



Emprego da microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME) para posterior determinação de Cd e Pb em manteiga de cacau por FAAS: uma abordagem verde para preparo de amostras

Use of reverse phase dispersive liquid-liquid microextraction (RP-DLLME) for further determination of Cd and Pb in cocoa butter by FAAS: a green approach to preparation of sample

Lenine Demarchi*, Eder Lisandro De Moraes Flores[†],
Murilo Oliveira Beato[‡] Oldair Donizeti Leite[§], Cristiane Canan[¶],
Daneysa Lahis Kalshne[‡]

RESUMO

A manteiga de cacau é a gordura natural da semente do cacau, geralmente sólida à temperatura ambiente. Matéria prima indispensável na produção de chocolate e também muito utilizada na indústria farmacêutica. Entretanto, na manteiga de cacau podem ocorrer teores elevados de cádmio e chumbo. Isso ocorre principalmente pela contaminação dos solos, geralmente solos vulcânicos podem conter altos níveis de Cd, onde é feito o plantio do cacau. Algumas metodologias têm sido utilizadas recentemente, entre elas a possibilidade de usar RP-DLLME para gorduras sólidas, como a manteiga de cacau, o que representa um avanço no preparo de amostras, uma vez que o lipídio é considerado uma matriz complexa de decompor, por possuir várias limitações, por exemplo, impedir a solidificação das amostras durante o preparo para análise. Este trabalho propõe um método alternativo de preparo de amostras empregando a micro extração dispersiva líquido - líquido em fase reversa (RP – DLLME) para a posterior determinação em Cd e Pb por espectrometria de absorção em chama (F AAS). O procedimento por RP-DLLME foi ajustado, utilizando 5 g de amostra, aquecimento em banho a 60 °C por 20 min, injeção da solução extratora, contendo 70% de agente dispersor (n-propanol) e 30% de agente extrator (HNO₃ 1,0 mol L⁻¹, v/v), seguido da agitação mecânica em vortex por 1 minuto e centrifugação por 10 min a 6000 RPM. Com relação aos métodos tradicionais para determinação de metais em amostras de matrizes lipídicas, o método proposto para a determinação de Cd e Pb em manteiga de cacau neste trabalho diferiu por simplicidade, rapidez, uso de baixas concentrações de reagentes, para atender os princípios analíticos da química verde.

Palavras-chave: Manteiga de cacau, RP-DLLME, F AAS, Química Verde.

ABSTRACT

Cocoa butter is the natural fat of the cocoa seed, usually solid at room temperature. Indispensable raw material in the production of chocolate and also widely used in the pharmaceutical industry. However, cocoa butter can contain high levels of cadmium and lead. This is mainly due to soil contamination, usually volcanic soils can contain high levels of Cd, where cacao is planted. Some methodologies have been used recently, including the possibility of using RP-DLLME for solid fats, such as cocoa butter, which represents an advance in sample preparation, since the lipid is considered a complex

<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2021>

1

* Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; leninedemarchi@hotmail.com

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira; eder@utfpr.edu.br

[‡] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; murilooliveirabeato@gmail.com

[§] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; oldairleite@utfpr.edu.br

[¶] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; cristianecanan@gmail.com

[‡] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; daneysa@hotmail.com



matrix to decompose, for have several limitations, for example, preventing the solidification of samples during preparation for analysis. This work proposes an alternative method of sample preparation employing reversed phase liquid-liquid micro dispersive extraction (RP – DLLME) for subsequent determination in Cd and Pb by flame absorption spectrometry (F AAS). The RP-DLLME procedure was adjusted, using 5 g of sample, heating in a bath at 60 °C for 20 min, injection of the extracting solution, containing 70% of dispersing agent (n-propanol) and 30% of extracting agent (HNO₃ 1.0 mol L⁻¹, v/v), followed by mechanical vortexing for 1 minute and centrifugation for 10 min at 6000 RPM. Regarding traditional methods for determination of metals in samples of lipid matrices, the method proposed for the determination of Cd and Pb in cocoa butter in this work differed by simplicity, speed, use of low concentrations of reagents, to meet the analytical principles of green chemistry.

Keywords: Cocoa butter, RP-DLLME, F AAS, Green chemistry.

1 INTRODUÇÃO

Além de ser um ingrediente indispensável na fabricação de chocolate, a manteiga de cacau é muito usada em formulações cosméticas e dermatológicas. Possui propriedades hidratantes e emolientes, portanto é um excelente hidratante, é facilmente absorvida pela pele, atingindo as camadas mais profundas. Assim, a manteiga de cacau é usada na fabricação de cremes e loções hidratantes e sabões como xampus e sabonetes, tendo também espaço na indústria farmacêutica (RAMOS E OLIVEIRA, 2010).

Entretanto, na manteiga de cacau podem ocorrer teores elevados de cádmio e chumbo. Isso ocorre principalmente pela contaminação dos solos, geralmente solos vulcânicos podem conter altos níveis de Cd, onde é feito o plantio do cacau. A ingestão de pequenas quantidades é quase inevitável, porém não tem efeitos negativos no momento da ingestão, entretanto os metais pesados têm toxicidade cumulativa, que pode significar sérios danos à saúde humana, sendo os principais efeitos cólicas abdominais, dores de cabeça, vômitos. A longo prazo, a exposição ao cádmio pode produzir danos renais.

Como extrair e detectar esses metais, Cd e Pb, de forma fácil e rápida, sem altos custos e com alta eficiência? As técnicas de micro extração surgiram como métodos alternativos, por possibilitar o uso de quantidades superiores a 3,0 g de massa de amostra (SILVA, 2011), o que facilita a detecção de concentrações vestigiais e baixo consumo de reagentes, tornando-o um método menos tóxico. Estas técnicas estão sendo renovadas constantemente, e com isso superando desvantagens e oferecendo novas vantagens, como preparo de amostras mais verdes, mais rápidos, mais baratos, mais fáceis, com redução do consumo de reagentes e solventes (SHISHOV), estando de acordo com os princípios da química verde.

A ideia da química verde tem suas raízes no desenvolvimento sustentável, com o objetivo de tornar as práticas de laboratório mais amigáveis ao meio ambiente. O desenvolvimento de instrumentação e metodologias vem sendo amplamente estudado, bem como a dedicação para reduzir o impacto negativo dos produtos químicos no meio ambiente e possibilitar a implementação de princípios de desenvolvimento sustentável para laboratórios analíticos (GAŁUSZKA, 2013).

São listados na literatura 12 princípios da química analítica verde, sendo no presente trabalho citados o tratamento da amostra, miniaturização do processo, diminuição dos reagentes e consequentemente menor geração de resíduos, economia de átomos e menor riscos ao operador.

Sendo assim, neste trabalho é proposto a Micro extração Líquido-Líquido Dispersiva em Fase Reversa para o preparo de amostras de forma simples, rápida e verde visando a determinação de Cd e Pb em manteiga de cacau por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS).

2 METODOLOGIA

A determinação de Cd e Pb em manteiga de cacau foi executada utilizando um espectrômetro de absorção atômica (Varian, modelo aa 240FS, Austrália) com chama de acetileno e ar comprimido.

* Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; leninedemarchi@hotmail.com

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira; eder@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; murilooliveirabeato@gmail.com

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; oldairleite@utfpr.edu.br

¶ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; cristianecanan@gmail.com

⌚ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; daneysa@hotmail.com



2.1 Amostras

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizadas amostras comerciais de manteiga de cacau, adquiridas pela internet em uma indústria de produtos de chocolate localizada em Santa Cruz do Rio Pardo – SP, as amostras foram acondicionadas em um refrigerador (4 °C) afim de manter suas propriedades e só retiradas de refrigeração no momento em que se inicia o processo de preparo de amostras para posterior determinação.

Após a pesagem das amostras em balança analítica, em frascos de polipropileno (15 ml) previamente descontaminados, adicionou-se quantidades específicas do padrão mono-elementar de óleo mineral, com os analitos Cd e Pb. As amostras foram preparadas de modo que a concentração fosse de 0,5 mg/g dos analitos para os ensaios de recuperação, para assim avaliar a exatidão e a precisão do método mediante a adição e recuperação dos analitos em amostras. A homogeneização da amostra e padrão foi realizada por meio de agitação mecânica intensa por 1 minuto por meio de vortex. Todos os frascos foram identificados com nome, data e concentração dos analitos. Com o intuito de minimizar possíveis erros realizou-se o procedimento de adição de analitos diariamente.

2.2 Avaliação do solvente dispersor

Para solvente dispersor estudou-se a melhor eficiência do isopropanol e n-propanol na recuperação do analito. A proporção de agente dispersor em relação ao extrator foi ajustada. A fase contendo a solução de solvente dispersor e extrator foi avaliada em diferentes proporções que variaram em 20, 30 e 40% de agente dispersor em relação ao volume total da mistura.

2.3 Concentração do solvente extrator

Avaliou-se o uso de HNO₃ como agente mediante a sua eficiência na recuperação dos analitos. Foram realizados estudos experimentais referentes às concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mol L⁻¹ de extrator.

2.4 Volume de Solução Extratora

Para avaliar a quantidade necessária de solução extratora utilizada na RP-DLLME ajustou-se nas quantidades de 100, 250, 500, 1000 e 1500 µL com o objetivo de utilizar o mínimo de reagente possível.

2.5 Procedimento de RP-DLLME proposto para Cd e Pb em manteiga de cacau

Foram pesados 5,0 g de amostra de manteiga de cacau em tubos de polipropileno do tipo Falcon com capacidade de 15 mL, em seguida as amostras foram submetidas a aquecimento no banho-maria por aproximadamente 20 min a 60 °C, posteriormente adicionou-se xileno e por fim adicionou-se 1,0 mL da solução solvente dispersor e extrator e realizou-se agitação das amostras no vortex por 1 minuto, para a dispersão e contato da mistura dispersor e extrator com o analito. Após, as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 min a 5600 g em a 40 °C. Após a centrifugação, com auxílio de uma pipeta, retirou-se parte da amostra orgânica para facilitar a retirada da fase aquosa, sendo que esta última foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 15 mL e aferida com uma solução de HNO₃ a 0,5% (v/v) e encaminhada para a determinação por F AAS. Esses ensaios de recuperação foram realizados com o intuito de estimar o percentual de recuperação dos analitos nas amostras investigadas. Os cálculos referentes a esses ensaios foram efetuados a partir da equação 1.

$$\text{Recuperação em \%} = \frac{c_1 - c_2}{c_3} \times 100$$

Onde:

C1 é a concentração final da amostra com adição do analito,

C2 é a concentração pré-existente na amostra antes da adição do analito,

* Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; leninedemarchi@hotmail.com

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira; eder@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; murilooliveirabeato@gmail.com

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; oldairleite@utfpr.edu.br

¶ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; cristianecanan@gmail.com

⌚ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; daneysa@hotmail.com



C3 é o valor de analito adicionado na amostra.

Testes de recuperação foram aplicados para todas as amostras estudadas e os respectivos ensaios realizados em triplicatas. A eficiência e desempenho do método foram conduzidos de forma a garantir a exatidão e precisão do mesmo.

3 RESULTADOS

Para o desenvolvimento de um método eficiente é necessário à avaliação das condições experimentais que afetam a extração dos analitos. Portanto, inicialmente foi determinado o parâmetro massa/volume (m/v) do solvente xileno para evitar a solidificação da manteiga durante o procedimento. Determinou-se com esse teste que o tubo contendo 5,0 g de amostra e 5,0 ml de xileno foi o parâmetro que apresentou o melhor resultado.

3.1 Avaliação do solvente dispersor

Para determinação da proporção da solução dispersora/extratora foram realizados teste de recuperação com a mistura n-propanol/HNO₃ (v/v) a proporções 80:20, 70:30 e 60:40. Verificou-se os valores de recuperação de Cd e Pb, sendo a proporção 70:30 (v/v) considerada como mais adequada para determinação dos metais, possibilitando sua aplicação em todos os experimentos seguintes.

Para a determinação do solvente dispersor foram analisados o isopropanol e n-propanol por mistura com HNO₃ diluído, com o objetivo de classificar o agente dispersor que promovesse interação rápida e eficiente entre a amostra e o extrator. Esses solventes foram selecionados com base nas características compatíveis com as recomendadas pelo procedimento de RP-DLLME, sendo elas a temperatura de ebulição e sua miscibilidade na amostra orgânica e no solvente extrator (LOURENÇO, 2016), para que ocorra uma eficiente dispersão do solvente extrator na amostra e conseqüentemente a extração dos analitos. Determinou-se, portanto, que o isopropanol teve melhores resultados e foi utilizado nos testes seguintes.

3.2 Concentração de HNO₃ na fase extratora

A avaliação da influência da concentração de HNO₃ foi realizada levando em consideração que uma melhor extração ocorre com volume e concentração otimizados. O volume da fase extratora foi fixado 30% (v/v) com a proporção da fase dispersora. Desta forma, foram realizados ensaios de recuperação para identificar a melhor concentração de HNO₃, para uma extração eficiente dos analitos da amostra. O procedimento de RP-DLLME foi avaliado em diferentes concentrações de HNO₃.

Definiu-se como a melhor concentração o de solução de HNO₃ para que ocorra a extração eficiente dos analitos da fase da amostra. Para os ensaios posteriores foram fixados os valores de 3,0 mol L⁻¹ para Pb e 2,0 mol L⁻¹ para Cd.

3.3 Volume da solução dispersor/extrator

A influência da solução dispersor/extrator na extração dos analitos foi avaliada com o objetivo de propiciar ao processo de preparo de amostra maior exatidão na recuperação, bem como garantir a quantidade apropriada dos solventes, para a realização de uma extração considerada mais eficiente e mais verde, sem o uso excessivo de reagentes.

Os volumes de solução avaliados foram de 100, 250, 500, 750, 1000 e 1500 µL. As amostras foram submetidas à agitação no vortex por 1 minuto e posteriormente levadas a centrifugação a 5600 g por 10 min. Determinou-se como melhor condição 1000 µL da mistura de solução, pois obteve os melhores resultados.

3.4 Condições para aplicação de RP-DLLME em manteiga de cacau

Mediante todos os ensaios desenvolvidos, ficaram definidas as condições consideradas ideais para a aplicação do procedimento de RP-DLLME em amostras de manteiga de cacau para posterior determinação de

* Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; leninedemarchi@hotmail.com

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira; eder@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; murilooliveirabeato@gmail.com

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; oldairleite@utfpr.edu.br

¶ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; cristianecanan@gmail.com

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; daneysa@hotmail.com



Cd e Pb. Dentre os parâmetros avaliados, as melhores condições estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros definidos para RP- DLLME de Manteiga de Cacau para Determinação de Chumbo e Cádmio

Parâmetro	Condição
Proporção de Dispersor/Extrator	70:30 (v/v)
Dispersor	n-Propanol - 700µL
Extrator	HNO ₃ , 2,0 mol.L ⁻¹ -300µL
Temperatura de Extração	60 °C
Volume de dispersor/extrator	1000 µL
Massa da Amostra	5,00 gramas
Centrifugação	10 minutos, 6000 RPM

Fonte: autoria própria, 2021

A frequência analítica para o método proposto é de 12 amostras por hora, desde sua pesagem até a sua análise, uma vez que a Centrífuga utilizada comporta apenas 12 tubos de 15 mL e isso acaba se tornando um fator preponderante e limitador para a determinar a frequência, entretanto ainda assim o método proposto tem uma alta frequência devido ao preparo de amostras por RP-DLLME ser um processo de rápida execução.

Para avaliar a calibração e a faixa linear, a calibração foi feita de maneira externa com a utilização de padrões multielementares e com concentrações variadas. As soluções padrões foram preparadas com água ultrapura HNO₃ 0,5% v/v. Todos os valores da faixa linear foram detectados no equipamento por sinal de absorvância e relacionados com a concentração dos analito e por fim criando a curva de calibração e representada pelo coeficiente de correlação linear (R²), conforme tabela 2.

Tabela 2 - Coeficiente de Correlação Linear, Equação da reta e faixa linear para Pb eCd.

Analito	Equação da reta	R ² *	Faixa linear, mg.L ⁻¹
Pb	Y=0,015x+0,0005	0,9968	0,1 - 2,0

* Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; leninedemarchi@hotmail.com

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira; eder@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; murilooliveirabeato@gmail.com

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; oldairleite@utfpr.edu.br

¶ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; cristianecanan@gmail.com

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; daneysa@hotmail.com



Cd $Y=0,39x+0,0334$ 0,9814 0,1 - 2,0

Fonte: Autoria própria, 2021

4 CONCLUSÕES

Tanto com as amostras com adição de analitos quanto para as amostras sem adição, o método se mostrou eficaz e exato, tornando uma proposta viável para a determinação destes metais.

No decorrer do desenvolvimento do método analítico proposto, é caracterizado pela simplicidade, rapidez, uso de baixas concentrações de reagentes (HNO_3), afim de estar de acordo os princípios da Química Verde, pois reduz o consumo de reagentes, solventes e amostras, conseqüentemente, reduzindo a geração de resíduos.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Fundação Araucária que proporcionou uma bolsa de iniciação científica para este projeto. Ao professor Dr. Eder Flores pela orientação, para que eu pudesse chegar ao final deste projeto. Aos meus pais e amigos pela compreensão que a dedicação pelo saber científico demanda tempo que as vezes devemos sacrificar, mas que ao final compensa.

REFERÊNCIAS

GALUSZKA, A; MIGASZEWSKI, Z; E NAMIESNIK, J.; **The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices**, TrAC Trends in Analytical Chemistry, vol. 50, 2013.

LOURENÇO, E. C. **Desenvolvimento de métodos empregando micro extração líquido-líquido dispersiva em fase reversa para determinação de Na, K, Ca e Mg em biodiesel**. Medianeira – PR, 2016. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.

RAMOS, M; OLIVEIRA, M. C.; **Estudo da Solubilidade em Etanol e Extração Alcoólica da Manteiga de Cacau**. São Paulo - SP, 2010.

SHISHOV, A.; TRUFANOV, I.; NECHAEVA, D.; BULATOV, A. **A reversed-phase air-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with colorimetric paper-based anal**

SILVA, I. F. **Enterobactérias na cadeia produtiva do cacau ao chocolate**, Campinas, 2011.

WENDT, J. F. DE B. **Emprego da microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME) para posterior determinação de Cu e Fe em óleos isolantes por FAAS: uma abordagem verde para preparo de amostras**. Medianeira – UTFPR, 2021.

* Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; leninedemarchi@hotmail.com

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira; eder@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; murilooliveirabeato@gmail.com

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; oldairleite@utfpr.edu.br

¶ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; cristianecanan@gmail.com

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; daneysa@hotmail.com