

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ROSELEIA DA SILVA RODRIGUES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO COLORIMÉTRICO PARA
DETERMINAÇÃO DE FERRO EM AZEITE DE OLIVA UTILIZANDO FRASCO
ÚNICO**

MEDIANEIRA

2023

ROSELEIA DA SILVA RODRIGUES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO COLORIMÉTRICO PARA
DETERMINAÇÃO DE FERRO EM AZEITE DE OLIVA UTILIZANDO FRASCO
ÚNICO**

**Development of an analytical method for the determination of iron in olive oil
by digital image using a single vial**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentada como requisito para obtenção do título
de Licenciada em Química da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador (a): Prof. Dr. Éder Lisandro de Moraes
Flores.

MEDIANEIRA

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao (s) autor (es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

ROSELEIA DA SILVA RODRIGUES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO COLORIMÉTRICO PARA
DETERMINAÇÃO DE FERRO EM AZEITE DE OLIVA UTILIZANDO FRASCO
ÚNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Licenciada em Química da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 05 de dezembro de 2023

Éder Lisandro de Moraes Flores
Doutor em Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Marcos André Bechlin
Doutor em Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Oldair Donizete Leite
Doutor em Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

MEDIANEIRA

2023

Ao dono de toda ciência, sabedoria e poder... porque Dele, por Ele, e para Ele são todas as coisas, a Ele seja a glória, eternamente, amém.
Romanos 11:36

AGRADECIMENTOS

Dos muitos momentos vividos nesses anos, posso afirmar que tudo só foi possível por que o meu Deus, meu melhor amigo, foi meu suporte em todos os momentos, por isso a Ele agradeço em primeiro lugar.

Agradeço ao Prof. Dr. Éder L. de Moraes Flores, que foi meu orientador, e que me permitiu crescer profissionalmente.

A CEANMED pela disponibilização dos equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

A família, colegas e amigos, que estiveram ao meu lado nesses anos.

RESUMO

No presente trabalho foi desenvolvido um método para a determinação de ferro em amostras de azeite de oliva. O preparo da amostra, por microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa, (do inglês, reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction – RP-DLLME), e a detecção por imagem digital, foi realizado empregando o conceito de análise em frasco único. A reação colorimétrica do Ferro (Fe) com tiocianato de amônio (SCN) em meio ácido foi empregada nos estudos de otimização do procedimento e determinação de ferro nas amostras de azeite. Os seguintes parâmetros do procedimento, envolvendo as etapas de preparo e detecção foram avaliados: diferentes solventes orgânicos como agente dispersor, a acidez do meio reacional, relação/proporção entre a solução dos solventes dispersor/extrator, concentração do íon SCN⁻, o tempo de agitação e o tempo de centrifugação. Após o ajuste das variáveis da etapa de preparo da amostra e detecção, foram estabelecidos os seguintes valores: LQ= 1,13 mg L⁻¹, e obtendo 99,9% de recuperação de analito. O método desenvolvido mostrou-se adequado na determinação de ferro em amostras comerciais de azeite de oliva, e como principais características destaca-se como de baixo custo, de simples de operação, emprego de um único frasco para as etapas de preparo de amostra e determinação de Fe³⁺, com foco nos princípios da química analítica verde.

Palavras-chave: RP-DLLME; ferro; imagens digitais; azeite.

ABSTRACT

In this work, a method was developed for the determination of iron in olive oil samples. The sample preparation, by reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction (RP-DLLME), and the detection by digital imaging, was carried out using the single-flask analysis concept. The colorimetric reaction of iron (Fe) with ammonium thiocyanate (SCN) in acidic medium was used in the studies to optimize the procedure and to determine iron in olive oil samples. The following parameters of the procedure, involving the preparation and detection steps, were evaluated: different organic solvents as dispersing agent, acidity of the reaction medium, ratio/proportion between the dispersing/extracting solvent solution, concentration of the SCN⁻ ion, agitation time and centrifugation time. After adjusting the variables of the sample preparation and detection step, the following values were established: LQ = 1.13 mg L⁻¹, and obtaining 99.9% of analyte recovery. The developed method was shown to be adequate for the determination of iron in commercial olive oil samples, and as main features it stands out as low-cost, simple to operate, using a single flask for the sample preparation and determination steps of Fe³⁺, with focus on the principles of green analytical chemistry.

Keywords: RP-DLLME; iron; digital images; olive oil.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo geral	11
2.1.1	Objetivos específicos.....	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	Azeite de oliva	12
3.1.1	Contaminantes metálicos e a oxidação lipídica	15
3.1.2	Métodos de preparo de amostras oleosas para determinação de metais.....	15
3.1.3	Microextração dispersive líquido-líquido em fase reversa	17
3.1.4	Análise por imagem digital	20
3.1.5	A química analítica verde aplicada aos métodos de preparo de amostra.....	23
4	METODOLOGIA	25
4.1	Instrumentos e equipamentos	25
4.1.1	Preparo de amostra	25
4.1.2	Procedimento metodológico para determinação de parâmetros	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1.1	Influência do tipo de dispersor em diferentes proporções em relação ao extrator.....	27
5.1.2	Influência do pH da solução extratora	28
5.1.3	Influência da concentração do agente extrator.....	29
5.1.4	Influência do tempo agitação manual	29
5.1.5	Influência do tempo de centrifugação.....	30
5.1.6	Configuração da curva analítica	32
6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	35
7	CONCLUSÕES	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Obtido a partir da maceração do fruto da oliveira, o azeite de oliva é composto por ácidos graxos que possuem grande valor nutricional, trazem inúmeros benefícios para a saúde, e tem sido identificado como um importante aliado na prevenção e tratamento de doenças, como distúrbios nos sistemas cardiovascular e nervoso, auxiliando também na regulação da imunidade, entre outros (GORZYNIK-DEBICKA, 2018).

Além disso, o crescente consumo desse produto, tem movimentado as importações nos últimos anos, impactando na economia do país, e direcionando o mercado interno para o plantio de oliveiras e produção de azeite. Sendo assim, necessário o desenvolvimento de parâmetros para a quantificação de possíveis contaminantes, entre eles, os contaminantes metálicos, que tem grande relevância, e que podem ser facilmente encontrados, já que existem vários meios de propagação na natureza pelos poluentes, e até na forma de obtenção do azeite (MAPA, 2012; OIC, 2023).

Dentre esta classe de contaminantes destaca-se o ferro, que é essencial para o desenvolvimento do ser humano desde a formação fetal. Porém, a presença desse metal pode depreciar o azeite causando a oxidação, perda nutricional e a aquisição de características rançosas (SOUZA, 2018; SANTOS, 2022).

Portanto, identificar e quantificar esse metal é de extrema necessidade. Para isso utilizou-se o método de microextração líquido-líquido em fase reversa (RP-DLLME), muito empregado em extrações de metais, inclusive o ferro. Esse método se caracteriza por extrair o analito de interesse de forma segura e precisa, movendo-o para a fase aquosa e já o qualificando quanto a sua natureza (LANÇAS, 2009). Sequencialmente, a partir da análise de imagens em um sistema de coleta e leitura que utiliza os canais RGB (Red, Green, Blue), quantificou-se o ferro existente em amostras que continham o analito em concentrações conhecidas (NUNES *et al.*, 2021; ABUGHRIN *et al.*, 2022; MONOGAROVA, 2018).

Observando a importância econômica e nutricional da matriz, objetivou-se aqui desenvolver um método simples, de baixo custo e confiável, de acordo com os princípios da química analítica verde, para determinação do ferro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um método analítico de baixo custo para determinação de ferro em amostras de azeite de oliva, empregando o conceito de análise em frasco único (preparo e a determinação do analito).

2.1.1 Objetivos específicos

a) Ajustar os parâmetros envolvidos no preparo da amostra por RP-DLLME tais como: pH, temperatura de extração, tempo de centrifugação, e concentração de agente colorimétrico complexante;

b) Validar parcialmente o método;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Azeite de oliva

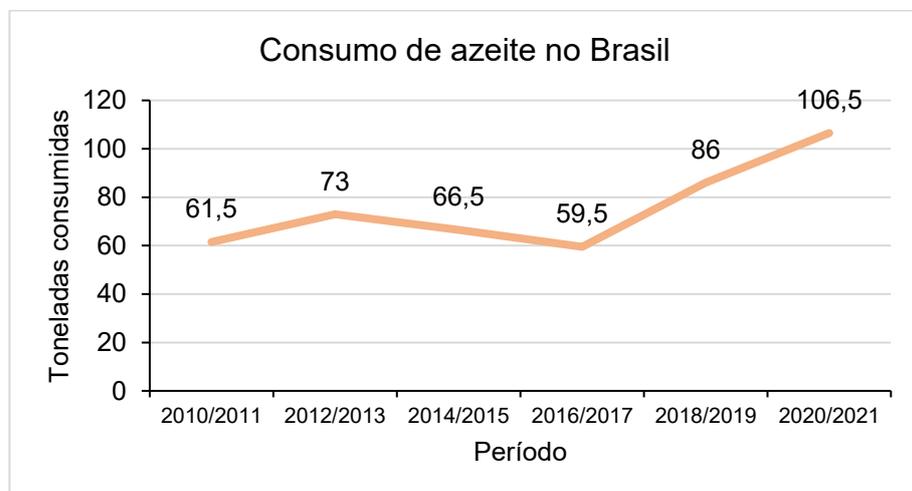
Os ácidos graxos são moléculas orgânicas formadas por cadeias de carbono e hidrogênio com uma extremidade ácida. Eles são essenciais para a estrutura das células, auxiliando na regulação imunológica, na produção energética do corpo, tem atividade anti-inflamatória, retardam o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e distúrbios do sistema nervoso (GORZYNIK-DEBICKA *et al.*, 2018). Além disso, o consumo de azeite de oliva tem sido associado a um melhor controle dos níveis de açúcar no sangue em indivíduos com diabetes tipo 2 (SCHWINGSHACKL; HOFFMANN, 2014).

Os ácidos graxos podem ser classificados como saturados, insaturados e poli-insaturados, dependendo da presença de ligações duplas entre os átomos de carbono em suas cadeias (MOREIRA; CURY; MANCINI FILHO, 2002).

Essa gordura vegetal é rica em ácido oleico, contendo cerca de 83% do total, contém também outros ácidos graxos como o ácido linoleico, ácido esteárico, e ácido palmítico (GORZYNIK-DEBICKA *et al.*, 2018), e é essa rica constituição que o torna um componente importante para a dieta amplamente consumida em todo o mundo.

No Brasil, nos últimos anos, houve aumento no consumo, que é validado pelo aumento de importação, conforme pode ser observado na figura 2, que contém os dados do International Olive Council (OIC). - (Conselho Internacional Oleícola).

Figura 2 - Consumo de azeite de oliva no Brasil nos últimos anos



Fonte: Adaptado de dados coletados no International Olive Council (OIC) (2023).

A maior parte do azeite de oliva consumido no Brasil é importado, principalmente de Portugal (IOC, 2023). Contudo, o aumento do consumo culminou no aumento da produção interna, houve então a necessidade de estabelecer critérios para comercialização. Assim, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2012) determinou em 2012, por meio da Instrução Normativa nº1, as características físico-químicas, que conceituam e qualificam os diferentes tipos de azeites, como é mostrado no quadro 1.

Para o azeite de oliva, deve-se considerar características tais como seu nível de acidez, que expressa a concentração de ácidos graxos, as propriedades sensoriais, o método de extração, que deve ser unicamente físico e não deve utilizar nenhum tipo de solvente. O uso de solventes necessita de uma etapa de refino que remove, além das impurezas, vitaminas e polifenóis, o que classifica esse óleo como refinado (MAPA, 2012).

Avalia-se, ainda, o grau de insaturação dos ácidos graxos presentes, pela quantificação de iodo absorvido, e a verificação da existência e quantificação de peróxidos, que seria o resultado da oxidação dos ácidos graxos, que são o produto de interesse (MAPA, 2012).

A oxidação lipídica é um parâmetro de grande relevância, já que os ácidos graxos insaturados são sensíveis podendo degradar-se quando exposto a alterações de temperatura, exposição ao oxigênio, também catalisada por enzimas, ou ainda pela presença de contaminantes de caráter metálico e os próprios peróxidos (SOUZA, 2018; LUO; HUANG; MITCHELL, 2022).

Quadro 1- Caracterização e qualificação de óleos derivados de azeitonas

Característica	Tipo de azeite				
	Extra virgem	Virgem	Lampante	Azeite de oliva	Azeite refinado
Acidez livre (%)	≤ 0,80	≤ 2,00	>2,00	≤ 1,00	≤ 0,30
Índice peróxidos (mEq.kg ⁻¹)	≤ 20,00		*	≤ 15,00	≤ 5,00
Índice ácidos graxos(mg.kg ⁻¹)	75-150	*	*	*	*
Índice de Iodo (Wijs)	75-94				
Teor de Fe (mg.kg ⁻¹)	≤ 3				
Teor de cobre (mg.kg ⁻¹)	≤ 0,1				
Teor de chumbo (mg.kg ⁻¹)	< 0,1				

Fonte: Adaptação de dados coletados da IN nº 1 de 30 de janeiro (2012).

Por isso, a presença de metais deve ser observada e controlada, a normativa do MAPA (2012) inclui valores máximos para alguns destes contaminantes, dentre eles o Fe, chumbo (Pb) e cobre (Cu). A maioria dos metais são altamente nocivos para o organismo humano, mas alguns possuem caráter ambíguo, ou seja, são essenciais para o bom funcionamento do organismo em determinadas concentrações, porém sua ingestão deve ser controlada para evitar o acúmulo no organismo.

Na literatura encontram-se estudos que relatam a intoxicação pela ingestão pelo Pb, citando efeitos nocivos no sistema nervoso central, disfunções no pulmão, e alterações hematológicas (BALALI-MOOD *et al.*, 2021). O Cu foi definido como um precursor para o estresse oxidativo das células, inflamação de órgãos, e induz a apoptose, que é a morte celular (LUO *et al.*, 2021).

O acúmulo de Fe no organismo também pode causar estresse oxidativo, e como os outros metais já citados, ele é altamente lipofílico, conseqüentemente, dissolve-se facilmente em lipídios (AJEEL *et al.*, 2021). Porém, consumimos diariamente uma grande quantidade de ferro, sendo necessário para um homem adulto 8 mg/dia, utilizados na manutenção de várias funções do organismo, entre eles

a síntese de biomoléculas, no transporte de oxigênio, na replicação e no reparo do DNA, entre outros (BORTOLINI; FISBERG, 2010; MORALES; XUE, 2021).

Assim, a presença Fe é um problema quando se observa a oxidação de alimentos, degradação que pode levar a obtenção de características sensoriais desagradáveis, manifestando odor e sabor com traços rançosos, além da perda de função nutricional (SOUZA, 2018; SANTOS, 2022).

3.1.1 Contaminantes metálicos e a oxidação lipídica

Tem-se grande parte de contaminantes metálicos oriundos dos processos industriais, da agricultura, por meio do uso de fertilizantes, e outros tipos de poluentes. Esses metais não se degradam naturalmente e, portanto, permanecem na natureza e podem ser absorvidos pelo organismo humano pelo consumo da água, de plantas e seus derivados e pelo ar (ZHOU *et al.*, 2022).

A degradação lipídica pode ser catalisada por vários fatores, pela hidrólise, pela polimerização, pela pirólise, pela absorção de odores e sabores, mas, principalmente pelo processo de oxidação. Na oxidação ocorre a transferência de elétrons de uma substância para outra levando a decomposição e formação de peróxidos (ARAÚJO, 2004).

Em lipídios a presença de metais é responsável por facilitar a reação de oxidação, chamada também de rancidez lipídica, que gera a deterioração dos ácidos graxos presentes (CAMPBELL-PLATT, 2015; SRINIVASAN; KIRK, 2019).

Considerando as implicações negativas que a simples presença desse metal pode ocasionar, e o aumento crescente do consumo de azeite de oliva, que é um alimento que pode sofrer deterioração em função de sua ação, é indispensável a disponibilidade de métodos confiáveis para a determinação desse analito.

3.1.2 Métodos de preparo de amostras oleosas para determinação de metais

Partindo do objetivo de qualificar e posteriormente quantificar um analito de interesse, é necessário em primeiro lugar analisar as características físicas e químicas da matriz que será explorada e do analito que se deseja extrair, como pH, solubilidade, densidade, reatividade, dureza, polaridade, entre outros. Considerando esses aspectos, na sequência essa amostra precisa passar pelo processo de preparo, que

tem a finalidade de tornar a amostra adequada para a quantificação seja em equipamentos específicos, seja para uma análise subsequente (LANÇAS, 2009).

A matriz que será analisada possui grande interação com metais pesados, e essa seria a primeira dificuldade a ser observada na escolha do método de extração. Precisa-se ainda considerar que a quantidade de ferro encontrada pode ser a nível de traço, já que esses metais podem ser oriundos de contaminação ambiental. Essas características tão específicas exigem um método que seja preciso e com alta sensibilidade.

Na literatura estão disponíveis muitos métodos de preparo de amostras como:

A extração induzida por quebra de emulsão – EIEB (do inglês, emulsion break-induced extraction), com subsequente determinação por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite de fonte contínua de alta resolução - HR-CS GFAAS, (do inglês, high resolution continuous source graphite furnace atomic absorption spectrometry) (LEAL, 2022).

A microextração líquido-líquido baseada em líquido iônico - IL-DLLME (do inglês liquid-liquid microextraction based on ionic liquid), e medição em espectrômetro de absorção atômica com chama - FAAS, (do inglês flame atomic absorption spectrometry) (ADHAMI; ASADOLLAHZADEH; GHAZIZADEH, 2020).

Pela RP-DLLME, e consecutiva leitura em espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) (KALSCHNE *et al.*, 2020).

A extração líquido-líquido - LLE (do inglês liquid-liquid extraction) promove a extração do analito da fase aquosa, por meio de um solvente de polaridade contrária, e, portanto, imiscível em água (REZAEI *et al.*, 2010).

Muito utilizada, a LLE exige uma grande quantidade de amostra e de extrator, gerando elevada quantidade de produtos. Para torná-la mais vantajosa e diminuir a quantidade de produtos poluentes, foi desenvolvida a microextração dispersiva líquido-líquido – DLLME (do inglês reverse-phase liquid-liquid microextraction), que usa o mesmo método, mas com porções menores tanto de amostra quanto de extrator (REZAEI *et al.*, 2006; REIS, 2018).

Na DLLME, com relação aos solventes, devem possuir um extrator orgânico apolar, e conseqüentemente, ser imiscível em água, e um dispersor com polaridade compatível para ser solúvel no extrator e na fase oleosa (REIS, 2018).

Como já descrito, o extrator possui características apolares e, por definição, tem pouca afinidade com espécies polares. Na qualificação de analitos metálicos, que

possuem natureza polar, usa-se agentes quelantes, que os tornam elegíveis para interação com o extrator. Porém em matrizes oleosas que possuem caráter apolar esse método é invalidado (REIS, 2018).

Como alternativa, desenvolveu-se a partir da DLLME a RP-DLLME, que utiliza o solvente extrator/dispersor de forma inversa (HASHEMI *et al.*, 2010). Dessa forma, este método pode ser aplicado para amostras oleosas, extraindo os analitos metálicos ou inorgânicos para a fase aquosa.

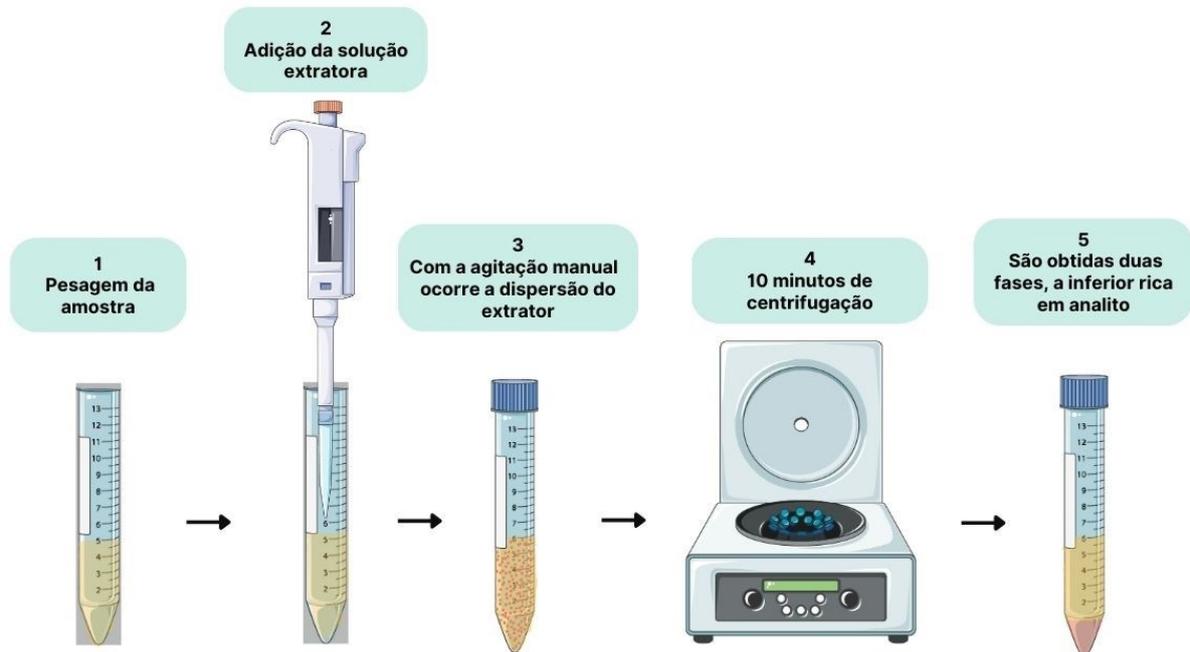
3.1.3 Microextração dispersiva líquido-líquido em fase reversa

Neste método de preparo de amostra, demonstrado na Figura 3, as partes constituintes têm polaridades invertidas. A amostra oleosa é apolar, enquanto o solvente é formado por um extrator de característica polar e o dispersor se configura parcialmente miscível na fase aquosa e na fase orgânica, dando a esta solução caráter anfifílico.

Assim se pretende obter uma solução com miscibilidade suficiente na fase oleosa orgânica, a ponto de concluir a captura e remoção do analito para a fase aquosa. Esse tipo de dispersor é obtido por meio da inserção de um álcool de cadeia curta como o etanol (RAZIC *et al.*, 2023; DELPINO, 2017).

A RP-DLLME possui vários atributos positivos alguns herdados da DLLME, outros obtidos pelo aprimoramento, dos quais podemos destacar o baixo custo, eficiência de extração, a simplicidade de análise, tempo reduzido no desenvolvimento da extração, e o menor volume de produtos nocivos (LANÇAS, 2009).

Figura 3 - Esquema do método RP-DLLME



Fonte: Autoria própria (2023).

Considerando as vantagens, esse método tem sido amplamente utilizado para extração de analitos de diversificadas matrizes oleosas, como pode-se observar na tabela 1. Em amostras contaminadas de óleo vegetal isolante, aplicando técnicas de otimização, foi possível identificar Fe e Cu (TASISTRO, 2022). Aplicando o método em amostras de óleo de peixe, OZZEYEK *et al.* (2020) recuperou cádmio. Pode ser utilizada para identificar tanto analitos metálicos, como fármacos, obtendo ótimos valores de recuperação, acima de 90% em todos os casos, sendo classificado pelos autores um método de alta precisão e eficiência, o que o configura como adequado e confiável para o desenvolvimento deste método.

Tabela 1 - Lista de pesquisas desenvolvidas aplicando o RP-DLLME

Autor	Ano	Matriz	Analito	Recuperação
Hashemi <i>et al.</i>	2011	Azeite de oliva	hidroxitirosol e tirosol	97,6 a 104,3%
Razic	2023	Óleos vegetais	Triptofano	90%
García; Martínez; Córdoba	2014	Óleos comestíveis	Cd e Pb	–
Reis	2018	Óleos vegetais	Fe, Mg e Zn	–
Kalshene <i>et al.</i>	2019	Óleo de peixe	Multielementos	Para Fe e Pb de 85% a 94%
Ozzeybeck <i>et al.</i>	2020	Azeite de oliva	Cd	95,6% a 105,7%
Rezaeinejad e Hashemi	2021	Azeite de oliva	Ânions inorgânicos	103,3 % a 116,4 %
Tarsistro	2022	Óleo vegetal isolante	Fe e Cu	Acima de 90%

Fonte: Autoria própria (2023).

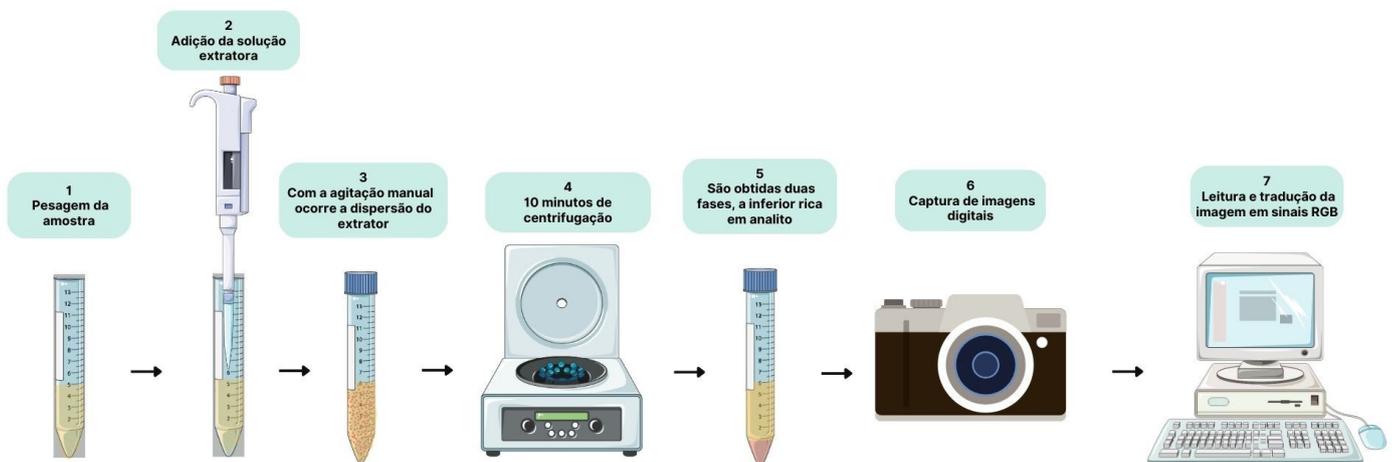
3.1.4 Análise por imagem digital

Após a preparação da amostra, e isolamento do analito, inicia-se a etapa em que se busca quantificar o analito, e interpretar a solução extraída, que pode ser realizada por meio de um equipamento ou método.

Os equipamentos usualmente utilizados são espectrofotômetro de absorção atômica em forno de grafite (HR-CS GFAAS) (LEAL *et al.*, 2022), espectrômetro de absorção atômica (FAAS), (ADHAMI, 2020), cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção ultravioleta e visível (HPLC-UV/Vis) (do inglês, high-performance liquid chromatography with ultraviolet/visible detection), empregado inclusive como método de comparação (ABUGHRIN; ALSHANA; CALEB, 2022).

Todos os equipamentos citados possuem técnicas validadas, confiáveis e de sensibilidade na identificação de analitos, possuem alto valor agregado, o que inviabiliza sua compra muitas vezes até para realizar reconhecimentos cotidianos, por isso são encontrados mais comumente em laboratórios voltados a pesquisas analíticas.

Figura 4 - Esquema método RP-DLLME associado a leitura de imagens digitais.



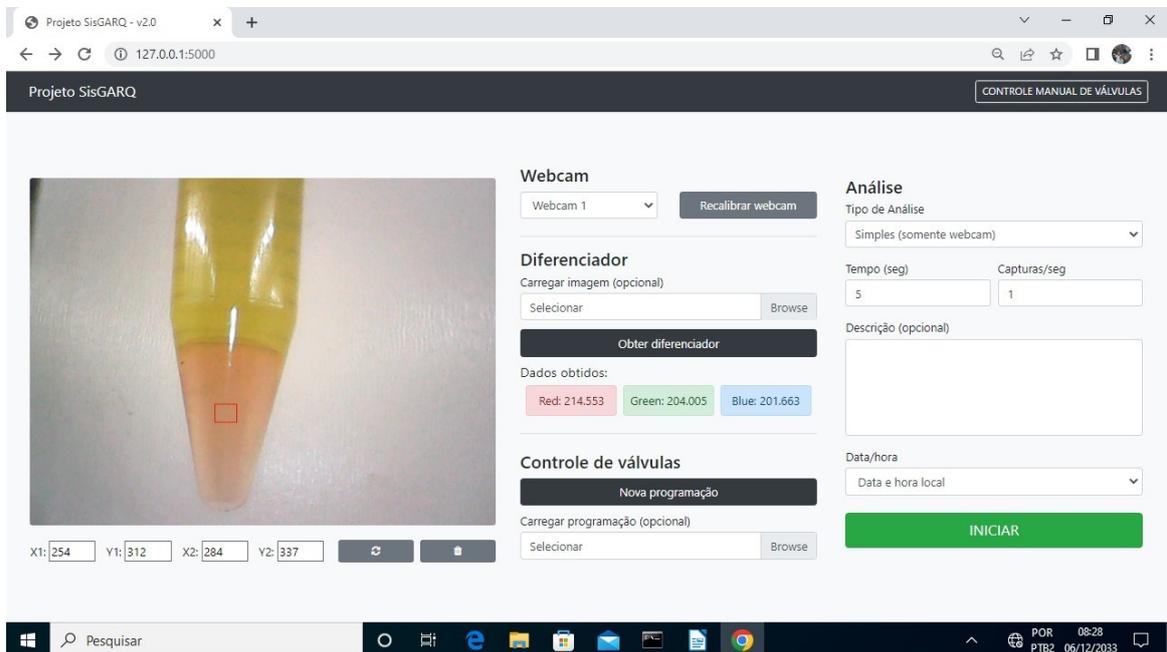
Fonte: Autoria própria (2023).

A colorimetria aliada a leitura de imagens digitais, representada na figura 4, se mostra como uma forma muito mais vantajosa, prática, e de fácil acesso. Considerando que para sua execução não é necessário o alto investimento em equipamentos, sendo inclusive encontrados aplicativos para smartphones que fazem a leitura de imagens.

Desenvolvido em 2017, o Photometrix[®], pode ser instalado no Windows Phone[®] ou no sistema Android[®]. Ele faz a leitura dos pixels emitidos por uma imagem digital usando uma função bidimensional, e calcula a partir intensidade da cor emitida e valores de sinal que são divididos em picos de sensibilidade, em torno das cores vermelho, verde e azul, os sinais RGB, do inglês red, green e blue (HELPER *et al.*, 2017; NUNES; KORN; LEMOS, 2021; ABUGHRIN; ALSHANA; CALEB, 2022; MONOGAROVA; OSKOLOK; APIARY, 2018; BI X *et al.*, 2022).

De forma similar, o software SisGarq (figura 5), permite a aquisição de imagens digitais, a leitura e o detalhamento da imagem dando origem a sinais RGB. Delimitando uma região de leitura, o software utiliza coordenadas que são aplicadas as todas as amostras, sendo possível assim, gerar sinais de amostras e curvas de calibração. Sequencialmente é realizada a coleta de pixels da região de leitura e traduzida em valores médios de sinais RGB de cada pixel (LYRA *et al.*, 2009).

Figura 5 - Software SisGarq em operação, leitura de amostra com analito com concentração de $1 \mu\text{g g}^{-1}$.



Fonte: Autoria própria (2023).

Os sinais são relacionados utilizando a equação mostrada na figura 6, e dão origem a uma norma.

Figura 6 - Equação que relaciona os sinais RGB a concentração de analito.

$$\| \mathbf{v} \| = \sqrt{\overline{R}_{s-b}^2 + \overline{G}_{s-b}^2 + \overline{B}_{s-b}^2}$$

Fonte: LYRA *et al.*, 2009.

Onde:

$R_b + G_b + B_b$ são os valores médios obtidos na região selecionada de amostras sem adição de analitos, ou branco.

E $R_s + G_s + B_s$ são os valores médios obtidos na região selecionada de amostras com adição de analito.

A equação determina uma relação linear entre os valores de RGB encontrados e a concentração de analito em cada amostra. A norma “ $\| \cdot \|$ ” de \mathbf{v} é obtida com valor numérico, onde o aumento da concentração de analito implica em maior intensidade de coloração, e conseqüentemente, maior valor para \mathbf{v} (LYRA *et al.*, 2009).

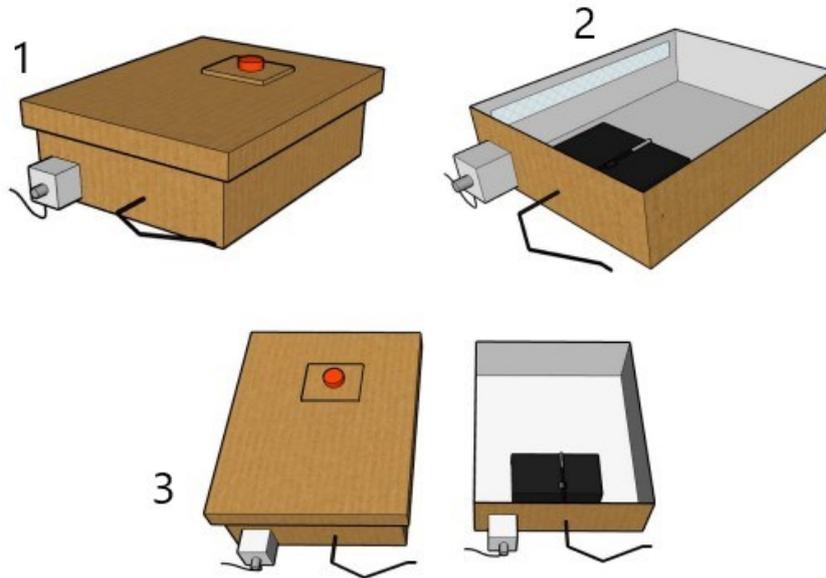
Este valor de norma foi utilizado para construção das curvas descritas a seguir e posterior determinação da concentração em amostras sem adição de analito.

A coleta de imagens foi realizada dentro de um ambiente fechado, representado na figura 7, que foi projetado exclusivamente para a coleta de imagens de forma que interferências externas sejam minimizadas.

O ambiente foi adaptado para manter o tubo suspenso e em seu interior, posicionando uma microcâmera com resolução de 640x480 pixels, e taxa de quadros 30fps responsável pela coleta de imagens de forma fixa.

Ele conta ainda com um sistema de iluminação interna que permite um padrão de incidência de luz.

Figura 7 - Sistema de coleta de imagens



Fonte: Adaptado de Bif (2023).

3.1.5 A química analítica verde aplicada aos métodos de preparo de amostra

O desenvolvimento de novos métodos científicos visa trazer comodidade, precisão e eficiência a uma análise. Contudo, é necessário atentar-se à produção de resíduos contaminantes.

A chamada química analítica verde delimita princípios (GALUSZKA; ZDZISLAW; NAMIESNIK, 2013), que devem ser observados a fim de minimizar os impactos ambientais que podem ser gerados nesse processo, dos quais podemos citar a utilização de amostras miniaturizadas e de um menor número de amostras, gerando menor quantidade de resíduos, a utilização de reagentes atóxicos, e obtidos preferencialmente de fontes renováveis.

Pode-se citar ainda a busca pelo desenvolvimento de métodos mais simples, com menor número de passos, o que minimiza o uso de vidrarias e recipientes de preparação, e de reagentes utilizados na limpeza de vidrarias.

O uso de materiais descartáveis, compostos por polipropileno (PP), também se mostram importantes, a resina é muito utilizada em vários setores da indústria tanto na sua forma virgem, como na forma reciclada. E inclusive seu uso tem sido preferível

na forma reciclada, por ter custo de 40% mais baixo que o PP virgem (FERNANDES et al, 2007).

4 METODOLOGIA

Os ensaios foram realizados no laboratório da Central Analítica Multiusuário de Medianeira - (CEANMED), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR - Campus Medianeira.

4.1 Instrumentos e equipamentos

Para quantização e determinação da concentração de ferro nas amostras que foram preparadas, foi utilizado um sistema de coleta e leitura de imagens digitais, controlado por um computador com o software SisGarq (SCHEEREN; FILHO; LEITE, 2021).

Foram utilizadas micropipetas com ponteiros removíveis (KASVI, modelo K1-P1000, Brasil) com capacidade de coleta e inserção de 100 microlitros a 1.000 microlitros. As amostras foram pesadas utilizando uma balança de precisão analítica (Marte, modelo AW220, 2010) com resolução de 0,0001g e sendo capaz de pesar até 220g.

Para quebra de emulsão formada e separação das fases das amostras, foi utilizada a centrífuga (Cientec, CT-5000R, Brasil) que detém a capacidade de agrupar até 12 tubos de 15 ml (Corning, ref.430766, México), próprios para centrifugação, com velocidade de até 6.000 rotações por minuto.

4.1.1 Preparo de amostra

A água ultrapura utilizada foi obtida no sistema Gehaka, com resistividade inferior a $18,2\Omega\text{ cm}^{-1}$, ligada a um sistema de osmose reversa (modelo OS 10 LX, Gehaka, Brasil).

Para a otimização e obtenção de melhores resultados, foram testados como dispersores os álcoois: 1-propanol (pureza $\geq 99,5\%$, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), 2-propanol (pureza $\geq 95\%$, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), e etanol (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA).

Para a acidificação da amostra, a fim de tornar a reação viável e favorável, foi utilizado o ácido nítrico p.a. (pureza $\geq 65\%$, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), e como agente complexante do ferro (III) foi utilizado o tiocianato de amônio p.a. (pureza de $97,5\%$, Dinâmica, Brasil).

Foi utilizada uma solução de Fe de referência ($100 \mu\text{g g}^{-1} \pm 0,6 \mu\text{g g}^{-1}$, Specsol, Brasil). Como amostra de estudo, utilizou-se para os testes uma amostra comercial de azeite de oliva extra virgem (acidez máxima de 0,5% no momento do envase, Argentina).

4.1.2 Procedimento metodológico para determinação de parâmetros

Inicialmente foi preparada uma solução de ácido nítrico a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2), onde dilui-se o SCN $0,8 \text{ mol L}^{-1}$. Para o ajuste dos parâmetros de influência da etapa de RP-DLLME, foram feitos testes de recuperação com o emprego de adição de analito na amostra teste, na concentração de $1 \mu\text{g g}^{-1}$.

A solução dispersora/extratora é composta por um álcool que possui a função de dispersar o analito, e SCN^- em solução ácida, com a função de complexar o Fe^{3+} , e extraí-lo da fase oleosa para a fase aquosa. Essa reação gera um composto intensamente colorido de tonalidade vermelha (HOUSECROFT; SHARPE, 2013; LEE; 1999), possibilitando a quantificação colorimétrica.

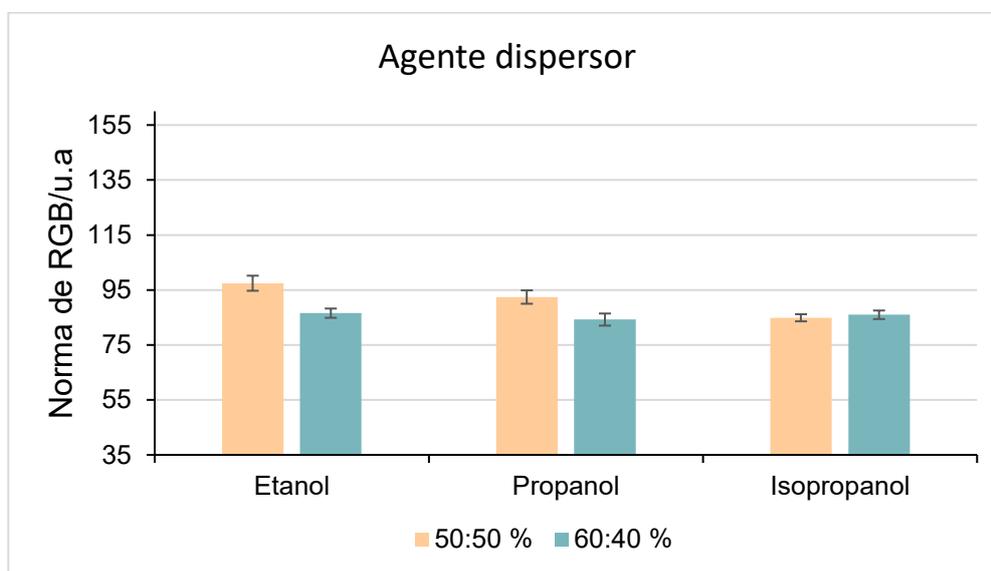
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a aquisição das melhores condições de extração, os testes foram iniciados com uma solução extratora de pH 2, contendo $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de SCN^- . Como agente dispersor, foi utilizado inicialmente o isopropanol, obtendo uma solução com 40% de dispersor e 60% de extrator. Em relação a centrifugação, as configurações aplicadas foram: 5 minutos de centrifugação, rotação: 6000 rpm, temperatura de 25°C . As configurações da centrífuga se mantiveram em todos as análises, sendo avaliado apenas o tempo de centrifugação.

5.1.1 Influência do tipo de dispersor em diferentes proporções em relação ao extrator

Para a avaliação do agente dispersor foram utilizados três diferentes álcoois: etanol, propanol e isopropanol nas concentrações apresentadas no gráfico da figura 8.

Figura 8 - Avaliação da Influência da concentração e determinação do melhor dispersor na etapa de RP-DLLME.



Condições experimentais: 5 g de amostra, 1 mg g^{-1} de solução padrão de Fe, 1 mL de solução extratora contendo $500 \mu\text{L}$ solução de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de SCN^- acidificada com HNO_3 na concentração de $0,001 \text{ mol L}^{-1}$, com concentrações de etanol, isopropanol e propanol variando entre 50% e 60%, agitação manual de 1 min e centrifugação de 10 min. (n=3)

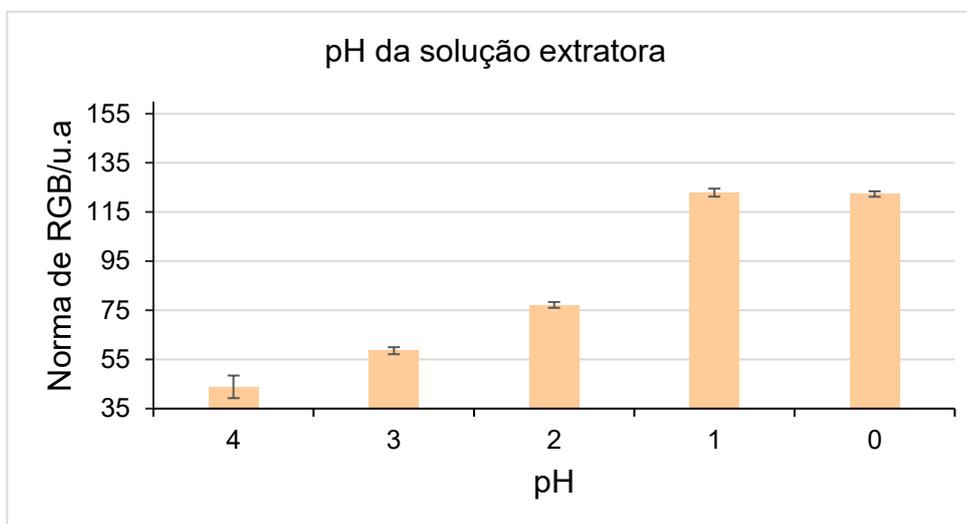
Fonte: Autoria própria (2023).

Quando foram testados os dispersores, nas proporções descritas, verificou-se que o melhor dispersor foi o etanol na proporção 50%, dado dispersor/extrator v/v, conforme os dados mostrados.

5.1.2 Influência do pH da solução extratora

A solução extratora possui caráter ácido e seu pH foi avaliado (figura 9) verificando o sinal obtido nas concentrações de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, $0,001 \text{ mol L}^{-1}$, que se referem, respectivamente, aos valores de pH 0, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0.

Figura 9 - Avaliação da Influência do pH na etapa de RP-DLLME



Condições experimentais: 5 g de amostra, 1 mg g^{-1} de solução padrão de Fe, 1 mL de solução extratora contendo $500 \mu\text{L}$ de etanol como solvente dispersor e $500 \mu\text{L}$ de solução de extratora de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de SCN com HNO₃ e concentrações variando entre $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, $0,001 \text{ mol L}^{-1}$, agitação manual de 1 min e centrifugação de 10 min. (n=3).

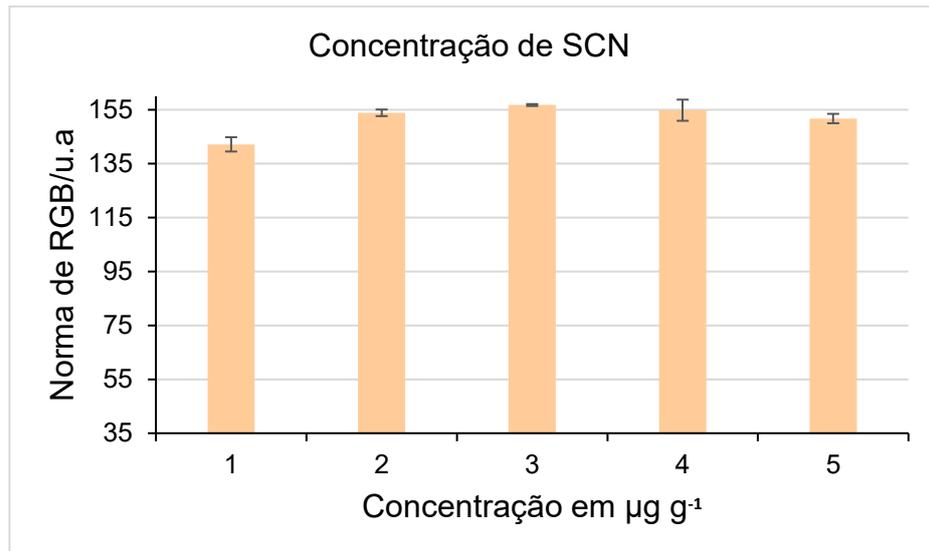
Fonte: Autoria própria (2023).

O melhor sinal e com menor erro foi obtido no pH 0, porém, neste pH foi observada a instantânea degradação do SCN⁻, gerando uma solução instável heterogênea com corpo de fundo, o que a torna imprópria, resultando na possibilidade de um erro de medida. Então, foi adotado o pH 1,0 que apresenta melhor desempenho, como pode ser verificado na figura 6, e se mantém estável ao longo do período de análise. A variação de sinal observada confirma a influência e importância do pH mais ácido para a formação do complexo.

5.1.3 Influência da concentração do agente extrator

A concentração de SCN^- foi avaliada, e para isso neste teste, mostrado na figura 10, utilizou-se 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 mol L^{-1} do agente complexante

Figura 10 - Avaliação da Influência da concentração do complexante na etapa de RP-DLLME



Condições experimentais: 5 g de amostra, 1mg g^{-1} de solução padrão de Fe, 1 mL de solução extratora contendo 500 μL de etanol como solvente dispersor e 500 μL de solução de extratora de HNO_3 com concentrações de 0,01 mol L^{-1} , e concentração de SCN variando entre 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$, 2,0 $\mu\text{g g}^{-1}$, 3,0 $\mu\text{g g}^{-1}$, 4,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 5,0 $\mu\text{g g}^{-1}$, agitação manual de 1 min e centrifugação de 10 min. (n=3)

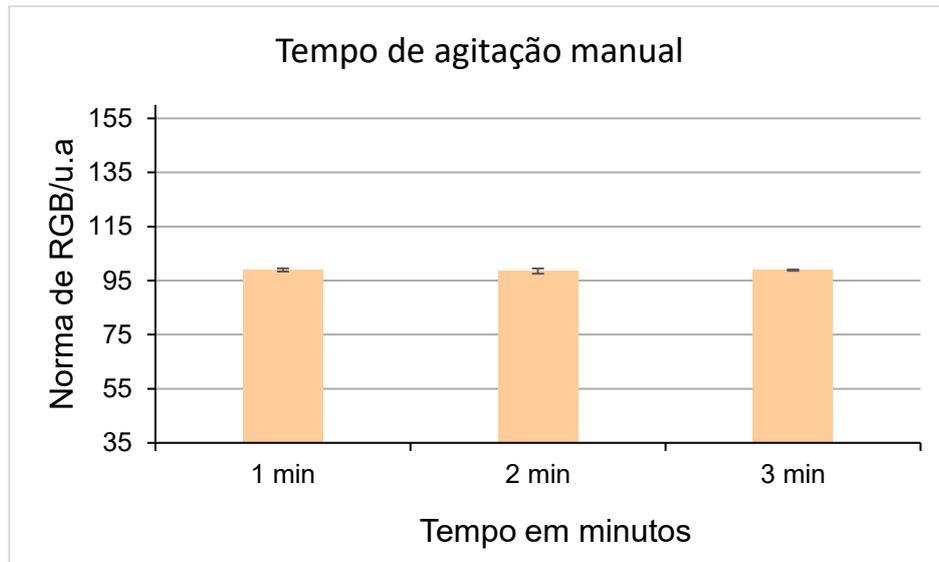
Fonte: autoria própria (2023).

Avaliando as diferentes concentrações o melhor sinal foi obtido na concentração de 3,0 mol L^{-1} , observou-se também o menor desvio padrão, categorizando-o como a mais adequado.

5.1.4 Influência do tempo agitação manual

A agitação manual tem por objetivo formar uma emulsão entre o azeite e a solução extratora (figura 11), e possibilitar a interação entre a solução e a amostra, para que assim o metal de interesse seja complexado.

Figura 11 - Avaliação da Influência da agitação na etapa de RP-DLLME.



Condições experimentais: 5 g de amostra, 1 mg g^{-1} de solução padrão de Fe, 1 mL de solução extratora contendo 500 μL de etanol como solvente dispersor e 500 μL de solução de $3,0\ \mu\text{g g}^{-1}$ SCN com HNO_3 na concentração de $0,01\ \text{mol L}^{-1}$, com 10 min de centrifugação e variação no tempo de agitação manual de 1, 2, e 3 min. (n=3)

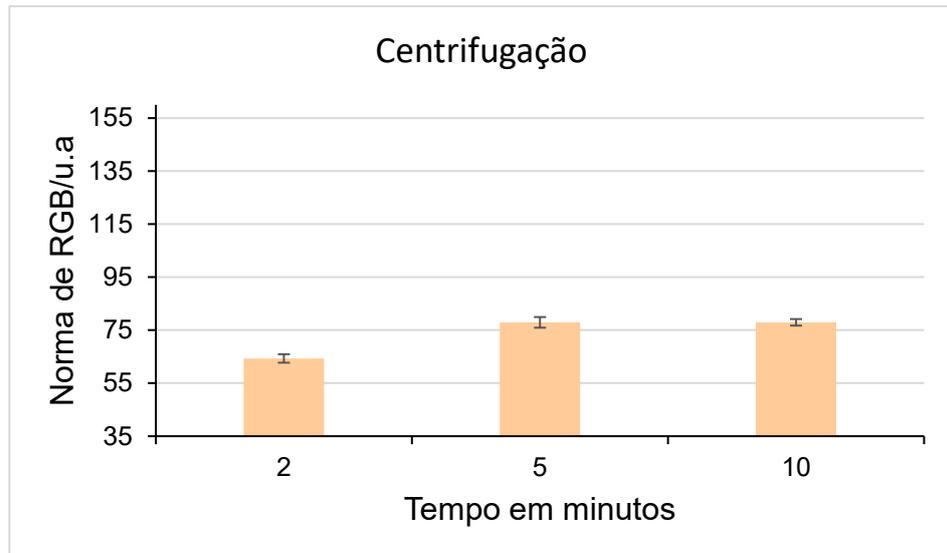
Fonte: Autoria própria (2023).

Neste teste as amostras foram expostas diferentes tempos de agitação: 1, 2 e 3 minutos. Os sinais obtidos em 1 e 2 min foram muito similares, porém avaliando, apresentando desvio-padrão irrelevante, por isso foi assumido o tempo 1 min.

5.1.5 Influência do tempo de centrifugação

A etapa de centrifugação promove a separação de fases, gerando uma fase aquosa que se deposita no fundo do tubo e que carrega o analito e uma fase oleosa na parte superior. As amostras foram submetidas a três períodos diferentes 2, 5 e 10 min, mostrado na figura 12.

Figura 12 - Avaliação do tempo de centrifugação na etapa de RP-DLLME.



Condições experimentais: 5 g de amostra, 1mg g⁻¹ de solução padrão de Fe, 1 mL de solução extratora contendo 500 µL de etanol como solvente dispersor e 500 µL de solução de 3,0µg g SCN⁻¹ com HNO₃ na concentração de 0,01 mol L⁻¹, tempo de agitação manual de 1 min, e variando o tempo de centrifugação entre 2, 5 e 10 min. (n=3)

Fonte: Autoria própria.

Para os tempos 5 e 10 min os sinais obtidos na norma foram muito similares, mas apresentaram desvios padrões com diferenças consideráveis, para 5 min 2,01 e para 10 min igual a 1,51.

Após a análise e avaliação sinais obtidos nos diversos parâmetros de influência, chegou-se as condições expostas no quadro 2.

Quadro 2 - Relação dos parâmetros de influência do método.

Parâmetros do método	Condições ajustadas
Massa da amostra	5 g
Solvente dispersor	500 µL Etanol
Solvente extrator	500 µL HNO ₃
Agente complexante	SCN
Proporção (solvente dispersor/solvente extrator)	50/50
Concentração do agente extrator	3,0 mol L ⁻¹
pH da solução extratora	1,0
Tempo de agitação manual	1 min
Tempo de centrifugação	10 min

Fonte: Autoria própria (2023).

5.1.6 Configuração da curva analítica

A sequência de tons com intensidade crescente, mostrado na figura 13, representa a imagem obtida no software, sendo a primeira imagem, à esquerda, o zero e a última imagem, à direita, concentração de $10 \mu\text{g g}^{-1}$.

Figura 13 - Representação da curva.

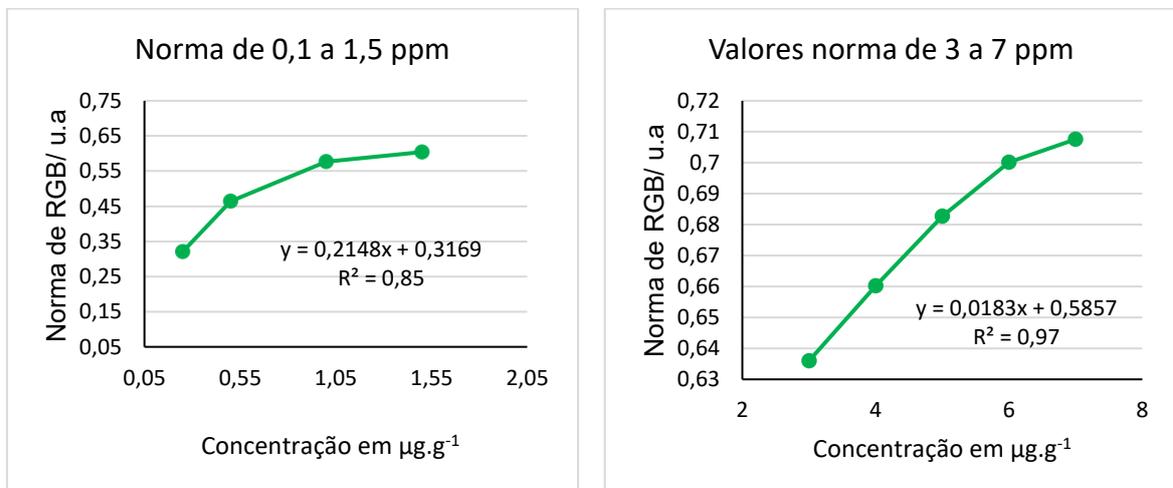


Fonte: Autoria própria (2023).

Sendo assim, a intensidade do sinal é diretamente influenciada pela intensidade de concentração de analito na amostra, que pela reflexão, após a leitura é traduzida em sinais RGB, e sequencialmente na norma, possibilitando a identificação e quantificação em amostras com ou sem adição analito.

A curva da norma, mostrada na figura 14, foi dividida afim de encontrar faixas lineares e assim determinar uma região da curva com maior sensibilidade. Como observado, obteve-se uma faixa entre $3 \mu\text{g g}^{-1}$ e $7 \mu\text{g g}^{-1}$, com $R^2 = 0,97$.

Figura 14 - Representação da curva da norma.

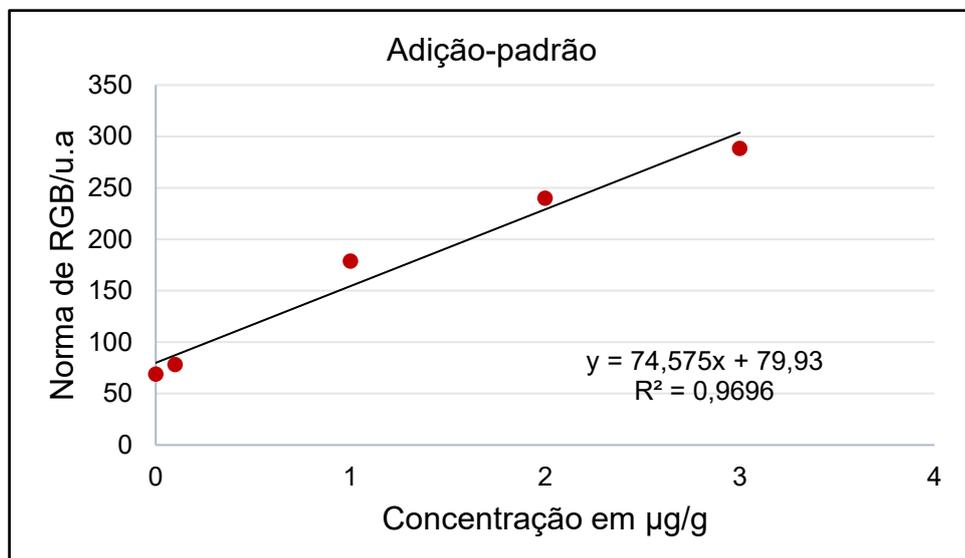


Fonte: Autoria própria (2023).

Após essa determinação efetuou-se testes de recuperação aplicando os parâmetros determinados no quadro 2, porém, quando comparados com os valores determinados na curva, não foram compatíveis. Por este motivo optou-se por realizar o tratamento dos dados pela análise a partir da adição de padrão.

Este método utiliza a equação da reta para determinação da concentração de analito na amostra sem adição, isolando a incógnita X. Para isso foram adicionados a amostra padrão $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$, $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$, $2,0 \mu\text{g g}^{-1}$ e $3,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de analito (figura 15) e obtido o seguinte gráfico:

Figura 15 - Curva relacionando sinais nas concentrações de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$, $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$, $2,0 \mu\text{g g}^{-1}$ e $3,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de analito.



Condições experimentais: 5 g de amostra, 1 mL de solução extratora contendo 500 μL de etanol como solvente dispersor e 500 μL de solução de $3,0 \text{mol L}^{-1}$ de SCN com HNO_3 na concentração de $0,01 \text{mol L}^{-1}$, tempo de agitação manual de 1 minutos, e tempo de centrifugação de 10 minutos. (n=3)

Fonte: Autoria própria (2023).

Os resultados obtidos a partir deste método, são apresentados na tabela 2, e se mostraram satisfatórios, os sinais foram analisados observando a norma, apresentou uma relação linear com $R^2 = 0,96$. Assim, foi determinada a concentração de Fe na amostra analisada.

Tabela 2: Resultados da análise por adição de padrão nas concentrações de 0,1 µg.g⁻¹ a 3 µg.g⁻¹

Sinal	Coefficiente angular	Coefficiente linear	R²
Norma	74,575	79,93	0,9696

Fonte: Autoria própria (2023).

6 VALIDAÇÃO PARCIAL DO MÉTODO

Para fins de validação, tomou-se as figuras de mérito propostas pelo Inmetro, que no documento orientativo DOQ-CGCRE – 008 de 2020 fornece recomendações para validação de métodos analíticos.

Para representar a curva apresentada na figura 16, foram aplicados os parâmetros ajustadas para o método, descritos no quadro 2, a uma triplicata para cada ponto da curva. E utilizando dos indicadores avaliou-se a linearidade observada na curva da figura 16.

Assim, por meio da equação da reta, que apresenta o coeficiente angular, que indica a inclinação da curva, observa-se que se obteve uma sensibilidade satisfatória.

Sequencialmente, conceituando o limite de quantificação (LOQ) que determina a quantidade mínima que o método é capaz de quantificar. Para tal, utiliza-se a seguinte equação:

$$\text{LOQ} = \frac{10 s}{b}$$

Onde tem-se:

s: desvio padrão das amostras sem adição de analito

b: coeficiente angular da curva analítica.

E, aplicando em 7 amostras sem adição de analito e expostas as mesmas condições ajustadas no quadro 2, resultou em um LOQ = 1,13 mg L⁻¹.

Para determinação da concentração percentual, foram utilizadas as recuperações obtidas nos diferentes níveis de concentração. De acordo com o Inmetro é considerado aceitável o método com valores de recuperação no intervalo de 98% a 102%.

A recuperação percentual é obtida pela equação (Inmetro, 2020):

$$\text{Recuperação} = \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) * 100$$

Onde tem-se:

C1: concentração de analito encontrada na amostra com adição.

C2: concentração de analito na amostra sem adição.

C3: concentração de analito adicionado na amostra.

Aplicando o cálculo obteve-se 99,9% ± 0,09 de recuperação de Fe. O valor encontrado pode ser classificado como satisfatório, considerando os limites determinados no DOQ-CGCRE.

7 CONCLUSÕES

Analisando os dados gerados a partir da aplicação do método proposto, observa-se que o método se mostra válido, por atender aos parâmetros estabelecidos pelo Inmetro, resultando em 99,9% de recuperação. E ainda, que se mostra apto para ser utilizado como método padrão na determinação de Fe em amostras de azeite de oliva, já que possui LOQ = 1,13 mg L⁻¹, considerando o limite máximo determinado pelo MAPA (2012), igual a 3 mg L⁻¹ do analito.

Considerando a química analítica verde, este método atende aos princípios propostos, se qualificando como barato, já que não utiliza equipamentos tradicionais, de fácil execução, utilizando de baixas concentrações de reagentes e em quantidades miniaturizadas. São utilizados tubos de PP, e todo o processo, desde a pesagem, extração e leitura da amostra são realizados utilizando um único frasco.

E isto acarreta em um método mais seguro em relação à exatidão e eficiência, já que a possível perda em decorrência de remoção de fase aquosa para análise externa em equipamentos tradicionais não ocorre.

E ainda que esse frasco pode retornar a indústria por meio da reciclagem, amplamente empregada e relevante na atualidade.

Avalia-se também que aplicação em amostras comerciais se mostra um caminho promissor, para consolidar este método como um padrão para a determinação de Fe em análises de rotina, de forma mais acessível e prática.

REFERÊNCIAS

- ABUGHRIN, S., ALSHANA, U., CALEB, J. Smartphone Digital Image Colorimetry for the Determination of Aluminum in Antiperspirant Products. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, Turquia, ed.19, n. 6, p. 618–625, nov. 2022. Disponível em: https://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_49723/TJPS-19-618-En.pdf. Acesso em: 07 de mai. 2023.
- ADHAMI, K., ASADOLLAHZADEH, H., GHAZIZADEH, M. Preconcentration and determination of nickel (II) and copper (II) ions, in vegetable oils by [TBP] [PO₄] IL-based dispersive liquid–liquid microextraction technique, and flame atomic absorption spectrophotometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol. 89, p. 103457, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103457>. Acesso em 04 de mai. 2023
- AJEEL, M. A., AJEEL, A. A., NEJRES, A. M., & SALIH, R. A. Assessment of Heavy Metals and Related Impacts on Antioxidants and Physiological Parameters in Oil Refinery Workers in Iraq. **Journal of Health & Pollution**, vol. 11, n. 31, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.5696/2156-9614-11.31.210907>. Acesso em 18 de mai. 2023.
- ARAUJO, J.M.A. **Química de alimentos**, Teoria e prática. Vol. único. Viçosa – MG: UFV, 2004.
- BALALI-MOOD, M., NASERI, K., TAHERGORABI, Z., KHAZDAIR, M. R., & SADEGHI, M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 12. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643972>. Acesso em 26 de mai. 2023
- BI, X., JIANG, H., GUO, X., WANG, M., NIU, Y., JIA, L., & JING, X. Density-adjusted liquid-phase microextraction with smartphone digital image colorimetry to determine parathion-methyl in water, fruit juice, vinegar, and fermented liquor. **RSC Advances**, vol.12, 2022, p.18127–18133. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d2ra02760g>. Acesso em: 17 de mai. 2023.
- BIF, E. **Conceito de análise em frasco único: Determinação de ferro em biodiesel por microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa e detecção por imagem digital**, 2023. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais) Programa de Pós-graduação em Tecnologias Ambientais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira.
- BORTOLINI, G. A., FISBERG, M. Orientação nutricional do paciente com deficiência de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Brasil, vol. 32, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010005000070>. Acesso em: 12 de jul. 2023.
- BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento - MAPA. **Instrução Normativa nº 1**, 30 de janeiro de 2012. Regulamento técnico do azeite de oliva e do óleo de bagaço de oliva. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 2012. Disponível em: <https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=629707739>. Acesso em: 15 de abr. 2023.

CAMPBELL-PLATT, G. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri, São Paulo, Editora Manole, 2015.

CARDOSO, L. G. V.; BARCELOS, M. F. P.; OLIVEIRA, A. F.; PEREIRA, J. A. R.; ABREU, W. C.; PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; PEREIRA, M. C. A. Características físico-químicas e perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas no Sul de Minas Gerais – Brasil, **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.1, p. 127-136, 2010.

CONSELHO OLEÍCOLA INTERNACIONAL – OIC. **Consumo, números mundiais do azeite; Importações de azeite do Brasil**. Madri- Espanha, 2022. Acesso em abril de 2023. Disponível em: <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/#figures>.

COVAS MI, KONSTANTINIDOU V, FITÓ M. Azeite e saúde cardiovascular. J **Cardiovasc Pharmacol**, vol. 54, n. 6, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19858733/>. Acesso em: 10 de abr. 2023.

DELPINO, I.S. **Determinação de contaminantes em óleo diesel por ICP-OES empregando a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa**. 2017. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais) - Programa de Pós-graduação em Tecnologias ambientais - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira.

FERNANDES, B.L, DOMINGUES, A.J. Caracterização mecânica de polipropileno reciclado para a indústria automotiva. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 17, p. 85-87, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/po/a/ysHfg6JdNRBMLtmSN5Qk9vM/abstract/?lang=pt#>. Acesso em: 30 de mai. 2023.

GAŁUSZKA, A., ZDZISŁAW, M., NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trac Trends in Analytical Chemistry**. vol. 50, p. 78-84, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993613001234>. Acesso em 26 de mai. 2023.

GORZYNIK-DEBICKA M., PRZYCHODZEN P., CAPPELLO F., KUBAN-JANKOWSKA A., GAMMAZZA A. M., KNAP N., WOZNIAK M., GORSKA-PONIKOWSKA M. Benefícios potenciais para a saúde do azeite e polifenóis vegetais. **International Journal of Molecular Sciences**, vol.19. 2018 Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/3/686>. Acesso em: 12 de abr. 2023

HASHEMI, P.; RAESI, F.; GHIASVAND, A. R.; RAHIMI, A. Reverse-phase dispersive liquid-liquid microextracion with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein. **Talanta**, v. 80, p. 1926-1931, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914009008406?via%3Dihub>. Acesso em: 2 de mai. 2023.

HOUSECROFT, C.E, SHARPE, A.G. **Química inorgânica**. 4º Ed. Editora LTC. Rio de Janeiro, 2013.

HELPER, G. A.; MAGNUS, V. S.; BÖCK, F. C.; TEICHMANN, A.; FERRÃO, M. F.; COSTA, A. B. Photometrix: An Application for Univariate Calibration and Principal Components Analysis Using Colorimetry on Mobile Devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 328. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160182>. Acesso em: 26 de mai. 2023.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. INMETRO, vol 9, Rio de Janeiro, jun., 2020. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_08.pdf>. Acesso em: 17 de out. 2023.

KALSCHNE, D. L., CANAN, C., BEATO, M.O., LEITE, O.D., FLORES, E.L.M., A new and feasible analytical method using reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction (RP-DLLME) for further determination of Nickel in hydrogenated vegetable fat, **Talanta**, vol. 208, p. 120409, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120409>. Acesso em 04 de mai. 2023.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Vol. único. Campinas, SP. Editora Átomo, 2009.

LEAL, G.C., ROVASI, F., MAZIERO, M., NASCIMENTO, P.C., CARVALHO, L. M., VIANA, C. Emulsion breaking-induced extraction of Cd and Pb from oily dietary supplements followed by graphite furnace atomic absorption spectrometry detection. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol. 112, 2022., Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104651>. Acesso em: 04 de mai. 2023.

LEE, J.D. **Química Inorgânica não tão concisa**. 5ªed., Editora Edgard Blucher. São Paulo, 1999.

LI, X., DUAN, X., TAN, D., ZHANG, B., XU, A., QIU, N., CHEN, Z., Deficiência e sobrecarga de ferro em homens e mulheres em idade reprodutiva e mulheres grávidas, **Reproductive Toxicology**, vol.118, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623823000552>. Acesso em: 01 de jun. 2023.

GARCÍA, I. L., MARTÍNEZ, Y. V., CÓRDOBA, M. H. Determination of cadmium and lead in edible oils by electrothermal atomic absorption spectrometry after reverse dispersive liquid–liquid microextraction, **Talanta**, vol. 124, p.106-110, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014000897> . Acesso em 01 de jun. 2023.

LUO, K. K., HUANG, G., & MITCHELL, A. E. Aceleração da oxidação lipídica em amêndoas armazenadas cruas em resposta à exposição à umidade pós-colheita. **Journal of Science, Food and Agriculture**, vol. 102, n. 3, p.1155–1164, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11452>. Acesso em: 28 de abr. 2023.

LUO, Q., SONG, Y., KANG, J., WU, Y., WU, F., LI, Y., DONG, Q., WANG, J., SONG, C., & GUO, H. (2021). mtROS-mediated Akt/AMPK/mTOR pathway was involved in Copper-induced autophagy and it attenuates Copper-induced apoptosis in RAW264.7 mouse monocytes. **Redox Biology**, vol. 41. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101912>. Acesso em: 26 de mai. 2023.

LYRA, W. S., DOS SANTOS, V., DIONIZIO, A., MARTINS, V., ALMEIDA, L., NOBREGA, E., ARAUJO, M. Digital image-based flame emission spectrometry. **Talanta**, vol. 77, n. 5, p. 1584–1589, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003991400800711X>. Acesso em: 11 de out. 2023.

MANCUSO JR, BRENNAN JT. Tecido adiposo e metabolismo de ácidos graxos no início da vida. **Adv Nutr**. vol. 2, p. 345-358, 2011. Disponível em: <https://doi:10.3945/an.111.000737>. Acesso em: 12 de abr. 2023.

MELLO, L. D.; PINHEIRO, M. F. Aspectos de azeites de oliva e de folhas de oliveira. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, vol. 23, n. 4, p. 537-548, dez. 2012. Disponível em: <https://doaj.org/article/0132087292d84cbea0a747c906157a20>. Acesso em: 20 de abr. 2023.

MONOGAROVA, O.V., OSKOLOK, K.V., APIARY, V.V. Colorimetria em Análise Química. **Journal of Analytical Chemistry**, vol. 73, p. 1076–1084, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S1061934818110060>. Acesso em: 07 de mai. 2023.

MORALES M, XUE X. Visando o metabolismo do ferro na terapia do câncer. **Teranostica**, vol. 25;17 p.8412-8429, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34373750/>. Acesso em: 20 de abr. 2023

MOREIRA, N. X; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos: uma revisão, **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, vol. 24, p. 105-123, 2002. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/porta1/resource/pt/lil-356356>. Acesso em 01 de abr. 2023.

NUNES, L. S. KORN, M.G.A., LEMOS, V.A. A novel direct-immersion single-drop microextraction combined with digital colorimetry applied to the determination of vanadium in water, **Talanta**, vol. 224, n. 121893, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121893>. Acesso em 07 de mai. 2023.

OZZEYBEK, G.; SAHIN, I.; ERARPAT, S.; BAKIRDERE, S. Reverse phase dispersive liquid-liquid microextraction coupled to statted quartz tube flame atomic absorption spectrometry as a new analytical strategy for trace determination of cadmium in fish and olive oil samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.90, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157520301939>. Acesso em: 02 de mai. 2023

RAZIC S., BAKIC T., TOPIC A., LUKIC J., ONJIA A. Deep Eutectic Solvent Based Reversed-Phase Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Free Tryptophan in Cold-Pressed Oils. **Molecules**, vol. 28, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36903640/>. Acesso em 02 de mai. 2023.

REIS, P. K. **Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa assistida por vórtex para determinação de Fe, Mg e Zn em óleos vegetais por espectrometria de absorção atômica**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. M.; AGHAEI, E.; FARDIN, A.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, vol. 1116, p. 1–9, maio 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16574135/>. Acesso em: 02 de mai. 2023.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, vol. 1217, p. 2342– 2357, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20005521/>. Acesso em: 02 de mai. 2023.

REZAEINEJAD, S., HASHEMI, P. Quantificação rápida e sensível de ânions inorgânicos em azeite de oliva por acoplamento de microextração líquido-líquido dispersiva de fase reversa e cromatografia de íons. **Food Analytical Methods**, vol.14, p. 2461–2468, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-021-02071-8#citeas>. Acesso em: 01 de jun. 2023.

SANTOS, M.P.O.; **Microextração líquido-líquido em fase reversa para determinação de cobre, ferro, magnésio, manganês, e níquel em gordura suína**. 2022. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos - Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Medianeira.

SCHEEREN, M. H.; FILHO, P. L. de P.; LEITE, O. D.; Emprego de webcam para detecção de fósforo em extrato de solo por imagens digitais. *In: XXVI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR*. Guarapuava – PR. 2021.

SCHWINGSHACKL L, HOFFMANN G. Ácidos graxos monoinsaturados e risco de doença cardiovascular: sinopse das evidências disponíveis a partir de revisões sistemáticas e meta-análises. **Nutrients**, vol.4 p.1989-2007, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23363996/>. Acesso em: 10 de abr.2023.

SOUZA, N. F. **Avaliação da estabilidade de óleos e gorduras**. 2018. Dissertação (Engenharia de Alimentos) – Graduação em engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Mato Grosso.

SRINIVASAN, D.; KIRK, P. **Química de Alimentos de Fennema**. 5. ed. Artmed, Porto Alegre, 2019.

TARSISTRO, I.B. **Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa para determinação de Fe e Cu em óleo vegetal isolante**. 2022. Dissertação (Mestrado em Tecnologias ambientais) – Programa de Pós-graduação em Tecnologias Ambientais - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira.

YOUSEFI, Y., HANACHI, P., SAMADI, S., KHOSHNAMEVAND, M. Remoção de metais pesados (cobre e ferro) e nutrientes (nitrito e fosfato) do meio aquoso por microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*, e seus biofilmes, **Marine Environmental Research**, vol.188, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113623001174>. Acesso em: 15 de mai. 2023.

ZHOU, Y., TANG, Y., LIAO, C., SU, M., SHIH, K. Avanços recentes em direção à incorporação estrutural para estabilização de contaminantes de metais pesados: uma revisão crítica, **Journal of Hazardous Materials**, vol. 448, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130977>. Acesso em: 20 de abril de 2023.

ANEXO A - Lei n. 9.610, de 19 de fevereiro de 1998



**Presidência da República
Casa Civil
Subchefia para Assuntos Jurídicos**

LEI Nº 9.610, DE 19 DE FEVEREIRO DE 1998¹.

Altera, atualiza e consolida a legislação sobre direitos autorais e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

Título I - Disposições Preliminares

Art. 1º Esta Lei regula os direitos autorais, entendendo-se sob esta denominação os direitos de autor e os que lhes são conexos.

Art. 2º Os estrangeiros domiciliados no exterior gozarão da proteção assegurada nos acordos, convenções e tratados em vigor no Brasil.

Parágrafo único. Aplica-se o disposto nesta Lei aos nacionais ou pessoas domiciliadas em país que assegure aos brasileiros ou pessoas domiciliadas no Brasil a reciprocidade na proteção aos direitos autorais ou equivalentes.

Art. 3º Os direitos autorais reputam-se, para os efeitos legais, bens móveis.

Art. 4º Interpretam-se restritivamente os negócios jurídicos sobre os direitos autorais.

Art. 5º Para os efeitos desta Lei, considera-se:

I - publicação - o oferecimento de obra literária, artística ou científica ao conhecimento do público, com o consentimento do autor, ou de qualquer outro titular de direito de autor, por qualquer forma ou processo;

II - transmissão ou emissão - a difusão de sons ou de sons e imagens, por meio de ondas radioelétricas; sinais de satélite; fio, cabo ou outro condutor; meios óticos ou qualquer outro processo eletromagnético;

III - retransmissão - a emissão simultânea da transmissão de uma empresa por outra;

IV - distribuição - a colocação à disposição do público do original ou cópia de obras literárias, artísticas ou científicas, interpretações ou execuções fixadas e fonogramas, mediante a venda, locação ou qualquer outra forma de transferência de propriedade ou posse;

V - comunicação ao público - ato mediante o qual a obra é colocada ao alcance do público, por qualquer meio ou procedimento e que não consista na distribuição de exemplares;

VI - reprodução - a cópia de um ou vários exemplares de uma obra literária, artística ou científica ou de um fonograma, de qualquer forma tangível, incluindo qualquer armazenamento permanente ou temporário por meios eletrônicos ou qualquer outro meio de fixação que venha a ser desenvolvido;

VII - contrafação - a reprodução não autorizada;

VIII - obra:

a) em co-autoria - quando é criada em comum, por dois ou mais autores;

b) anônima - quando não se indica o nome do autor, por sua vontade ou por ser desconhecido;

c) pseudônima - quando o autor se oculta sob nome suposto;

d) inédita - a que não haja sido objeto de publicação;

e) póstuma - a que se publique após a morte do autor;

f) originária - a criação primígena;

g) derivada - a que, constituindo criação intelectual nova, resulta da transformação de obra originária;

h) coletiva - a criada por iniciativa, organização e responsabilidade de uma pessoa física ou jurídica, que a publica sob seu nome ou marca e que é constituída pela participação de diferentes autores, cujas contribuições se fundem numa criação autônoma;

i) audiovisual - a que resulta da fixação de imagens com ou sem som, que tenha a finalidade de criar, por meio de sua reprodução, a impressão de movimento, independentemente dos processos de sua captação, do suporte usado inicial ou posteriormente para fixá-lo, bem como dos meios utilizados para sua veiculação;

IX - fonograma - toda fixação de sons de uma execução ou interpretação ou de outros sons, ou de uma representação de sons que não seja uma fixação incluída em uma obra audiovisual;

X - editor - a pessoa física ou jurídica à qual se atribui o direito exclusivo de reprodução da obra e o dever de divulgá-la, nos limites previstos no contrato de edição;

XI - produtor - a pessoa física ou jurídica que toma a iniciativa e tem a responsabilidade econômica da primeira fixação do fonograma ou da obra audiovisual, qualquer que seja a natureza do suporte utilizado;

XII - radiodifusão - a transmissão sem fio, inclusive por satélites, de sons ou imagens e sons ou das representações desses, para recepção ao público e a transmissão de sinais codificados, quando os meios de decodificação sejam oferecidos ao público pelo organismo de radiodifusão ou com seu consentimento;

XIII - artistas intérpretes ou executantes - todos os atores, cantores, músicos, bailarinos ou outras pessoas que representem um papel, cantem, recitem, declamem, interpretem ou executem em qualquer forma obras literárias ou artísticas ou expressões do folclore.

Art. 6º Não serão de domínio da União, dos Estados, do Distrito Federal ou dos Municípios as obras por eles simplesmente subvencionadas.

¹ Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19610.htm.