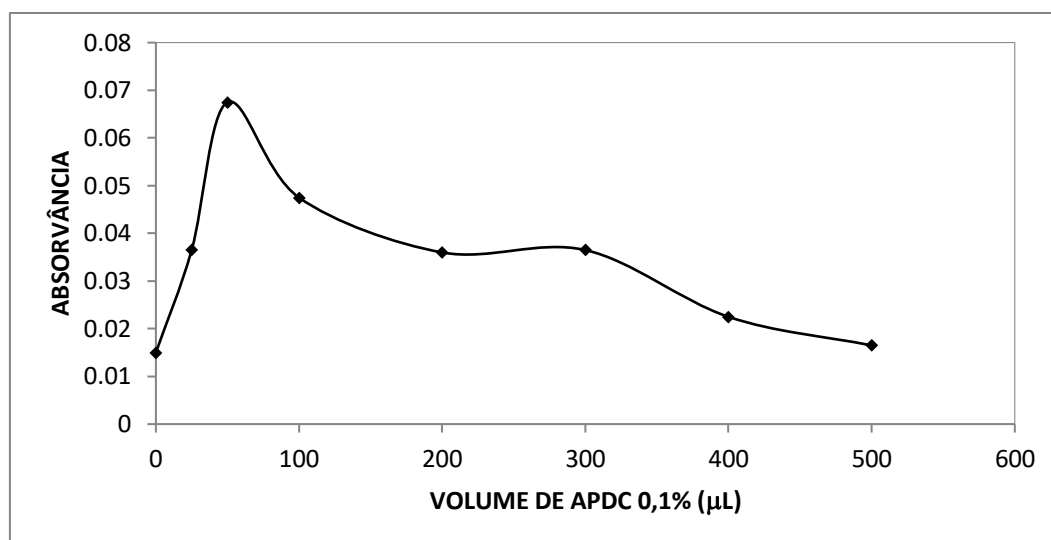


Figura 14: Efeito do volume do agente complexante APDC 0,1%.

Para uma reação de complexação completa e eficiente a concentração analítica e/ou volume do agente utilizado é tão importante quanto a acidez do meio. O gráfico ilustra o aumento da resposta analítica com o seu máximo quando 50 µL da solução é utilizada no procedimento de microextração. Nota-se ainda que o aumento sucessivo do volume da solução de APDC 0,1% (m/v) leva ao decaimento do sinal de absorvância. Característica que pode ser explicada provavelmente pelo excesso de moléculas ligantes que passam a competir durante a etapa de extração com o complexo já formado  $\text{Hg}^{2+}/\text{APDC}$  influenciando negativamente a resposta do método. O volume do reagente complexante APDC utilizado na determinação de mercúrio foi então fixada em 50 µL.

### 2.3.3. Influência do volume de líquido iônico

O volume do solvente de extração é uma variável de extrema importância em LPME. Neste trabalho, para a extração de mercúrio, foi empregado o líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio ([Bmim][PF<sub>6</sub>]), ilustrado na Figura 15.

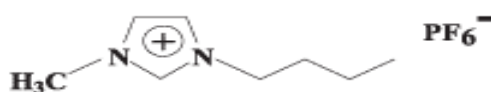


Figura 15: Estrutura do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio.

É interessante observar que para que se tenha uma extração eficiente, é necessário que o volume do líquido iônico seja proporcionalmente adequado para capturar todo o complexo  $\text{Hg}^{2+}/\text{APDC}$  presente na solução de amostra. Outra característica que deve ser observada é a taxa de recuperação do próprio LI utilizado no procedimento experimental. Observou-se que parte do  $[\text{bmim}][\text{PF}_6]$  adicionado inicialmente não foi recuperado ao final do processo de microextração líquido-líquido. Isto deve-se ao fato do líquido iônico empregado ser mais facilmente dissociável em solução aquosa quando comparado a outros LI's. Esta característica é dependente da natureza dos íons que compõe a substância extratora. Desta maneira, para a utilização do  $[\text{Bmim}][\text{PF}_6]$  um intervalo de 100-240  $\mu\text{L}$  foi estudado.

De acordo com a Figura 16, o máximo de extração do complexo  $\text{Hg}^{2+}/\text{APDC}$  ocorreu quando 120  $\mu\text{L}$  de LI foi utilizado, e a medida que o volume foi aumentado a eficiência da extração diminuiu pouco a pouco com tendência a manter-se constante. Então, um volume de 120  $\mu\text{L}$  de LI foi empregado em todos os estudos posteriores.

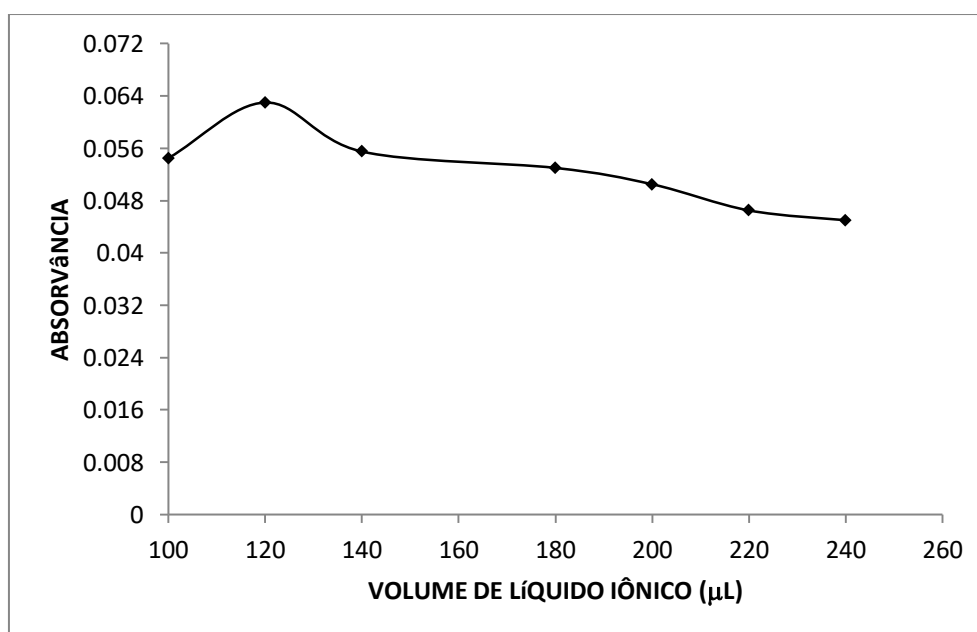


Figura 16: Efeito da quantidade do líquido iônico  $[\text{Bmim}][\text{PF}_6]$  utilizado como solvente extrator na pré-concentração de mercúrio.

### 2.3.4 Influência do tempo de agitação em vortex

Para favorecer a formação de microgotículas com maiores áreas superficiais e conseqüentemente uma maior dispersão do solvente extrator na solução aquosa, um agitador vortex foi utilizado. Essa fonte externa de energia, com agitação vigorosa, promove maior eficiência quanto a transferência de massa do analito. O tempo ótimo de agitação para que ocorra o deslocamento dos íons de  $\text{Hg}^{2+}$ , da fase aquosa, para o solvente extrator (líquido iônico), com uma maior eficácia, foi estudado e os resultados podem ser observados na Figura 17.

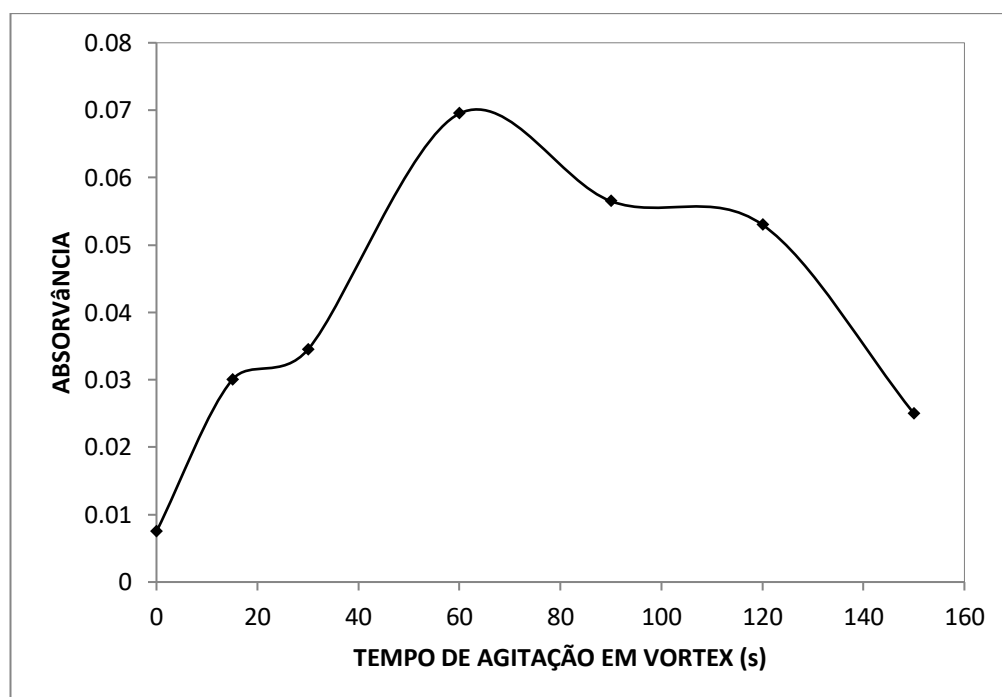


Figura 17: Influência do tempo de agitação em vortex.

Para o estudo, a faixa de tempo investigada foi de 0 – 150 segundos. Ao iniciar a análise do gráfico, observou-se que quando nenhuma agitação foi empregada a resposta analítica foi mínima. Este valor tende a aumentar a medida que mais analitos são extraídos para a fase extratora. O tempo ótimo deste parâmetro no procedimento para a determinação de mercúrio foi de 60 segundos. Após este tempo, a resposta analítica sofreu um decaimento, evidenciando a redução na eficiência de extração, o que pode ser atribuído a perda de LI no meio aquoso por solubilização parcial promovida pela vigorosa agitação.

### 2.3.5 Efeito da temperatura na extração

Com o objetivo de investigar como o aumento da temperatura de banho-maria afetava o processo de extração/pré-concentração no método de microextração com temperatura controlada proposto, o intervalo de 25-70°C foi estudado.

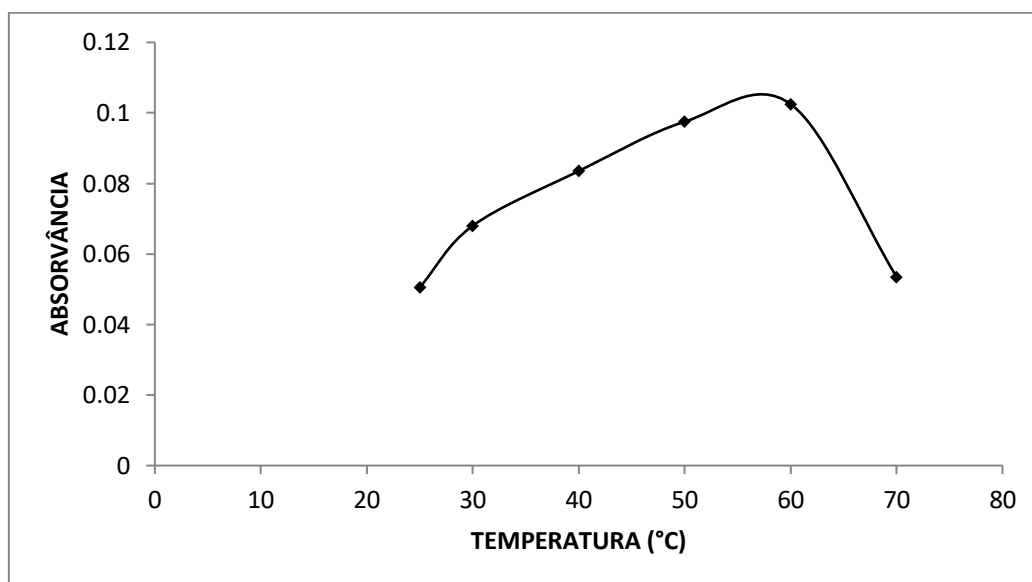


Figura 18: Efeito da temperatura de aquecimento do banho-maria na pré-concentração.

As amostras foram mantidas por 3 min no banho-maria e a Figura 18 ilustra o comportamento crescente da resposta analítica a medida que a temperatura é aumentada até aproximadamente 60 °C. Isto deve-se ao fato de que a eficiência da extração é influenciada significativamente pela temperatura. O aumento gradativo da temperatura promove a diminuição da viscosidade do LI. Desta forma, maior será a dispersão do líquido iônico na fase aquosa. Com isso, uma melhor homogeneização entre as fases acarreta em maior transferência de massa na microextração líquido-líquido. Posteriormente, notou-se uma queda brusca da resposta analítica, provavelmente devido a perda do analito por volatilização. Desta maneira, a temperatura de aquecimento em banho-maria escolhida para os próximos estudos, foi de 55 °C. Após o aquecimento, as amostras foram submetidas a um banho de gelo com temperatura a 0 °C durante 10 min para que um maior volume do [Bmim][PF<sub>6</sub>] fosse recuperado antes da etapa de separação das fases.

### 2.3.6. Influência do diluente

A viscosidade dos líquidos iônicos pode ser considerada uma desvantagem em sua utilização. Para tanto, algumas substâncias são empregadas com a finalidade de diminuir a viscosidade. A reextração do analito e/ou solubilização do LI em etanol, metanol ou soluções ácidas é uma medida adotada quando a técnica de detecção é afetada negativamente por essa característica física do solvente de extração. Assim, para testar como a presença de um reagente diluente afetaria o método proposto antes da etapa de redução do mercúrio, contido na gotícula do líquido iônico, alguns diluentes, tais como: etanol, metanol, ácido nítrico, ácido clorídrico e proporções de ácido/etanol foram estudados. Entretanto, por proporcionar melhores respostas analítica, foi utilizado como diluente da fase rica uma solução de  $\text{HNO}_3$  70% (m/v). Foi estudado o intervalo de 0 a 60  $\mu\text{L}$  de solução ácida. O gráfico da Figura 19 ilustra o comportamento da resposta analítica. Observou-se que um volume de 10  $\mu\text{L}$  influencia positivamente, fazendo com que mais  $\text{Hg}^{2+}$  esteja disponível para reagir com cloreto estanoso e seja convertido a  $\text{Hg}^0$  na etapa de geração de vapor, facilitando a quantificação do mercúrio por CV AAS.

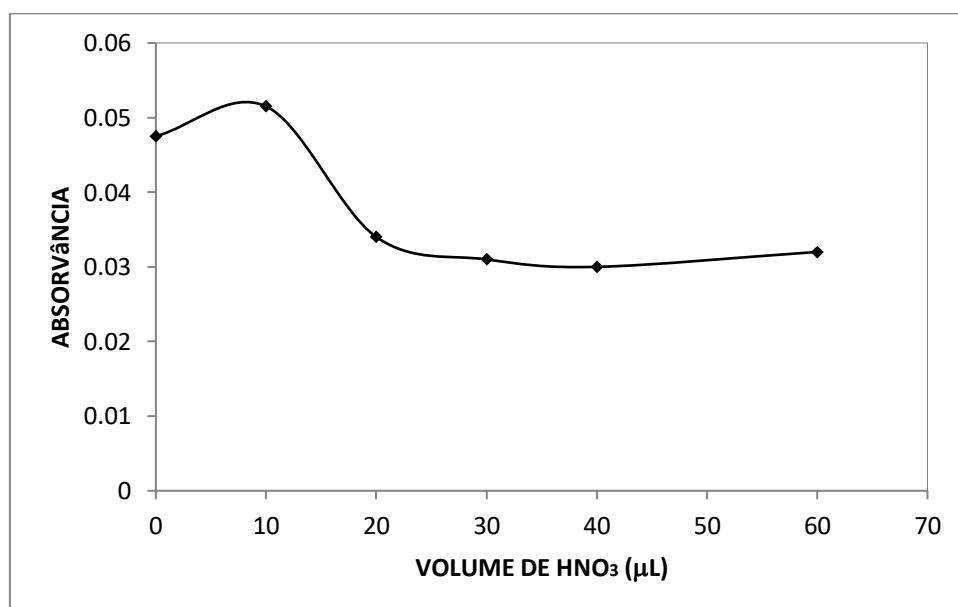


Figura 19: Efeito do volume do diluente utilizado na solubilização do líquido iônico. Volume da microgota: 60  $\mu\text{L}$ ;

Após esse valor, o aumento da quantidade do ácido nítrico (diluente) sugere que a reação de redução é afetada pela diluição e pouco mercúrio

inorgânico é convertido em sua forma elementar. Portanto, para dar continuidade aos estudos posteriores, apenas 10  $\mu\text{L}$  da solução ácida foi utilizada.

### 2.3.7. Influência da quantidade de agente redutor

No procedimento de microextração líquido-líquido utilizado, o vapor frio de mercúrio foi formado a partir da reação de redução do  $\text{Hg}^{+2}$  a  $\text{Hg}^0$  pelo agente redutor cloreto estânico. O comportamento desta variável em função da sensibilidade analítica, ilustrado na Figura 20, foi avaliado na faixa de 80-1.040  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{SnCl}_2$  adicionado em linha dentro do minisseparador gás/líquido.

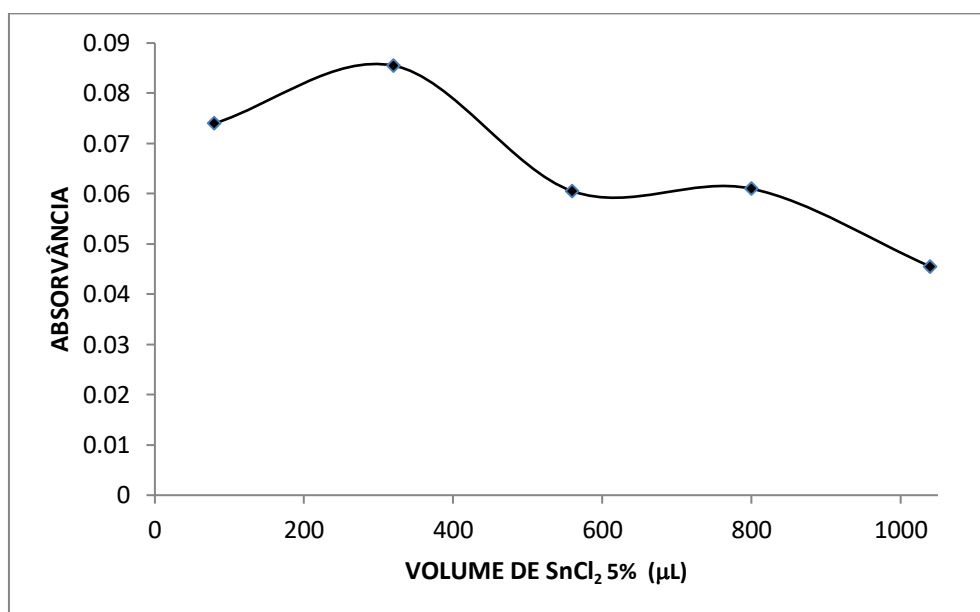


Figura 20: Efeito do volume de reagente redutor na geração de vapor frio de mercúrio.

De acordo com o comportamento da resposta analítica, observou-se que o volume de 320  $\mu\text{L}$  foi o valor ótimo para a estequiometria da reação, sendo assim, escolhido para as análises posteriores. A quantidade ideal foi adicionada com o auxílio de uma bomba peristáltica com rotação ajustada para exatos 5 segundos de funcionamento. Ou seja, a bomba era mantida em funcionamento durante 5 segundos. Durante esse tempo, exatos 320  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{SnCl}_2$  5% (m/v) foram adicionados ao mini separado. Excesso de

reductor proporcionou aumento no volume de líquidos dentro do ambiente de reação e possivelmente dificultou a geração do vapor frio de mercúrio no espaço disponível.

### 2.3.8. Influência do volume do separador gás/líquido

Tratando-se de uma metodologia miniaturizada e consequente utilização de um volume bastante reduzido de fase rica, o volume adequado do recipiente onde ocorre a geração de vapor químico deve ser avaliado. Aproximadamente 60 µl de líquido iônico diluído em solução ácida de HNO<sub>3</sub> 70% (m/v) são introduzidos no misseparador gás-líquido. A influência deste aparato foi verificada para os volumes de 2, 4, 5, 10 e 25 mL (Figura 21). A utilização de frascos com volumes muito pequenos afetou negativamente a resposta analítica quanto a quantificação do mercúrio elementar. Notou-se que a quantidade de vapor gerada nesta etapa do experimento foi superior a capacidade máxima do frasco utilizado como separador gás-líquido e uma segunda análise era necessária para que todo o Hg<sup>+2</sup> ainda presente no meio reacional fosse convertido a Hg<sup>0</sup>. Por outro lado, volumes maiores proporcionaram efeitos negativos. As baixas respostas sugerem que o vapor químico de Hg<sup>0</sup> formado tenha sido disperso no grande espaço do separador, dificultando o carregamento efetivo do vapor pelo gás de arraste, além da maior dificuldade em promover uma mistura mais eficiente a partir da agitação magnética devido os frascos serem demasiadamente grandes para pequenos volumes de líquidos (fase rica + cloreto estanoso). Então, para o bom funcionamento do sistema proposto, um minisseparador gás/líquido com capacidade máxima de 4 mL foi empregado como suporte reacional para geração de vapor frio.



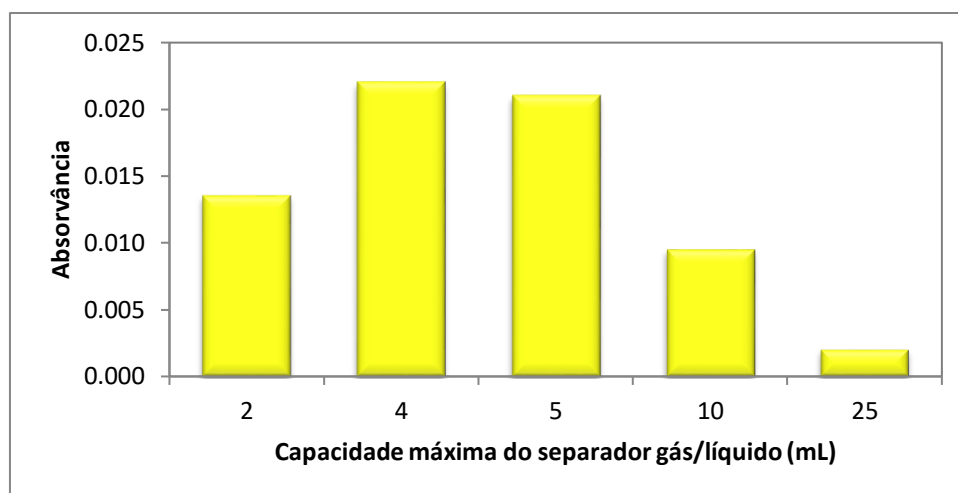


Figura 21: Influência do volume do separador gás/líquido na geração de vapor frio.

### 2.3.9. Efeito do tempo de reação para geração de vapor químico

O gráfico da Figura 22 ilustra a influência do tempo necessário para que a reação entre o  $\text{Hg}^{+2}$  e o  $\text{SnCl}_2$  fosse completa. Este estudo tornou-se necessário devido a viscosidade do LI influenciar negativamente na força necessária entre misturas heterogêneas. Nessa etapa do procedimento experimental, um agitador magnético foi utilizado para auxiliar o contato entre as fases e consequentemente aumentar a cinética da reação química.

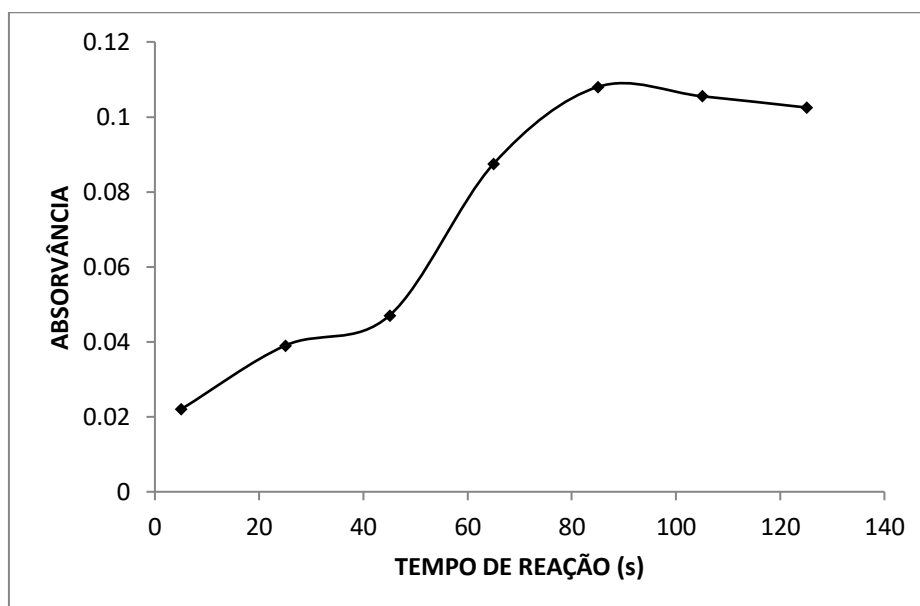


Figura 22: Efeito do tempo de reação sob agitação magnética para geração de vapor frio de mercúrio.

A mistura entre a fase rica e o agente redutor na etapa de geração de vapor frio é fundamental para que bons resultados sejam alcançados. Com base no gráfico, observou-se que a medida que o tempo de reação foi aumentado de 5 para 85 s a resposta analítica para o método também foi aumentada. Após esse tempo, os valores de absorvância no intervalo de 85-125 s permaneceram praticamente constantes. Evidenciando que a reação se completava, não havendo necessidade de um tempo maior. Então o tempo de espera para geração do vapor de mercúrio sob agitação magnética foi de 85 s.

### 2.3.10 Efeito da vazão do gás de arraste

Após todo o mercúrio (II) presente na amostra ser reduzido, o vapor de mercúrio (0) é carregado do misseparador gás-líquido para um tubo de quartzo em formato “T” adaptado ao espectrômetro de absorção atômica. Dentro da faixa de 1,66-25 mL s<sup>-1</sup> (Figura 23), Observou-se que a vazão de 3,57 mL s<sup>-1</sup> foi a que proporcionou maior sinal de absorvância, porém a vazão de 4 mL s<sup>-1</sup> foi escolhida por promover eficiência e maior estabilidade em relação a resposta analítica ( a partir da análise crítica do gráfico gerado neste estudo) quanto o carregamento de todo o vapor químico para o AAS. É importante observar que uma vazão muito lenta, provoca alargamento do pico, uma vez que o vapor de mercúrio demora a chegar na cela de quartzo, apresentando como consequência desse efeito a baixa resposta analítica. A Figura 24 ilustra os picos produzidos a partir de baixas e altas vazões no sistema desenvolvido.

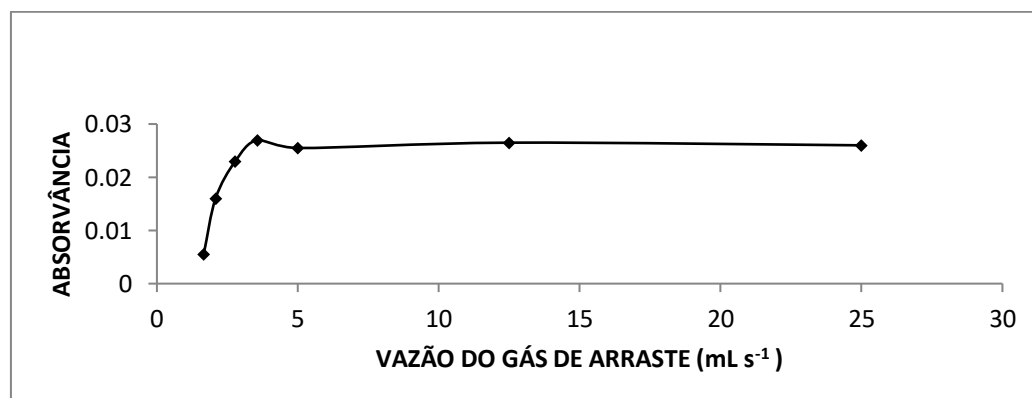


Figura 23: Vazão do gás de nitrogênio utilizado para carrear o vapor de mercúrio em CV AAS.

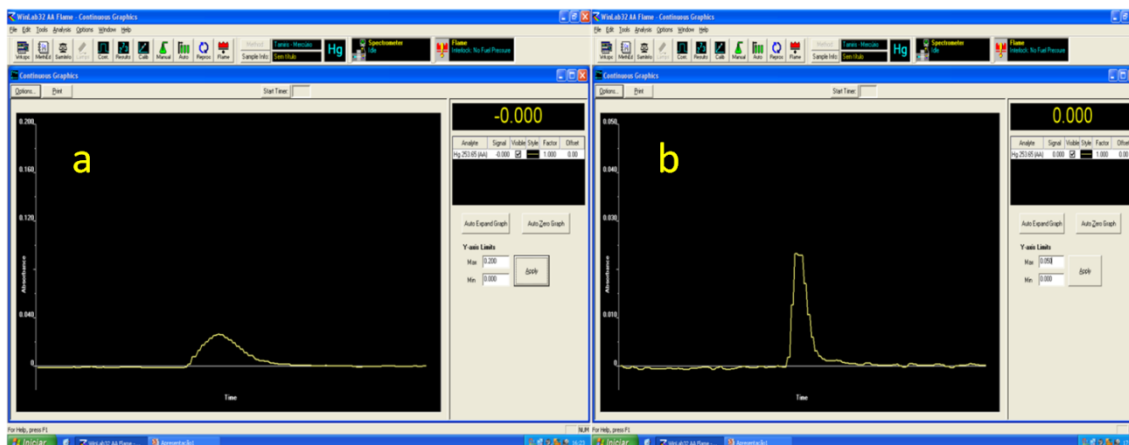


Figura 24: Alargamento do pico proporcionado por baixa vazão (a); Formado do pico gerado por vazões igual e/ou superior a  $3,57 \text{ mL s}^{-1}$  (b).

### 2.3.11 Resumo das condições após otimização

Após o estudo de otimização do método de pré-concentração proposto, as condições ótimas para o bom funcionamento do sistema foram resumidas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições otimizadas para o método de microextração baseado em líquido iônico proposto.

Variável	Valor ótimo
pH	2,0
Volume de APDC 0,1% (m/v)	50 $\mu\text{L}$
Volume de LI	120 $\mu\text{L}$
Tempo em vortex	60 s
Temperatura do banho-maria	55°C
Volume do diluente ( $\text{HNO}_3$ 70% (m/v))	10 $\mu\text{L}$
Volume de $\text{SnCl}_2$ 5% (m/v)	320 $\mu\text{L}$
Volume do misseparador gás/líquido	4 mL
Tempo de reação de redução	85 s
Vazão do gás de arraste	4 $\text{mL s}^{-1}$

## 2.4. Validação do método analítico

Sob o sistema de microextração de mercúrio baseado em líquido iônico otimizado os parâmetros analíticos foram calculados utilizando os valores obtidos a partir da curva analítica. Desta maneira, os parâmetros selecionados para avaliar o desempenho do método proposto foram: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, fator de enriquecimento, índice de consumo e exatidão.

## 2.4.1. Seletividade

O efeito de outros íons na microextração líquido-líquido baseada em líquido iônico foi estudado. O critério para interferência de cada espécie foi fixado em  $\pm 5,0\%$  no sinal analítico obtido para uma solução contendo mercúrio com concentração de  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ , sem qualquer interferente. Os índices toleráveis das espécies indesejadas para ânions e cátions foram listados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Para os ânions avaliados, a partir da concentração  $10^5 \mu\text{g L}^{-1}$  notou-se interferência na resposta analítica.

Tabela 5: Efeito de ânions coexistentes na extração de mercúrio.

Ânion	Recuperação (%)
	$[A]/[\text{Hg}^{2+}] \cdot 10^3$
Nitrato	96
Fosfato	104
Carbonato	90
Fluoreto	97
	$[A]/[\text{Hg}^{2+}] \cdot 10^5$
Nitrato	111
Fosfato	120
Carbonato	94
Fluoreto	123

Para avaliar a influência de outros cátions no processo de microextração líquido-líquido de mercúrio, as proporções  $[\text{Hg}^{2+}]:[\text{Cátion}]$  em  $\mu\text{g L}^{-1}$ , foram: 1:1, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:250, 1:1000.

Tabela 6: Efeito de cátions coexistentes na extração de mercúrio.

Cátion	Tolerância
$\text{Al}^{+3}$	1:100
$\text{Cd}^{+2}$	1:1000
$\text{Co}^{+2}$	1:1000
$\text{Cu}^{+2}$	1:1000
$\text{Pb}^{+2}$	1:100
$\text{Mn}^{+2}$	1:1000
$\text{Mg}^{+2}$	1:100
$\text{Ni}^{+2}$	1:100
$\text{K}^{+}$	1:1000
$\text{Se}^{+2}$	1:1000
$\text{Na}^{+}$	1:1000
$\text{Zn}^{+2}$	1:100

## 2.4.2 Linearidade

A avaliação da linearidade evidencia a capacidade de um método em produzir resultados proporcionais entre a resposta instrumental e a concentração do analito. Para tanto, duas curvas analíticas foram obtidas a fim de expressar essa relação matemática. As Figuras 25 e 26 apresentam as curvas analíticas, com e sem pré-concentração, respectivamente, para determinação de mercúrio.

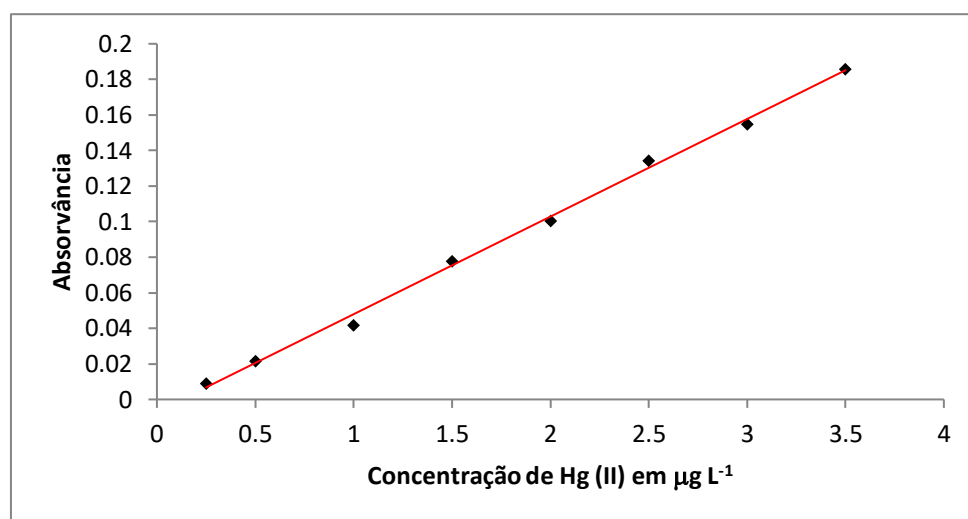


Figura 25: Curva analítica utilizando o método de microextração líquido-líquido proposto.

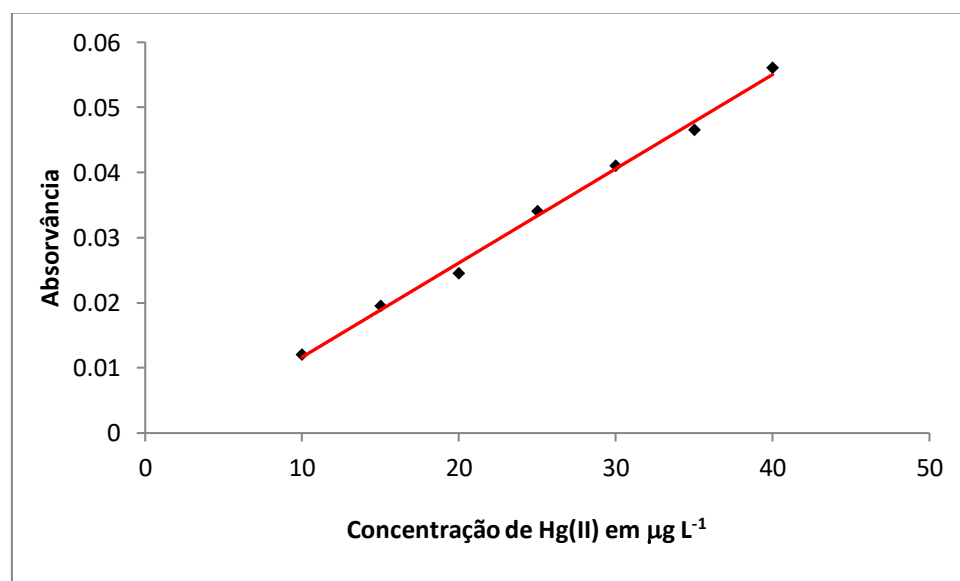


Figura 26: Curva analítica para medida direta de mercúrio

O método de pré-concentração apresentou linearidade até a concentração de  $3,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . A equação da curva pré-concentrada no intervalo de  $0,25$  a  $3,5 \mu\text{g L}^{-1}$  foi  $Y = 0,054C - 0,006$ , onde  $Y$  é a absorvância e  $C$  a concentração de mercúrio, em  $\mu\text{g L}^{-1}$ , com coeficiente de correlação  $r = 0,997$ . E a equação da curva direta no intervalo de  $10$  a  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  foi  $y = 0,001C - 0,002$ , com coeficiente de correlação  $r = 0,995$ .

#### 2.4.3 Limite de detecção

O limite de detecção (LD), calculado como  $3s_b/b$ , sendo  $s_b$  o desvio-padrão para dez medidas do branco e  $b$  o coeficiente angular da seção linear da curva analítica, foi  $0,045 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 2.4.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ), calculado como  $10s_b/b$ , sendo  $s_b$  o desvio-padrão para dez medidas do branco e  $b$  o coeficiente angular da seção linear da curva analítica, foi  $0,152 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 2.4.5 Fator de enriquecimento

O fator de enriquecimento (FE) indica a eficiência do método analítico proposto e é definido, matematicamente, como a razão entre o coeficiente angular da curva de calibração com pré-concentração ( $0,054$ ) e o coeficiente angular da curva de calibração sem pré-concentração ( $0,001$ ). O FE encontrado neste trabalho para o mercúrio foi de  $54$ .

#### 2.4.6 Índice de consumo

O índice de consumo (IC) indica o volume de amostra consumido para a obtenção de uma unidade de FE. O cálculo é baseado na razão entre o volume em mililitros de amostra utilizada no procedimento experimental ( $5 \text{ mL}$ ) e o fator de enriquecimento ( $54$ ). Assim, o IC para a microextração líquido-líquido baseada em líquido iônico foi de  $0,09 \text{ mL}$ .

### 2.4.7 Exatidão

Neste trabalho, a avaliação da exatidão foi realizada pela determinação da concentração de mercúrio em material de referência certificada. O material analisado foi o BCR-060, planta aquática (*lagarosiphon major*) do Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Geel, Belgium). Os valores certificado e encontrados são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: Resultados obtidos a partir do material de referência certificada BCR-060.

Material	Quantidade de mercúrio (mg/kg)	
	Certificada	Encontrada
<b>Planta aquática BCR-060</b>	0,34 ± 0,04	0,31 ± 0,01

Intervalo de confiança de 95 % (n=3)

O valor encontrado mostrou que não há diferença significativa entre o valor certificado. Teste de adição e recuperação do analito também foi realizado para avaliar a exatidão do método proposto. O teste T foi utilizado para avaliar estatisticamente a significância entre os resultados.

### 2.4.8 Aplicação em amostras reais

Em razão da importância biológica e ambiental, a determinação de mercurio foi realizada aplicando o método de pré-concentração proposto em amostras de óleo de peixe, comercializados como ômega 3 por sete marcas diferentes. Os valores encontrados e adicionados encontram-se na tabela 8.

Tabela 8: Resultados obtidos a partir da determinação de mercúrio em amostras reais.

Óleo de peixe	Quantidade de mercúrio (µg/g)		Recuperação (%)
	Adicionada	Encontrada	
Marca A	0	<LD	---
	1,0	1,18 ± 0,02	118
Marca B	0	<LD	---
	1,0	1,05 ± 0,08	105
Marca C	0	<LD	---
	1,0	1,05 ± 0,05	105

Marca D	0	<LD	---
	1,0	1,09 ± 0,03	109
Marca E	0	<LD	---
	1,0	1,12 ± 0,13	112
Marca F	0	<LD	---
	1,0	1,10 ± 0,06	110
Marca G	0	<LD	---
	1,0	1,12 ± 0,09	112

Intervalo de confiança de 95 % (n=3)

## 2.5. Considerações finais e perspectivas

O método proposto mostrou-se simples, eficiente e de fácil execução para a determinação de mercúrio em amostras de óleo de peixe. A utilização do líquido iônico proporcionou ao método destaque quanto à substituição aos solventes orgânicos voláteis, caracterizando-o como uma alternativa com baixo impacto ambiental. Os pequenos volumes de amostra e reagentes utilizados, também foram algumas das características vantajosas neste trabalho.

A utilização de um sistema de introdução de amostra totalmente miniaturizado, mostrou-se bastante compatível com o procedimento de microextração líquido-líquido baseada em líquido iônico e controle de temperatura assistida por vortex na determinação de mercúrio.

A microextração proposta otimizada mostrou-se seletiva à determinação de mercúrio mediante estudo do efeito de interferentes e aplicação em material de referência certificado, uma vez que a mesma também possui outros íons coexistentes em sua composição. As excelentes características analíticas resultantes deste trabalho, tais como, limite de detecção e fator de enriquecimento, possibilita o emprego da metodologia em uma grande variedade de matrizes.

Atualmente, as técnicas de microextração líquido-líquido encontram-se em pleno avanço e o emprego de sistemas totalmente automatizados são promissores.



## **Capítulo 3**

Microextração líquido-líquido dispersiva com  
solidificação da gota orgânica flutuante  
(DLLME-SFOD) para extração de mercúrio em  
frutos do mar

### **3.0. Objetivos**

#### 3.0.1. Objetivo geral

Desenvolver um método simples e de baixo custo para determinação de mercúrio em peixes e sururu utilizando microextração em fase líquida e detecção por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio.

#### 3.0.2. Objetivos específicos

3.0.2.1 Desenvolver uma metodologia baseada em microextração dispersiva com solidificação de gota orgânica para a extração de mercúrio;

3.0.2.2. Empregar sistema de introdução da amostra com geração de vapor frio completamente miniaturizado;

3.0.2.3. Utilizar o ar atmosférico como carreador do vapor de mercúrio formado do minisseparador gás/líquido;

3.0.2.4. Utilizar ferramentas quimiométricas para otimizar variáveis que afetam significativamente o método proposto;

3.0.2.5 Aplicar o método desenvolvido na determinação de mercúrio em amostras de frutos do mar;

### **3.1. Parte experimental**

#### 3.1.1 Materiais utilizados

- Ultrapurificador de água, Elga - modelo Purelab Classic;
- Balanças analíticas, Shimadzu - modelo AY 220;
- Medidor de pH, Quimis - modelo Q400AS;
- Tubos de silicone de variados diâmetros;
- Tubos capilares de Teflon;

- Bomba peristáltica, Watson Marlow Pumps;
- Mini agitador magnético, Dragonlab;
- Micropipetas (Transferpette Digital - Brand, RB704174, RB704178; Sealpette, ER 33832; Kacil S;
- Ponteiras (Brand, 18170, 18266, 702533);
- Termômetro;
- Vidraria convencional, mantida em solução de HNO<sub>3</sub> a 10% v/v durante a noite para descontaminação. Enxaguadas com água ultra pura;

### 3.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos foram todos de grau analítico.

- Solução padrão de Hg 10000 µg/mL<sup>-1</sup> (Fluka)
- Ácido nítrico 65% (m/m) (MERCK);
- Ácido clorídrico 37% (m/m) (MERCK);
- Etanol 99% (v/v) (MERCK);
- Cloreto de potássio P. A. (VETEC);
- Cloreto de amônio P. A. (VETEC);
- Hidróxido de amônio P. A. (MERCK);
- Hidróxido de sódio (QUIMEX);
- Borato de sódio (SYNTH);
- Acetato de sódio anidro (SYNTH);
- Ácido acético glacial (MERCK);
- Pirrolidina ditiocarbamato de amônio – APDC (SYNTH);
- Ácido acético (MERCK);
- Cloreto estano (SYNTH);
- 1-dodecanol (SIGMA);

### 3.1.3 Instrumentação e preparo de soluções

#### 3.1.3.1 Instrumentação

Um espectrômetro de absorção atômica Perkin Elmer (modelo AA200), foi equipado com um sistema geração de vapor miniaturizado. Foi utilizada uma

lâmpada de cátodo oco como fonte de radiação específica para Hg, com comprimento de onda de 253,7 nm e intensidade de corrente de 6 mA. Um mini agitador magnético, uma bomba peristáltica de única via e uma mini bomba peristáltica para sucção de ar também foram acoplados ao sistema. As medições do analito foram feitas utilizando-se um tubo de quartzo em formato de T sem aquecimento.

#### 3.1.3.2 Preparo da solução de APDC 0,1% (m/v)

Em um balão volumétrico de 100 mL foi adicionado 0,1 gramas do reagente orgânico pirrolidina ditiocarbamato de amônio. Posteriormente, pequenos volumes de etanol P.A foram adicionados ao balão, mantendo-o sobre constante agitação manual. Após total homogeneização, a solução estava pronta para ser utilizada nos experimentos.

#### 3.1.3.3 Preparo das soluções tampão

Foram preparadas soluções tampão com concentração final de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  para o estudo de pH na faixa de 1-5.

#### 3.1.3.4 Solução tampão cloreto (pH 1,0 - 3,0)

Pesar 0,37 g de cloreto de potássio (Vetec), dissolver em 42,50 mL de ácido clorídrico  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  e diluir em 100 mL de água ultrapura..

#### 3.1.3.5 Solução tampão acetato de sódio (pH 4,0 - 5,0)

Pesar 82,00g de acetato de sódio anidro (QM), dissolver em 1000 mL de água ultrapura e ajustar o pH com ácido acético glacial (Merck).

#### 3.1.3.6 Preparo da solução de $\text{SnCl}_2$ 5% (m/v)

A solução de cloreto estanoso a 5% foi preparada em ácido clorídrico  $2,4 \text{ mol L}^{-1}$ . Para tanto, foi solubilizado sob aquecimento 1,25 gramas de cloreto estanoso em 5 mililitros de ácido clorídrico concentrado. A solução foi

transferida para um balão volumétrico e aferida para 25 mL. Uma nova solução era preparada para cada dia de trabalho experimental.

#### 3.1.3.7 Digestão da amostra certificada

A digestão do material de referência certificado ERM-CE 278, Mussel tissue, foi realizada utilizando uma bomba de digestão ácida Parr (Moline, EUA, modelo 4781). Para digestão, aproximadamente 0,1010 gramas foram pesadas e adicionadas ao copo de PTFE. Posteriormente, 1,5 mL de ácido nítrico concentrado e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio foram adicionados. O tempo de digestão foi de 6 horas com temperatura de 110 °C em estufa. Após digestão, o pH da solução foi ajustado com solução diluída de NaOH. Em seguida, adicionou-se a solução tampão com pH adequado e aferiu-se com água até o volume final de 25,0 mL.

#### 3.1.3.8 Digestão da amostra real

Amostras de peixes: robalo (*Centropomus undecimalis*) e tainha (*Mugil brasiliensis*) e do molusco: sururu (*Mytella guyanensis*), coletadas no município de São Francisco do Conde, Bahia foram utilizadas como amostras reais. Foram pesados, aproximadamente, 0,100 g das amostras e transferidos para o copo de uma bomba de digestão. Ao copo de PTFE também foram adicionado 0,5 mL de peróxido de hidrogênio e 1,5 mL de ácido nítrico concentrado. O sistema fechado foi mantido em uma estufa a 110°C durante 6,0 h. Após o arrefecimento até à temperatura ambiente, o pH do digerido foi ajustado para com solução diluída de NaOH e adicionado ao balão volumétrico de 25,0 mL contendo solução tampão adequada e o volume final aferido com água ultrapura. Brancos de reagentes também foram preparados. Desta forma, as soluções de amostras e os brancos dos reagentes foram submetidas ao procedimento de microextração líquido-líquido.

### 3.2. Microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante (DLLME-SFOD) para extração de mercúrio em frutos do mar

Em frascos do tipo *vials*, foram adicionados 4,0 mL de solução de amostra contendo  $\text{Hg}^{2+}$  a 2  $\mu\text{g/L}$ , com pH previamente ajustado com solução tampão. Posteriormente, uma mistura de solvente dispersor e solvente extrator (1-dodecanol) e 40  $\mu\text{L}$  de APDC 0,1 % (m/v), foi injetada rapidamente na fase aquosa contendo o analito e uma turvação foi observada. A mistura foi agitada magneticamente e, posteriormente, resfriada em banho de gelo para o congelamento da gota orgânica. Posteriormente, a fase aquosa foi removida com o auxílio de um seringas e a gota congelada foi diluída em 50  $\mu\text{L}$  de solução ácida. O *vial* contendo a fase rica foi utilizado como separador gás/líquido e o reagente redutor  $\text{SnCl}_2$  5% (m/v) foi adicionado em linha. O vapor de mercúrio foi carregado com ar atmosférico aspirado do ambiente. Por fim, as determinações de mercúrio foram realizadas por CV AAS. O esquema adotado no procedimento experimental proposto neste trabalho é ilustrado pela Figura 27.

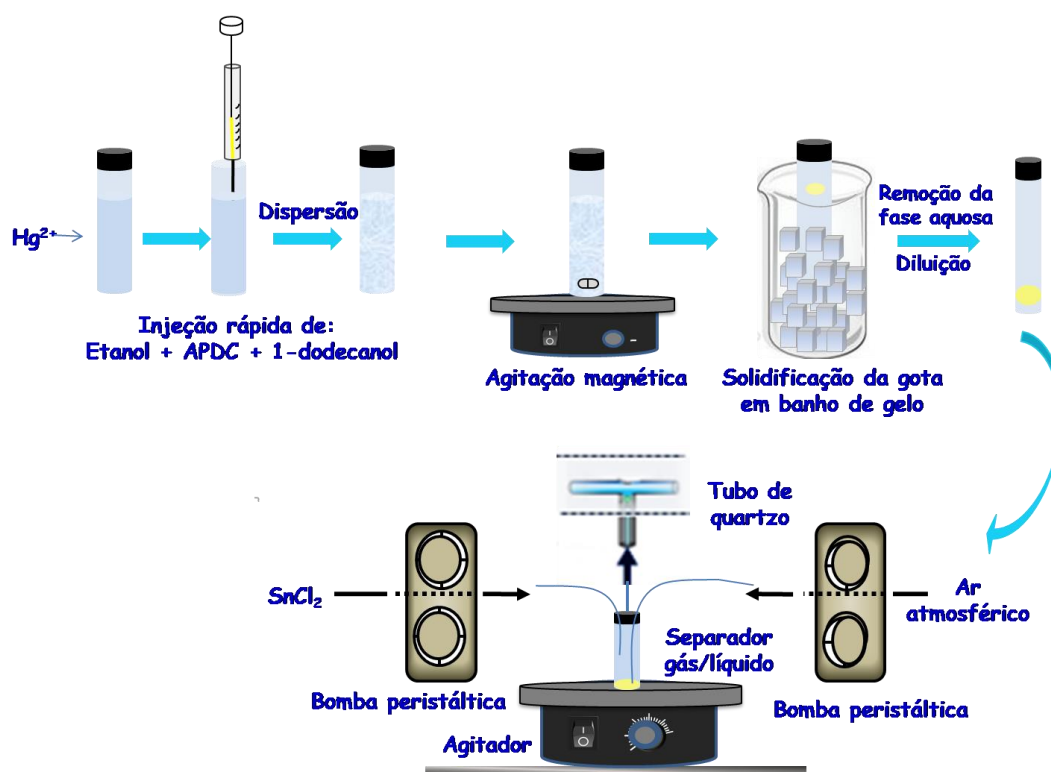


Figura 27: Ilustração esquemática do método de pré-concentração de mercúrio em frutos do mar.

### 3.3. Resultados e discussão

Para melhorar o desempenho da metodologia proposta, as variáveis foram otimizadas. Neste trabalho foi utilizada a otimização univariada e otimização multivariada para avaliação dos principais fatores. Para todos os estudos, a concentração de mercúrio utilizada foi fixada em  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 3.3.1. Otimização univariada

##### 3.3.1.1. Influência da agitação magnética após procedimento de microextração dispersiva

Para avaliar se a capacidade de extração de mercúrio era aumentada com o auxílio de uma fonte externa de energia, o procedimento de microextração foi executado de dois modos diferentes. No primeiro modo, foi realizada a microextração dispersiva e posteriormente o congelamento da gota orgânica que era levada para determinação em CV AAS. No segundo modo, após a etapa de microextração dispersiva, o sistema foi agitado e, então, levado para o banho de gelo. Após o congelamento da gota orgânica, a mesma foi analisada por CV AAS. A Figura 28 ilustra o comportamento da resposta analítica para os dois procedimentos. Notou-se que a capacidade de extração foi aumentada quando o método de microextração dispersiva foi assistido por agitação magnética. A transferência de massa do analito foi favorecida com o maior contato promovido pela mistura mais vigorosa entre as fases líquidas.

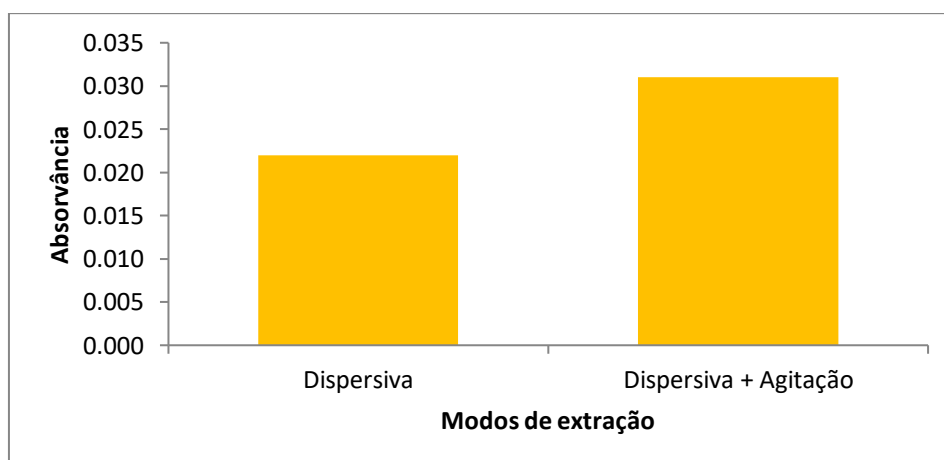


Figura 28: Influência do uso do agitador magnético na etapa de microextração dispersiva líquido-líquido.

### 3.3.1.2. Efeito do tipo de diluente

O diluente utilizado na dissolução da fase rica, proporciona a quebra do complexo formado, tornando os íons de  $\text{Hg}^{2+}$  mais disponíveis, facilitando a reação de redução para a geração de vapor frio e conseqüentemente melhores respostas na determinação do elemento cádmio por CV AAS são observadas. Então, para este estudo, solução de HCl 2M, soluções de  $\text{HNO}_3$  a 35, 40 e 50% (v/v) e proporções de uma mistura de  $\text{HNO}_3$ / etanol (2:1) foram empregadas. A Figura 29 ilustra o efeito do estudo em relação ao sinal analítico.

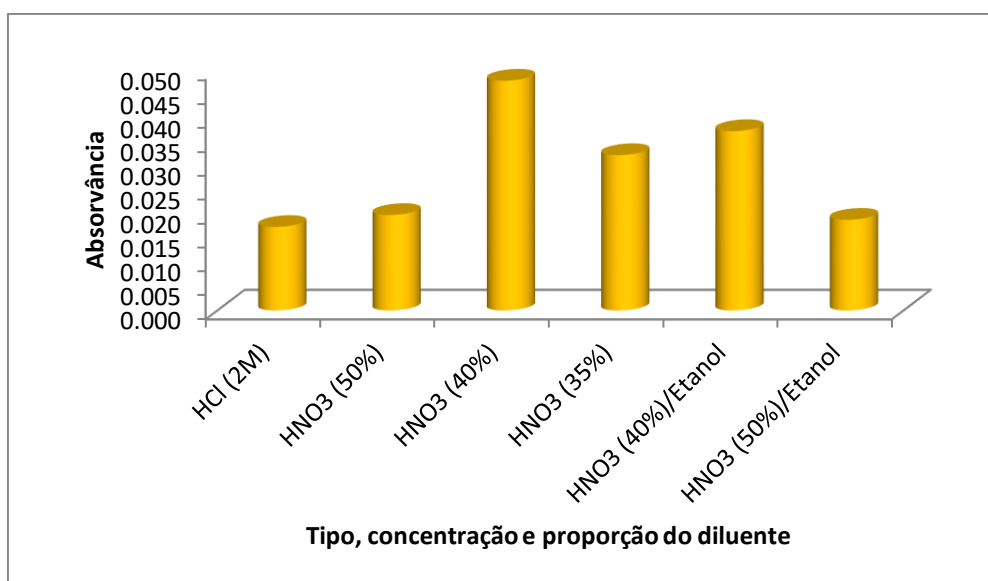


Figura 29: Influência do tipo de diluente utilizado para dissolução da gota orgânica solidificada.

De acordo com o gráfico obtido para este estudo, observou-se que  $\text{HNO}_3$  40% (v/v) foi o que obteve o melhor resposta. Então, 50  $\mu\text{L}$  desta solução foi utilizada para diluir a fase rica.

### 3.3.2. Otimização multivariada

Técnicas quimiométricas foram utilizadas para avaliar e otimizar o método proposto [73-75]. Em todos os experimentos, 4 mL de solução de  $\text{Hg}^{2+}$  2,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  foi utilizado. O planejamento fatorial completo  $2^4$  permitiu verificar as variáveis que afetam o método de forma significativa. As variáveis estudadas foram: tempo de agitação em vortex, pH, quantidade de solvente extrator e dispersor. Os fatores e seus níveis mínimo (-) e máximo (+) são apresentados na Tabela 9, e a matriz de planejamento experimental com seus resultados



obtidos em duplicata para cada experimento (expresso em absorvância) é mostrada na Tabela 10.

Tabela 9: Níveis das variáveis no planejamento fatorial 2<sup>4</sup>

Variáveis	Símbolo	Nível baixo(-)	Nível alto(+)
Tempo de agitação (min)	(A)TA	5	15
Quantidade de solvente extrator (μL)	(B)QS	25	100
Quantidade de dispersor (μL)	(C)QD	100	250
pH	(D)pH	2	5

Tabela 10: Matriz e resultados do planejamento fatorial de dois níveis para determinação do Hg<sup>2+</sup> em DLLME-SFOD

Experimento	(A)TA	(B)QS	(C)QD	(D)pH	ABS
1	+	+	+	+	0,012 / 0,013
2	+	+	+	-	0,073 / 0,072
3	+	+	-	+	0,024 / 0,024
4	+	+	-	-	0,060 / 0,062
5	+	-	+	+	0,044 / 0,044
6	+	-	+	-	0,076 / 0,076
7	+	-	-	+	0,055 / 0,053
8	+	-	-	-	0,092 / 0,093
9	-	+	+	+	0,030 / 0,028
10	-	+	+	-	0,064 / 0,064
11	-	+	-	+	0,026 / 0,025
12	-	+	-	-	0,056 / 0,055
13	-	-	+	+	0,038 / 0,038
14	-	-	+	-	0,070 / 0,070
15	-	-	-	+	0,038 / 0,037
16	-	-	-	-	0,093 / 0,092

A Figura 30 apresenta o gráfico de Pareto gerado para avaliar resultados obtidos (Tabela 10).

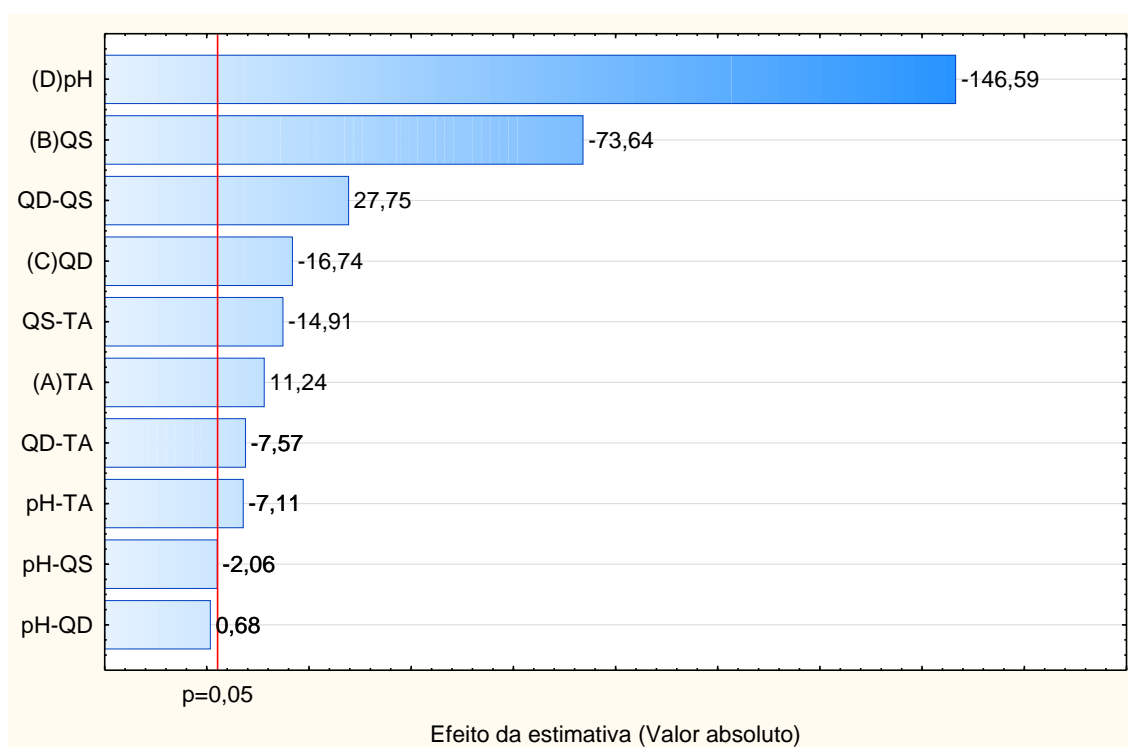


Figura 30: Gráfico de Pareto dos efeitos para as variáveis estudadas em DLLME-SFOD

Na etapa de triagem, de acordo com o gráfico de Pareto, observou-se que as variáveis que mais influenciam no procedimento de microextração com gota orgânica flutuante no intervalo estudado, são (D) pH e (B) quantidade de solvente extrator, seguidos de (C) QD e (A) TA, quantidade de dispersor e tempo de agitação em vortex, respectivamente. Desta forma, com base nas variáveis e interações que influenciam no sistema de pré-concentração, dois planejamentos Doehlert foram executados para encontrar os valores ótimos das variáveis do método proposto. O primeiro planejamento Doehlert foi desenvolvido para otimização da quantidade de dispersor (QD) e quantidade de solvente extrator (QS), uma vez que este par apresentou a interação de maior efeito. Posteriormente, foi desenvolvido um segundo planejamento Doehlert, agora com os valores de QD e QS já otimizados, para a otimização das variáveis pH e tempo de agitação em vortex (TA).

### 3.3.2.1. Planejamento Doehlert 1

As duas variáveis, QD e QS, foram otimizadas pelo planejamento Doehlert (Tabela 11) para encontrar os valores críticos em mais níveis. O

tempo de agitação em vortex e o pH foram fixados nos seus valores máximo e mínimo, respectivamente, conforme os efeitos mostrados no Pareto.

Tabela 11: Matriz do primeiro planejamento Doehlert para a DLLME-SFOD

Experimento	(C)QD	(B)QS	ABS
1	50	50	0,046 / 0,045
2	100	25	0,053 / 0,053
3	100	100	0,074 / 0,073
4	150	50	0,065 / 0,063
5	200	25	0,069 / 0,069
6	200	100	0,067 / 0,067
7	250	50	0,050 / 0,051

A partir dos resultados fornecidos pelos experimentos, uma superfície de resposta e um gráfico de curva de níveis foram gerados (Figura 31).

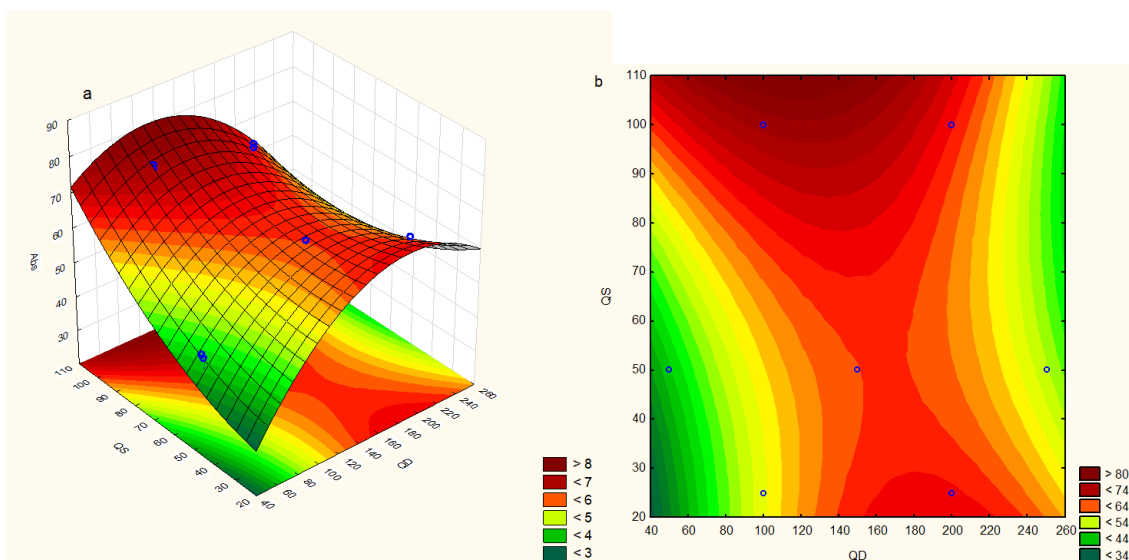


Figura 31: Superfície de resposta (a) e curvas de níveis (b), para a otimização de QD e QS.

De acordo com os gráficos acima, os valores críticos das variáveis estudadas provenientes da interação de maior efeito, QD-QS, tendem aos valores dos níveis mais altos. Assim os valores da quantidade do solvente extrator 1-dodecanol e quantidade de etanol (solvente dispersor) ótimos para o sistema de microextração com gota orgânica solidificada para extração de mercúrio foram 100 e 200  $\mu\text{L}$ , respectivamente.

## 3.3.2.1. Planejamento Doehlert 2

Considerando os resultados obtidos no primeiro planejamento Doehlert, a quantidade de dispersor e quantidade de solvente extrator foram fixados em 200 e 100  $\mu\text{L}$ , respectivamente. No segundo planejamento Doehlert, o pH e o tempo de agitação em vortex foram otimizados. Os sete experimentos necessários para a realização do planejamento são descritos na Tabela 12.

Tabela 12: Matriz do segundo planejamento Doehlert para a DLLME-SFOD

Experimento	(D)pH	(A)TA	ABS
1	1	10	0,254 / 0,250
2	2	5	0,096 / 0,097
3	2	15	0,101 / 0,099
4	3	10	0,095 / 0,094
5	4	5	0,051 / 0,050
6	4	15	0,057 / 0,059
7	5	10	0,039 / 0,040

Os dados obtidos na realização dos experimentos que compõem a matriz de Doehlert geraram a superfície de resposta e curvas de níveis que estão apresentadas na Figura 32.

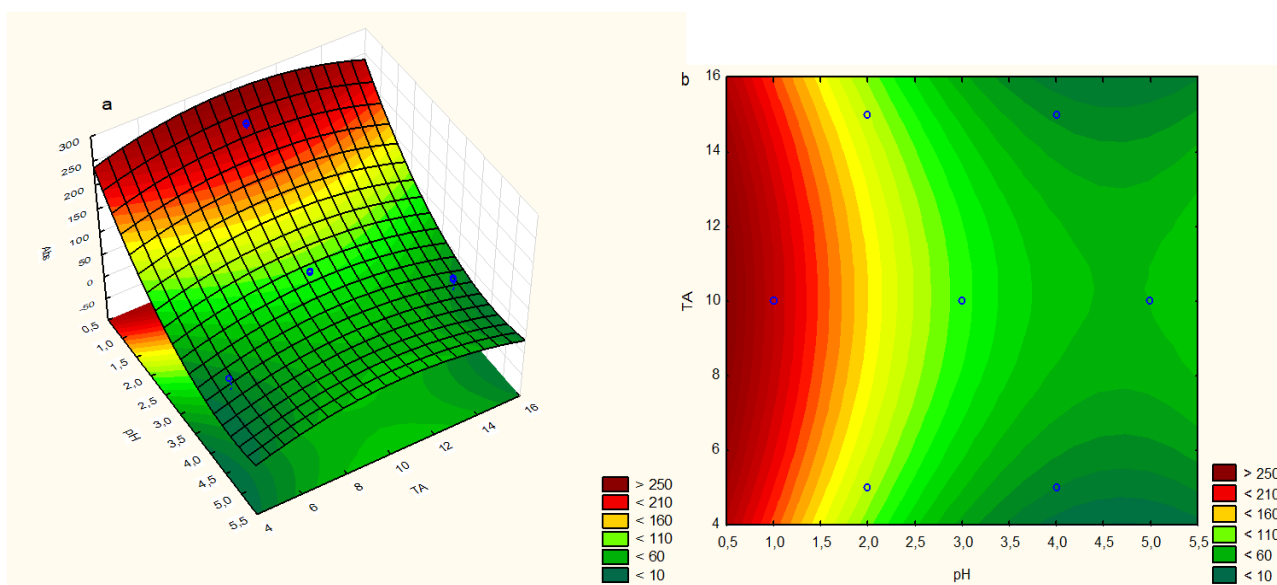


Figura 32: Superfície de resposta (a) e curvas de níveis (b), para a otimização de pH e TA.

Através dos gráficos apresentados acima, nota-se que quando utilizados níveis mais baixos de pH e níveis altos de tempo de agitação, são obtidas melhores respostas analíticas para a metodologia proposta. De acordo com o gráfico de

Pareto, a variável pH apresentou efeito negativo indicando que a medida que o valor do pH diminui há um acréscimo no sinal analítico. A reação de complexação entre o reagente APDC e o íon  $\text{Hg}^{+2}$  é então favorecida nesta condição. Ainda de acordo com o gráfico de Pareto, o tempo de agitação após a microextração dispersiva apresentou efeito positivo. Com isso, a medida que o tempo de agitação é aumentado, melhor é a resposta analítica e um ponto ótimo de rendimento é observado. Dessa maneira, considerando os resultados obtidos na etapa de otimização pelo segundo planejamento Doehlert, as condições estabelecidas foram: pH 1,0 e tempo de agitação magnética de 10 min.

### 3.4. Validação do método analítico

Com o método de microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante para determinação de mercúrio por CV AAS otimizado, alguns parâmetros que atestam o desempenho do método foram avaliados. A Tabela 13 apresenta um resumo dos valores para os parâmetros analíticos selecionados.

Tabela 13: Principais parâmetros analíticos do método proposto.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
<b>Limite de detecção (LD)</b>	0,067 $\mu\text{g/L}$
<b>Limite de quantificação (LQ)</b>	0,22 $\mu\text{g/L}$
<b>Linearidade</b>	0,5-3,0 $\mu\text{g/L}$
<b>Fator de enriquecimento (FE)</b>	7
<b>Índice de consumo (IC)</b>	0,57 mL

#### 3.4.1 Estudo de interferentes

A seletividade do método foi avaliada pelo estudo da influência de outros íons na determinação de  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  de mercúrio. A tabela 14 indica que as espécies  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$ , são aquelas que interferem em menores concentrações no sistema de microextração líquido-líquido. Provavelmente porque estes cátions competem com o mercúrio na complexação com o APDC.

Tabela 14: Quantidades toleráveis de outros íons na determinação de mercúrio (II) pelo método de microextração proposto.

<b>Cátion</b>	<b>Tolerância</b>	<b>Ânion</b>	<b>Tolerância</b>
Al <sup>+3</sup>	1:1000	CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	1:1000
Cd <sup>+2</sup>	1:500	F <sup>-</sup>	1:1000
Co <sup>+2</sup>	1:1000	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1:1000
Cu <sup>+2</sup>	1:1000	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	1:1000
Pb <sup>+2</sup>	1:500		
Mn <sup>+2</sup>	1:500		
Ni <sup>+2</sup>	1:500		

### 3.4.2 Exatidão

Foi realizada a determinação da concentração de mercúrio em material de referência certificada para avaliar a exatidão do método desenvolvido. O material analisado foi o ERM-278, tecido de mexilhão, do Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Geel, Belgium). O resultado encontrado para o mercúrio encontra-se na Tabela 15. Observou-se que não foi encontrada diferença significativa entre os resultado obtido e o valor certificado.

Tabela 15: Resultados obtidos a partir do material de referência certificada ERM-278.

<b>Material</b>	<b>Quantidade de mercúrio (mg/kg)</b>	
	<b>Certificada</b>	<b>Encontrada</b>
<b>Tecido de Mexilhão ERM-278</b>	0,071 ± 0,007	0,072 ± 0,005

Intervalo de confiança de 95 % (n=3)

### 3.4.3. Aplicação em amostras reais

O procedimento de pré-concentração com análise por espectrometria de absorção atômica e geração de vapor frio desenvolvido, foi aplicado para determinação de Hg<sup>2+</sup> no molusco *Mytella guyanensis* (Sururu) e nos peixes *Centropomus undecimalis* (Robalo) e *Mugil brasiliensis* (Tainha). Um estudo de recuperação também foi realizado. Valores conhecidos de mercúrio foram adicionados nas amostras de frutos do mar. Os níveis de mercúrio encontrados e os resultados da recuperação encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados obtidos a partir da determinação de mercúrio em amostras de frutos do mar.

Fruto do mar	Quantidade de mercúrio ( $\mu\text{g/g}$ )		Recuperação (%)
	Adicionada	Encontrada	
Sururu	0	$0,30 \pm 0,06$	
	1,0	$1,09 \pm 0,02$	79
Tainha	0	<LOD	---
	1,0	$0,97 \pm 0,02$	97
Robalo	0	<LOD	---
	1,0	$1,05 \pm 0,05$	105

Intervalo de confiança de 95 % (n=3)

Por meio da resolução - RDC N42, de 29 de agosto de 2013, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabeleceu o limite máximo de 0,5  $\mu\text{g/g}$  de mercúrio em peixes e moluscos. Dessa forma, o valor de 0,3  $\mu\text{g/g}$  de mercúrio encontrado nas amostras de sururu está dentro do limite recomendado. Entretanto, o consumo excessivo desse molusco pode ser considerado preocupante, devido a capacidade do Hg ser acumulado no organismo.

### 3.5. Considerações finais e perspectivas

O método de microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante (DLLME-SFOD) combinado com o sistema miniaturizado de geração de vapor frio, mostrou-se eficiente na determinação de mercúrio em frutos do mar. Alguns resultados obtidos tiveram destaque após o término deste trabalho. Como por exemplo, a necessidade de um pequeno volume de amostra (4 mL) para realização de cada experimento. Amostras que não permitem a coleta de grandes volumes, podem ser facilmente aplicadas no sistema apresentado. Os baixos volumes de reagentes utilizados e a utilização do ar como gás de arraste, também tornam o método atrativo, devido o menor impacto ambiental.

O procedimento proposto apresentou parâmetros analíticos, tais como, limite de detecção e exatidão adequados para a determinação de Hg (II) tanto nas amostras de peixes quanto em molusco. E apresentou como principais

vantagens a simplicidade e baixo custo (quando comparado com outros métodos existentes na literatura), tornando-o um método que pode ser utilizado para determinar baixas concentrações de mercúrio em uma ampla variedade de amostras.

Como perspectivas futuras, a automatização do sistema proposto com a utilização de válvulas solenóides, visando diminuir a probabilidade de contaminação, de erros relacionados à manipulação da amostra e aumento da frequência analítica.



#### 4.0 REFERÊNCIAS

- [1] RAMOS, L., RAMOS, J. J., BRINKMAN, U. A. T. Miniaturization in sample treatment for environmental analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 381, n. 1, p. 119-140, 2005
- [2] FLEISCHER, H., VORBERG, E., THUROW, K. Determination of Total Mercury Content in Wood Materials-Part 3: Miniaturization Using ICP-MS. *American Laboratory*, v. 46, n. 6, p. 16-19, 2014
- [3] KATO, M., SAKA-KATO, K., TOYO'OKA, T. Miniaturization of analytical systems using immobilized biomolecules for high-throughput screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 384, n. 1, p. 50-52, 2006
- [4] KUTTER, J. P. Special issue - Miniaturization in analytical chemistry - Preface. *Talanta*, v. 56, n. 2, p. 221-221, 2002
- [5] MATYSIK, F. M. Miniaturization of electroanalytical systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 375, n. 1, p. 33-35, 2003
- [6] NILSSON, S., LAURELL, T. Miniaturization in analytical and bioanalytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 378, n. 7, p. 1676-1677, 2004
- [7] SPIETELUN, A., MARCINKOWSKI, L., DE LA GUARDIA, M., NAMIESNIK, J. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta*, v. 119, n. p. 34-45, 2014
- [8] KAUR, V., MALIK, A. K., VERMA, N. Applications of solid phase microextraction for the determination of metallic and organometallic species. *Journal of Separation Science*, v. 29, n. 3, p. 333-345, 2006
- [9] LAMBROPOULOU, D. A., KONSTANTINOOU, I. K., ALBANIS, T. A. Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices. *Journal of Chromatography A*, v. 1152, n. 1-2, p. 70-96, 2007
- [10] PEDERSEN-BJERGAARD, S., RASMUSSEN, K. E. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 817, n. 1, p. 3-12, 2005

- [11] XU, L., BASHEER, C., LEE, H. K. Developments in single-drop microextraction. *Journal of Chromatography A*, v. 1152, n. 1-2, p. 184-192, 2007
- [12] DE LA CALLE, I., PENA-PEREIRA, F., LAVILLA, I., BENDICHO, C. Liquid-phase microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 936, n. p. 12-39, 2016
- [13] ARTHUR, C. L., PAWLISZYN, J. SOLID-PHASE MICROEXTRACTION WITH THERMAL-DESORPTION USING FUSED-SILICA OPTICAL FIBERS. *Analytical Chemistry*, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, 1990
- [14] MEHDINIA, A., AZIZ-ZANJANI, M. O. Advances for sensitive, rapid and selective extraction in different configurations of solid-phase microextraction. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, v. 51, n. p. 13-22, 2013
- [15] ZAITSEV, V. N., ZUI, M. F. Preconcentration by solid-phase microextraction. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 69, n. 8, p. 715-727, 2014
- [16] SPIETELUN, A., MARCINKOWSKI, L., DE LA GUARDIA, M., NAMIESNIK, J. Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry. *Journal of Chromatography A*, v. 1321, n. p. 1-13, 2013
- [17] JIANG, X., WU, M., WU, W., CHENG, J., ZHOU, H., CHENG, M. A novel dispersive micro-solid phase extraction method combined with gas chromatography for analysis of organochlorine pesticides in aqueous samples. *Analytical Methods*, v. 6, n. 24, p. 9712-9717, 2014
- [18] SHIRKHANLOO, H., KHALIGH, A., MOUSAVI, H. Z., RASHIDI, A. Ultrasound assisted-dispersive-micro-solid phase extraction based on bulky amino bimodal mesoporous silica nanoparticles for speciation of trace manganese (II)/(VII) ions in water samples. *Microchemical Journal*, v. 124, n. p. 637-645, 2016
- [19] ABDOLMOHAMMAD-ZADEH, H., TALLEB, Z. Dispersive solid phase micro-extraction of dopamine from human serum using a nano-structured Ni-Al layered double hydroxide, and its direct determination by spectrofluorometry. *Microchimica Acta*, v. 179, n. 1-2, p. 25-32, 2012
- [20] GRIJALBA, A. C., ESCUDERO, L. B., WUILLOUD, R. G. Ionic liquid-assisted multiwalled carbon nanotube-dispersive micro-solid phase extraction for sensitive

determination of inorganic As species in garlic samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 110, n. p. 118-123, 2015

[21] ABDULRA'UF, L. B., SIRHAN, A. Y., TAN, G. H. Recent developments and applications of liquid phase microextraction in fruits and vegetables analysis. *Journal of Separation Science*, v. 35, n. 24, p. 3540-3553, 2012

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

[23] PROSEN, H. Applications of Liquid-Phase Microextraction in the Sample Preparation of Environmental Solid Samples. *Molecules*, v. 19, n. 5, p. 6776-6808, 2014

[24] BELLO-LOPEZ, M. A., RAMOS-PAYAN, M., OCANA-GONZALEZ, J. A., FERNANDEZ-TORRES, R., CALLEJON-MOCHON, M. ANALYTICAL APPLICATIONS OF HOLLOW FIBER LIQUID PHASE MICROEXTRACTION (HF-LPME): A REVIEW. *Analytical Letters*, v. 45, n. 8, p. 804-830, 2012

[25] ANDRUCH, V., BALOGH, I. S., KOCUROVA, L., SANDREJOVA, J. Five Years of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 48, n. 3, p. 161-259, 2013

[26] LEMOS, V. A., FERREIRA, V. J., BARRETO, J. A., MEIRA, L. A. Development of a Method Using Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction for the Determination of Nickel in Water Samples. *Water Air and Soil Pollution*, v. 226, n. 5, p. 2015

[27] LEMOS, V. A., OLIVEIRA, L. A. Ultrasound-assisted temperature-controlled ionic liquid microextraction for the preconcentration and determination of cadmium content in mussel samples. *Food Control*, v. 50, n. p. 901-906, 2015

[28] LEMOS, V. A., VIEIRA, U. S. Single-drop microextraction for the determination of manganese in seafood and water samples. *Microchimica Acta*, v. 180, n. 5-6, p. 501-507, 2013

[29] MENEZES, R. M., OLIVEIRA, R. V., DE OLIVEIRA, D. M., LEMOS, V. A. A Method Using Liquid-Liquid Microextraction in a Dynamic System for Preconcentration

and Determination of Lead in Food Samples. *Water Air and Soil Pollution*, v. 227, n. 5, p. 2016

[30] SANTOS, A. P., LEMOS, V. A. Determination of Vanadium Levels in Seafood Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Optical Sensors. *Water Air and Soil Pollution*, v. 226, n. 3, p. 2015

[31] FERNANDEZ, E., VIDAL, L., COSTA-GARCIA, A., CANALS, A. Mercury determination in urine samples by gold nanostructured screen-printed carbon electrodes after vortex-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction. *Analytica Chimica Acta*, v. 915, n. p. 49-55, 2016

[32] SOYLAK, M., KARACA, M. Vortex-assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Pb (II) as 2-hydroxypyridine-3-carboxylic Acid Chelates From Food and Water Samples Prior to Flame Atomic Absorption Spectrometric Determination. *Atomic Spectroscopy*, v. 37, n. 3, p. 108-113, 2016

[33] ESPINO, M., FERNANDEZ, M. D., GOMEZ, F. J. V., SILVA, M. F. Natural designer solvents for greening analytical chemistry. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, v. 76, n. p. 126-136, 2016

[34] JADHAV, A. H., LIM, A. C., THORAT, G. M., JADHAV, H. S., SEO, J. G. Green solvent ionic liquids: structural directing pioneers for microwave-assisted synthesis of controlled MgO nanostructures. *Rsc Advances*, v. 6, n. 38, p. 31675-31686, 2016

[35] REDDY, A. S., LAALI, K. K. Sonogashira cross-coupling in a designer ionic liquid (IL) without copper, external base, or additive, and with recycling and reuse of the IL. *Tetrahedron Letters*, v. 56, n. 33, p. 4807-4810, 2015

[36] SHAPLOV, A. S., PONKRATOV, D. O., VYGODSKII, Y. S. Poly(ionic liquid)s: Synthesis, properties, and application. *Polym. Sci. Ser. B*, v. 58, n. 2, p. 73-142, 2016

[37] BATRA, D., SEIFERT, S., FIRESTONE, M. A. The effect of cation structure on the mesophase architecture of self-assembled and polymerized imidazolium-based ionic liquids. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 208, n. 13, p. 1416-1427, 2007

[38] HAN, D., TANG, B., LEE, Y. R., ROW, K. H. Application of ionic liquid in liquid phase microextraction technology. *Journal of Separation Science*, v. 35, n. 21, p. 2949-2961, 2012

- [39] TRUJILLO-RODRIGUEZ, M. J., ROCIO-BAUTISTA, P., PINO, V., AFONSO, A. M. Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, v. 51, n. p. 87-106, 2013
- [40] AGUILERA-HERRADOR, E., LUCENA, R., CARDENAS, S., VALCARCEL, M. The roles of ionic liquids in sorptive microextraction techniques. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, v. 29, n. 7, p. 602-616, 2010
- [41] HO, T. D., CANESTRARO, A. J., ANDERSON, J. L. Ionic liquids in solid-phase microextraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 695, n. 1-2, p. 18-43, 2011
- [42] VICKACKAITE, V., PADARAUSKAS, A. Ionic liquids in microextraction techniques. *Central European Journal of Chemistry*, v. 10, n. 3, p. 652-674, 2012
- [43] MARTINIS, E. M., BERTON, P., WUILLOUD, R. G. Ionic liquid-based microextraction techniques for trace-element analysis. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, v. 60, n. p. 54-70, 2014
- [44] STANISZ, E., WERNER, J., ZGOLA-GRZESKOWIAK, A. Liquid-phase microextraction techniques based on ionic liquids for preconcentration and determination of metals. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, v. 61, n. p. 54-66, 2014
- [45] ZHANG, P. J., HU, L., LU, R. H., ZHOU, W. F., GAO, H. X. Application of ionic liquids for liquid-liquid microextraction. *Analytical Methods*, v. 5, n. 20, p. 5376-5385, 2013
- [46] LI, Z. J., CHEN, P. P., YU, C. P., FANG, Y. J., WANG, Z. Y., LI, M., SHAN, H. X. A Novel Temperature-Controlled Ionic Liquid Dispersive Liquid Phase Microextraction for Determination of Dicofol and DDT in Environmental Water Samples Prior to Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Current Analytical Chemistry*, v. 5, n. 4, p. 324-329, 2009
- [47] WANG, R. F., QI, X. J., ZHAO, L., LIU, S. M., GAO, S., MA, X. Y., DENG, Y. Q. Ionic-liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the forensic determination of methamphetamine in human urine. *Journal of Separation Science*, v. 39, n. 13, p. 2444-2450, 2016
- [48] SHA, O., CHEN, J., CHEN, L., LI, S. In situ ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction and determination of Au(III) by flame atomic absorption spectrometry. *Journal of the Iranian Chemical Society*, v. 12, n. 8, p. 1391-1398, 2015

- [49] ASHKENANI, H., TAHER, M. A. Use of ionic liquid in simultaneous microextraction procedure for determination of gold and silver by ETAAS. *Microchemical Journal*, v. 103, n. p. 185-190, 2012
- [50] RANJBAR, L., YAMINI, Y., SALEH, A., SEIDI, S., FARAJI, M. Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction combined with ICP-OES for the determination of trace quantities of cobalt, copper, manganese, nickel and zinc in environmental water samples. *Microchimica Acta*, v. 177, n. 1-2, p. 119-127, 2012
- [51] GUO, X. Q., CHEN, B. B., HE, M., HU, B., ZHOU, X. Q. Ionic liquid based carrier mediated hollow fiber liquid liquid liquid microextraction combined with HPLC-ICP-MS for the speciation of phenylarsenic compounds in chicken and feed samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 28, n. 10, p. 1638-1647, 2013
- [52] GHAREHBAGHI, M., SHEMIRANI, F., BAGHDADI, M. Dispersive liquid-liquid microextraction based on ionic liquid and spectrophotometric determination of mercury in water samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 89, n. 1, p. 21-33, 2009
- [53] SERESHTI, H., ESKANDARPOUR, N., SAMADI, S., ALIAKBARZADEH, G. Investigation on *Dracaena Sanderiana* Phytoremediation Ability for Hg and Cd using Multivariate Optimized Task Specific Ionic liquid-based Dispersive liquid-liquid Microextraction. *International Journal of Environmental Research*, v. 8, n. 4, p. 1075-1084, 2014
- [54] STANISZ, E., WERNER, J., MATUSIEWICZ, H. Mercury species determination by task specific ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with cold vapour generation atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 110, n. p. 28-35, 2013
- [55] PENA-PEREIRA, F., LAVILLA, I., BENDICHO, C., VIDAL, L., CANALS, A. Speciation of mercury by ionic liquid-based single-drop microextraction combined with high-performance liquid chromatography-photodiode array detection. *Talanta*, v. 78, n. 2, p. 537-541, 2009
- [56] MARTINIS, E. M., WUILLOUD, R. G. Cold vapor ionic liquid-assisted headspace single-drop microextraction: A novel preconcentration technique for mercury species determination in complex matrix samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 25, n. 9, p. 1432-1439, 2010

- [57] ZENG, C. J., LI, M. S., XIE, Q. J., YAN, H. X., ZHANG, X. UV-Vis Spectrophotometric Determination of Mercury Based on Room Temperature Ionic Liquids Enhanced Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction. *Spectroscopy Letters*, v. 48, n. 9, p. 653-659, 2015
- [58] WANG, Z. H., XU, Q. Z., LI, S. Y., LUAN, L. Y., LI, J., ZHANG, S. X., DONG, H. H. Hollow fiber supported ionic liquid membrane microextraction for speciation of mercury by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Methods*, v. 7, n. 3, p. 1140-1146, 2015
- [59] SHIRKHANLOO, H., KHALIGH, A., MOUSAVI, H. Z., ESKANDARI, M. M., MIRAN-BEIGI, A. A. Ultra-trace arsenic and mercury speciation and determination in blood samples by ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction combined with flow injection-hydride generation/cold vapor atomic absorption spectroscopy. *Chemical Papers*, v. 69, n. 6, p. 779-790, 2015
- [60] SONG, X. X., YE, M. D., TANG, X. J., WANG, C. J. Ionic liquids dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC-atomic fluorescence spectrometric determination of mercury species in environmental waters. *Journal of Separation Science*, v. 36, n. 2, p. 414-420, 2013
- [61] JIA, X. Y., HAN, Y., WEI, C., DUAN, T. C., CHEN, H. T. Speciation of mercury in liquid cosmetic samples by ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 26, n. 7, p. 1380-1386, 2011
- [62] GAO, Z. B., MA, X. G. Speciation analysis of mercury in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v. 702, n. 1, p. 50-55, 2011
- [63] WANG, X. W., CHEN, S. Use of Ionic Liquid 1-Octyl-3-methylimidazolium Hexafluorophosphate as a Recyclable Solvent for Extraction/Removal of Hg(II) from Water. *Acta Chimica Sinica*, v. 72, n. 11, p. 1147-1151, 2014
- [64] BAGHDADI, M., SHEMIRANI, F. Cold-induced aggregation microextraction: A novel sample preparation technique based on ionic liquids. *Analytica Chimica Acta*, v. 613, n. 1, p. 56-63, 2008

- [65] AMDE, M., LIU, J. F., TAN, Z. Q., BEKANA, D. Ionic liquid-based zinc oxide nanofluid for vortex assisted liquid liquid microextraction of inorganic mercury in environmental waters prior to cold vapor atomic fluorescence spectroscopic detection. *Talanta*, v. 149, n. p. 341-346, 2016
- [66] LENG, G., CHEN, W. J., WANG, Y. Speciation analysis of mercury in sediments using ionic-liquid-based vortex-assisted liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography and cold vapor atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Separation Science*, v. 38, n. 15, p. 2684-2691, 2015
- [67] SHIRKHANLOO, H., GOLBABAEI, F., HASSANI, H., EFTEKHAR, F., KIAN, M. J. Occupational Exposure to Mercury: Air Exposure Assessment and Biological Monitoring based on Dispersive Ionic Liquid-Liquid Microextraction. *Iranian Journal of Public Health*, v. 43, n. 6, p. 793-799, 2014
- [68] MARTINIS, E. M., BERTON, P., OLSINA, R. A., ALTAMIRANO, J. C., WUILLOUD, R. G. Trace mercury determination in drinking and natural water samples by room temperature ionic liquid based-preconcentration and flow injection-cold vapor atomic absorption spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*, v. 167, n. 1-3, p. 475-481, 2009
- [69] BAGHDADI, M., SHEMIRANI, F. In situ solvent formation microextraction based on ionic liquids: A novel sample preparation technique for determination of inorganic species in saline solutions. *Analytica Chimica Acta*, v. 634, n. 2, p. 186-191, 2009
- [70] FERNANDEZ, E., VIDAL, L., MARTIN-YERGA, D., BLANCO, M. D., CANALS, A., COSTA-GARCIA, A. Screen-printed electrode based electrochemical detector coupled with ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction and microvolume back-extraction for determination of mercury in water samples. *Talanta*, v. 135, n. p. 34-40, 2015
- [71] STANISZ, E., WERNER, J., MATUSIEWICZ, H. Task specific ionic liquid-coated PTFE tube for solid-phase microextraction prior to chemical and photo-induced mercury cold vapour generation. *Microchemical Journal*, v. 114, n. p. 229-237, 2014
- [72] SHIRKHANLOO, H., KHALIGH, A., MOUSAVI, H. Z., RASHIDI, A. Ultrasound assisted-dispersive-ionic liquid-micro-solid phase extraction based on carboxyl-functionalized nanoporous graphene for speciation and determination of trace inorganic



and organic mercury species in water and caprine blood samples. *Microchemical Journal*, v. 130, n. p. 245-254, 2017

[73] FERREIRA, S. L., LEMOS, V. A., DE CARVALHO, V. S., DA SILVA, E. G., QUEIROZ, A. F., FELIX, C. S., DA SILVA, D. L., DOURADO, G. B., OLIVEIRA, R. V. Multivariate optimization techniques in analytical chemistry-an overview. *Microchemical Journal*, v. n. p. 2018

[74] TARLEY, C. R. T., SILVEIRA, G., DOS SANTOS, W. N. L., MATOS, G. D., DA SILVA, E. G. P., BEZERRA, M. A., MIRÓ, M., FERREIRA, S. L. C. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. *Microchemical Journal*, v. 92, n. 1, p. 58-67, 2009

[75] FERREIRA, S. L., LEMOS, V. A., SILVA, L. O., QUEIROZ, A. F., SOUZA, A. S., DA SILVA, E. G., DOS SANTOS, W. N., DAS VIRGENS, C. F. Analytical strategies of sample preparation for the determination of mercury in food matrices—a review. *Microchemical Journal*, v. 121, n. p. 227-236, 2015