

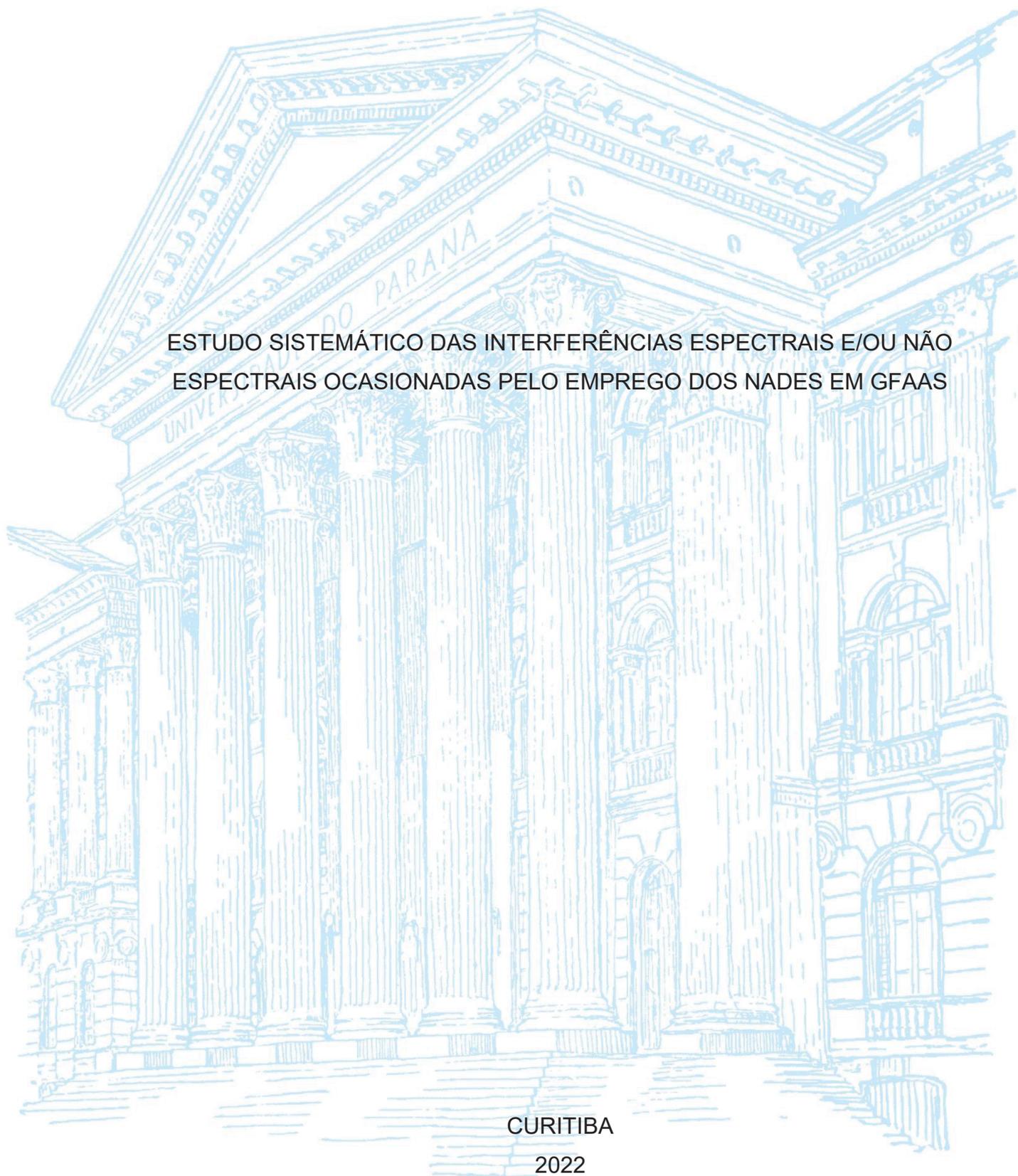
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WILLIAM GOMES ENDO

ESTUDO SISTEMÁTICO DAS INTERFERÊNCIAS ESPECTRAIS E/OU NÃO
ESPECTRAIS OCASIONADAS PELO EMPREGO DOS NADES EM GFAAS

CURITIBA

2022



WILLIAM GOMES ENDO

ESTUDO SISTEMÁTICO DAS INTERFERÊNCIAS ESPECTRAIS E/OU NÃO-
ESPECTRAIS OCASIONADAS PELO EMPREGO DOS NADES EM GFAAS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Química,
Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Pinto de Oliveira.

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Endo, William Gomes

Estudo sistemático das interferências espectrais e/ou não espectrais ocasionadas pelo emprego dos NADES em GFAAS / William Gomes Endo. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Andrea Pinto de Oliveira

1. Análise espectral. 2. Espectroscopia de absorção atômica em forno. 3. Solventes. 4. Calibração. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Oliveira, Andrea Pinto de. IV. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **WILLIAM GOMES ENDO** intitulada: **Estudo Sistemático das Interferências Espectrais e/ou Não-Espectrais Ocasionadas pelo Emprego dos NADES em GFAAS**, sob orientação da Profa. Dra. ANDREA PINTO DE OLIVEIRA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Novembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

30/11/2022 10:17:29.0

ANDREA PINTO DE OLIVEIRA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

30/11/2022 10:16:48.0

CLARICE DIAS BRITTO DO AMARAL

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/11/2022 10:42:11.0

MARIO HENRIQUE GONZALEZ

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE EST. PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO/SJR. PRETO)

AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão aos meus pais pelo investimento e incentivo à minha educação e carreira. A finalização deste trabalho só foi possível graças ao suporte e presença de vocês.

A Professora Dra. Andrea por ter me aceitado como aluno de mestrado, por permitir que meu trabalho flua conforme minha curiosidade pela ciência e estar sempre disponível para me direcionar nos tópicos centrais da nossa área de estudo.

Aos Professores avaliadores Profa. Dra. Clarice Dias Britto Amaral, que se disponibiliza em ler meu trabalho desde a fase Projeto, ao Prof. Dr. Frederico Luis Felipe Soares que integrou minha banca de Qualificação e que muito me elucidou no aspecto quimiométrico deste estudo e ao Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez pela disponibilidade em ler este documento e compor a minha banca para a Defesa.

Aos colegas de grupo de pesquisa Patrícia que com seu bom humor sempre se mostrou disponível em ajudar, igualmente para Iohanna ao qual muito contribuiu para o meu entendimento inicial sobre GFAAS. Aos alunos de IC Priscila, Rubens e Victor pela paciência de me acompanhar no forno e a colega de laboratório Amanda pela companhia no laboratório de pesquisa.

Não posso deixar de agradecer também o pessoal do laboratório de síntese orgânica Bruno, Bruna, Maria e Tay por sempre me receber muito bem e compartilhar algumas doses de café. Principalmente durante os longos dias de GFAAS essas companhias foram fundamentais. Ao Dr. Valmir que desde a minha época de IC é um exemplo e uma inspiração acadêmica.

Aos técnicos Rubens e Tiago por permitir usufruir da centrífuga e do vórtex do Departamento de Química. Sem essa disponibilidade certamente estaria em apuros.

As grandes amizades realizadas nesses últimos anos, em especial àqueles que estão presentes comigo quase toda semana dividindo uma bebida e trocando

ideias: Ana, Aoki, Bruna, Bruno, Lucas, Manu, Marcos e Moreno. Nos tornamos maiores quando rodeados por pessoas incríveis.

Aos que lutam por preservar e ampliar o direito de uma educação pública, gratuita e de qualidade. Pela luta e criação do poder popular. Venceremos!

Por fim, à CAPES, CNPq e UFPR pelos recursos disponibilizados para a execução deste trabalho.

RESUMO

Os solventes eutéticos profundos (DES) vêm atualmente sendo bastante estudados conforme observado na literatura, dado o elevado número de publicações dentro das mais diversas áreas da Química. Uma das razões refere-se à simplicidade e rapidez de síntese dos DES, baixo custo e toxicidade, e flexibilidade quanto a capacidade de modulação desses solventes, possibilitando que seja adaptável e otimizado conforme o propósito de aplicação. Os solventes eutéticos profundos naturais (NADES), sendo uma das subclasses do DES têm como precursores compostos naturais como ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares e álcoois e tem ganhado atenção devido ao seu alinhamento aos conceitos da Química Verde e sua versatilidade de uso, em particular no preparo de amostras. No presente estudo, será avaliado o uso dos NADES a base de ácido cítrico (Ac), ácido láctico (Al), cloreto de colina (ClCo) e glicose (Gli) como solvente extrator no preparo de amostras para a determinação de As, Cd e Pb, elementos cuja toxicidade em humanos é bem fundamentada, empregando-se duas estratégias de preparo de amostras distintas (assistido por vórtex e ultrassom), bem como a compatibilidade dos NADES com a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com o Forno de Grafite (GFAAS), através da avaliação de interferências espectrais e/ou não espectrais decorrentes das condições reacionais/instrumentais aplicadas, por meio de ferramentais quimiométricas como planejamentos experimentais, funções de deseabilidade e análise de superfície de resposta, por meio das variáveis dependentes: recuperação (%), massa característica (m_0) e o parâmetro *signal-to-background-ratio* (SBR) na otimização e avaliação do comportamento dos NADES frente a técnica GFAAS. Além dos NADES terem a capacidade de extrair os analitos estudados no método mais simples (vórtex a temperatura ambiente), foi observado uma possível capacidade dos constituintes dos NADES atuarem sinergicamente com modificadores químicos para os analitos As, Cd e Pb na técnica GFAAS, tornando a aplicação dos estudos com NADES muito promissor para a área de Química Analítica. O destaque fica com o NADES (ClCo-Ac-A), atingindo recuperações em valores desejados (90,25 a 95,89 %) na determinação de Cd e Pb em todos os MRC's avaliados neste estudo. Os LOD's obtidos foram, para NADES (Al-Gli-A) e (ClCo-Ac-A), respectivamente, 0,2722 e 1,2308 mg kg⁻¹ para As, 0,0837 e 0,1914 mg kg⁻¹ para Cd e 0,1859 a 0,6135 mg kg⁻¹ para Pb.

Palavras-chave: GFAAS; NADES; calibração multivariada; interferências, modificador químico, sinergia.

ABSTRACT

Deep eutectic solvents (DES) are currently being extensively studied as observed in the literature, given the high number of publications within the most diverse areas of Chemistry. One of the reasons refers to the simplicity and speed of DES synthesis, low cost and toxicity, and flexibility regarding the modulation capacity of these solvents, allowing it to be adaptable and optimized according to the application purpose. Natural deep eutectic solvents (NADES), being one of the subclasses of DES, have as precursors natural compounds such as organics, amino acids, sugars and alcohols and have gained attention due to their improvement to the concepts of Green Chemistry and their versatility of use, particularly in sample preparation. In the present study, the use of NADES based on citric acid (Ac), lactic acid (Al), choline chlorine (ClCo) and glucose (Gli) will be evaluated as an extractor solvent in sample preparation for the extraction of As, Cd and Pb, elements whose toxicity in humans is well-known, using two different sample preparation strategies (assisted by vortex and ultrasound), as well the compatibility of NADES with the technique of Atomic Absorption Spectrometry with the Graphite Furnace (GFAAS), through the evaluation of spectral and/or non-spectral interferences suffered from the applied reaction/instrumental conditions, through chemometric tools such as experimental designs, desirability functions and response surface analysis, through the dependent variables: recovery (%), resource mass (m_0) and the signal-to-background-ratio (SBR) parameter in the optimization and evaluation of the NADES behavior against the GFAAS technique. In addition to the NADES having the ability to extract the analytes studied in the simplest method (vortex at room temperature), an ability of the NADES constituents to act synergistically with chemical modifiers ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) for the analytes As, Cd and Pb in the GFAAS technique was observed, making the application of studies with NADES very promising for the area of Analytical Chemistry. The highlight is NADES (ClCo-Ac-A), achieving recoveries in desired values (90.25 to 95.89%) in the Cd and Pb experiment in all MRCs evaluated in this study. The LOD's obtained were, for NADES (Al-Gli-A) and (ClCo-Ac-A), respectively, 0.2722 and 1.2308 mg kg^{-1} for As, 0.0837 and 0.1914 mg kg^{-1} for Cd and 0.1859 to 0.6135 mg kg^{-1} for Pb.

Key-words: GFAAS; NADES; Multivariate Calibration; interferences, chemical modifier, synergy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Programa de aquecimento, com as etapas bem estabelecidas (secagem, pirólise, atomização e limpeza) na técnica de GFAAS.....	21
Figura 2: Esquema adaptado (MARTIN, 2018) de comparação de equilíbrio sólido-líquido de uma mistura eutética ideal (linha vermelha) e de uma mistura eutética profunda (linha azul). A definição dos DES deve ser aquela que garante uma diminuição da temperatura de fusão da mistura eutética ideal (ΔT_2) e não somente da diferença de seus precursores isolados (ΔT_1).....	31
Figura 3: Publicações por ano utilizando o termo “ <i>Deep eutectic solvent</i> ” na Base de Dados Scopus.....	34
Figura 4: Publicações por ano utilizando o termo “ <i>Natural Deep eutectic solvent</i> ” na Base de Dados Scopus.....	34
Figura 5: Constituintes naturais mais comuns utilizados na síntese dos Solventes Eutéticos Profundos Naturais (NADES).....	35
Figura 6: Folhas de espinafre (<i>Spinacia oleracea</i>), obtidas de comércio local na região de São José dos Pinhais – PR, liofilizadas e moída/peneiradas, respectivamente.....	44
Figura 7: Viscosímetro de Ostwald, utilizado para a determinação da viscosidade dos NADES.....	46
Figura 8: Esquema do Procedimento de Preparo de Amostras empregando os NADES como Solvente Extrator.....	48
Figura 9: Aplicação de Planejamentos Fatoriais de dois níveis, para a avaliação das variáveis dependentes mais significativas, e suas possíveis interações no auxílio da determinação das condições ótimas para a determinação de As por GFAAS em amostras de folhas de espinafre (<i>Spinacie oleracea</i>).....	50
Figura 10: NADES (Al-Gli-A) sintetizados em diferentes proporções molares (mol) de água (ácido lático: glicose: água): 1:1:0 (A); 1:1:1 (B) e 1:1:5 (C) e 1:1:10 (D).	55
Figura 11: NADES (ClCo-Ac-A) sintetizados em diferentes proporções molares (mol) (cloreto de colina: ácido cítrico: água): 1:1:0 (A); 1:1:1 (B) e 1:1:5 (C) e 1:1:10 (D).	56
Figura 12: de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para os NADES (Al-Gli-A) (verde) e seus compostos precursores: ácido lático (vermelho) e glicose (azul).	58

Figura 13: Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para o NADES (CICo-Ac-A) (verde) e seus compostos precursores: cloreto de colina (vermelha) e ácido láctico (verde).....	60
Figura 14: Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para o NADES (CICo-Ac-A) e NADES (Al-Gli-A) em diferentes proporções molares (mol): 1:1:0 e 1:1:10 (constituente 1: constituinte 2: água).....	61
Figura 15: Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) mensais, realizados no período de fevereiro (mês (0)) a julho (mês (4)), para o NADES (Al-Gli-A) em diferentes modos de armazenamento – Refrigerador (R) e Dissecador (D).	62
Figura 16: Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) mensais, realizados no período de fevereiro (mês 0) a julho (mês 4), para o NADES (CICo-Ac-A) em diferentes modos de armazenamento – Refrigerador (R) e Dissecador (D).	63
Figura 17: Folhas de Espinafre (<i>Spinacia oleracea</i>) após o processamento da amostra (tamanho de partícula da amostra processada de 20 mesh).	64
Figura 18: Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para os NADES (Al-Gli-A) na determinação de As com cinco variáveis dependentes: Temperatura de Pirólise (°C), Tempo de Pirólise (s), Tempo de Atomização (°C), Razão Massa/Volume (mg / 2 mL) e Modificador ($\mu\text{g}/ 5 \mu\text{L}$) e as variáveis respostas: Recuperação (%), m_0 e SBR.....	69
Figura 19: Gráficos de superfície resultado do planejamento Fatorial Fracionário 3^2 desenvolvido para a avaliação e otimização das variáveis mais significativas das condições instrumentais do GFAAS para a determinação de Pb em amostras de folhas de espinafre (<i>Spinacia Oleracea</i>).	73
Figura 20: Gráficos de superfície resultado do Planejamento Fatorial Fracionário 3^2 desenvolvido para a avaliação e otimização das variáveis mais significativas das condições instrumentais do GFAAS para a determinação de As em amostras de folhas de espinafre (<i>Spinacia Oleracea</i>).	74
Figura 21: Gráficos de superfície resultado do Planejamento Fatorial Fracionário 3^2 desenvolvido para a avaliação e otimização das variáveis mais significativas das condições instrumentais do GFAAS para a determinação de Cd em amostras de folhas de espinafre (<i>Spinacia Oleracea</i>).	76

Figura 22: Valores de Recuperação obtidos para o analito Cd, empregando-se diferentes métodos de preparo de amostras (VAE, VAE-T, UAE), utilizando os NADES (Al-Gli-A) e NADES (CICo-Ac-A) em amostras certificadas de proteínas de peixe (DORM-4, Nist) e folhas de espinafre (1560a, Nist).	80
Figura 23: Forno -de grafite após sucessivas análises (queimas), aproximadamente 500 queimas) com NADES (Al-Gli-A), na proporção molar (mol)1:1:10.	81
Figura 24: Curva de calibração de As, Cd e Pb utilizando NADES (Al-Gli-A) e NADES (CICo-Ac-A) com a diluição utilizada no preparo de amostra otimizado (1:10, NADES:solução HNO ₃ 1%)......	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros instrumentais do GFAAS aplicados para os diferentes analitos (As, Cd e Pb).	45
Tabela 2: Características físico-química dos precursores dos NADES: Ácido Lático – Glicose (Al-Gli-A) e Cloreto de Colina – Ácido Cítrico (CICo-Ac-A).....	45
Tabela 2: Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1} desenvolvido para a avaliação das variáveis referentes ao preparo de amostras e das condições instrumentais do GFAAS para a determinação de As em amostras de folha de espinafre (<i>Spinacia Oleracea</i>).....	50
Tabela 3: Valores mínimo, máximo e desejado para os parâmetros avaliados: Recuperação, massa característica (m_0) e signal-to-background-ratio (SBR) no GFAAS.	54
Tabela 5: Valores de densidade e viscosidade dos NADES (Al-Gli-A) e NADES (CICo-Ac-A) e suas respectivas soluções de análise no GFAAS (NADES (Al-Gli-A) GFAAS e NADES (CICo-Ac-A) GFAAS após a etapa de diluição (1:10) do preparo de amostras.....	57
Tabela 6: Avaliação da etapa de diluição do preparo de amostra empregando NADES para as análises por GFAAS. Condições Instrumentais: $T_{\text{pirólise}} = 1050 \text{ }^\circ\text{C}$; $t_{\text{pirólise}} = 5 \text{ s}$; $T_{\text{atm}} = 2200 \text{ }^\circ\text{C}$ (Pb) e $2450 \text{ }^\circ\text{C}$ (As); $t_{\text{atomização}} = 3 \text{ s}$; modificador = $5 \text{ } \mu\text{g}/5 \text{ } \mu\text{L}$ $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$. Volume de amostra: $20 \text{ } \mu\text{L}$ e de modificador $5 \text{ } \mu\text{L}$	65
Tabela 7: Parâmetros instrumentais do GFAAS para a determinação de As em amostras de folhas de espinafre (<i>Spinacia oleracea</i>) aplicando-se o Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1} para os NADES (Al-Gli-A) e NADES (CICo-Ac-A).....	68
Tabela 8: Avaliação das variáveis e seus respectivos níveis estudados para o Planejamento Fatorial de Nível 3 para as duas variáveis: Temperatura de pirólise ($^\circ\text{C}$) e quantidade de modificador ($\mu\text{g} / 5\mu\text{L}$) para os NADES (Al-Gli-A) e NADES (CICo-Ac-A) na determinação de As e Pb por GFAAS.....	71
Tabela 10: Avaliação das variáveis e seus respectivos níveis estudados para o Planejamento Compostos Centrais Nível 2 para as duas variáveis: Temperatura de pirólise ($^\circ\text{C}$) e Temperatura de atomização ($^\circ\text{C}$) para os NADES (Al-Gli-A) e NADES (CICo-Ac-A) na determinação de As e Pb por GFAAS. Os valores em α se referem às regiões axiais.....	70
Tabela 10: Condições instrumentais do GFAAS otimizadas após aplicação do planejamento fatorial de nível 3^2 (As, Pb) e composto central (Cd).	77

Tabela 11: Avaliação dos modelos de MSR (Figura 19 e 20) com base nas regiões de valores ótimos dos parâmetros resposta selecionados (recuperação, m_0 e SBR) para a determinação de As e Pb em amostras de folhas de espinafre (*Spinacia Oleracea*) por GFAAS, através da comparação dos valores preditos e obtidos experimentalmente.....77

Tabela 12: Valores de concentração de As, Cd e Pb em material de referência certificado de capim-marandu (E1001a, Embrapa, Brasil), folhas de tomate (1573a, Nist, EUA) e folhas de espinafre (1570a, Nist, EUA), empregando o método proposto com NADES (Al-Gli-A) e NADES (CICo-Ac-A) e determinação por GFAAS.78

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica
Ac	Ácido Cítrico
Al	Ácido Lático
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CICo	Cloreto de Colina
MRC	Material de Referência Certificado (<i>Certified Reference Materials</i>)
CS	Fonte Contínua
D ₂	Deutério
DES	Solvente Eutético Profundo
ETAAS	Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica
FAO	Food and Agriculture Administration
FDA	Food and Drugs Administration
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformata de Fourier
GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite
Gli	Glicose
HBA	Aceitador de Ligação de Hidrogênio (Hydrogen Bond Aceptor)
HBD	Doador de Ligação de Hidrogênio (Hydrogen Bond Donator)
HCL	Lâmpada de Catodo Oco
hDES	Solvente Eutético Profundo Hidrofóbico
HG GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Graffite com Geração de Vapor
HR-CS	Fonte Contínua de Alta Resolução
HR-CS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Graffite com
GFAAS	Fonte Contínua de Alta Resolução
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado
ICP-MS	Espectrometria de Massas com plasma Indutivamente Acoplado
IL	Líquido Iônico
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LMT	Limite Máximo Tolerado
LOD	Limite de Detecção

LOQ	Limite de Quantificação
LS	Fonte de Linha
LS GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite com Fonte de Linha
m_0	Massa característica
MAE	Extração Assistida por Micro-ondas
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
NADES	Solvente Eutético Profundo Natural
OES	Espectrometria de Emissão Óptica
PDES	Solvente Eutético Profundo Polimérico
SBR	Signal-background-ratio
THEDES	Solvente Eutético Profundo Terapêuticos
UAE	Extração Assistida por Ultrassom
VAE	Extração Assistida por Vortex
VAE-T	Extração Assistida por Vortex em Temperatura Elevada
WHO	World and Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

[M]	Concentração do analito
°C	Graus Celsius
A_{analito}	Sinal de absorbância do analito na amostra
$A_{\text{branco de amostra}}$	Sinal de absorbância do branco de amostra
A_{fundo} (ou A_{BG})	Sinal de absorbância do fundo proveniente da amostra
C_{analito}	Concentração do analito na amostra
C_{nominal}	Concentração Nominal da solução padrão do analito
D	Desejabilidade global
d	desejabilidade individual
E_A	Efeito da variável
EP	Efeito padronizado
$m_{\text{água}}$	massa de água
m_{NADES}	massa de NADES
n	nano
N	Número de experimentos
p	pico
rpm	rotação por minuto
S	Desvio Padrão
S_{efeito}	Desvio padrão dos efeitos e interações
T	Temperatura
$T_{\text{atomização}}$	Temperatura de atomização do programa de aquecimento do GFAAS
$t_{\text{atomização}}$	Tempo de atomização (permanência) do programa de aquecimento do GFAAS
$T_{\text{pirólise}}$	Temperatura de pirólise do programa de aquecimento do GFAAS
$t_{\text{pirólise}}$	Tempo de pirólise (permanência) do programa de aquecimento do GFAAS
V_{amostra}	Volume de amostra injetada no GFAAS
Y_{negativo}	Resposta para os valores negativos obtidos durante o desenvolvimento do método

Y_{positivo}	Resposta para os valores positivos obtidos durante o desenvolvimento do método
γ	Modo vibracional de deformação angular fora do plano
η_1	Viscosidade do fluido a ser determinado
η_2	Viscosidade do fluido referência
μ	micro
ν	Modo vibracional de estiramento
π	pi
$\rho_{\text{água}}$	Densidade da água
ρ_{NADES}	Densidade do NADES

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1.	A TOXICIDADE NOS ALIMENTOS	16
1.2.	TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS DE ANÁLISE	18
1.3.	PREPARO DE AMOSTRAS	26
1.4.	SOLVENTES ALTERNATIVOS	29
1.5.	SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS (NADES)	34
1.6.	TÉCNICAS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	40
2.	OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	43
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1.	MATERIAIS	44
3.2.	PROCEDIMENTO	45
3.2.1.	SÍNTESE DOS NADES	45
3.2.2.	CARACTERIZAÇÃO DOS NADES	46
3.2.2.1.	DENSIDADE	46
3.2.2.2.	VISCOSIDADE	46
3.2.2.3.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	47
3.2.3.	PREPARO DE AMOSTRAS EMPREGANDO OS NADES	47
3.2.3.1.	AMOSTRAS E PROCESSAMENTO	47
3.2.3.2.	EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR VÓRTEX (VAE E VAE-T)	48
3.2.3.3.	EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (UAE)	49
3.2.4.	ESTRATÉGIAS DE OTIMIZAÇÃO	49
3.2.4.1.	METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)	52
3.2.4.2.	FUNÇÕES DE DESEJABILIDADE	53
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1.	SÍNTESE DOS NADES E CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS	55
4.2.	CARACTERIZAÇÃO VIA FTIR	58
4.3.	PREPARO DE AMOSTRAS	63
4.4.	ESTUDO DAS VARIÁVEIS REFERENTES ÀS CONDIÇÕES REACIONAIS/INSTRUMENTAIS DO MÉTODO ANALÍTICO	68
4.5.	ESTUDOS DOS PARÂMETROS DE DESEMPENHO	78
4.6.	COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE PREPARO DE AMOSTRAS EMPREGADAS	79

4.7. AVALIAÇÃO DO TUBO DE GRAFITE.....	81
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....	83
7. REFERÊNCIAS.....	84
ANEXO 1.....	96

1. INTRODUÇÃO

Acompanhando o desenvolvimento industrial e tecnológico ao longo das últimas décadas, a geração de resíduos e exposição aos contaminantes inorgânicos (As, Cd, Se, Pb, Hg, etc) é uma preocupação global devido aos riscos de degradações do meio ambiente e à saúde humana (MICHELSEN-CORREA, 2021). Oriundos da contaminação de solos e água, a exposição a esses elementos mesmo em baixas concentrações causam uma variedade de efeitos adversos à saúde de animais e humanos, sendo esses elementos químicos incluídos na cadeia alimentar por meio da ingestão de alimentos contaminados.

Bioacumulativos e de elevada toxicidade mesmo presentes em baixas concentrações, é de interesse global o monitoramento dos contaminantes inorgânicos. Agências reguladoras como a *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e outras equivalentes de cada país são responsáveis pelo monitoramento e estabelecimento de métodos de análise para fins de avaliação de conformidade, através do parâmetro como o limite máximo tolerado (LMT) para cada contaminante inorgânico em diversos tipos de matrizes (ANVISA, 2021). Dentro desse contexto, metodologias analíticas mais sustentáveis estão atualmente sendo propostas, ou seja, métodos de análise química que demandam baixo consumo de energia, reduzida toxicidade, baixo custo e reduzida geração de resíduos alinhados aos princípios da Química Verde para a determinação do teor dos contaminantes inorgânicos por técnicas espectrométricas (ABBOTT, 2004; GALUSZKA, 2013; BENVENUTTI, 2019; NOWAK, 2021).

Entre as técnicas analíticas para a quantificação dos constituintes inorgânicos, a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) é uma técnica comumente empregada para a quantificação de elementos como: As, Cd e Pb - objeto de estudo desse trabalho (BUTCHER, 2017). A técnica, também conhecida como espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (ETAAS), consiste no monitoramento da radiação absorvida por elementos na forma atomizada produzidos dentro de um tubo de grafite (atomizador) aquecido eletricamente. Vantagens para essa técnica incluem nível de detectabilidade na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ à ng L^{-1} , reduzido consumo de massa/volume de amostra, para as análises químicas, requerendo comumente volumes de amostra na ordem de uma alíquota de 20 μL . (WELZ, 2008; SKOOG, 2021; BUTCHER, 2021).

1.1. A Toxicidade nos Alimentos

Por meio de uma variedade de fatores comumente presentes na indústria alimentícia, como o tipo de cultivo do solo, poluição ambiental, práticas agrícolas, contaminações durante as operações unitárias, condições de armazenamento (enlatados, por exemplo), elementos químicos potencialmente danosos à saúde humana podem ser inseridos no produto final a ser consumido pelo ser humano (ORESTE, 2013). Em plantas, diversos contaminantes inorgânicos podem ser bioacumulados e transferidos para a cadeia alimentar tanto de animais como de seres humanos. Para tanto, índices de transferência de elementos metálicos entre solo-planta (por exemplo, fator de bioconcentração e índice de carga-poluição) são propostos para descrever a translocação de metais em sistemas de solos e plantas, de modo a determinar e monitorar os efeitos ecotoxicológicos do consumo de alimentos contaminados (RAI, 2019).

Dos contaminantes inorgânicos, são de relevância tóxica os elementos As, Cd e Pb, pois além de serem bioacumulativos (animais e vegetais), possuem baixo nível de LMT (limite máximo tolerado). Para a saúde humana, elevadas concentrações de As, Pb e Cd trazem severas complicações como disfunções renais, cirrose, danos cerebrais, problemas cardiovasculares e são também agentes cancerígenos como indicados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) (SMITH, 1997).

O arsênio é o vigésimo elemento mais abundante da crosta terrestre e sua presença na água pode ocorrer por fonte natural e antrópicas (GONG, 2002). A principal forma de contaminação por As é pelo consumo de água contaminada, sendo absorvido pelo trato gastrointestinal. Outras fontes de contaminação incluem os processos de fundição de metais não-ferrosos, plantas termoelétricas, atividades de mineração, deposição de particulados provenientes da queima de combustível fóssil e pesticidas contendo o elemento como impureza (VEZZA, 2018). A exposição ao arsênio pode levar a disfunção de multi-organismos, problemas na medula óssea, encefalopatia, hepatomegalia, melanoma, diarreia, neuropatias, distúrbio no ritmo cardíaco e doença vascular periférica, além de risco de câncer, no fígado, rins, bexiga e pele (RAI, 2019). A tolerância máxima de arsênio segundo a *Food and Agriculture Organization/World Health Organization* (FAO/WHO) é de $100 \mu\text{g g}^{-1}$ para óleos vegetais, de $10 \mu\text{g g}^{-1}$ para água mineral, e

0,02 $\mu\text{g g}^{-1}$ para arroz. No Brasil o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece um limite de 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ para peixes. (NOGUEIRA, 2006; COMMISSION, 2011; MEETING, 2011; DAI, 2013; ABBAS, 2016).

A exposição humana ao elemento Cd se dá pelo consumo de alimentos contaminados, cigarro e resíduos de processos de mineração e indústrias como as de baterias e metalúrgicas. Em humanos, a exposição ao Cd pode causar edemas pulmonares e irritações respiratórias quando inalado. A exposição crônica pode levar a doenças renais, anemia, pneumonia, inibição de hormônios (progesterona e estradiol), osteoporose e fraturas ósseas, além de risco de câncer no pulmão e mamas (RAI, VARDHAN, 2019).

Um caso notório de contaminação pelo elemento Cd ocorreu no Japão em 1912 onde os esforços para a remediação da contaminação veem ocorrendo desde 1972 até os dias atuais. Tal evento se deu pela contaminação de rios por resíduos de companhias de mineração contaminando centenas de pessoas por meio do consumo de arroz contaminado por Cd. A doença, desde então denominada *itai-itai*, além dos sintomas supracitados causa severas dores em juntas como também dor nas costas (IKEDA, 2015). Segundo a agência reguladora (FAO/WHO), a tolerância máxima de Cd é de 400 $\mu\text{g g}^{-1}$ para arroz, 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ para vegetais e 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ para frutas vegetais (COMMISSION, 2011; MEETING, 2011; ABBAS, 2016).

O chumbo é um elemento não biodegradável e acumulativo nos organismos vivos. A maior preocupação quanto à contaminação de Pb está relacionada ao consumo de água contaminada principalmente por atividades de mineração, processos metalúrgicos, plantas eletrotérmicas, queima do petróleo cru e uso de tintas que contém chumbo em sua composição (SHARMA, 2005; SENGAR 2008). Entre as consequências de sua bioacumulação no organismo humano, são relatados casos de anemia, doenças renais e outras doenças relacionadas ao metabolismo, encefalopatia, náuseas e vômitos. Danos ao sistema nervoso central, sistema circulatório e dores abdominais também são relatadas em caso de contaminação por Pb, além de ser considerado um potencial cancerígeno aos seres humanos. Em crianças, situações de vulnerabilidade são descritas desde o desenvolvimento do feto, podendo causar distúrbios quanto aos aspectos cognitivos, afetando áreas neurológicas relacionadas a concentração e ao aprendizado da criança (RAI, 2019; KIM, 2019). A tolerância máxima de chumbo

segundo a FAO/WHO é de 300 $\mu\text{g g}^{-1}$ para peixes, 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ para vegetais e 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ em leites (COMMISSION, 2011; MEETING, 2011; ABBAS, 2016).

Todos os fatores citados contribuem para a importância e crescente demanda na determinação quantitativa desses contaminantes inorgânicos (As, Cd e Pb) em diversos tipos de amostras, onde a área de química analítica vem contribuindo significativamente na elucidação quanto ao teor desses elementos, como também na análise de especiação química, que consiste na determinação da concentração de várias formas químicas de um determinado elemento em uma matriz (ORESTE, 2013; VAN BEIK, 2017; VALASQUES, 2020; NASCIMENTO, 2020; ATAEE, 2020; HUANG, 2022). Nas análises de alimentos, elementos potencialmente tóxicos, a considerar As, Cd, e Pb necessitam de uma atenção especial devido ao grau de toxicidade elevada mesmo em baixas concentrações, cujo o LMT está na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$. Para tanto, a técnica de GFAAS é comumente utilizada nesse contexto, pois ela abrange a determinação de elementos traços ($\mu\text{g g}^{-1}$) à ultratraços (ng g^{-1}), além de ser um instrumento bem consolidado na literatura devido a elevada sensibilidade e seletividade, esse último parâmetro intrínseco às técnicas de AAS. Como já comentado, a origem desses elementos nos alimentos é variada, podendo ocorrer a partir do cultivo do solo, da poluição ambiental, práticas agrícolas, como também durante o processo de fabricação (ORESTE, 2013). Outras técnicas analíticas como a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e técnicas multielementar como espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) também são utilizadas em análises de alimentos, entretanto ou não apresentam o nível de detectabilidade desejado para a quantificação desses elementos, ou apresentam um custo relativamente alto, como o ICP-MS, fazendo com que a técnica GFAAS ainda seja muito empregada na quantificação de As, Cd e Pb em diversos tipos de amostras (ORESTE, 2013).

1.2. Técnicas Espectrométricas de Análise

As técnicas espectrométricas são empregadas na determinação qualitativa e quantitativa de uma variedade de elementos químicos, em nível traços-ultratraços. Os métodos analíticos desenvolvidos empregando a espectrometria são geralmente rápidos, eficientes e no geral apresentam desejável seletividade quando bem otimizados os parâmetros reacionais/instrumentais de cada método.

A determinação das espécies químicas inorgânicas ocorre na fase gasosa e atômica do analito, tornando a denominada etapa de atomização uma das fases críticas durante a análise que garante alta eficiência e reprodutibilidade para as técnicas espectrométricas (CROUCH, 2006).

Os métodos espectrométricos de absorção e emissão atômica podem ser classificados de acordo com o atomizador empregado nas análises químicas, sendo os mais utilizados as técnicas com fonte de plasma, como as técnicas de ICP OES e ICP-MS, técnicas com atomizador de chama e eletrotérmico, utilizados em FAAS e GFAAS, respectivamente (GORDON, 2001; CROUCH, 2006; THUY, 2010; PERIC, 2013; KERTON, 2013).

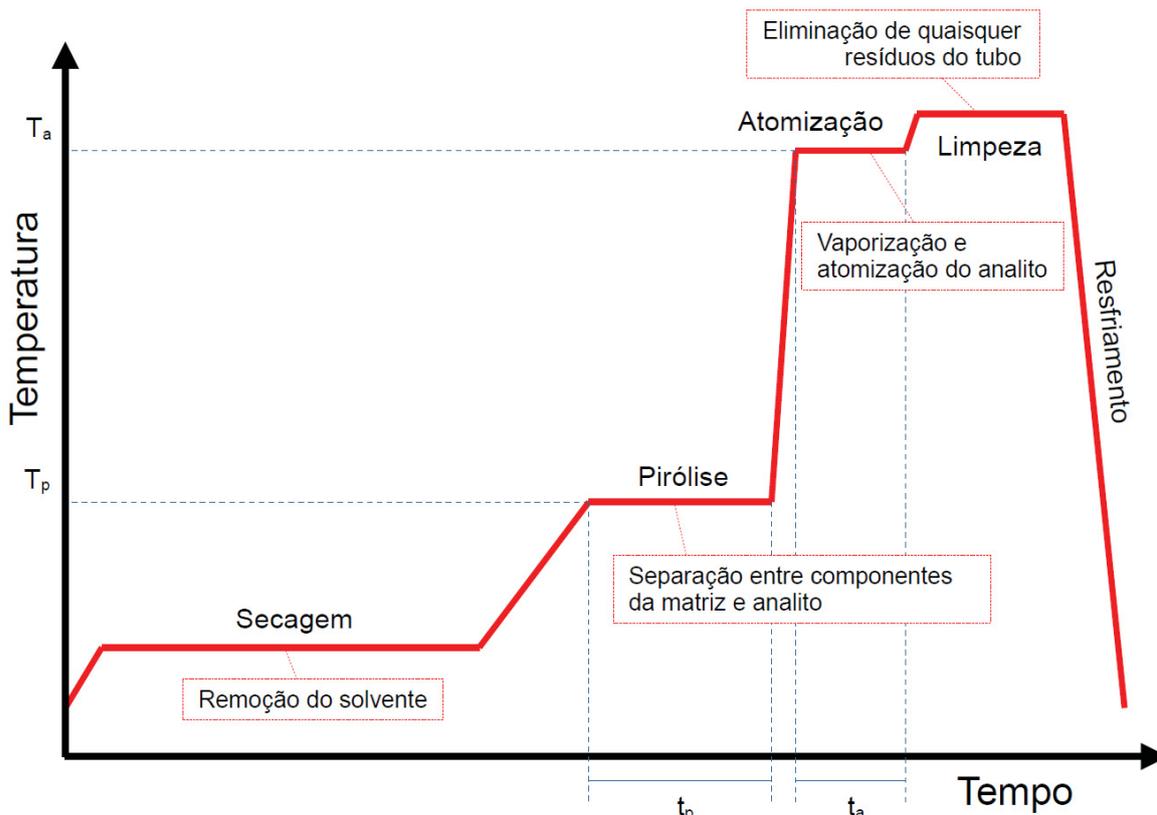
A técnica de GFAAS baseia-se na absorção de radiação por átomos livres, no estado gasoso, em um atomizador eletrotérmico (normalmente um atomizador de grafite). A radiação incidida no vapor atômico possui comprimento de onda específico para cada elemento, o que torna a técnica essencialmente monoelementar. O processo de atomização (geração de átomos no estado elementar e gasoso) ocorre no interior de um tubo de grafite, aquecido eletricamente. Como o processo se passa no interior do tubo (atomizador), o ambiente parcialmente fechado permite que a nuvem atômica da amostra permaneça por um tempo considerável no caminho óptico, melhorando a eficiência e a sensibilidade da técnica. Importante mencionar também que toda a amostra é volatilizada no processo de quantificação do analito e associado ao tempo no caminho óptico de 1s ou mais, a técnica de GFAAS apresenta um nível de detectabilidade na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ à ng L^{-1} (WELZ, 2008; SKOOG, 2013).

Essas condições características do GFAAS, como elevada sensibilidade, baixo consumo de amostra (alíquotas de 20 μL em geral) e considerando ainda que o número de etapas do preparo de amostras é menor – visto que o tratamento térmico da amostra pode ser realizado durante a etapa de quantificação do analito onde efetivamente ocorre a separação dos concomitantes inorgânicos (presentes na matriz) do analito, a técnica de GFAAS é extensivamente empregada para muitos propósitos analíticos, quando se deseja elevada sensibilidade para a quantificação dos espécies inorgânicas em variadas amostras.

As análises, bem como as otimizações de um procedimento analítico por GFAAS seguem um programa de aquecimento bem estabelecido (Figura 1). O volume de amostra injetada (de 10 – 100 μL), sob a forma de gota, é aquecida em

uma primeira etapa cuja função é a evaporação e eliminação do solvente (etapa de dessolvatação). Posteriormente, é definido como etapa de pirólise (400 – 1300 °C) àquela responsável pela separação térmica do analito da matriz (concomitantes inorgânicos). O sinal do analito é obtido na etapa de atomização, onde a temperatura é elevada o suficiente (1300 – 2600 °C a depender do analito) para criar uma nuvem do analito vaporizado e atomizado. Este sinal é gerado através da absorção da radiação proveniente da fonte primária da radiação lâmpada de cátodo oco (HCL), juntamente com o corretor de fundo, a lâmpada de Deutério (D₂) que poderá ser empregado ou não, a depender do comprimento de onda do analito. Ambos os sinais obtidos (sinal do analito e sinal de fundo (*background*) são integrados e equalizados (WELZ, 2008). Por fim, o atomizador passa por uma etapa de limpeza para a eliminação de possíveis resíduos remanescentes da amostra, para eliminação ou redução de possíveis efeitos de memória, aplicando-se uma etapa de resfriamento no final do programa, para iniciar uma nova análise.

Figura 1: Programa de aquecimento, com as etapas bem estabelecidas (secagem, pirólise, atomização e limpeza) na técnica de GFAAS.



Problemas de interferências espectrais e/ou não espectrais em técnicas analíticas baseadas em absorção atômica e seu conhecimento/entendimento é de interesse comum dentro da área de aplicação da espectrometria para a quantificação de elementos em diversos tipos de amostras, visto que a presença de interferentes afeta diretamente a sensibilidade, a exatidão e a precisão dos resultados. Na espectrometria de absorção atômica (AAS), as interferências são classificadas de acordo com o conjunto de características em comum, entretanto não devem ser consideradas independentes pois podem interagir mutuamente. Deste modo, as interferências são divididas em interferências espectrais e não espectrais.

As interferências espectrais são aquelas relacionadas a separação incompleta da radiação absorvida pelo analito, sendo ocasionada por outras fontes de radiação como também a radiações de absorção de outras espécies químicas detectadas e processadas pelo sistema de detecção do instrumento. Incluem como interferência espectral a sobreposição de linhas de absorção ocasionada por outros elementos químicos e de vibrações de moléculas no estado gasoso; a absorção por concomitantes em comprimentos de onda (λ) muito próximos ao λ do analito, que não são possíveis de serem separadas pelo monocromador/corretor de fundo;

como também devido ao espalhamento da radiação do analito ocasionada pela presença de materiais sólidos particulados. Em AAS as interferências espectrais oriundas do processo de absorção dos elementos químicos são menos comuns, sendo mais observadas em espectrometria de emissão atômica (OES) por se tratar de uma técnica multielementar e que atinge altos valores de temperatura no atomizador suficiente para promover a excitação eletrônica da grande maioria dos elementos químicos presentes em uma amostra (WELZ, 2008). Em AAS são mais comuns as interferências espectrais relacionadas a absorção molecular quando a etapa de pirólise não é eficiente para reduzir/eliminar os concomitantes presentes na matriz.

Quanto às interferências não espectrais, essas estão relacionadas diretamente ao número de átomos do analito no estado gasoso livre quando na etapa de atomização, sendo que eventual mudança no estado químico do analito afeta diretamente no sinal analítico. Desta forma, perdas do analito durante a etapa de pirólise é comumente uma fonte de interferência não espectral, ou seja, quando o elemento químico a ser determinado tem sua volatilidade alterada consequente das condições reacionais (preparo de amostras) e instrumentais de análise, sendo neste caso crucial a otimização da temperatura de pirólise para cada analito/matriz e a possibilidade do emprego de modificadores químicos. Neste sentido também se aplica para a etapa de atomização, pois para cada analito uma temperatura de atomização deve ser avaliada. Temperaturas baixas podem não possibilitar a atomização eficiente do analito, bem como temperaturas demasiadamente elevadas podem favorecer a atomização de contaminantes – intensificando também as interferências espectrais - além da possibilidade de acelerar o desgaste do tubo de grafite. A depender do solvente utilizado no preparo de amostras (seja aquosa ou solvente orgânico), a etapa de secagem deve ser otimizada de modo a evitar que a gota inserida “espirre” e expulse o analito para fora do tubo de grafite.

É comum, ao se observar com interferências não-espectrais, o emprego de modificadores químicos a fim de se evitar possíveis perdas do analito e melhorar a eficiência de separação dos concomitantes presentes na matriz do analito, efeito este que reflete consideravelmente na seletividade, bem como no nível de detectabilidade do método, quanto aos limites de determinação (LOD) e quantificação (LOQ). A viabilidade do emprego de modificadores químicos deve-se a possibilidade no aumento da temperatura de pirólise, pois o analito se torna mais

refratário, permitindo eficiente separação térmica da matriz e do analito, reduzindo significativamente as interferências não espectrais. A sistemática de trabalho é fazer a adição dos modificadores químicos nas soluções padrão, como também nas amostras de análise (LIMA, 2016; BUTCHER, 2021). Ou ainda, pode-se empregar a estratégia de se adicionar o modificador químico uma única vez no tubo de grafite, modificador químico permanente (WELZ, 2008; BUTCHER, 2021). Dentre os modificadores empregados nas análises, comumente são utilizados modificadores químicos de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ e/ou $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, conhecido como modificador químico universal, devido a possibilidade do emprego desses modificadores quando em conjunto atuarem de forma significativa para um grande número de analitos, por meio da formação de compostos ou sólidos de paládio/magnésio, oxigênio e o analito, viabilizando uma eficiente separação térmica do analito/matriz (WELZ, 2008; BUTCHER, 2021).

Além dos tradicionalmente modificadores de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ e/ou $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, outros modificadores são recorrentemente relatados na literatura, como modificadores de irídio, peróxido de hidrogênio, ácido cítrico, ureia, nanopartículas como Fe_3O_4 , dentre outros (ACAR, 2008; LIMA, 2016; BAFGHI, 2020; BUTCHER, 2021).

Deslocamento nos equilíbrios de ionização e dissociação do analito também pode ser significativamente alterado pela presença dos concomitantes, além de processos de recombinação do analito com os interferentes são comuns de ocorrerem em AAS. As formações de óxidos metálicos são indesejáveis, para tanto a utilização de argônio como gás de purga se faz necessário para evitar que o oxigênio presente no ar não reaja com elementos químicos presentes na amostra, em particular o analito (WELZ, 2008). Outro fator importante é a possível formação de carbetos podendo ser influenciada pelos concomitantes presentes na amostra, que também reagem com o tubo de grafite diminuindo sua vida útil.

Em geral, quando as etapas do programa de aquecimento (pirólise e atomização) são bem otimizadas, levando-se em consideração o analito e a matriz de análise, problemas de interferências são significativamente reduzidos, propiciando um ambiente químico na etapa de atomização eficiente e reprodutível, refletido na qualidade analítica dos resultados, em termos de sensibilidade, exatidão e precisão.

A excitação dos átomos em sua forma vaporizada geralmente é feita por fontes de radiação externa de linha espectral, como lâmpadas de cátodo oco

(HCLs). Para as análises das amostras, é comum a necessidade de estratégias analíticas que reduzam significativamente os sinais de fundo gerado pela presença dos concomitantes inorgânicos, que podem absorver, emitir ou espalhar radiação, muito próxima à radiação emitida ou absorvida pelo analito, podendo gerar resultados super/subestimados quanto ao teor do analito na amostra. Desta forma, estratégias analíticas para a correção do sinal de fundo são empregadas, como a correção por fonte contínua (lâmpada de deutério, D₂), como também pode ser empregado a correção de fundo baseado no efeito Zeeman, pela incorporação de magnetos no atomizador ou na fonte de radiação, aplicando-se o conceito do desdobramento dos níveis eletrônicos quando um vapor atômico é submetido a um forte campo magnético (WELZ, 2008; BUTCHER; 2021).

A técnica de correção de fundo (*background*) utilizando uma fonte contínua se baseia assumindo que a atenuação do sinal do analito proveniente do sinal de fundo é uma banda larga comparada a linha de absorção do analito (linhas estreitas, característica em AAS) e que esta banda não varia na faixa da largura da fenda selecionada. Um modulador rotatório alterna a radiação proveniente da lâmpada de HCL e a lâmpada D₂ e a banda de radiação (sinal do analito) é isolada pela diferença dos espectros obtidos destas duas fontes de radiação. Vantagens desta técnica inclui baixo custo, sem perda de sensibilidade e boa exatidão para os elementos químicos que absorvem radiação entre 190-360 nm. Quanto às limitações incluem a necessidade de alinhar a fonte de radiação primária com a fonte de radiação contínua e a quantificação do analito deve estar contemplada dentro da faixa da lâmpada de D₂ (190 a 360 nm). Fora desta faixa outras fontes de radiação contínuas são recomendadas, por exemplo a fontes de tungstênio ou halogênio para a correção do sinal de fundo (WELZ, 2008; BUTCHER; 2021).

O efeito Zeeman se baseia no fenômeno de desdobramento das linhas de absorção/emissão com a influência de um campo magnético. Considerado uma das formas mais eficientes para a correção de fundo, entretanto os instrumentos equipados com este método de correção geralmente são mais custosos e pode ocorrer também perda de sensibilidade (devido ao desdobramento de picos de alta intensidade), além da possibilidade de gerar possíveis interferências espectrais, ou seja, desdobramentos de outras linhas de absorção nas proximidades da linha do analito (WELZ, 2008; BUTCHER; 2021).

Um dos destaques das técnicas de espectrometria de absorção atômica está na aplicação de fontes contínuas de alta resolução (HR-CS) em AAS, ao qual superou algumas limitações instrumentais, como elevados ruídos e baixa intensidade das lâmpadas de xenônio de arco voltaico em baixos comprimentos de onda (onde se encontra a maioria das linhas de absorção, 190-360 nm) e monocromadores com baixa resolução. Apesar de todos os problemas e obstáculos, os trabalhos empregando-se fonte contínua em AAS não foram abandonados e hoje essa técnica se mostra viável, levando a obtenção de resultados promissores. Almeida et al. (2020) determinaram Be, Cd e Pb em particulados atmosféricos utilizando da técnica HR-CS-GFAAS, com satisfatórios valores para o LOD 0,001 e 0,004 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Be e Pb, e valores de LOQ 0,0033 e 0,0132 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Be e Pb respectivamente). Schriter et al. (2021) analisaram amostras de plantas e solos empregando-se a técnica HR-CS-GFAAS por amostragem sólida para a determinação de Ge, podendo-se verificar um método analítico robusto, de elevada frequência analítica e alta sensibilidade, para um elemento químico não usualmente estudado, como o Ge. Uma das vantagens em relação as fontes de linha (LS) está nas informações que são geradas e obtidas de todo o espectro de análise, que podem auxiliar na determinação e correção de interferências espectrais (WELZ, 2005).

A geração química de vapor, empregando-se a geração de hidretos (HG GFAAS) é uma estratégia analítica de introdução de amostra consolidada na literatura que visa a redução/eliminação de possíveis interferentes e significativa melhora na sensibilidade da técnica analítica. Nesse sistema de introdução de amostras, compostos voláteis do analito são transportados por um fluxo de gás inerte, geralmente argônio, até o atomizador. Dentre as técnicas de geração química de vapor, o sistema de geração de hidretos é o mais estudado e aplicado para a quantificação dos elementos inorgânicos. Para a formação de hidretos dos elementos químicos (As, Sb, Bi, Se, Te, Ge, Sn, Pb, Cd, Hg e Zn) é empregado um agente redutor, sendo o tetraidroborato de sódio (NaBH_4) mais comumente empregado, por apresentar uma cinética de reação elevada e ser de fácil automação, ou seja, apresenta características ideais no que se refere a estabilidade, não flameabilidade e baixa toxicidade para ser empregado em métodos automáticos de análise (YU, 2014; BUTCHER, 2021). Shaltout et al. (2020) compara às técnicas de fonte de linha: LS-GFAAS, HR-CS GFAAS e HG-

LS GFAAS para a determinação de selênio em amostras de feijão. No mencionado estudo, LS-GFAAS e HR-CS GFAAS não atingiram sensibilidade adequada para análises de Se em teor abaixo de 5 ng g^{-1} (LOD de 2,3 e $24,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para LS-GFAAS e HR-CS GFAAS respectivamente) devido a interferências espectrais, ocasionadas pela presença de óxidos de PO e NO na linha do Se $196,026 \text{ nm}$). Para a técnica HR-CS GFAAS a lâmpada de xenônio apresentou baixa intensidade na linha mais sensível para o Se $196,026 \text{ nm}$. Empregando como sistema de introdução de amostras, a geração de hidretos (HG-GFAAS), a microextração e aprisionamento dos hidretos gerados foram fundamentais para superar as interferências ocorridas nas demais técnicas avaliadas, apresentando assim sensibilidade satisfatória (LOD $0,030 \mu\text{g L}^{-1}$) sendo considerada a técnica adequada pelos autores nesse estudo.

1.3. Preparo de Amostras

Uma das etapas cruciais dentro de um método analítico é o preparo de amostras, pois é nessa etapa onde ocorre a remoção/redução de potenciais interferentes, liberando o analito da matriz e tornando-o quimicamente livre e disponível para ser quantificado pelas técnicas analíticas. Quando a amostragem é inserida no estado líquido, em geral a etapa de preparo de amostras constitui das seguintes etapas: i) digestão/mineralização da matéria orgânica constituinte; ii) extração do analito (considerando a especificidade do analito) e iii) manutenção do analito em uma forma química estável e compatível com a técnica de determinação (IEGGLI, 2011; MACHADO, 2020; BUSTOS, 2022).

Os métodos de preparo de amostras comumente reportados envolvem via seca ou úmida, utilizando diversas formas de energia como térmica, ultrassom, micro-ondas ou ultravioleta. A etapa de preparo de amostras geralmente é selecionada de acordo com a matriz e técnica de determinação, cuja otimização do processo inclui alcançar as melhores condições reacionais que favoreçam a extração do analito na matriz, em um menor tempo de preparo, mínima contaminação, reduzido gasto de reagente, e mínima geração de resíduos e efluentes, além de manter a integridade química do elemento a ser determinado.

De forma geral, a maior parte do preparo de amostras se dá por via úmida. Muitas das estratégias de preparo de amostras empregadas em AAS para análise quantitativa dos elementos inorgânicos incluem o emprego de radiação micro-ondas combinada com a digestão ácida. Entretanto, nos métodos de digestão ácida os riscos estão associados a segurança do analista, geração de resíduos químicos,

além do elevado custo de aquisição de um forno de micro-ondas com cavidade. Também se caracteriza, em alguns casos, por ser morosa, podendo ocorrer perdas do analito por volatilização (KRUG, 2008; NÓBREGA, 2006; SANTANA, 2019; ORESTE, 2020). Desta forma há uma variedade de trabalhos na literatura propondo estratégias alternativas de preparo de amostras que demandam menor tempo operacional, evitando alguns dos problemas clássicos supracitados (NÓBREGA, 2006; SANTANA, 2019). Dentre elas, se destacam as com amostragem direta na fase sólida e por suspensão (*slurry*).

Parte das vantagens do ETAAS inclui a possibilidade de injetar amostras diretamente na fase sólida, ou na forma de uma suspensão. Manfro et al (2020) analisaram amostras de sangue e plasma previamente secas para a determinação de Li por amostragem sólida em GFAAS, apresentando parâmetros de desempenho adequados (LOD 7 mg L⁻¹, valores de recuperação de 104,0% e precisão 11%) para o monitoramento terapêutico de íons Li nessas amostras. Rodriguez et al. (2020) determinaram os elementos Cr, Fe, Mg, Mn, Na e Ni por amostragem sólida no GFAAS em difenilmetano diisocianato polimérico, um material precursor para polímeros poliuretano. Calibrações foram feitas utilizando solução padrão e os resultados mostraram que a quantificação dos analitos, empregando-se a amostragem sólida por GFAAS alcançou valores de LOD significativamente mais baixos quando comparada a quantificação dessa amostra (na forma de solução) por ICP OES e ICP-MS. Entretanto, a amostragem sólida possui algumas limitações, dentre elas a necessidade de um controle maior sobre o tamanho de partícula (homogeneização da amostra), em razão de se garantir a representatividade da amostra na técnica analítica empregada; limitações quanto ao tipo de amostra, visto que matrizes como solo são altamente heterogêneas e são susceptíveis as interferências não espectrais como, por exemplo, espalhamento da radiação; limite máximo para a massa de amostra sólida injetada, o que pode ser superado utilizando-se métodos de preparo de amostras com suspensão (MACHADO, 2020).

O preparo de amostra com suspensão (*slurry*) se baseia na formação de uma solução contendo particulados sólidos em suspensão introduzido no GFAAS. Nessa estratégia de preparo de amostras, as vantagens da junção da amostragem sólida e líquida permite uma gama de possibilidades, incluindo o uso de solventes alternativos e materiais de adsorção, como o uso de nanopartículas (FILATOVA,

2020). Em comparação com a digestão ácida, o emprego da suspensão reduz significativamente etapas do preparo de amostras, reduzindo assim a possibilidade de contaminação da amostra, redução do tempo de preparo e volume de solvente/agente extrator. Entretanto, essa estratégia de preparo de amostras por suspensão apresenta algumas desvantagens como a promoção da heterogeneidade das amostras, o que leva às maiores imprecisões para os resultados obtidos quando comparado a bem fundamentada e consolidada digestão ácida. Deve-se mencionar também, que a quantidade de amostra presente na suspensão é em geral, maior quando comparada a digestão ácida, o que se faz necessário, na maioria das vezes, a aplicação de estratégias de otimização das condições instrumentais de análise, como também a redução do sinal de fundo por meio da aplicação de corretores de fundo. Kriegerova et al. determinaram Pb em amostras de placentas humanas por GFAAS utilizando a estratégia de preparo de amostras por suspensão. O método foi validado empregando-se materiais de referência certificado (MRC) e comparado com o método de digestão ácida, não apresentando diferença significativa entre os dois métodos avaliados. Maratta et al. (2020) determinou Bi em minérios de cobre empregando a preconcentração fotocatalítica em nanopartículas de óxido de titânio (IV) utilizando a técnica GFAAS e planejamentos experimentais tipo Box-Behnken, para o desenvolvimento do método. O método foi validado com MRC, com recuperações obtidas na faixa de 97,3 a 102% e LOD e LOQ de 0,5 e 1,6 ng L⁻¹ respectivamente.

Tanto a amostragem direta em fase sólida quanto por suspensão apresentam um número significativo de aplicações em sistemas ETAAS, pois para as técnicas analíticas seja de AAS ou técnicas de fonte de plasma, em geral o sistema de introdução de amostras não é compatível com elevados teores de sólidos dissolvidos, ou mesmo com suspensões de amostras, podendo sobrecarregar o sistema de nebulização em técnicas de FAAS, ICP OES e ICP-MS, não tendo representatividade da amostra no atomizador, além da possibilidade de danificar o sistema de introdução de amostras.

Nos preparos de amostras via úmida, o solvente/agente extrator comumente utilizado são os ácidos minerais, em particular ácido com potencial propriedade oxidante, como o HNO₃ que é extensivamente empregado (GONZALEZ, 2009; ORESTE, 2013). Todavia, apesar de bem fundamentada as técnicas de preparo de amostras que façam uso de ácidos minerais, o seu elevado nível de

periculosidade sempre é uma preocupação, o que faz com que a busca por reagentes químicos ambientalmente amigáveis e de baixa periculosidade como os solventes alternativos sejam atualmente promissores solvente/agente extrator para análise elementar. Dentro desse contexto, e em acordo com os doze princípios da química verde (ANASTAS, 2010), o preparo de amostras empregando solventes alternativos de baixa toxicidade e que veem apresentando notório efeito extrator dos elementos inorgânicos em diferentes tipos de amostras, como os solventes eutéticos profundos naturais (NADES), vem apresentando elevado potencial de aplicabilidade no preparo de amostras e que ainda demanda aprofundamento nos estudos na área de química analítica em destaque para as técnicas espectrométricas, em particular para a técnica de GFAAS, objeto do estudo de pesquisa. (RASHID, 2019, SANTANA, 2019; RUI 2020; BROUWER, 2021).

1.4. Solventes Alternativos

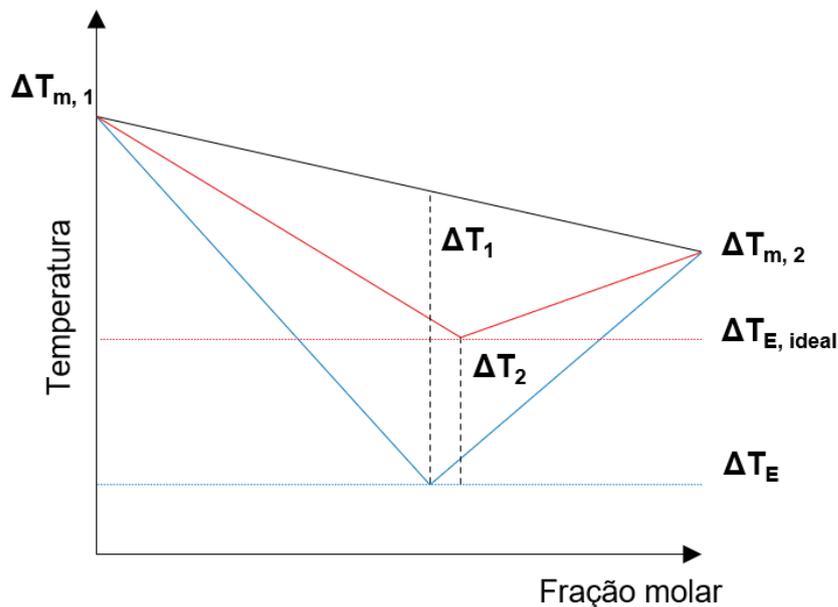
Atualmente há uma crescente preocupação com a poluição ambiental gerada principalmente por atividades antrópicas, e dentre essas, um olhar especial deve ser dado aos métodos analíticos que em sua maioria, empregam solventes de toxicidade moderada à severa, geram quantidades apreciáveis de resíduos químicos e ainda, nos tempos atuais, alguns desses são comumente descartados nas redes de esgotos. Contudo, em acordo com os princípios da química verde, corrente essa datada na década de 1980, vem ganhando cada vez mais espaço nos estudos/discussões acadêmicas frente à questão da poluição ambiental e possíveis ações/estratégias de como remediá-la. A Química Verde foi definida pela *International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC*, como: "A invenção, desenvolvimento e aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas" (TUNDO, 2000; ANASTAS, 2010). Nessa definição, o termo "perigosas" deve ser entendido como substâncias nocivas de algum modo à saúde humana ou ao meio ambiente.

Dentro desse contexto têm crescido a procura e desenvolvimento por metodologias analíticas que estejam em acordo com os princípios da química verde, de modo a garantir a segurança ao analista, diminuição de custos operacionais, empregando reduzidas quantidades de reagentes (mg - µg) além de empregar substâncias químicas de baixa toxicidade tanto ao analista como ao meio ambiente. Nas últimas décadas, acompanhando as tecnologias emergentes que

atendam às necessidades mencionadas, os solventes alternativos vêm cada vez mais ganhando espaço e atenção dos pesquisadores. Essa classe de solventes inclui os Líquidos iônicos (ILs) e os solventes eutéticos profundos (DES).

Enquanto os ILs são por definição compostos constituídos por sais catiônicos e aniônicos orgânicos, com temperaturas de fusão inferior à 100 °C, os DES são classes de solventes alternativos, denominados em 2003 por Abbot et al. (2001) e mais recentemente redefinidos como uma mistura eutética de ácidos e bases de Lewis/Brønsted em determinadas proporções molares de seus constituintes precursores. Apresentando como principal e exclusiva característica a temperatura de fusão (T_E , Figura 2) menor que seus constituintes iniciais ($T_{m,1}$ e $T_{m,2}$) e principalmente de sua mistura eutética ideal ($T_{E, ideal}$) (MARTINS, 2019; CHANDRAN, 2019; SANTANA, 2019). Esta última consideração final se faz necessária, pois a presença de ponto eutético ideal é comum em compostos que são completamente ou parcialmente imiscíveis na fase sólida. Além disso, a formação de uma $T_E < T_{E, ideal}$ (ΔT_2 na Figura 2) nos DES é de suma importância para a sua definição, pois torna a classe de solventes mais restritivos e assegura a qualificação “profundo” de seu nome. Dito isto, esta ressalva se faz necessária, pois a primeira definição quanto a formação apenas de uma $T_E < T_{m,1}; T_{m,2}$ se encontra atualmente limitada e defasada (MARTINS, 2019; CHANDRAN). A formação desta T_E se dá pelas relações com o efeito não-ideal da fase líquida através das múltiplas interações das substâncias químicas aceptoras e doadoras de ligação de hidrogênio (HBA e HBD, respectivamente) presentes no sistema, como também as interações eletrostáticas, ligações π , ligações de hidrogênio, Van der Waals, etc (MARTINS, 2019).

Figura 2: Esquema adaptado (MARTIN, 2018) de comparação de equilíbrio sólido-líquido de uma mistura eutética ideal (linha vermelha) e de uma mistura eutética profunda (linha azul). A definição dos DES deve ser aquela que garante uma diminuição da temperatura de fusão da mistura eutética ideal (ΔT_2) e não somente da diferença de seus precursores isolados (ΔT_1).



Fonte: Autor.

Ao longo dos últimos anos, devido a notabilidade dos DES, diversas subclasses deste solvente alternativo foram desenvolvidas e descritas, com finalidades e/ou definições específicas, como solventes eutéticos profundos terapêuticos (THEDES), solventes eutéticos profundos poliméricos (PDES), solventes eutéticos profundos hidrofóbicos (hDES) e os solventes eutéticos profundos naturais (NADES).

Os THEDES consistem em solventes sintetizados para aplicações farmacêuticas, ou seja, foram desenvolvidos para aumentar a solubilidade, a permeabilidade e a biocompatibilidade dos compostos farmacêuticos ativos (RAHMAN, 2021). Diferentes estudos apontam que quando compostos farmacêuticos ativos, como por exemplo, o ácido acetil salicílico e ibuprofeno são administrados na forma de THEDES, a eficiência quanto ao transporte do princípio ativo, sua absorção intestinal, solubilidade são significativamente aumentados. Para a formulação destes THEDES são comumente utilizados cloreto de colina e mentol como HBA. Pereira et al. (2022) combinaram quimicamente terpenos, como mentol, linalol e safranól com farmacêuticos ativos como ibuprofenos, flurbiprofeno e ketoprofeno para a formulação dos THEDES sendo aplicados em atividades anticancerígenas, apresentando resultados promissores, atendendo a uma demanda do setor relacionados a terapia alternativa, apresentando menor efeito

adverso, de baixo custo e com reagentes ambientalmente amigáveis. Syed et al. (2022) fez uso de um THEDES hidrofóbico a base de timol e mentol como fase dispersiva para a produção de uma nanoemulsão via ultrassom para atuação em atividades antimicrobiais, como por exemplo em aplicações dermatológicas, apresentando parâmetros satisfatórios neste quesito.

Os PDES possuem, além das características mencionadas dos DES, as propriedades particulares dos polímeros, possibilitando, por exemplo, a modificação de materiais funcionalizados, dentre as quais incluem materiais a base de nanopartícula de carbono, metais nobres, de transição entre outros (GE, 2017). Nos estudos conduzidos por Ni et al (2020). descrevem um material a base de nanotubo de carbono magnético modificado com PDES constituído de sais de amônio quaternário polimérico (cloreto de 3-acrilamidopropil trimetilamônio) com xilitol para a extração de proteína bovina. Estudo similar foi realizado por Wei et al. (2019) com PDES constituídos por sal de amônio quaternário polimérico e D-sorbitol, um açúcar polimérico, na modificação de nanopartícula metal-orgânica magnética para a separação seletiva de tinturas catiônicas.

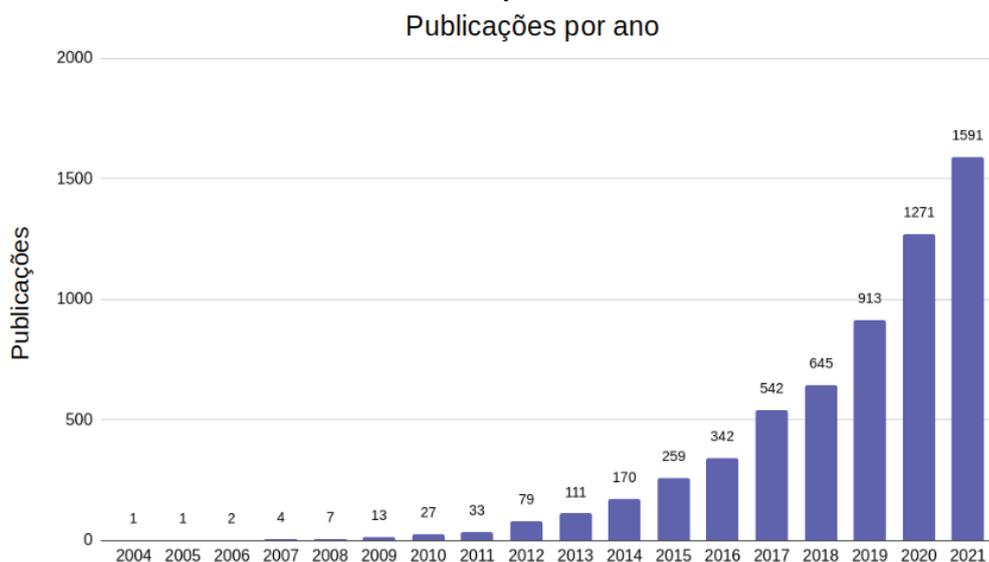
A maioria dos DES reportados atualmente são miscíveis em água, o que limita de certa forma suas aplicações para extrações de compostos químicos hidrofóbicos. Os hDES surgem como uma proposta para atender esta demanda, primeiramente relatado por Van et al. (2015) em misturas constituídas por ácidos decanóicos e sais de amônio quaternário para a extração de ácidos graxos voláteis (por exemplo, ácido acético, propanóico e butanóico) em amostras aquosas (LIAO, 2022; VAN, 2015). Akramipour et al. (2018) utilizam hDES a base de cloreto de imidazol como HBA e 1-undecanol como HBD em diferentes proporções molares para a determinação de mercúrio em amostras de sangue utilizando a técnica de microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex, apresentando boas condições de recuperação, linearidade, precisão e limites de detecção. Habibollahi et al (2019). realizaram determinação de contaminantes inorgânicos (Cd, Hg e Pb) em amostras vegetais utilizando a técnica de microextração dispersivo líquido-líquido via solidificação (em banho de gelo) de hDES a base de cloreto de 1-decil-3metilimidazol e 1-undecanol. Os resultados foram promissores para um método relativamente simples, boa frequência analítica, baixo custo, nível de detectabilidade (0,1 a 0,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e que não necessitou do uso de solventes orgânicos considerados tóxicos.

Por fim, os NADES recentemente ganharam destaque como promissores substituintes aos solventes clássicos como metanol, etanol, acetona, hexano, acetonitrila, ácido sulfúrico, entre outros, que são comumente empregados nas mais variadas formas de preparo de amostras (CHANDRAN, 2019; BENVENUTTI, 2019). Os DES, em ênfase aos NADES, se destacam principalmente às suas características como: i) baixa pressão de vapor comparada aos solventes de conhecida volatilidade/aplicação; ii) precursores econômicos e de fácil aquisição; iii) capacidade de ser “moldável”, isto é, os NADES, assim como os outros DES citados, apresentam a vantagem de serem sintetizados de acordo com a finalidade de uso.

Por exemplo, no caso dos NADES, a seleção de precursores deve-se se basear na sua possível atuação como modificador químico para a técnica de GFAAS, bem como a adição de água também é possível, na etapa da síntese do NADES para que se torne compatível com as técnicas espectrométricas empregadas. (ACAR, 2008; HUANG, 2015; LIMA, 2016; GHILANE, GE, 2020). De forma geral, o reflexo das características intrínsecas dos DES e suas subclasses, bem como a possibilidade de atuar nas mais diversas áreas, corroboram com o aumento considerável de publicações científicas envolvendo esses solventes ao longo dos últimos anos, como podem ser observados nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

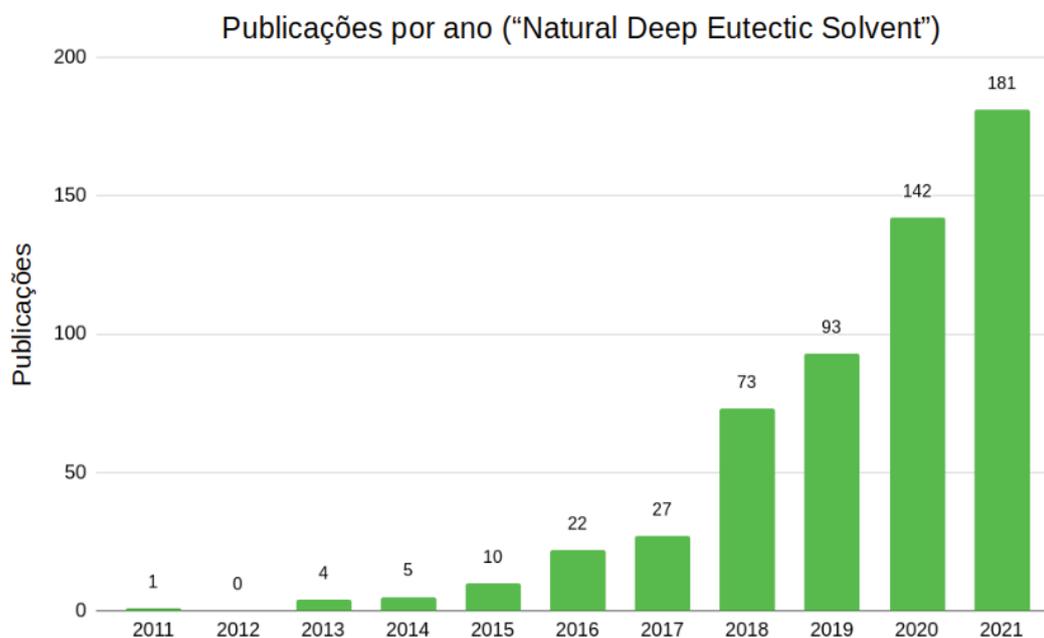
Pode-se verificar pelo perfil obtido de ambos os gráficos (a partir do ano de 2004 sendo a primeira publicação de definição dos DES e 2011 dos NADES), um significativo aumento no número de publicações envolvendo os solventes alternativos, mostrando o interesse acadêmico por esta classe de solventes, devido em particular, a versatilidade e viabilidade do emprego desses solventes em diferentes finalidades, desde a elucidação, quantificação e síntese de compostos orgânicos até a análise elementar nas mais diversas matrizes, empregando inúmeras técnicas analíticas. O que pode inferir na preocupação em se buscar os solventes alternativos, alinhados aos princípios da química verde, como uma forma de se propor metodologias analíticas menos agressivas ao meio ambiente e ao analista.

Figura 3: Publicações por ano utilizando o termo “*Deep eutectic solvent*” na Base de Dados Scopus.



Fonte: Elsevier (2022).

Figura 4: Publicações por ano utilizando o termo “*Natural Deep eutectic solvent*” na Base de Dados Scopus.



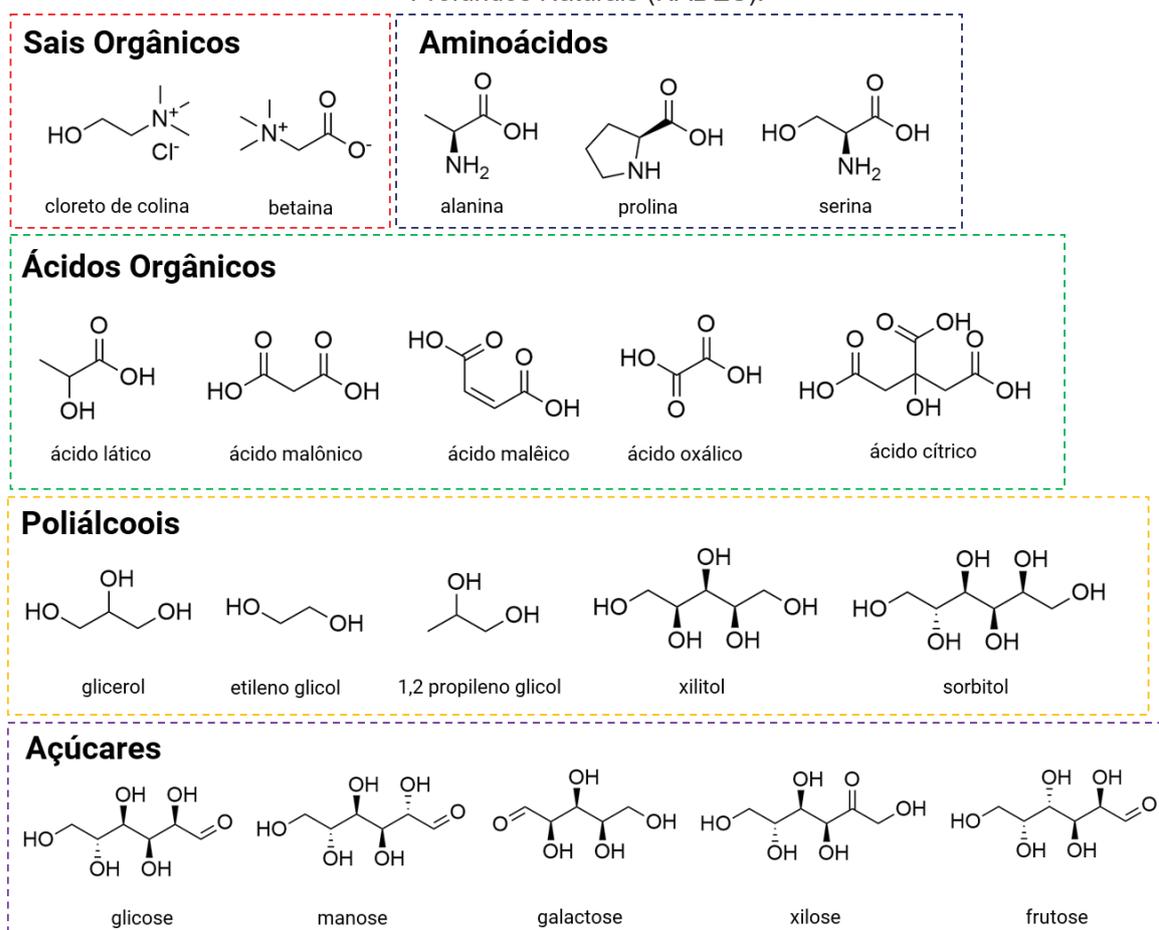
Fonte: Elsevier (2022).

1.5. Solventes Eutéticos Profundos Naturais (NADES)

O termo NADES foi inicialmente reportado em 2011 por Choi et al. (MARTINS, 2019; EL ACHKAR, 2021; SEKHARAN, 2022) quando se descobriu que metabólitos primários de plantas como aminoácidos (prolina, serina, alanina), ácidos orgânicos (ácido málico, cítrico, maleico), poliálcoois (glicerina, xilitol, sorbitol), açúcares (glicose, frutose, sacarose) e sais orgânicos como a colina

(C₅H₁₄NO) poderiam ser utilizados para a síntese dos DES (Figura 5). Na literatura é relatado que alguns organismos fazem uso desses constituintes para o importante papel de proteção celular, quando a célula se encontra em condições não adequadas no ambiente que a circunda, como por exemplo falta de água ou baixas temperaturas (PAIVA, 2014).

Figura 5: Constituintes naturais mais comuns utilizados na síntese dos Solventes Eutéticos Profundos Naturais (NADES).



A síntese dos NADES em geral são relativamente simples e rápidas. Os principais métodos estão baseados em agitação e aquecimento, secagem a frio, evaporação e síntese assistida por radiação micro-ondas e ultrassom (SANTANA, 2019; BIGLARI, 2020; YANG, 2021; SANTANA, 2022).

Os NADES, por apresentar como precursores fontes naturais e não exigir solventes orgânicos em sua síntese, são em geral mais vantajosos em relação aos ILs atribuídos pela sua baixa toxicidade e elevada biodegradabilidade, são economicamente viáveis, além de possuir características usuais dos DES como capacidade de modulação através da alteração e proporção de seus constituintes precursores de modo a ser otimizado em procedimento específico. Tais

características intrínsecas, alinhadas aos princípios da química verde, colocam atualmente os NADES em posição de destaque em diversos estudos científicos, nas mais variadas finalidades (RUTKOWSKA, 2017; GOMEZ, 2018; CHANDRAN, 2019; SANTANA 2022). Kumar et al. (2016) avaliaram a extração de ligninas em resíduos de arroz utilizando mistura de ácido láctico e cloreto de colina como NADES. O método apresentou uma solubilidade de 57% (m/m) de lignina na biomassa utilizando uma proporção molar (mol) de 1:5 dos componentes mencionados. O conceito de biorefinaria como a do estudo citado engloba uma gama de possibilidades de processos importantes para o tratamento de resíduos na indústria alimentar. É estimado que um terço dos alimentos produzidos não são consumidos, ou seja cerca de 1,3 bilhões de toneladas por ano. Nesse cenário os NADES tem apresentado aspectos promissores. PANIC et al. (2021) investigam o uso de diversas combinações de NADES a base de cloreto de colina, glicerol e etilenoglicol em diferentes proporções molares para a extração de compostos considerados de alto valor agregado via o biorefinamento de cascas de laranja. Os NADES com cloreto de colina, etileno glicol na proporção molar (mol) 1:1 e água (50%, m/m) apresentou excelente capacidade de extração de componentes como D-limoneno, proteínas e polifenóis em cascas de laranja, sendo assim considerado um método promissor para o aproveitamento de resíduos desta categoria na indústria.

Na literatura, foi também demonstrado a capacidade de melhora do nível de detectabilidade de métodos eletroquímicos utilizando os NADES. Azcarate et al. (2022) fez uso de diferentes NADES, cujos componentes precursores eram ácido cítrico, ácido láctico, frutose, glicose e água, para a modificação de eletrólitos na obtenção de uma variedade de sensores voltamétricos, que nesse estudo foram utilizados para avaliar diferentes amostras de mel cujos processos de tratamentos térmico foram distintos. Além de evidenciar que a temperatura é um fator significativo para a alteração dos compostos químicos do mel, o estudo demonstrou que todas as combinações dos NADES avaliados, nas proporções molares (mol) 1:1:2 (ácido cítrico, glicose e água); 5:1:3 (ácido láctico, glicose e água) (5:1:3); 1:1:2 (ácido cítrico, frutose e água), foram compatíveis para as técnicas voltamétricas de análises empregadas para a verificação da qualidade do mel e de possíveis outros processos de controle em que a qualidade do alimento é sensível a variações de temperatura. Outros estudos similares na área da eletroquímica incluí o de Gomez

et al. (2016) em uma síntese alternativa de nanopartículas de óxido de ferro utilizando NADES determinação de flavonoides em amostras de cebola e Percevault et al. (2022) em análises eletroquímicas via reações redox com NADES para análises de polifenóis.

Na área de modificação de materiais, Cariati et al. (2019) utilizaram diferentes combinações de NADES constituídos de cloreto de colina, ureia, etilenoglicol, glicerol para a obtenção de eletrodos de pasta de carbono modificado. Os autores observaram um aumento na cinética de transferência de cargas e na condutividade nos compósitos sintetizados, evidenciando a versatilidade do uso dos NADES na área de eletroquímica. Ren et al. (2022) utilizaram os NADES obtidos a partir do cloreto de colina e benzotriazol como solvente para a síntese de ponto de carbono quântico enriquecido com nitrogênio, um derivado dos materiais alotrópicos de carbono, com características e aplicações promissoras atualmente em processos fluorescentes e eletroquímicos. O método foi proposto para a quantificação de Co^{2+} em amostras de água, apresentando linearidade na faixa de 5 μM a 250 μM .

No que se refere a área da Química Orgânica, os NADES vem apresentando notável desempenho em processos de estabilidade e aumento da atividade enzimática. Em estudos conduzidos por Nian et al. (2020) foi verificado a viabilidade e o mecanismo do uso dos NADES em reações enzimáticas. Foram avaliados a atividade e estabilidade da enzima lipase *Candida Antarctica lipase B* em NADES de diferentes composições como betaina-glicerina, cloreto de colina-xilitol, cloreto de colina-glicerina. Os resultados sugeriram uma melhora significativa de atividade da enzima comparado ao procedimento tradicional, que utiliza como solvente o etanol. Quanto a estabilidade da enzima, os NADES betaina-glicerina e cloreto de colina-glicerol apresentaram uma melhoria significativa na estabilidade térmica, quando comparada ao método tradicional. Como pode ser observado, os NADES apresentam grande potencialidade de aplicação nas mais diversas áreas da química. Nos estudos, de Thomas et al. (2022) os NADES foram aplicados na biotecnologia dos canabinóides, explorando a síntese de canabinóides específicos a partir de um precursor comum (ácido canabigerólico). O estudo demonstrou que além de serem solventes viáveis e biocompatíveis para a classe de síntese orgânica, foi observado um aumento de duas vezes na produção de ácido tetrahydrocannabinóise e de três vezes para a síntese de ácido canabícromérico,

quando comparado a síntese em meio aquoso, processo esse tradicionalmente empregado.

Setiawan et al. (2020) realizou a extração de brazilinas, um antioxidante utilizado em complicações da diabetes, a partir da madeira da árvore *Caesalpinia sappan* com NADES constituídos a partir de betaína e ácido lático e método assistido por ultrassom, obtendo-se um teor de 4,49 mg/g da substância brazilina em um intervalo de tempo de aproximadamente 30 minutos. Os autores também realizaram a extração da brazilina por maceração em meio de etanol-água por 72 h, alcançando uma taxa de extração de 4,58 mg/g, como também empregaram a extração por Soxhlet empregando esse mesmo meio reacional durante um período de 3 horas, obtendo-se uma concentração de 5,43 mg/g de brazilina. Desta forma, pode-se observar que a extração da brazilina utilizando os NADES se mostrou além de eficaz quanto a taxa de extração também significativamente econômica em relação ao tempo consumido no processo de extração (30 minutos).

Sakti et al (2019) realizaram um estudo similar quanto a extração da substância brazilina em madeiras de *Caesalpinia sappan* e o súber de *Cinnamomum burmannii* com NADES constituídos de cloreto de colina-glicerol, obtendo valores de extração de 368,67 µg/mL, seis vezes mais ao valor de extração (57,38 µg/mL) obtido via maceração com etanol-água. Xiong et al (2019) realizaram a extração de flavonoides de espécies de raízes secas (*Radix scutellariae*) assistida por ultrassom alcançando resultados excelentes com NADES a base de L-prolina e glicerol na proporção molar (mol) de 1:4. Nesta categoria de estudo, os NADES apresentam alta premissa, pois convencionalmente utilizam-se solventes orgânicos como: etanol, metanol e acetona (DA SILVA, 2020). Porém como se sabe, tais métodos utilizando os tradicionais solventes mencionados geram elevados volumes de resíduos tóxicos, além de apresentar impacto negativo para a saúde e segurança do analista dada a volatilidade e baixa flameabilidade desses solventes (KALIA, 2008).

No que se refere ao aspecto modulável dos NADES, propriedades físico-químicas podem ser manipuladas através da variação de proporcionalidade molar de seus constituintes precursores, bem como a alterações destes, de acordo com um propósito específico (LIU, 2018). Além da variação da proporção molar dos precursores, o volume de água utilizado na síntese altera também as propriedades físicas do solvente tais como sua viscosidade e densidade. Como os NADES não

possuem uma reatividade considerável com água, a adição desta não implica em mudanças químicas relevantes na sua estrutura, viabilizando o ajuste de densidade e viscosidade dos NADES para uma aplicação específica sem afetar sua natureza eutética do solvente. Por exemplo, tem sido reportado que o emprego dos NADES que apresentam baixa densidade e viscosidade são altamente compatíveis com técnicas de fonte plasma, como o ICP OES ICP-MS. Nesses casos, a formação de um aerossol homogêneo e representativo no atomizador é indicado frente ao melhor desempenho referente aos parâmetros que avaliam a sensibilidade e a exatidão das análises químicas, quando NADES de baixa viscosidade são empregados (SANTANA, 2020).

A chamada extração verde se baseia nos princípios da química verde aplicados aos diversos processos de extração, aos quais ponderam o uso de reagentes e solventes que sejam: i) baixa toxicidade; ii) baixo consumo de volume e massa de reagentes; iii) baixo consumo de energia; iv) baixa geração de resíduos que não comprometam o meio ambiente e, v) seguro ao analista. É uma demanda que está em constante crescimento na busca por solventes mais sustentáveis e que vão de encontro com as demandas tecnológicas e econômicas. (ANASTAS, 2010; BOSILJKOV 2017).

Mais recentes estão os estudos envolvendo a extração das espécies inorgânicas utilizando os NADES. Na agricultura alguns elementos como: Cu, Zn, Ni, Mb, B, Fe são importantes para o desenvolvimento/manutenção das plantas até uma concentração limite estabelecida a depender do órgão regulamentador da região em questão, sendo frequentemente monitorados (ELIK, 2019). Na literatura, a utilização dos NADES atuando como solventes extratores dos elementos inorgânicos na etapa de preparo de amostras veem sendo crescentemente reportado ressaltando significativa eficiência de extração do(s) analito(s) em diversos tipos de amostras (OSOWSKA, 2019).

Santana et al. (2019) utilizaram os NADES a base de xilitol, ácido cítrico e ácido málico com satisfatória eficiência de extração para As, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, e Zn em amostras de plantas, e determinação por ICP OES e ICP-MS. Nesse estudo a estratégia de preparo de amostras empregando a radiação por ultrassom se mostrou simples, eficiente e de total acordo aos princípios da química verde. O mesmo grupo de pesquisa também propôs em estudo subsequente três tipos de NADES dos mesmos precursores mencionados, mas nas proporções

mássicas (% m m⁻¹) 42:13:45 (ácido cítrico: xilitol: água), 34:21:45 (ácido málico: xilitol: água) e 42:13:45 (ácido cítrico: ácido málico: água) foram utilizados como solventes na extração assistida por ultrassom (UAE) e na extração assistida por micro-ondas (MAE), na determinação de As, Cd, Hg, Pb, Se e V por ICP-MS (SANTANA, 2020). As duas estratégias de preparo de amostras empregando os NADES foram comparadas com a digestão ácida assistida por micro-ondas (método convencional), obtendo-se exatidão nas análises de 80 à 120%. Além disso, foi observado também que o emprego dos NADES melhorou a sensibilidade para a quantificação de As e Cd no ICP-MS, atribuído em grande parte às possíveis transferências de cargas entre os analitos e a fonte de carbono proveniente do NADES (SANTANA, 2020).

Para a técnica de GFAAS poucos estudos são relatados, todavia, alguns estudos relacionados chamam a atenção. Lima et al. (2016) propuseram compostos metabólitos como o ácido cítrico e glicose como modificadores químicos na determinação de Pb e Ca em amostras de folhas de espinafre, água e efluentes. Compostos metabólitos estes que estão presentes na composição de alguns NADES descritos na literatura, indicando grande potencial da aplicação desta classe de NADES a base de ácido cítrico e glicose na técnica GFAAS (ACAR, LIMA, 2016).

Como pode ser observado, cada vez mais se faz necessário o desenvolvimento de alternativas analíticas de acordo com os princípios da química verde (DAI, BOSILJKOV, 2017). Desta forma, é proposto nesse trabalho o desenvolvimento de métodos analíticos empregando os NADES como solventes extratores de elementos químicos inorgânicos de conhecida toxicidade (As, Cd e Pb) e a avaliação de sua compatibilidade com a técnica espectrométrica GFAAS. Em termos de compatibilidade com a espectrometria de absorção atômica, será levada em consideração as possíveis interferências espectrais e/ou não espectrais que poderão ocorrer advindas das condições reacionais/instrumentais a serem estudadas nesse trabalho. Para auxiliar e nortear este estudo com a devida eficiência merecida, ferramentas quimiométricas da calibração multivariada serão empregadas.

1.6. Técnicas de calibração multivariada

O desenvolvimento de uma metodologia analítica para qualquer técnica analítica pode se apresentar morosa, dependendo da composição da amostra a ser

analisada que por vezes pode ser de alta complexidade e/ou apresentar potenciais interferentes. Para a técnica de GFAAS, fatores que levam em consideração o preparo de amostra (condição reacional), etapas do programa de aquecimento do forno de grafite, como temperaturas referentes as etapas de secagem, pirólise e atomização, bem como os respectivos tempos (segundos) de execução dessas diferentes etapas (condições instrumentais); e a necessidade ou não de se empregar modificadores químicos, em geral são fatores muito significativos para a otimização de uma metodologia analítica. Aliado a isto, tais variáveis podem apresentar interações entre si que um modelo linear não é capaz de explicar, dificultando a otimização quando esta é realizada de modo univariado.

Planejamentos fatoriais, inteiros ou fracionados, metodologia de superfície de resposta (MSR) e funções de desejabilidade formam um conjunto de ferramentas multivariadas matemáticas e estatísticas com alta capacidade de otimização, economizando tempo e custo de reagente, além de gerar modelos matemáticos de predição capazes de fornecer condições ótimas de respostas e avaliar o comportamento do processo frente as alterações dos parâmetros estudados (variáveis independentes). Adicionalmente, o método multivariado pode fornecer as possíveis interações, correlações das variáveis dependentes selecionadas e sua significância em variar o parâmetro resposta avaliado (variável dependente) (WANG, 1999; FERREIRA, 2018).

Santana et al (2020) fez uso de planejamentos de misturas para a otimização da proporção molar mais adequada de NADES de a partir de três componentes (ácido cítrico: xilitol: água; ácido málico: xilitol: água e ácido cítrico: ácido málico: água) para a extração de contaminantes inorgânicos em amostras de plantas. Brandão et al (2006) e Yao (2017) empregaram o planejamento composto central e gráficos de Pareto na otimização dos parâmetros de GFAAS para a determinação de Ni em óleo cru e Cd e Pb em água, respectivamente, tendo êxitos em seus procedimentos. Batista et al (2016) aplicaram planejamentos fatoriais fracionados e funções de desejabilidade, bem como modelos matemáticos foram gerados a partir de planejamentos de composto central e planejamentos Doehlert na avaliação dos parâmetros instrumentais de ICP OES e GFAAS, em determinações elementares em amostras de batom, apresentando êxito em seus objetivos com uma metodologia de otimização de alta eficiência analítica e econômica.

Dentro do contexto do estado-da-arte dos solventes alternativos e a demanda de metodologias de análise elementar e seus desafios, esse estudo tem como propósito avaliar as possíveis interferências espectrais e/ou não espectrais que eventualmente poderão ser ocasionadas decorrentes do emprego dos NADES como agente extrator dos analitos (As, Cd e Pb) em amostras MRC contemplando tecidos biológicos e vegetais, aspecto ao qual é escasso na literatura atualmente dentro área de espectrometria, em particular para a técnica de GFAAS. (ALTUNAY, SANTANA-MAYOR, 2020). Será avaliada a presença de possíveis interferências espectrais e/ou não espectrais diante a presença e ausência do emprego de modificadores químicos ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$), frente ao emprego de diferentes meios reacionais de preparo de amostras, aliado às diferentes condições instrumentais aplicadas no GFAAS na quantificação de As, Cd e Pb em amostras de referência certificado (vegetais e animais). Nesses estudos, ferramentas quimiométricas como planejamentos fatoriais (inteiros e fracionados), funções de desejabilidade MSR foram empregados.

2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

Objetivo Geral

Estudo das possíveis interferências espectrais e/ou não espectrais decorrentes do emprego dos NADES na extração de As, Cd e Pb em matrizes de tecidos animais e vegetais na espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS).

Objetivos Específicos

- Síntese dos NADES a partir de ácido láctico, glicose, cloreto de colina, ácido cítrico e água;
- Caracterização dos NADES por meio das técnicas: espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análises de densidade e viscosidade;
- Avaliação/otimização da estratégia de preparo de amostras empregando os NADES na extração de As, Cd e Pb em folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*) e validação em materiais de referência certificados de origem vegetal: folhas de espinafre (SRM 1570a), folhas de tomate (1573a) e capim-marandú (E1001a).
- Avaliação de possíveis interferências decorrentes dos NADES com o(s) analito(s), levando-se em consideração os seguintes aspectos: i) meio reacional constituinte (matriz/analito/NADES); ii) condições instrumentais de análise (temperaturas de pirólise e de atomização) otimizados no GFAAS, empregando-se parâmetros de desempenho como: recuperação (%), *signal-background-ratio* (SBR) e massa característica (m_0);
- Avaliar os parâmetros de validação pertinentes, que indicam confiabilidade, precisão e sensibilidade ao método proposto, tais como: seletividade, linearidade, exatidão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), repetitividade, reprodutibilidade e estudos de robustez, conforme agências reguladoras nacionais e internacionais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os materiais utilizados como balões volumétricos, béqueres, *ependorfs*, ponteira foram previamente lavados, colocados em banho ácido de HNO_3 10% v v⁻¹ por período mínimo de dois dias e lavados novamente ao menos três vezes com água ultrapura obtida pelo sistema Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, USA).

Soluções padrão 1000 mg L⁻¹ em HNO_3 1% v v⁻¹ (Carlo Erba Analyticals) de cada analito (As, Cd e Pb) utilizadas para o preparo de soluções padrão e fortificação das amostras foram armazenadas em refrigerador durante todo o trabalho de pesquisa. Todas as pesagens foram realizadas na balança analítica Bel, modelo M124Ai.

A amostra selecionada (folhas de espinafre, *Spinacia oleracea*, *Figura 6*) no estudo de otimização do método foi a que apresentava maior disposição de obtenção e fácil manuseio no preparo de amostras e foram comercialmente obtidas de mercado local (São José dos Pinhais-PR). Estas amostras foram liofilizadas (Terroni, modelo Enterprise I, Brasil), moídas no moinho de facas tipo Willye (STAR FT-50, Fortinox, Brasil) e peneiradas (Bertel, Tamis, Brasil) a 20 mesh. Para o preparo de amostras foi utilizado um vórtex da marca B.BRAUN BIOTECH CERTOMAT e centrífuga da marca CENTRIBIO.

Figura 6: Folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*), obtidas de comércio local na região de São José dos Pinhais – PR, liofilizadas e moída/peneiradas, respectivamente.



Fonte: O autor

Todas as análises elementares foram realizadas em GFAAS (modelo AA 6800, Shimadzu, Japão), equipado com lâmpadas de cátodo oco (As, Cd e Pb), correção de fundo com lâmpada de Deutério (D_2) e tubos de grafite pirolítico aquecidos no modo longitudinal. Como gás de purga foi utilizado argônio de alta pureza (99,999%). Alíquotas ($n = 3$) de 20 μL foram analisadas, acompanhadas com 5 μL de solução de modificador químico $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (concentração 3 a 7 $\mu\text{g}/5$

μL) e medições realizadas pela área do pico. Os demais parâmetros instrumentais do GFAAS podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros instrumentais do GFAAS aplicados para os diferentes analitos (As, Cd e Pb).

Parâmetro / Elemento	Pb	As	Cd
Comprimento de onda (nm)	283.3	193.7	228.8
Corrente da lâmpada (mA)	20	12	8
Largura da fenda (nm)	1.0	0	0

3.2. Procedimento

3.2.1. Síntese dos NADES

Os NADES estudados foram preparados utilizando ácido láctico (Neon, Brasil), glicose anidra (Êxodo Científica, Brasil), cloreto de colina (Inlab, Brasil) e ácido cítrico (Dinâmica, Brasil), em meio aquoso, empregando-se água ultrapura. Dois diferentes tipos de NADES foram sintetizados conforme a seguinte combinação: ácido láctico-glicose-água (Al-Gli-A) e cloreto de colina-ácido cítrico-água (ClCo-Ac-A). Todos os NADES sintetizados seguiram a proporção molar (mol) de 1:1:10 (componente 1: componente 2: água ultrapura). A proporção foi selecionada conforme otimizado por Santana et al. (2019) e o procedimento de síntese baseado em Dai et al (2013).

Os componentes dos NADES e água foram adicionados em tubos cônicos (falcon) de 50 ml e colocados em banho maria do tipo Dubnoff (modelo Q226M) a 50°C durante 1 hora sob agitação constante de 7 rpm. A solução final foi armazenada em dissecador para posterior caracterização/preparo de amostras. Características gerais dos constituintes de cada NADES estão sumarizadas na Tabela 2.

Tabela 2: Características físico-química dos precursores dos NADES: Ácido Láctico – Glicose (Al-Gli-A) e Cloreto de Colina – Ácido Cítrico (ClCo-Ac-A).

Componente	Ponto de Fusão (°C)	Massa Molar (g/mol)	Característica física
Ácido Láctico	16,80	90,08	Líquido incolor, viscoso
Ácido Cítrico	156,0	192,12	Sólido branco
Cloreto de Colina	302,0	139,62	Sólido branco, hidroscópico
Glicose	146,0	180,16	Sólido branco

3.2.2. Caracterização dos NADES

3.2.2.1. Densidade

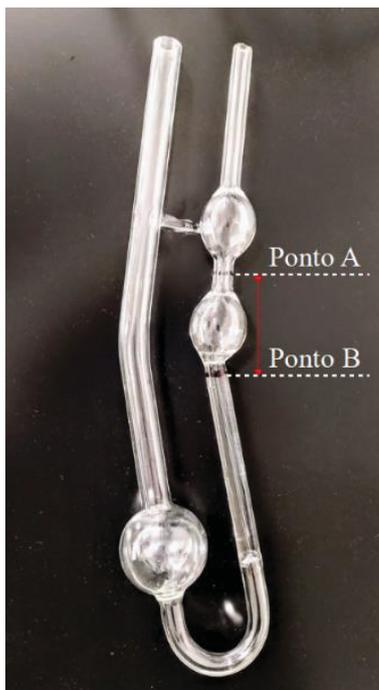
A densidade dos NADES (Equação 1) sintetizados foi realizada utilizando uma micropipeta calibrada apropriada em um volume de $1,000 \pm 0,4\%$ mL utilizando os valores de massa da água, temperatura ambiente no dia da caracterização e densidade da água, descrita na literatura na respectiva temperatura ambiente (26°C) (FIERRO, 2007). Tanto o processo de pesagem da água ultrapura quanto dos NADES sintetizados (Al-Gli-A e ClCo-Ac-A) foram realizados em triplicata, $n = 3$.

$$\text{Equação 1: } \rho_{NADES} = \frac{m_{NADES}}{(m_{\text{água}} \times \rho_{\text{água}}^{-1})}; \rho_{\text{água}} = 0,9968 \text{ g/mL}$$

3.2.2.2. Viscosidade

A determinação da viscosidade (η_1) dos NADES foi realizada utilizando um viscosímetro Cannon Fenske (Figura 7), a partir da equação derivada de Hagen-Poiseuille (Equação 2). A viscosidade do líquido, de densidade conhecida (ρ_1), foi obtido pelo tempo de escoamento (t_1), por influência da gravidade, dentro de dois pontos, relativo ao tempo de escoamento (t_2) de um líquido cuja densidade (ρ_2) e viscosidade (η_2) é conhecida, neste mesmo intervalo de pontos, sob temperatura constante. Água ultrapura foi utilizada como líquido padrão (solução de referência) (com ρ_2 e η_2 obtidos da literatura) e medidas foram realizadas em triplicatas (FIERRE, 2007).

Figura 7: Viscosímetro de Ostwald, utilizado para a determinação da viscosidade dos NADES.



Fonte: O autor

$$\text{Equação 2: } \eta_1 = \eta_2 \frac{\rho_1 t_1}{\rho_2 t_2}$$

3.2.2.3. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Espectros dos NADES sintetizados e seus precursores foram obtidos no espectrômetro VERTEX70 (Bruker, EUA), localizado no Laboratório Multiusuário de Espectroscopia no Infravermelho no Departamento de Química – UFPR. As análises foram realizadas na região de varredura de 400 a 4000 cm^{-1} , a temperatura ambiente, no modo transmitância com 16 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1} . Devido a umidade presente nos NADES, as análises FTIR foram realizadas utilizando cristal de KBr, ou seja, na deposição qualitativa da amostra na superfície do cristal, que então foi posicionada no suporte do instrumento para análise. Os espectros foram tratados por linha de base (*baseline*) no software do próprio equipamento.

3.2.3. Preparo de amostras empregando os NADES

3.2.3.1. Amostras e processamento

Folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*) foram separadas, congeladas em refrigerador, liofilizadas (Enterprise I, Terroni, SP, Brasil) por 24 horas e moídas empregando-se um moinho de facas tipo Willye STAR FT-50, Fortinox, SP, Brasil,

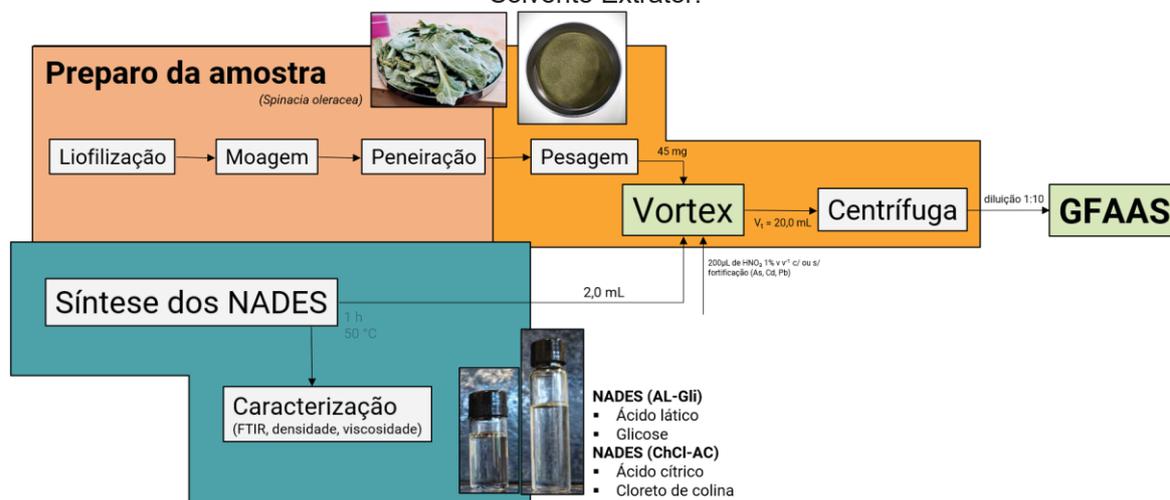
peneiradas, em peneiras de granulometria de 20 mesh. O conteúdo foi transferido em tubos falcon de 50 mL e mantidas em dissecador até as análises químicas.

3.2.3.2. Extração assistida por vórtex (VAE e VAE-T)

Adicionou-se 45 ou 90 mg de folhas de espinafre em tubos falcon de 50 mL, em seguida um volume de solução padrão multielementar As, Cd e Pb (em solução HNO_3 1% v v⁻¹) foi adicionado às amostras, de modo que a fortificação com os analitos, ao final do preparo de amostras, ficasse em uma concentração de 20 µg/L. Nas amostras não fortificadas (branco analítico), apenas o volume correspondente de fortificação de uma solução HNO_3 1% v v⁻¹ foi adicionado. Após um período de 30 min para a ambientação da solução, 2,0 mL da solução de NADES (Al-Gli ou ClCo-Ac, proporção molar (mol) 1:1:10) foi adicionado às amostras com e sem fortificação. A mistura resultante foi submetida a agitação por vórtex (Certomat MV, B. Braun Biotech International) durante 30 segundos e colocada em repouso durante 10 minutos à temperatura ambiente, etapa essa repetida por mais três vezes, totalizando 30 minutos desta etapa.

Nos estudos com em Temperatura Elevada (VAE-T), entre as etapas de repouso a solução foi colocada em banho maria à uma temperatura de 90°C. Após a etapa de extração, as soluções foram centrifugadas (CT 6000, Laboratech, SP, Brasil) a 3500 rpm por 15 min, totalizando 45 min de tempo do preparo de amostra proposto. Alíquotas de 1,0 mL foram coletadas em balões volumétricos de 10 mL, completado o volume com solução de HNO_3 1% v v⁻¹ e 20 µL de cada amostra foram injetadas no GFAAS. O esquema do procedimento experimental da extração dos analitos com NADES, está resumido na Figura 8.

Figura 8: Esquema do Procedimento de Preparo de Amostras empregando os NADES como Solvente Extrator.



3.2.3.3. Extração assistida por ultrassom (UAE)

Uma massa de aproximadamente 45 mg de amostra (folhas de espinafre comercial ou MRC's) foi adicionada em tubo falcon de 50 mL, junto com um volume de NADES (2 mL NADES para cada 45 mg de amostra) e submetida a agitação por vórtex durante 10 s para homogeneização da mistura. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho ultrassônico (modelo USC-1450) a 25 kHz durante 10 min a temperatura ambiente. Na sequência, a solução foi centrifugada a 3500 rpm durante 15 minutos. Um volume de 1 mL do sobrenadante foi adicionado em balão volumétrico de 10 mL completado com solução de HNO₃ 1% v v⁻¹, onde uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi injetada no GFAAS.

3.2.4. Estratégias de otimização

Para avaliar as variáveis mais significativas e seus possíveis efeitos de interação, a fim de se avaliar a possibilidade do emprego dos NADES como solvente extrator na determinação de As, Cd e Pb por GFAAS, as variáveis respostas selecionadas foram: i) recuperação; ii) massa característica (m_0) e iii) razão sinal analito/sinal de fundo (*background*) (SBR), empregando-se planejamento fatoriais conforme esquematizado na Figura 9.

Inicialmente, foi realizado um planejamento fatorial 2^{5-1} , cujo objetivo foi rastrear quais seriam as variáveis independentes mais significativas para as variáveis dependentes selecionadas (recuperação, m_0 e SBR) no preparo de amostras e conseqüentemente na determinação primeiramente de As por GFAAS.

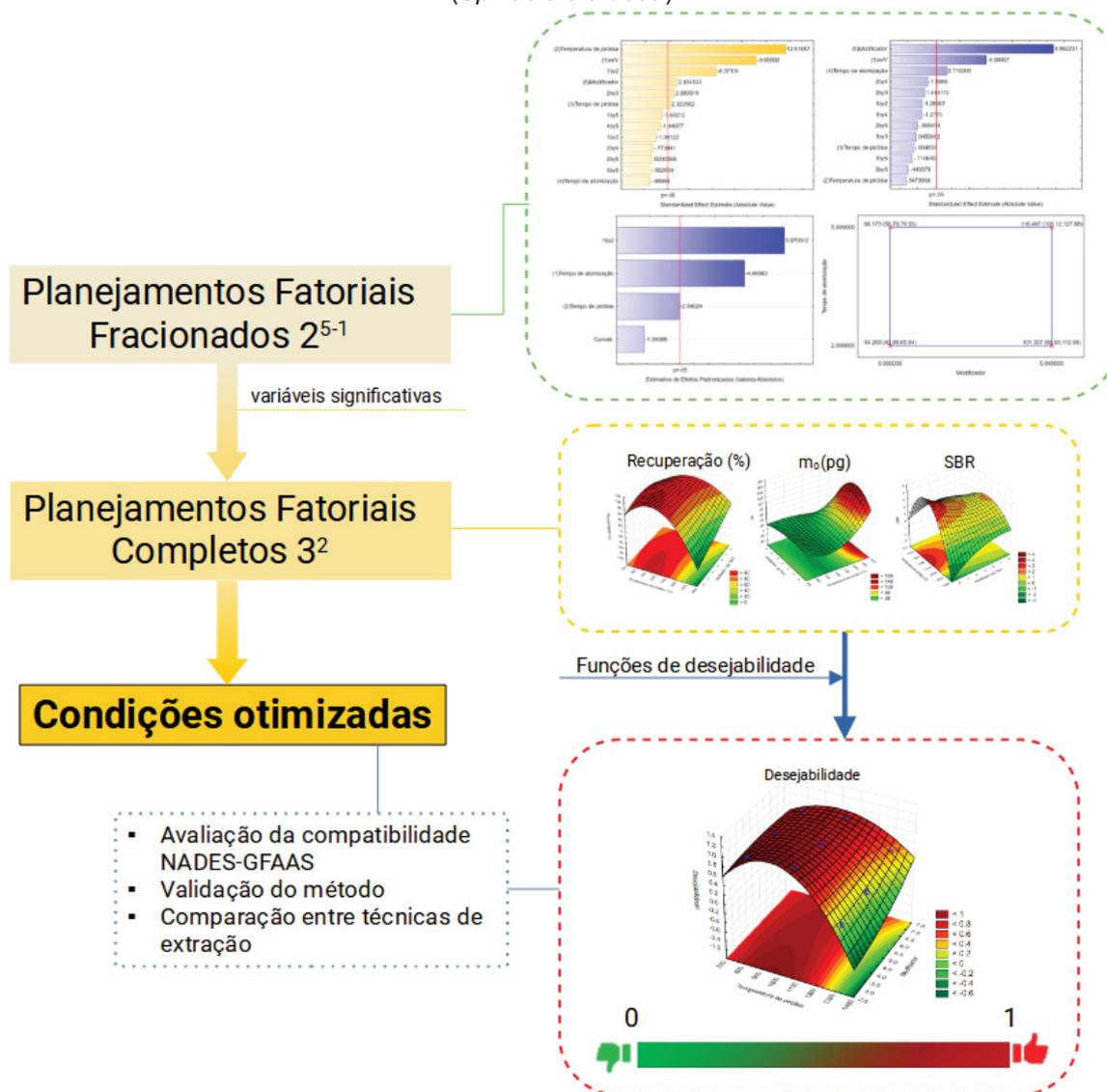
Dentre os elementos investigados nesse trabalho, o elemento As é o que apresenta a menor razão (sinal analito/sinal de fundo) para o parâmetro SBR, quando comparado aos elementos Cd e Pb, sendo, portanto, mais susceptível às possíveis interferências espectrais, sendo, desta forma, selecionado para o início dos trabalhos (MA, 2004; MENEZES, 2021).

As variáveis independentes selecionadas bem como seus valores, utilizando-se como base o programa de aquecimento padrão do GFAAS (default) e informações obtidas na literatura para NADES similares ao trabalho proposto estão sumarizadas na Tabela 3. A elaboração do planejamento e a avaliação dos resultados foram realizadas empregando o software Statistica 7.0 (StarSoft, Tulsa, USA).

Tabela 3: Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1} desenvolvido para a avaliação das variáveis referentes ao preparo de amostras e das condições instrumentais do GFAAS para a determinação de As em amostras de folha de espinafre (*Spinacia Oleracea*).

Variável Independente	Unidade	Nível no Planejamento Fatorial Fracionado 2^{5-1}	
		-1	+1
Razão $m_{amostra}/V_{NADES}$	mg / 2 mL	45	90
Temperatura de pirólise	°C	600	1200
Tempo de pirólise	s	5	15
Tempo de atomização	s	2	5
Modificador Pd (NO_3) ₂	µg / 5 µL	0	5

Figura 9: Aplicação de Planejamentos Fatoriais de dois níveis, para a avaliação das variáveis dependentes mais significativas, e suas possíveis interações no auxílio da determinação das condições ótimas para a determinação de As por GFAAS em amostras de folhas de espinafre (*Spinacie oleracea*).



As variáveis respostas selecionadas: recuperação (Equação 3), SBR (Equação 4) e m_0 (Equação 5), foram empregadas a fim de se avaliar o nível de detectabilidade (sensibilidade) bem como a exatidão do método analítico para a quantificação dos analitos nas amostras estudadas. Essas três variáveis analisadas em conjunto, são excelentes indicadores para a avaliação da possibilidade de interferências espectrais e/ou não espectrais no sinal do analito em GFAAS, que podem comprometer ou não tanto a confiabilidade do método analítico como sua sensibilidade.

O parâmetro massa característica (m_0) – é um parâmetro instrumental que representa a massa do analito que corresponde a 1% de absorção, ou seja, uma absorbância líquida igual a 0,0044 (descrito na Equação 5). Ou seja, valores baixos de m_0 em geral são desejáveis pois indicam maior sensibilidade da análise. O valor de m_0 obtido experimentalmente é comparado com o valor de m_0 teórico, indicando o nível de detectabilidade do GFAAS de acordo com as condições operacionais de trabalho aplicadas. As variáveis dependentes (resposta) empregadas foram obtidas a partir das equações abaixo:

$$\text{Equação 3: } \text{Recuperação}(\%) = \frac{C_{\text{analito}}}{C_{\text{nominal}}} \times 100$$

Onde:

C_{analito} = Concentração do Analito obtida pelo GFAAS

C_{nominal} = Concentração Nominal da solução padrão do analito ($20 \mu\text{g L}^{-1}$)

$$\text{Equação 4: } SBR = \frac{A_{\text{analito}} - A_{\text{branco de amostra}}}{A_{\text{fundo}}}$$

$$\text{Equação 5: } m_0 = \frac{V_{\text{amostra}} \times [M] \times 0,044}{A_{\text{analito}} - A_{\text{branco de amostra}}}$$

Onde:

V_{amostra} = Volume de amostra = $20 \mu\text{L}$

$[M]$ = Concentração do analito = $20 \mu\text{g L}^{-1}$

A_{analito} = Sinal de absorbância do analito na amostra

$A_{\text{branco de amostra}}$ = Sinal de absorbância do branco de amostra

A_{fundo} = Sinal de fundo proveniente da amostra,

Os planejamentos fatoriais fracionados de nível dois tem o número de experimentos (N) definido pela expressão $N = 2^{k-1}$, onde k é o número de variáveis independentes. Para este estudo, cinco variáveis independentes foram

selecionadas, portanto 16 experimentos foram realizados com duplicata. Este planejamento permite calcular o Efeito da Variável (E_A), bem como suas interações, conforme a Equação 6.

$$\text{Equação 6: } E_A = \frac{\Sigma(Y_{positivo})}{N/2} - \frac{\Sigma(Y_{negativo})}{N/2}$$

E_A = Efeito da Variável

$Y_{positivo}$ = Resposta para os valores positivos obtidos durante o desenvolvimento do método

$Y_{negativo}$ = Resposta para os valores negativos obtidos durante o desenvolvimento do método

N = Número de experimentos

O gráfico de Pareto é uma das ferramentas de calibração multivariada frequentemente utilizada para a avaliação do planejamento fatorial. As variáveis independentes e suas interações são comparadas por Efeitos Padronizados (EP, Equação 8), obtido pela razão do Efeito da Variável (E_A) e do desvio padrão dos efeitos e interações (S_{efeito} , Equação 7), este último calculado utilizando a variância dos resíduos experimentais (S^2) e o número de total de experimentos (N). Por meio destas equações será observado quais das variáveis independentes adotadas possui maior significância e/ou interações para as variáveis dependentes empregadas (recuperação, m_0 e SBR)

$$\text{Equação 7: } S_{efeito} = \left(\frac{4S^2}{N} \right)^{\frac{1}{2}}$$

$$\text{Equação 8: } EP = \frac{E_A}{S_{efeito}}$$

Selecionadas as variáveis independentes mais significativas, outros planejamentos experimentais foram elaborados para uma avaliação por meio da metodologia de superfície de resposta (MSR), onde os modelos quadráticos obtidos auxiliam na obtenção das condições ótimas de trabalho. O perfil obtido nos gráficos (MSR) também auxiliam a encontrar um perfil satisfatório para os NADES estudados, o qual foi corroborado com as observações experimentais e seu entendimento químico acerca das condições reacionais obtidas empregando-se diferentes composição de NADES e das proporções molares aqui estudadas.

3.2.4.1. Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Duas das variáveis independentes mais significativas determinadas via planejamento fatorial de dois níveis foram novamente estudadas através de planejamentos de três níveis (3^2), de modo a se obter modelos quadráticos,

conforme a Equação 9, que forneçam condições críticas de melhor resultado para os parâmetros avaliados neste trabalho (recuperação, m_0 e SBR). Em caso de três ou mais variáveis significativas, como foi o caso nos estudos envolvendo, o elemento As por ser um elemento cujo comprimento de onda selecionado (193,7 nm) acompanha elevados sinais de fundo, planejamentos *Box Behnken* e composto central foram aplicados, visto que são planejamentos mais eficientes em termos de números de experimentos e resposta de otimização, requerendo um número menor número de experimentos para duas ou três mais variáveis dependentes.

Equação 9:
$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i=1}^n b_i x_j (\sum_{j=1}^n b_{ij} x_i) + \sum_{i=1}^{n-1} b_{ii} x_i (\sum_{j=i+1}^n b_{ij} x_i x_j)$$

3.2.4.2. Funções de desejabilidade

Considerando que neste trabalho três parâmetros resposta serão avaliados (recuperação, m_0 e SBR), e que cada um representa um aspecto que reflete na qualidade de análise, funções de desejabilidade foram utilizados para compilar as três variáveis em um único valor de modo que se possa avaliar o conjunto da análise para cada condição e NADES utilizado. As funções de desejabilidade são aplicadas para cada experimento e é gerado um conjunto de valores de desejabilidade individual (d_i) no intervalo de 0 a 1, correspondente a cada um dos três parâmetros resposta avaliado nesse trabalho. Menores valores correspondem a respostas indesejáveis e o maior valor (ou seja, mais próximos de 1) para respostas desejáveis. Os três valores de d_i são combinados de modo a obter a desejabilidade global (D , Equação 10), definido como a média geométrica ponderada, de acordo com a equação abaixo:

Equação 10:
$$D = \sqrt[3]{d_{recovery} d_{m_0} d_{SBR}}$$

A desejabilidade individual (d , Equação 11) para cada parâmetro (recuperação, m_0 e SBR) foi obtida pela seguinte equação:

Equação 11:
$$d = \begin{cases} 0 & \text{if } y < 0 \\ \frac{(y-L)}{(T-L)} & \text{if } L \leq y \leq T \\ \frac{(U-y)}{(U-T)} & \text{if } T \leq y \leq U \\ 0 & \text{if } y > U \end{cases}$$

Onde L corresponde ao valor mínimo permitido, T o valor desejado e U o valor máximo permitido. Os valores de L, T e U para cada parâmetro (recuperação, m_0 e SBR) podem ser consultados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores mínimo, máximo e desejado para os parâmetros avaliados: Recuperação, massa característica (m_0) e signal-to-background-ratio (SBR) no GFAAS.

	Recuperação (%)	m_0 (pg)	SBR
Valor mínimo permitido (L)	30	0	0
Valor desejado (T)	100	15 (As); 0,4 (Cd); 16 (Pb)	3
Valor máximo permitido	130	100	-

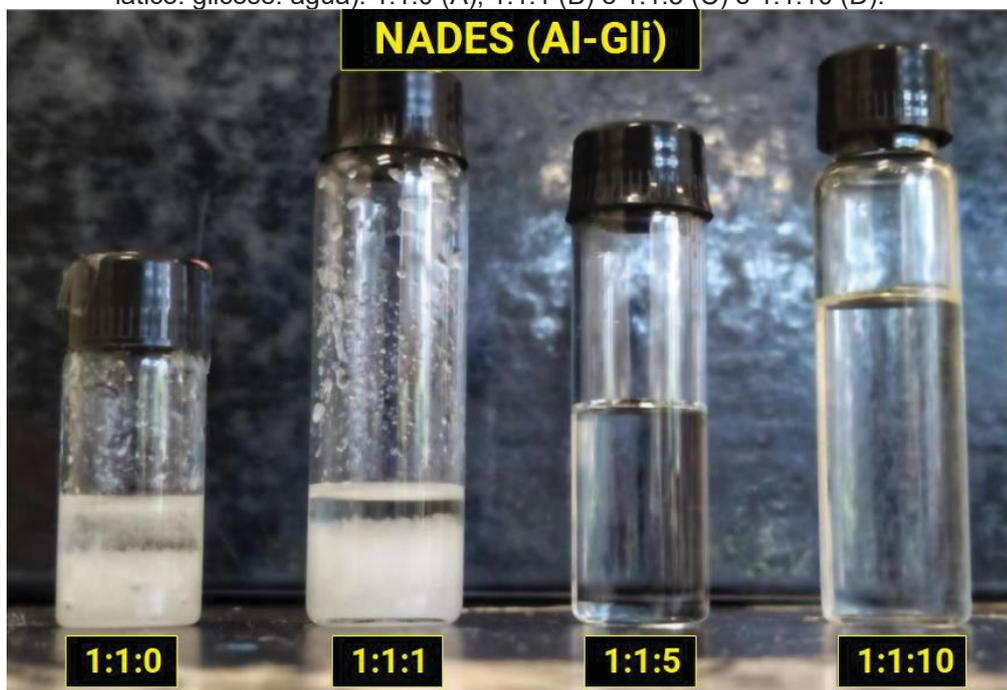
Parâmetros de desempenho como os limites de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram calculados a partir da multiplicação de 3 e 10, respectivamente, da razão entre o desvio padrão obtido a partir dez análises do branco analítico e o coeficiente angular (*slope*) da curva de calibração (European Commission 2002; ANVISA 2017; INMETRO 2018).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese dos NADES e caracterizações físico-químicas

Diferentes proporções molares de água nos NADES (Al-Gli-A) e (ClCo-Ac-A) foram avaliadas, entretanto apenas aquelas que possuíam características desejáveis para o preparo de amostras e análises em GFAAS foram selecionadas para serem utilizadas nesse trabalho, ou seja, ser um líquido homogêneo em temperatura ambiente, apresentar baixa densidade e viscosidade (Figura 10). Portanto, os dois NADES sintetizados na proporção molar (mol) 1:1:10 (ácido láctico: glicose: água) e os NADES (cloreto de colina: ácido cítrico: água) foram selecionados para serem utilizados no preparo de amostras. A viscosidade e densidade da solução pós preparo de amostras também foram avaliados, pois são características que estão relacionadas no formato e na reprodutibilidade da gota da solução formada no interior do tubo de grafite durante o processo de análise, sendo desejável que a viscosidade seja similar ao da água.

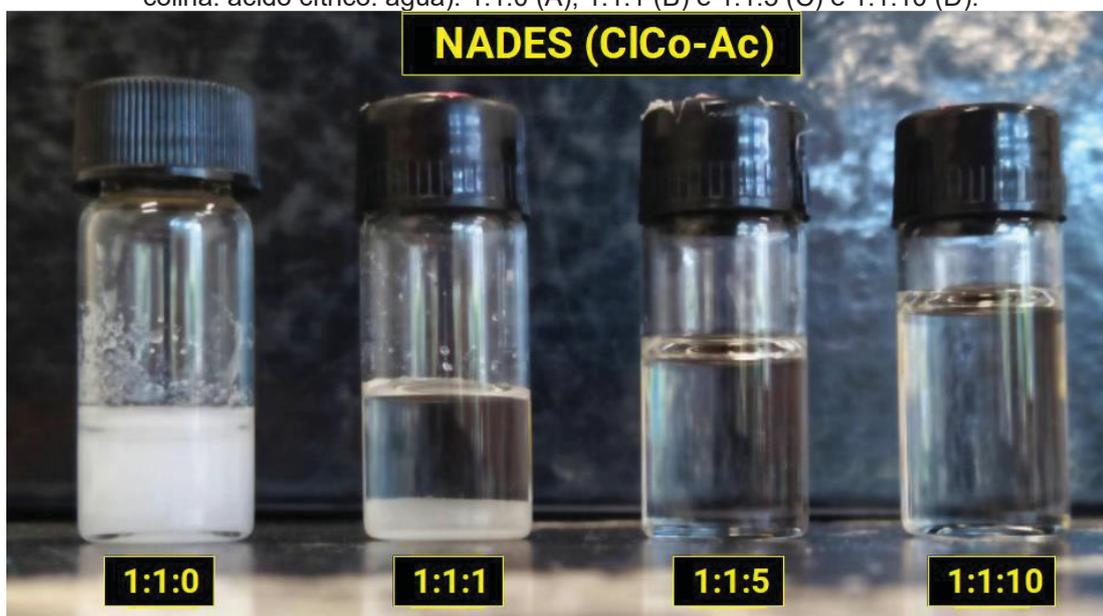
Figura 10: NADES (Al-Gli-A) sintetizados em diferentes proporções molares (mol) de água (ácido láctico: glicose: água): 1:1:0 (A); 1:1:1 (B) e 1:1:5 (C) e 1:1:10 (D).



Fonte: Autor.

Para os NADES (ClCo-Ac-A) soluções de aspectos semelhantes foram observadas em relação ao NADES (Al-Gli-A). Ou seja, no que se refere às proporções molares 1:1:10 e 1:1:5, soluções límpidas, homogêneas e estáveis foram obtidas, características essas muito desejáveis para o emprego dessas soluções de NADES no preparo de amostras para as técnicas espectrométricas. Para as proporções molares (mol) 1:1:0 e 1:1:1, a formação de duas fases e elevado aspecto viscoso dos NADES foram observados, não sendo desejáveis para os métodos de extração dos analitos nas amostras estudadas, conforme pode ser verificado na Figura 11.

Figura 11: NADES (ClCo-Ac-A) sintetizados em diferentes proporções molares (mol) (cloreto de colina: ácido cítrico: água): 1:1:0 (A); 1:1:1 (B) e 1:1:5 (C) e 1:1:10 (D).



Fonte: Autor

As características físico-químicas dos NADES em diferentes proporções molares estudadas, bem como suas soluções finais – pós a etapa de preparo das amostras - estão reportadas na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de densidade e viscosidade dos NADES (Al-Gli-A) e NADES (ClCo-Ac-A) e suas respectivas soluções de análise no GFAAS (NADES (Al-Gli-A) GFAAS e NADES (ClCo-Ac-A) GFAAS após a etapa de diluição (1:10) do preparo de amostras.

NADES	proporção molar (mol)	Densidade (g/cm ³)	Viscosidade (mPa s)
(Al-Gli-A)	1:1:10	1,22	15,14
(Al-Gli-A) GFAAS	1:1:10	1,03	0,98
(Al-Gli-A)	1:1:5	1,32	66,58
(ClCo-Ac-A)	1:1:10	1,21	13,77
(ClCo-Ac-A) GFAAS	1:1:10	1,01	0,93
(ClCo-Ac-A)	1:1:5	1,31	60,56

A densidade e viscosidade são características que devem ser consideradas para o preparo de amostras, como também a compatibilidade dessa solução para com a técnica de GFAAS, pois ambas as propriedades afetam a qualidade analítica dos resultados, em termos de exatidão e precisão (MINAMISAWA, 2006). Além disso, para a etapa de preparo de amostras, em geral é desejável baixos valores de densidade e viscosidade pois contribuem para uma maior eficiência de extração devido a maior difusividade e conseqüentemente maior transferência de massa do analito para a fase extratora (DWAMENA, 2019). Por este motivo, dado a elevada viscosidade e densidade dos NADES na proporção molar 1:1:5, para os propósitos desta pesquisa, tanto para os NADES (Al-Gli-A) como para os NADES (ClCo-Ac-A) foram adotadas as proporções molares 1:1:10 para ser utilizada como solvente extrator no preparo de amostras.

Ainda que sejam elevadas a viscosidade dos NADES sintetizados (15,14 e 13,77 mPa s), o processo de homogeneização da amostra empregando-se a agitação por vórtex é importante para que se promova de forma eficiente, melhor dispersão da amostra no solvente extrator, o que não seria possível sem a adição de água na composição desses NADES. A viscosidade atingida após os processos de diluição com solução de HNO₃ 1% v v⁻¹ (volume final de 20 mL) no preparo de amostras (0,977 e 0,927 mPa s) é viável para as análises no forno de grafite, visto que são valores muito similares à viscosidade da água (0,976 mPa s à temperatura ambiente), como também já reportado nas análises por técnicas de fonte de plasma, como ICP OES e ICP-MS (SANTANA, 2019; MOREIRA, 2020).

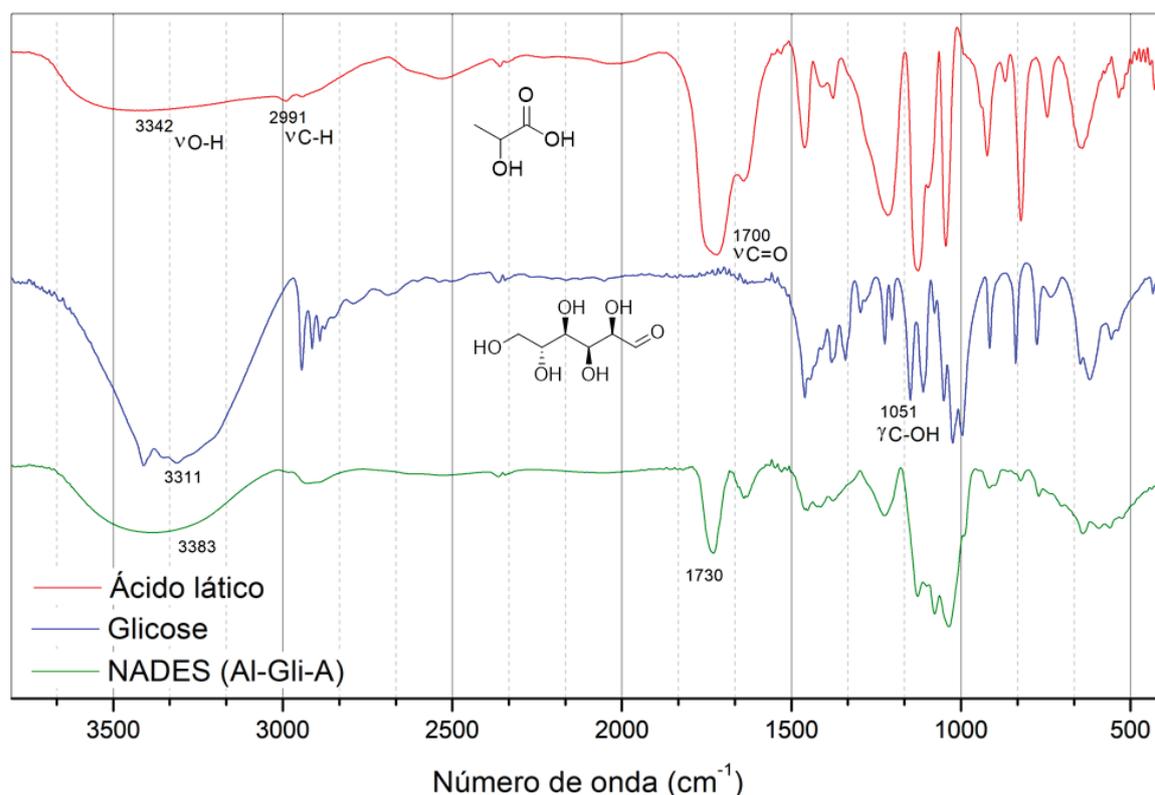
Tal adequação evidencia a importância de uma etapa de diluição no preparo de amostras utilizando NADES como solvente extrator. A viabilidade de se ajustar a proporção molar dos DES torna essa classe de solventes, em particular os

NADES, muito atrativo e eficiente, em especial devido sua notável compatibilidade com as técnicas analíticas (ALI, 2019; SANTANA, 2019, XUE, 2021; HSU, 2022).

4.2. Caracterização via FTIR

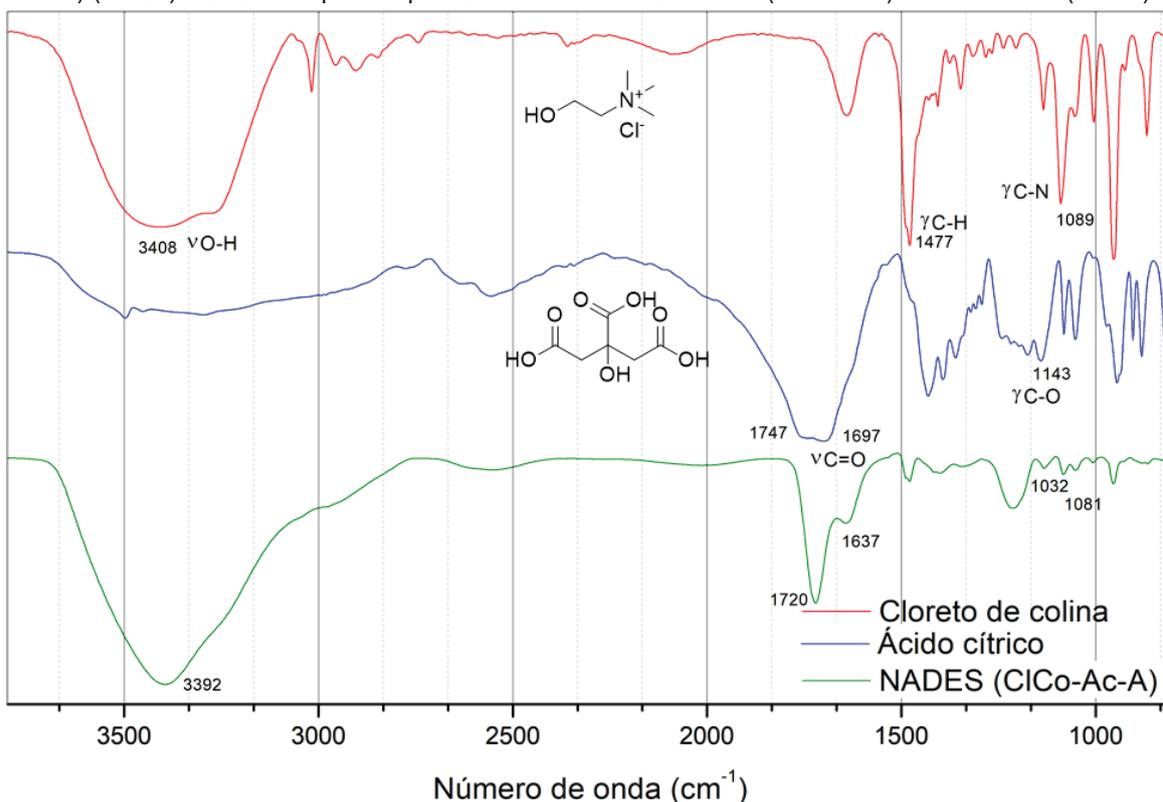
Uma das características dos NADES e de sua formação eutética vem da presença de interações intermoleculares (ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e Van der Waals), as quais podem ser confirmadas via espectros FTIR (SANTANA, 2019; MARTINS, 2019). Na Figura 12 é apresentado o espectro de FTIR dos compostos precursores, ácido láctico, glicose e o NADES obtido da combinação destes dois compostos NADES (Al-Gli-A). Algumas bandas características do ácido láctico estão presentes, como bandas de estiramento O-H (ν O-H, 3300-3400 cm^{-1}), C-H sp^3 (ν C-H, 2989 e 2939 cm^{-1}) e da carbonila C=O (ν O-H, 1720 cm^{-1}) (PAUCEAN, 2017). No espectro da glicose, são também observados estiramentos ν O-H e deformação angular fora do plano C-OH (γ C-OH, 1037 -1049 cm^{-1}), além de ligações glicosídicas em 988 cm^{-1} . Na mistura destes componentes, ou seja, na forma de NADES (Al-Gli-A), ocorre uma sobreposição e preservação das bandas mais características dos precursores, o que indica que tais precursores não foram quimicamente modificados durante o processo de formação dos NADES. Além disso ocorre o deslocamento de certas bandas, como as de ν C=O, de 1720 cm^{-1} do ácido láctico para 1730 cm^{-1} do NADES (Al-Gli-A), as ν O-H do ácido láctico, na faixa de 3342 cm^{-1} , e glicose, em 3311 cm^{-1} , para 3383 cm^{-1} do NADES (Al-Gli-A). Esses deslocamentos são indícios de formação de ligação de hidrogênio devido a variações de comprimento e direção das ligações (JACKSON, 1995; WANG, 1999; BARTH, 2007; BIGLARI, 2020; MACCIONI, 2021).

Figura 12: de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para os NADES (Al-Gli-A) (verde) e seus compostos precursores: ácido láctico (vermelho) e glicose (azul).



Para o espectro dos NADES (CICo-Ac-A) e seus respectivos precursores (Figura 13), foi possível observar bandas de deformação angular fora do plano C-H ($\gamma\text{C-H}$, 1477 cm^{-1}) e C-N ($\nu\text{C-N}$, $950\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$) do cloreto de colina, além de estiramentos O-H ($\nu\text{O-H}$, 3379 cm^{-1}) (WANG, JIANG, 2020). No espectro de ácido cítrico, foi verificado as bandas de estiramentos assimétricos C=O ($\nu\text{C=O}$, $1695\text{-}1744 \text{ cm}^{-1}$), $\nu\text{O-H}$ e deformação angular fora do plano C-O ($\gamma\text{C-O}$, $1151\text{-}1171 \text{ cm}^{-1}$). Quando o espectro destes precursores é comparado ao NADES (CICo-Ac-A), foi possível verificar a presença das bandas mais características ($\nu\text{O-H}$, $\nu\text{C=O}$, $\gamma\text{C-H}$ e $\nu\text{C-N}$), o que é um indicativo da preservação dos precursores na mistura, além de deslocamentos no número de onda em algumas bandas, como a banda de estiramentos $\nu\text{O-H}$, um indício da presença de ligação de hidrogênio no solvente NADES (CICo-Ac-A) (WANG, 1999; JIANG, 2020).

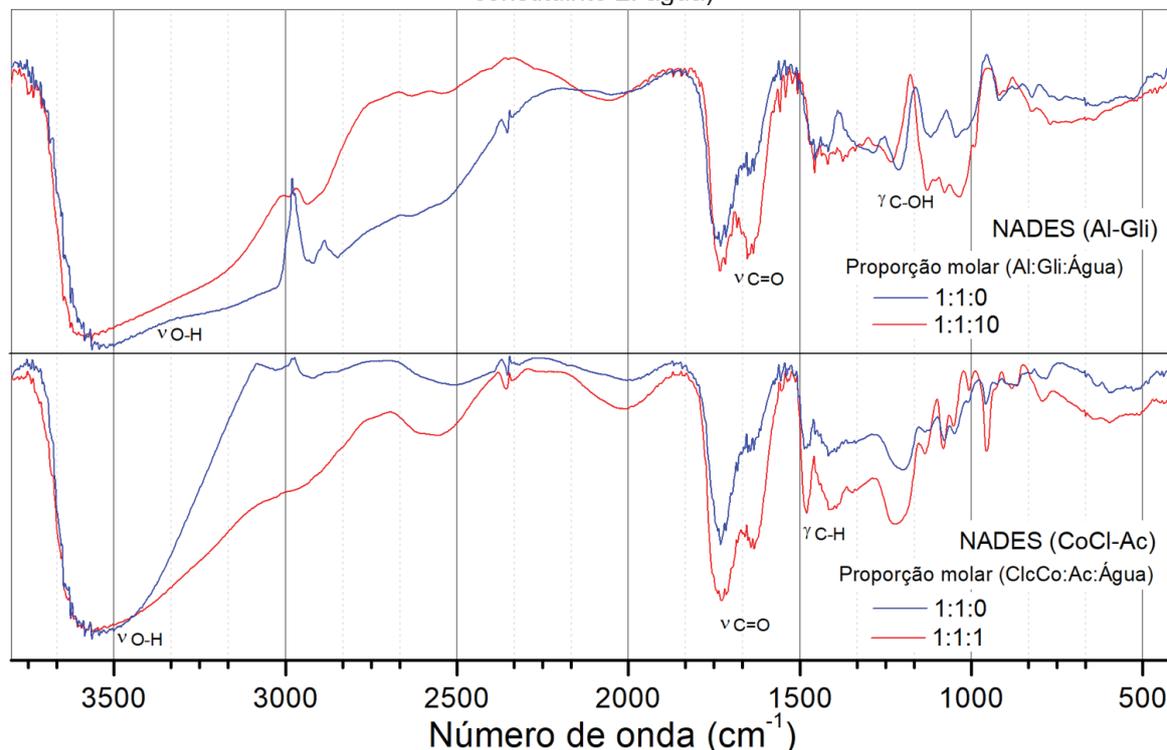
Figura 13: Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para o NADES (CICo-Ac-A) (verde) e seus compostos precursores: cloreto de colina (vermelha) e ácido láctico (verde).



Para melhor eficiência de extração dos NADES e sua compatibilidade com o GFAAS, água foi adicionada na composição dos NADES. De modo a avaliar se houve alteração na composição química dos respectivos NADES, foram realizados espectros em NADES na proporção molar (mol) 1:1:0 e 1:1:10 de ambos os NADES estudados (Al-Gli-A e CICo-Ac-A).

Como pode ser observado (Figura 14), todas as bandas características foram preservadas, sendo que algumas bandas tiveram um deslocamento no número de onda, o que é esperado, visto que a adição de água promove o enfraquecimento das ligações de hidrogênio, que pode ser visualizado de forma qualitativa na alteração da viscosidade da solução.

Figura 14: Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para o NADES (ClCo-Ac-A) e NADES (Al-Gli-A) em diferentes proporções molares (mol): 1:1:0 e 1:1:10 (constituente 1: constituinte 2: água)



A estabilidade dos NADES também foi avaliada quanto a sua armazenagem – em refrigerador (G) e em dessecador (D) durante um período de cinco meses (fevereiro – julho/2022). Como podem ser visualizados nas Figuras 15 (NADES (Al-Gli-A)) e Figura 16 (NADES (ClCo-Ac-A)), não houve nenhum surgimento ou desaparecimento de quaisquer bandas das originalmente presentes. Ou seja, os NADES apresentaram satisfatória estabilidade ao longo do período avaliado, independente do modo de armazenamento. Todavia foi possível notar uma variação em relação as intensidades das bandas entre as análises mensais, mais notável no primeiro mês (preto) e a último (verde).

A intensidade das bandas do espectro está relacionada a transmitância do feixe de radiação que por sua vez está relacionado a concentração da espécie na amostra (ROHMAN, 2010; PAIVA, 2011). Alguns fatores podem ter contribuído para este fenômeno: i) variação de massa de amostra entre análises, visto que as varreduras foram qualitativas; ii) o mesmo cristal de KBr foi utilizado ao longo dos meses, ou seja o desgaste do cristal pela amostra polar e consequente alteração na transmitância do substrato e iii) variabilidade do tratamento do espectro (*baseline*) realizado no software do instrumento que pode alterar a intensidade dependendo do espectro. Apesar dos fatores, para os NADES (Al-Gli-A) esta

alteração de intensidade se dá de modo diferente nos armazenamentos R e D, sendo que no dessecador a variação de intensidade é em menor grau quando comparado no armazenamento por refrigerador, o que pode indicar maior preservação do solvente.

Já para os NADES (ClCo-Ac-A), pode-se verificar que para ambas as formas de armazenamento até o quarto mês não houve mudança relevante na intensidade das radiações para as ligações analisadas, contudo para o armazenamento em dessecador, verifica-se que para o quinto mês, uma significativa diminuição da intensidade foi observada, sugerindo-se que a estabilidade desse NADES pode estar comprometida. Contudo, essa hipótese requer estudo mais aprofundado e dado estas observações preliminares, avaliações em relação ao poder de extração dos NADES recém-sintetizados e de meses de armazenamento (seja em refrigerador e/ou dessecador) são previstos em projetos futuro do grupo de pesquisa.

Figura 15: Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) mensais, realizados no período de fevereiro (mês (0)) a julho (mês (4)), para o NADES (Al-Gli-A) em diferentes modos de armazenamento – Refrigerador (R) e Dissecador (D).

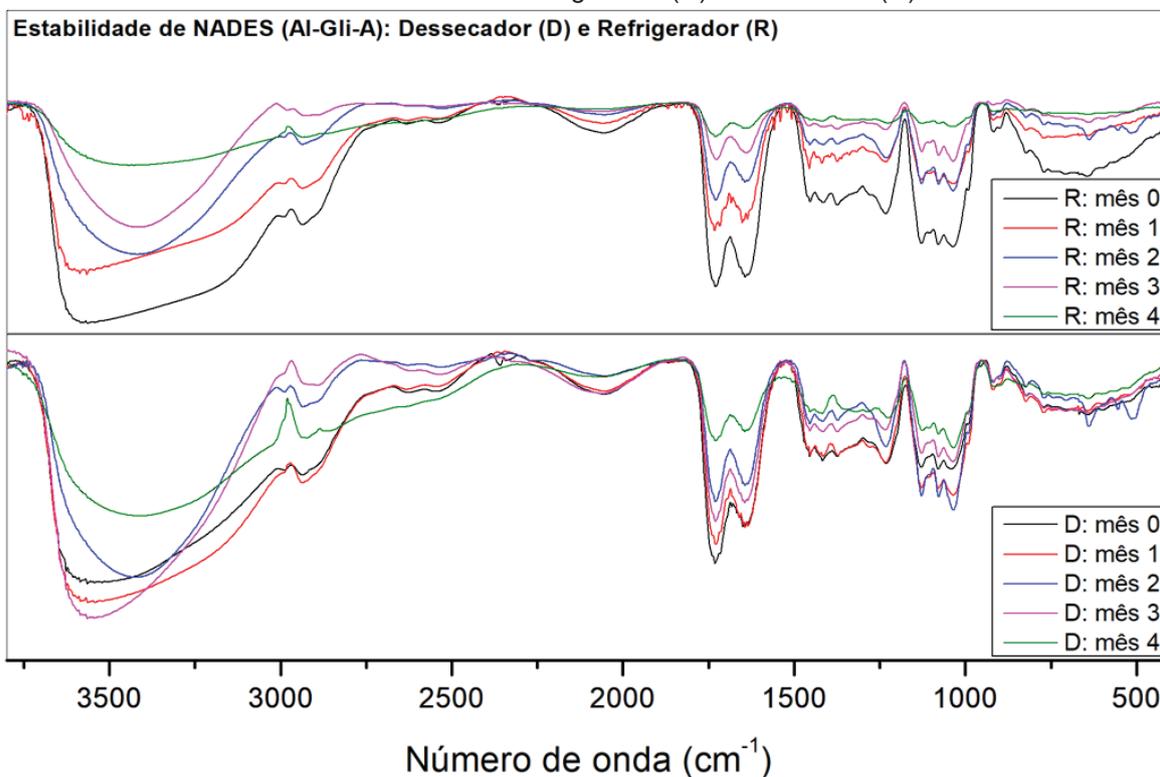
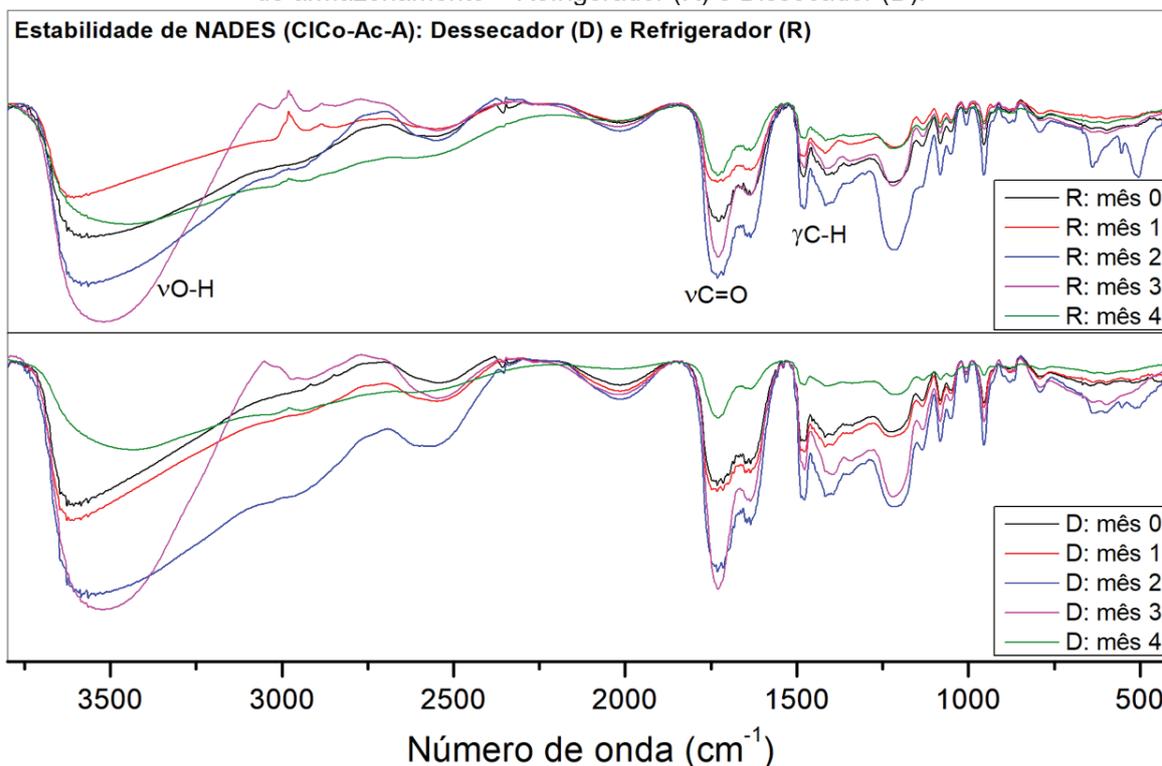


Figura 16: Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) mensais, realizados no período de fevereiro (mês 0) a julho (mês 4), para o NADES (CICo-Ac-A) em diferentes modos de armazenamento – Refrigerador (R) e Dissecador (D).



4.3. Preparo de amostras

Para estudos envolvendo a aplicação dos NADES foi selecionada a estratégia de preparo de amostras que seja simples e rápida, como descritas na literatura (LIU, 2019; SANTANA, 2019). A contaminação das amostras de espinafre (Figura 17) foi realizada por adição de uma solução padrão multielementar de As, Cd e Pb ($20 \mu\text{g L}^{-1}$), em meio de HNO_3 1% v v⁻¹. Para as amostras não fortificadas, volumes correspondentes de uma solução de HNO_3 1% v v⁻¹ foram adicionados às amostras, para que todas estivessem no mesmo meio reacional para posterior análise no GFAAS.

Figura 17: Folhas de Espinafre (*Spinacia oleracea*) após o processamento da amostra (tamanho de partícula da amostra processada de 20 mesh).



Fonte: O autor.

A diluição final do preparo de amostras de 1:10 ($v v^{-1}$) da solução contendo (NADES + amostra + HNO_3 1% $v v^{-1}$ com ou sem analito): HNO_3 1% $v v^{-1}$ foi empregada, pois observou-se que na diluição inicialmente avaliada 2:10 ($v v^{-1}$), os sinais dos analitos (As e Pb) sofriam significativas interferências espectrais possivelmente de íons cloretos presentes nos NADES (CICo-Ac-A), bem como efeitos de memória advindos do resíduo orgânico de ambos os NADES estudados, no tubo de grafite, que prejudicavam a qualidade analítica dos resultados, quando na proporção de diluição 2:10 ($v v^{-1}$). A alteração do fator de diluição de 2:10 para 1:10 não acarretou em impactos significativos nas variáveis respostas estudadas: recuperação, m_0 e o parâmetro SBR (Tabela 6), logo foi adotado como diluição padrão na etapa de preparo de amostras para análises no GFAAS.

As interferências produzidas pelos íons cloretos são bem fundamentadas e conhecidas para diversos elementos químicos em GFAAS (WELZ, 2008). Dentre os efeitos que a presença de íons Cl^- podem ocasionar, incluem: a volatilização do analito pela formação de cloretos solúveis na etapa de pirólise; oclusão do analito na forma de cloreto dentro da matriz de análise (formação de complexos), que podem ser expelidos na etapa de atomização; formação de cloretos estáveis não dissociáveis durante a etapa de atomização e formação de cloretos metálicos que absorvem no mesmo comprimento de onda do analito (WELZ, 2008; ALLER, 2018).

Tabela 6: Avaliação da etapa de diluição do preparo de amostra empregando NADES para as análises por GFAAS. Condições Instrumentais: $T_{\text{pirólise}} = 1050 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{pirólise}} = 5 \text{ s}$; $T_{\text{atm}} = 2200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Pb) e $2450 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (As); $t_{\text{atomização}} = 3 \text{ s}$; modificador = $5 \text{ } \mu\text{g}/5 \text{ } \mu\text{L Pd}(\text{NO}_3)_2$. Volume de amostra: $20 \text{ } \mu\text{L}$ e de modificador $5 \text{ } \mu\text{L}$.

As						
Diluição	NADES (Al-Gli-A)			NADES (CICo-Ac-A)		
	Recuperação (%)	m_0	SBR	Recuperação (%)	m_0	SBR
2:10	73,20	20,85	0,37	49,35	30,97	0,29
1:10	94,45	16,17	0,79	61,71	24,74	0,59
Pb						
2:10	98,26	17,36	1,39	115,31	14,79	1,98
1:10	83,19	20,51	1,59	104,89	16,26	2,40

Antes do detalhamento dos comportamentos das variáveis respostas selecionadas, sejam eles positivos ou negativos, consequente das alterações do procedimento e suas otimizações na aplicação dos NADES propostos no preparo de amostras e determinação de As e Pb na técnica de GFAAS; é importante realizar a descrição dos parâmetros respostas selecionadas: recuperação (%), signal-to-background-ratio (SBR) e massa característica (m_0) e como foram abordadas nesse trabalho.

A recuperação (Equação 2) é um parâmetro obtido em porcentagem para avaliar a exatidão do método, podendo ser estimado pela análise das amostras previamente fortificadas.

Quanto ao parâmetro SBR, é desejado valores elevados (Equação 3), pois indica melhor razão entre o sinal analítico e o sinal de fundo, atribuído às condições reacionais e instrumentais do método, estando correlacionado diretamente com os parâmetros LOD/LOQ.

O monitoramento da massa característica m_0 (Equação 4), está relacionado com a sensibilidade (nível de detectabilidade) do método analítico, além de indiretamente indicar a seletividade do método proposto (efeito de matriz), sendo muito útil para a avaliação das possíveis interferências espectrais e/ou não espectrais em GFAAS. Desta forma, para que seja estabelecido que o método apresente uma sensibilidade satisfatória, é desejável que o valor calculado esteja dentro do que a literatura propõe atribuindo uma faixa de 20% superior e/ou inferior ao valor teórico estabelecido para a m_0 . Para a técnica de GFAAS, o valor teórico

da m_0 de As é de 15 pg, ou seja, é desejável que o valor experimentalmente obtido esteja dentro de uma faixa de 12,0 à 18,0 pg (WELZ, 2008). Para Pb, o valor teórico da m_0 é de 16 pg, sendo sua faixa desejável de 12,8 à 19,2 pg. Para Cd, m_0 teórico é 0,40 pg e sua faixa desejável é de 0,32 à 0,48 pg (WELZ, 2008).

Logo, é importante avaliar, nos experimentos que possuem um faixa de recuperação considerado quantitativos (80-120%; ANVISA, 2017), se a sensibilidade e a resolução dos sinais analíticos atingem valores desejáveis, indicando a presença ou não de interferentes de matriz, por meio do monitoramento dos parâmetros SBR e m_0 , respectivamente. O monitoramento desses parâmetros auxilia nas tomadas de decisões em relação a otimização dos parâmetros reacionais/instrumentais de análise, como pode ser observado na otimização da etapa de diluição do preparo de amostras (Tabela 6).

Para as determinações de As, os valores de recuperação, SBR e m_0 atingiu valores satisfatórios em termos de sensibilidade e exatidão quando uma diluição 1:10 v v⁻¹ foi empregada nas análises por GFAAS. Observou-se também que um aumento nos valores do parâmetro SBR (indicativo de melhor razão do sinal analito: sinal de fundo) foram observados nas análises quando a alteração da diluição dos NADES para 1:10 v v⁻¹, independente do analito As e Pb. Nesse fator de diluição empregado, possivelmente ocorre a diminuição da carga orgânica presente na matriz/NADES, como também na concentração de íons cloreto nas soluções de NADES (CICo-Ac-A) nas análises por GFAAS.

Conforme a literatura, a concentração de cloretos tem pouca influência no sinal de arsênio na linha (193,7 nm) nas condições instrumentais empregadas nesse trabalho (WELZ, 2013). Considerando que nas duas condições de diluição, os NADES (CICo-Ac-A), que possui cloretos em sua composição, apresentou menor sensibilidade para As quando comparado aos NADES (Al-Gli-A), foi possível inferir que a presença de íons cloreto não seja um fator para o efeito observado dos parâmetros avaliados (recuperação, SBR e m_0) e que possa haver presença de efeito de estabilização de As por NADES (Al-Gli-A) dentro da técnica de GFAAS. Até o momento deste estudo não foi descrito na literatura e se confirmado evidenciará alta compatibilidade de determinados NADES (Al-Gli-A) com a técnica GFAAS na determinação de As.

Quanto a recuperação, exceto para a determinação de Pb na utilização dos NADES (Al-Gli-A) houve uma diminuição (de 98,26 para 83,19%), porém ainda dentro da faixa de recuperação preconizado pelo INMETRO, 2020. Na determinação de As, a alteração no fator de diluição de 2:10 para 1:10, independente dos NADES estudado, levou a uma diminuição do m_0 (de 20,85 para 16,17 para os NADES (Al-Gli-A) e 30,97 para 24,74 para os NADES (CICo-Ac-A)), ou seja, uma melhora na sensibilidade foi observada, enquanto que nas análises de Pb o fenômeno observado foi oposto (17,36 para 20,51 para os NADES (Al-Gli-A) e 14,79 para 16,56 para os NADES (CICo-Ac-A)). Contudo, para ambos os analitos, a maior parte dos valores de m_0 obtidos estão dentro da faixa analítica recomendada, indicando, satisfatória sensibilidade. Desta forma, a diluição adotada 1 mL (NADES + amostra + HNO_3 1% v v⁻¹ com ou sem analito): 10 mL (HNO_3 1% v v⁻¹) foi empregada nesse estudo por gerar menos carga residual orgânica no tubo de grafite (mais detalhes no tópico 4.7.).

É fundamentado na literatura que para o Pb, a presença de cloretos tem influência na formação e volatilização do analito na forma de $\text{PbCl}_2(\text{g})$, apresentando-se como uma interferência não espectral (WELZ, 2013). Todavia, a formação de hidrogênio tem a capacidade de suprimir essa interferência, eliminando cloretos na forma de $\text{HCl}(\text{g})$. É conhecido que a introdução de modificadores orgânicos como ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido lático tem a capacidade de promover a formação de hidrogênio durante as análises em GFAAS. Considerando que os NADES selecionados neste estudo possuem na composição potenciais modificadores orgânicos, os dados obtidos das análises em diferentes diluições sugerem que, o aumento da quantidade de NADES presente na amostra em 2:10 v v⁻¹ e sua atuação como modificador químico parece superar a presença de interferências não espectrais oriundas de íons cloretos em NADES (CICo-Ac-A) e do aumento da carga orgânica dos NADES.

Nesta etapa de estudo análises análogas com o elemento Cd não foram realizadas por razões de otimização de tempo de uso do equipamento. Para este analito, foram adotadas as diluições otimizadas para As e Pb, ou seja, 1:10.

4.4. Estudo das variáveis referentes às condições reacionais/instrumentais do método analítico

Métodos univariados foram utilizados para a otimização das etapas de pré-aquecimento e secagem, que são etapas importantes para a eliminação majoritária de parte do solvente no programa de aquecimento do GFAAS. Nestas etapas o aquecimento deve ser realizado de forma gradual e suave, evitando a eliminação brusca do solvente para a parte externa do tubo de grafite, o que comprometeria as análises químicas. Contudo, de forma a avaliar as variáveis independentes mais significativas das condições reacionais/instrumentais empregadas, para as variáveis dependentes selecionadas (recuperação, m_0 e SBR) em amostras de folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*) previamente fortificadas (com As, Cd e Pb), planejamentos fatoriais, fracionados e completos, foram realizados de modo a determinar combinações das condições ótimas de análise de determinação dos analitos em questão, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros instrumentais do GFAAS para a determinação de As em amostras de folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*) aplicando-se o Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1} para os NADES (Al-Gli-A) e NADES (CICo-Ac-A).

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	
		Rampa	Permanência
Pré-aquecimento	80	20	5
Secagem	150	20	5
Pirólise	V.I.	30	V.I.
Atomização	2200	0	V.I.
Limpeza	2500	0	2

* V.I.: Variável independente avaliado nos planejamentos fatoriais.

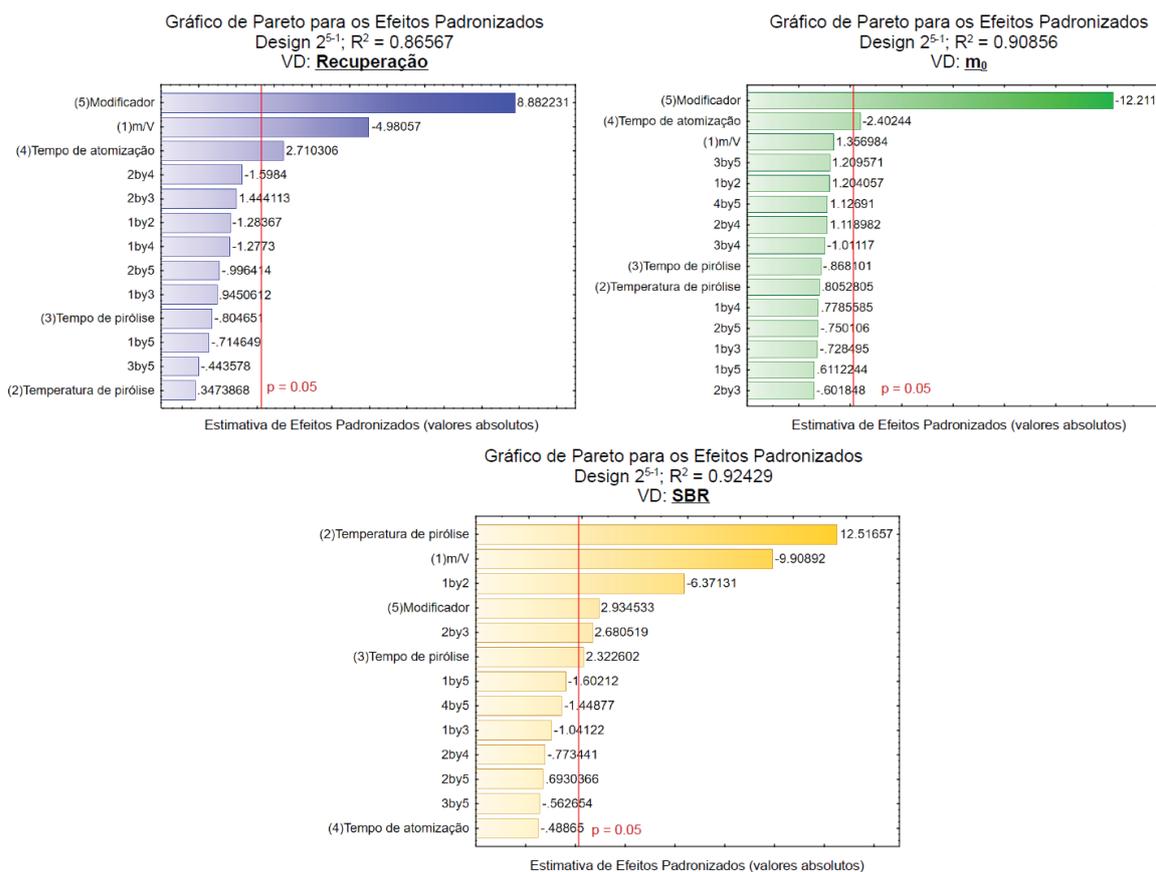
Para completar o estudo aplicando-se o planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} , também foram incluídas as variáveis presença de modificador químico $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, nas concentrações 0 a 5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$, e razão massa de amostra : volume de solução extratora (NADES), nas faixas de 45 e 90 mg: 2 mL NADES.

O gráfico de Pareto evidência quais as variáveis foram mais significativas, positivamente ou negativamente, nas respectivas variáveis dependentes avaliadas. Como pode ser verificado na Figura 18, o modificador químico é um fator significativo e relevante na interação com as demais variáveis analisadas. Modificadores químicos são substâncias inseridas juntamente com a amostra no

tubo de grafite, e sua função, nesse estudo, está na estabilização do analito durante todo o processo de aquecimento/pirólise/atomização.

No modelo avaliado gerado pelo planejamento fatorial fracionado de nível 2, a presença do modificador químico aumenta a recuperação e o SBR, em acordo com a estabilização do analito, ao mesmo tempo que diminui a m_0 , obtendo-se melhor sensibilidade nas condições operacionais avaliadas, indicado pelos valores dos efeitos padronizados (positivos para as variáveis recuperação e SBR e negativos para m_0). A presença do modificador químico foi de considerável relevância para a estabilização do sinal de As, levando-se em consideração os três parâmetros analisados (recuperação, SBR e m_0) conjuntamente, independente da razão massa de amostra/volume de NADES empregada (45 ou 90mg / 2mL). Em todas as análises realizadas como já mencionado, a solução de análise consiste em NADES (Al-Gli-A) e NADES (ClCo-Ac-A) na proporção molar (mol) 1:1:10 e diluição 1:10 (NADES: solução HNO_3 1% v v⁻¹) no preparo de amostras.

Figura 18: Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial fracionado 2⁵⁻¹ para os NADES (Al-Gli-A) na determinação de As com cinco variáveis dependentes: Temperatura de Pirólise (°C), Tempo de Pirólise (s), Tempo de Atomização (°C), Razão Massa/Volume (mg / 2 mL) e Modificador (µg/ 5 µL) e as variáveis respostas: Recuperação (%), m_0 e SBR.



A temperatura de pirólise ($T_{\text{pirólise}}$) é também significativa para o aumento dos valores de SBR, o que significa melhor razão sinal analito/sinal de fundo, além de apresentar uma interação importante com a variável massa/volume (massa de amostra e volume de NADES), indicando que o aumento na $T_{\text{pirólise}}$ (de 600 para 1200 °C) aumenta a eficiência de eliminação da matriz orgânica presente, reduzindo significativamente o efeito de interferência de matriz, melhorando consequentemente a sensibilidade do método analítico.

As variáveis tempo de pirólise ($t_{\text{pirólise}}$) e tempo de atomização ($t_{\text{atomização}}$) apresentaram significância para as variáveis estudadas, porém no conjunto avaliado não parece influenciar de forma significativa, quando comparada às variáveis modificador químico e $T_{\text{pirólise}}$. Sendo assim foram fixadas para o menor valor (5s para $t_{\text{pirólise}}$ e 2s para $t_{\text{atomização}}$) de modo a diminuir o tempo de análise e de desgaste do tubo de grafite.

Quanto a razão massa de amostra/volume NADES pode-se observar que em todos os experimentos realizados, quando o valor em nível mais baixo (45 mg / 2mL) foi empregado, melhores valores para os parâmetros estudados foram obtidos.

Levando isto em consideração e em consideração ao tempo de otimização de uso do equipamento e de recursos, foi decidido selecionar e refinar os valores apenas para as variáveis independentes mais significativas, como o modificador e $T_{\text{pirólise}}$, para todos os analitos avaliados neste estudo. A avaliação criteriosa dessas variáveis foi crucial nessa etapa do trabalho, para a elaboração dos futuros planejamentos fatoriais no auxílio da verificação das interferências espectrais e/ou não espectrais no desenvolvimento do método analítico por GFAAS.

Tendo em vista que a temperatura de pirólise e modificador químico foram as variáveis mais significativas e com maiores interações entre as demais variáveis, foi utilizado um planejamento fatorial de nível 3 completo (Tabela 8) com 9 experimentos para cada NADES, em duplicatas, a fim de gerar perfis de superfície de resposta (MSR) que possa fornecer modelos e assim auxiliar na obtenção de valores ótimos para os parâmetros resposta avaliados (recuperação, m_0 e SBR), levando-se em consideração o efeito das variáveis lineares, quadráticas e suas possíveis correlações. Os valores de temperatura de pirólise para os analitos As e Pb foram selecionados com base no programa *default* do equipamento e análises preliminares das soluções NADES-GFAAS (Al-Gli-A)/(ClCo-Ac-A).

Tabela 8: Avaliação das variáveis e seus respectivos níveis estudados para o Planejamento Fatorial de Nível 3 para as duas variáveis: Temperatura de pirólise ($^{\circ}\text{C}$) e quantidade de modificador ($\mu\text{g} / 5\mu\text{L}$) para os NADES (Al-Gli-A) e NADES (ClCo-Ac-A) na determinação de As e Pb por GFAAS.

Variável/Parâmetro	Nível do Planejamento Fatorial nível 3 ²		
	-1	0	+1
Temperatura de pirólise ($^{\circ}\text{C}$)	800 (Pb); 1200 (As)	1050 (Pb); 1350 (As)	1300 (Pb); 1500 (As)
Modificador ($\mu\text{g} / 5\mu\text{L}$)	3	5	7

Os gráficos MSR referentes a cada parâmetro resposta e os gráficos correspondentes ao fator desejabilidade global (Figura 19) na determinação de Pb para ambos os NADES, indicam que em temperaturas acima de 1200°C o fator de desejabilidade atinge os piores índices (valores mais próximos de zero), sugerindo que o analito (Pb) acima desta temperatura é facilmente volatilizado e a presença de maior quantidade de modificador não foi suficiente para estabilizá-lo na amostra.

Em temperaturas em torno de 850°C os valores para os parâmetros avaliados também diminuem, como bem indicam os valores de desejabilidade nesta região, podendo ser atribuído a interferência da matriz orgânica presente na amostra como também proveniente dos NADES. Esta hipótese é reforçada ao

observar o perfil de MSR individual para o parâmetro SBR. O parâmetro SBR acompanha as condições ótimas encontradas para as variáveis recuperação e mo, sugerindo que a diminuição do sinal de fundo está correlacionada com a diminuição da presença de concomitantes inorgânicos da matriz.

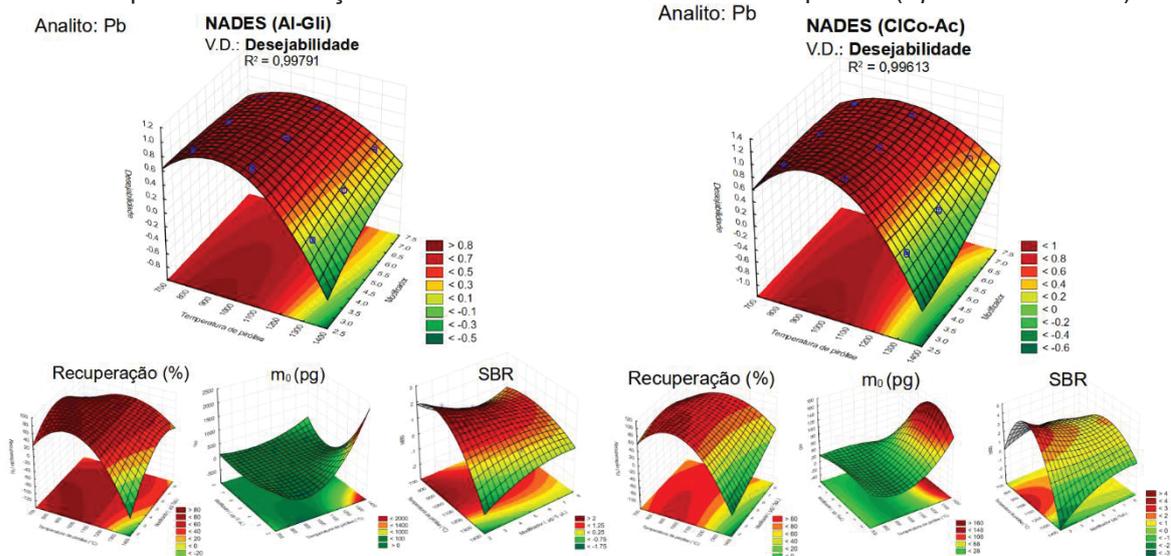
Todavia não basta diminuir o sinal de fundo apenas com o aumento da temperatura de pirólise, pois pode acarretar na volatilização do analito nessa etapa. Desta forma, é importante encontrar uma condição de equilíbrio entre a temperatura de pirólise que seja o suficiente para a separação térmica do analito e matriz, mas que não provoque a volatilização do analito na presença de modificador químico na etapa de pirólise.

Neste sentido, observar os resultados por meio da aplicação de funções de desejabilidade global tornam as respostas de otimização mais claras, pois são avaliados um conjunto ponderado das variáveis respostas, tornando a etapa de otimização mais eficiente e econômica, em termos do número reduzido de experimentos. Seguindo esta óptica, foi possível observar que uma região ótima de análise química por GFAAS, compreende uma região de 900-1050°C de temperatura de pirólise e 2,5-3,0 µg/5µL de modificador, para ambos os NADES estudados.

Adicionalmente, é notável que empregando-se os NADES (CICo-Ac-A) para a determinação de Pb foram obtidos valores mais próximos de 1,0 para a desejabilidade global, quando comparado ao mesmo perfil em NADES (Al-Gli-A), fortalecendo a hipótese de atuação do ácido cítrico como modificador químico orgânico para a estabilização de Pb no solvente (CICo-Ac-A).

Alguns autores propuseram que compostos orgânicos como ácido cítrico e ácido tartárico tem a capacidade de promover a redução de Pb durante o processo de aquecimento do tubo antes da etapa de pirólise, evitando a perda do analito por sublimação de haletos, óxidos, dímeros e outros composto (DE LA CALLE-GUNTINAS, 1992, BYRNE, 1993). Outro mecanismo relatado na literatura inclui a diminuição da interferência não espectral ocasionada por cloretos, através da eliminação do íon na forma de HCl(g) formado com a combinação de hidrogênio fornecido pelos modificadores orgânicos durante a rampa de análise (DE MATTOS, 2005; ACAR, 2008; 2009; HUSÁKOVÁ, 2009; LIMA, 2016).

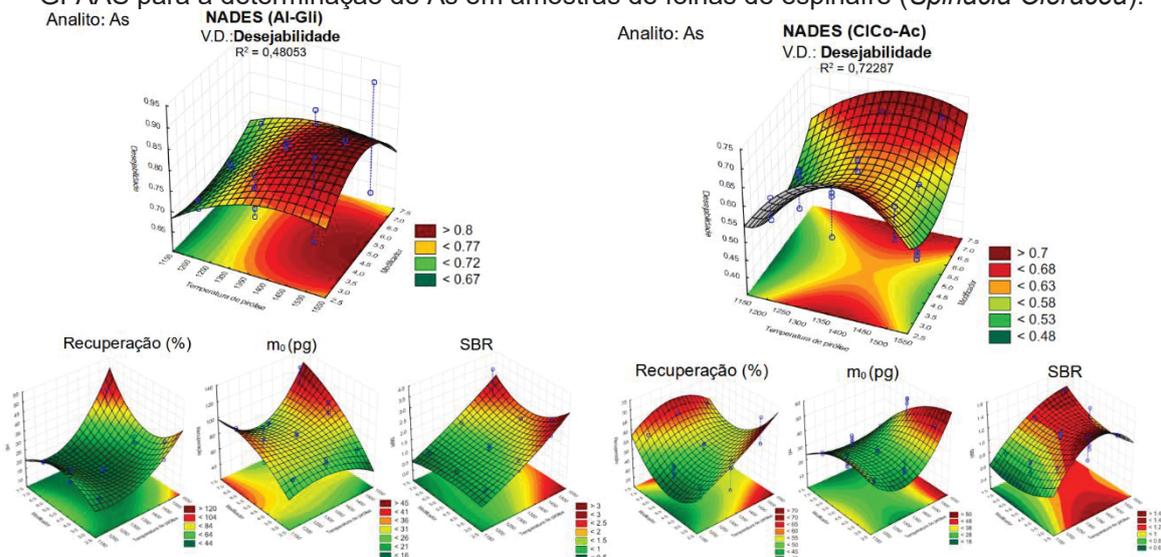
Figura 19: Gráficos de superfície resultado do planejamento Fatorial Fracionário 3^2 desenvolvido para a avaliação e otimização das variáveis mais significativas das condições instrumentais do GFAAS para a determinação de Pb em amostras de folhas de espinafre (*Spinacia Oleracea*).



Observações semelhantes foram encontradas para a determinação de As no que se referem as relações/interações entre as variáveis dependentes (Figura 20). Para os NADES (Al-Gli-A), em temperatura próxima a 1200 °C, valores para o parâmetro SBR atinge os piores índices, o que reflete em maiores valores de m_0 visto que nessas condições a presença significativa de concomitantes promove a ocorrência de interferências.

Valores de recuperação próximas de 100% são observadas em temperaturas de pirólise elevada ($T_{\text{pirólise}} \cong 1500$ °C e na presença de modificador químico de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (5 $\mu\text{g}/5$ μL), condições essas desejáveis para a quantificação de As na matriz folhas de espinafre. Para os NADES (ClCo-Ac-A) é interessante notar que a variável temperatura de pirólise se comporta de maneira mais acentuada, ou seja, seu aumento próximo as condições otimizadas para os NADES (Al-Gli-A) (1500°C) não é favorável, tendo em vista os piores índices alcançados para as variáveis analisadas, exceto para o parâmetro SBR. O que sugere maior compatibilidade do NADES (Al-Gli-A) para a quantificação de As em amostra de tecido vegetal.

Figura 20: Gráficos de superfície resultado do Planejamento Fatorial Fracionário 3^2 desenvolvido para a avaliação e otimização das variáveis mais significativas das condições instrumentais do GFAAS para a determinação de As em amostras de folhas de espinafre (*Spinacia Oleracea*).



Os valores mais baixos de desejabilidade global, bem como os menores valores de coeficiente de determinação (R^2) quando comparado com as modelagens em Pb, refletem na dificuldade de se determinar As no meio reacional empregado, indicando a presença de interferências espectrais, em que o método de correção de fundo do equipamento (fonte contínua com lâmpada de D_2) não foi capaz de resolver de forma eficiente, como na determinação de Pb. Estratégias como alteração da linha de absorção de As (em 193,7 para 197 nm) foram adotadas, todavia não refletiram em melhores resultados por ainda ser uma linha muito próxima ao limite de comprimento de onda da lâmpada D_2 empregada como corretor de fundo.

De modo a avaliar os modelos MSR obtidos para os NADES (Al-Gli-A) e NADES (ClCo-Ac-A) (Figura 19 e 20), foram selecionadas regiões onde o modelo responde com ótimos valores de predição dos parâmetros avaliados (recuperação, m_0 e SBR) para a determinação de As e Pb. A temperatura de pirólise selecionada foi de 900 °C para NADES (Al-Gli-A) e 1050 °C para NADES (ClCo-Ac-A) e a quantidade de modificador $Pd(NO_3)_3$ foi de 1 $\mu g/5 \mu L$ para ambos os NADES nas determinações de Pb.

Para os casos de análises com As, temperatura de pirólise selecionada foi de 1500 °C para NADES (Al-Gli-A) e 1350 °C para NADES (ClCo-Ac-A) e a quantidade de modificador $Pd(NO_3)_3$ foi de 5 $\mu g/5 \mu L$ e 3 $\mu g/5 \mu L$ para NADES (Al-Gli-A) e NADES (ClCo-Ac-A), respectivamente. O resultado desse estudo está

descrito na Tabela 9, com os valores preditos aqueles obtidos pelo modelo MSR e o valor experimental obtido em análises realizadas em duplicata. Para os NADES (Al-Gli-A) o valor predito para m_0 na Tabela 9 está nulo dado que o modelo gerado por MSR responde a um valor de -240 de m_0 , o que é inconsistente com a realidade deste parâmetro, logo não foi incluído como valor predito. Todos os valores obtidos de recuperação, SBR e m_0 estão de acordo com os valores preconizados pelas agências reguladoras INMETRO e (ANVISA, 2021).

Apesar das dificuldades com a geração de um modelo MSR na determinação de As utilizando os NADES, foi possível obter condições satisfatórias dos parâmetros avaliados (recuperação, m_0 , SBR) e de deseabilidade (0,68 para (Al-Gli-A) e 0,64 para CCo-Ac)). Experimentalmente, os resultados para As nas soluções contendo NADES (Al-Gli-A) foram mais satisfatórios quando comparados aos NADES (CCo-Ac-A). Como já mencionado, alguns autores (DE LA CALLE-GUNTINAS, 1992, BYRNE, 1993) propuseram que modificadores químicos orgânicos como ácido láctico e ácido ascórbico promovem a redução do paládio (presente no modificador universal Pd-Mg), que por sua vez reage com as espécies de As (As_2O_3 , formando outras espécies estáveis do elemento ($Pd_xAs_yO_z$), de acordo com a reação (WELZ, 2008):



Desde modo, pode-se verificar o aspecto promissor dos NADES não somente em seu notável potencial extrator dos elementos inorgânicos, como também na possibilidade de atuarem sinergicamente com os modificadores químicos convencionalmente usados (como os de $Pd(NO_3)_2$) nas análises com a técnica de GFAAS, melhorando ainda mais seus efeitos de estabilização do analito.

Tanto para o Pb como para o As, as evidências observadas indicaram uma melhora na estabilidade desses analitos no meio reacional, tornando-os mais refratários em valores de $T_{pirólise}$ próximas ou acima de $1000^\circ C$, muito desejável para se promover a separação térmica do analito e amostra, com reduzido sinal de fundo. Outros potenciais candidatos para constituintes de NADES com possíveis características de modificador químico nas análises por GFAAS incluem o ácido ascórbico, a ureia e o ácido oxálico. Todavia o efeito destes constituintes dos NADES pode variar para cada analito, e seus efeitos devem ser investigados, a depender do elemento como também da amostra em que está contido. De la Caileguntinãs et al. (1992) reportou que uma mistura contendo ácido láctico/málico/cítrico

e iodeto de potássio em HCl 1 mol L⁻¹ eliminou completamente a interferência causada por Sb e Se para a determinação de As em amostras aquosas. Byrne al. (1993) observaram que, em presença de ácido ascórbico ou oxálico, o sinal de Pb atenua em determinadas temperaturas, atribuído segundo os autores pela formação de gás hidrogênio e monóxido de carbono, que são produtos da decomposição dos compostos orgânicos adicionados.

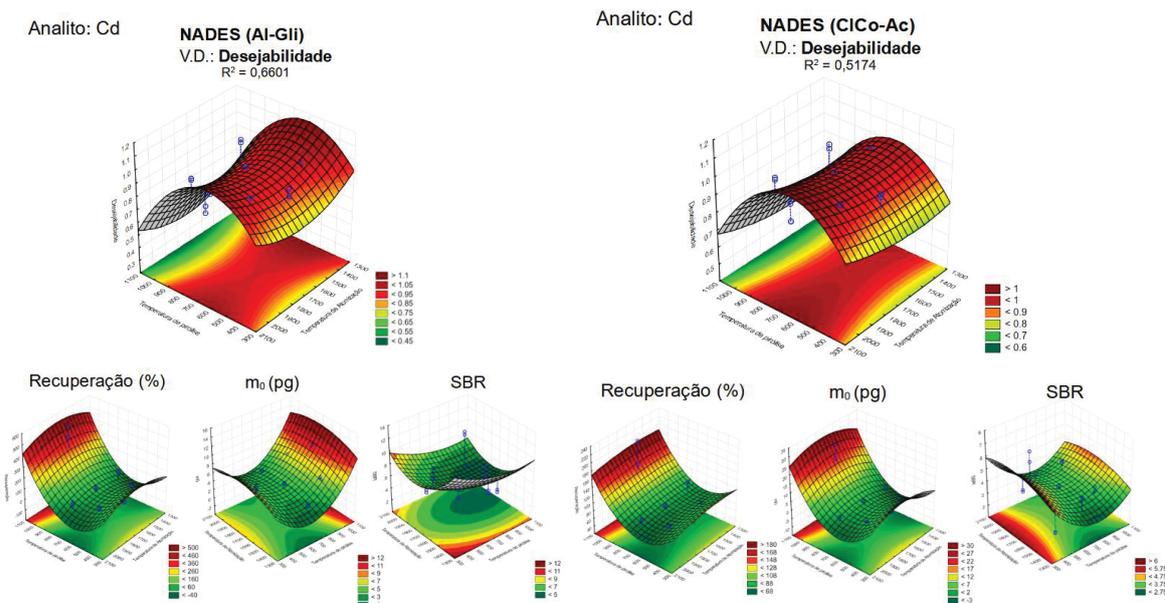
Para Cd, por ser um elemento de fácil volatilização e atomização, temperatura de atomização foi selecionado no lugar de quantidade de modificador como variável dependente e o perfil de seus gráficos de superfície pode ser observado na Figura 21. Além disso, de modo a melhorar a eficiência do estudo, uma otimização por planejamento experimental composto central foi adotada e seus valores (Tabela 9) foram selecionados com base no programa de aquecimento padrão do equipamento e dados da literatura (WELZ, 2008).

Tabela 9: Avaliação das variáveis e seus respectivos níveis estudados para o Planejamento Compostos Centrais Nível 2 para as duas variáveis: Temperatura de pirólise (°C) e Temperatura de atomização (°C) para os NADES (Al-Gli-A) e NADES (ClCo-Ac-A) na determinação de As e Pb por GFAAS. Os valores em α se referem as regiões axiais.

Variável/Parâmetro	Nível do Planejamento Fatorial nível 2 ²				
	- α	-1	0	1	+ α
Temperatura de pirólise (°C)	417	500	700	900	983
Temperatura de atomização (°C)	1417	1500	1700	1900	1983

Experimentalmente foi notado que para NADES (ClCo-Ac-A) os sinais de Cd são mais atenuados quando comparado com as amostras contendo NADES (Al-Gli-A), o que pode ser atribuído pelas etapas de decomposição do ácido cítrico que contribuem na atenuação dos sinais do analito, fenômeno similar observado para Pb. Isto permitiu que se elevasse a temperatura de pirólise (um incremento de 50 °C quando comparado a análise com NADES (Al-Gli-A) e atomização (um incremento de 100 °C) e ainda sim manter bons valores dos parâmetros avaliados, como pode ser visualizado na Tabela 11.

Figura 21: Gráficos de superfície resultado do Planejamento Fatorial Fracionário 3² desenvolvido para a avaliação e otimização das variáveis mais significativas das condições instrumentais do GFAAS para a determinação de Cd em amostras de folhas de espinafre (*Spinacia Oleracea*).



Por fim, ao final do processo, além de obter um perfil do comportamento dos NADES (Al-Gli-A) e (CICo-Ac-A) frente as determinações via GFAAS, foi possível obter as melhores condições instrumentais para a determinação dos analitos estudados, como pode ser verificada na Tabela 10.

Tabela 10: Condições instrumentais do GFAAS otimizadas após aplicação do planejamento fatorial de nível 3^2 (As, Pb) e composto central (Cd).

Etapa	Tempo (s)		Temperatura (°C)		
	Rampa	Permanência	As	Cd	Pb
Pré-secagem	10	5	90	90	90
Secagem	20	-	90	150	150
Pirólise	20	5	1500 (Al-Gli-A) / 1350 (CICo-Ac-A)	750 (Al-Gli-A) / 800 (CICo-Ac-A)	900 (Al-Gli-A) / 1000 (CICo-Ac-A)
Atomização	-	3	2450	1800 (Al-Gli-A) / 1900 (CICo-Ac-A)	2200
Limpeza	-	2	2500	2500	2500

Tabela 11: Avaliação dos modelos de MSR (Figura 19 e 20) com base nas regiões de valores ótimos dos parâmetros resposta selecionados (recuperação, m_0 e SBR) para a determinação de As e Pb em amostras de folhas de espinafre (*Spinacia Oleracea*) por GFAAS, através da comparação dos valores preditos e obtidos experimentalmente.

Analito	NADES	Recuperação (%)		m_0 (pg)		SBR	
		Predito	Exp.	Predito	Exp.	Predito	Exp.
As	(Al-Gli-A)	88,74	111,44	17,10	20,07	1,48	1,65
	(CICo-Ac-A)	61,52	86,06	18,76	27,63	1,14	1,14
Cd	(Al-Gli-A)	80,02	73,00	4,36	4,55	4,74	7,55
	(CICo-Ac-A)	90,94	80,41	5,34	4,21	3,53	2,97
Pb	(Al-Gli-A)	83,86	77,24	-	17,61	2,92	2,23
	(CICo-Ac-A)	104,29	98,13	12,34	15,23	5,54	3,88

4.5. Estudos dos parâmetros de desempenho

Materiais de referência certificado de capim-marandu (E1001a, Embrapa, Brasil), folhas de tomate (1573a, Nist, EUA) e folhas de espinafre (1570a, Nist, EUA) foram utilizados para a avaliação da acurácia do método proposto. A seleção se deu pela disponibilidade do MRC que contém os elementos estudados. Como reportado na Tabela 12, todos os valores de recuperação obtidos nos preparos utilizando NADES (CICo-Ac-A) com os MRC utilizados estão de acordo com o preconizado pela agência regulamentadora brasileira ANVISA (80 a 120%) (ANVISA, 2017). Para NADES (Al-Gli-A), apenas houve exatidão adequada na determinação de Cd no MRC 1573a (folhas de tomate). Nesta etapa foram utilizadas as condições otimizadas sumarizadas na Tabela 11.

Tabela 12: Valores de concentração de As, Cd e Pb em material de referência certificado de capim-marandu (E1001a, Embrapa, Brasil), folhas de tomate (1573a, Nist, EUA) e folhas de espinafre (1570a, Nist, EUA), empregando o método proposto com NADES (Al-Gli-A) e NADES (CICo-Ac-A) e determinação por GFAAS.

	Valor de referência ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD (%)
As				
E1001a (Al-Gli-A)	19.90	10.37	52.09	6.32
E1001a (CICo-Ac-A)		23.35	117.33	2.92
Cd				
E1001a (Al-Gli-A)	19.90	14.27	71.71	1.36
E1001a (CICo-Ac-A)		17.96	90.25	2.37
1573a (Al-Gli-A)	1.52	1.22	80.73	1.39
1573a (CICo-Ac-A)		1.43	94.08	0.64
1570a (Al-Gli-A)		1.70	59.10	1.47
1570a (CICo-Ac-A)		2.76	95.89	2.00
Pb				
E1001a (Al-Gli-A)	4.00	2.81	70.29	0.19
E1001a (CICo-Ac-A)		3.65	91.16	0.95

Deve-se mencionar também que os comportamentos observados na etapa de otimização quanto a compatibilidade dos NADES aos os analitos estudados, exceto por As, podem ser visualizados nesta etapa de validação por MRC. Valores mais próximos de Pb e Cd são observados para o preparo de amostras utilizando NADES (CICo-Ac-A) quando comparado as que foram utilizados NADES (Al-Gli-A). A exceção vista em As pode ter se dado por i) efeito de matriz, visto que a otimização foi realizada em folhas de espinafre, enquanto o MRC aplicado foi capim-marandú ou ii) precisão da otimização, dado as complicações de análise de

As pelo método de correção de fundo (linha 193,7 nm muito próxima do limite da lâmpada de D2).

Cálculos para os parâmetros Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ) foram realizados por meio da medida de 10 análises do branco analítico, empregando-se o método analítico proposto. O LOD e LOQ, respectivamente, do método obtido para NADES (Al-Gli-A) foi de 0,2722 e 0,9075 mg kg⁻¹ para As, 0,0837 e 0,2789 mg kg⁻¹ para Cd e 0,1859 e 0,6198 mg kg⁻¹ para Pb. Para NADES (CICo-Ac-A) o LOD e LOQ respectivamente foram de 1,2308 e 4,1026 mg kg⁻¹ para As, 0,1914 e 0,6381 mg kg⁻¹ para Cd e 0,6135 e 2,045 mg kg⁻¹ para Pb. As curvas analíticas podem ser visualizadas no ANEXO 1.

4.6. Comparação das diferentes estratégias de preparo de amostras empregadas

Foram comparados diferentes métodos de preparo de amostras para ambos os NADES estudados: 1) assistido por vórtex (VAE); 2) assistido por vórtex com em Temperatura Elevada (VAE-T) e 3) assistido por ultrassom (UAE). Os procedimentos das estratégias de preparo de amostras estão descritos nas seções 3.2.3.2. e 3.2.3.3., respectivamente sendo realizados em duplicata para a determinação do elemento cádmio (condições instrumentais descritas na seção 3.4.) em amostras de material de certificado (proteína de peixe, DORM-4 e Folhas de Espinafre, 1570a)

Os resultados (Figura 22), indicam que o método de preparo de amostras por VAE tanto para os NADES (Al-Gli-A) como para os NADES (CICo-Ac-A), além de ser o método de preparo de amostras mais simples e econômico por não necessitar de um instrumento de ultrassom e ser realizado a temperatura ambiente, se mostrou também bem eficiente na transferência de massa dos analitos para a fase aquosa, como demonstra os valores de recuperação e desejabilidade que são significativamente maiores, quando comparado às outras formas de preparo de amostras.

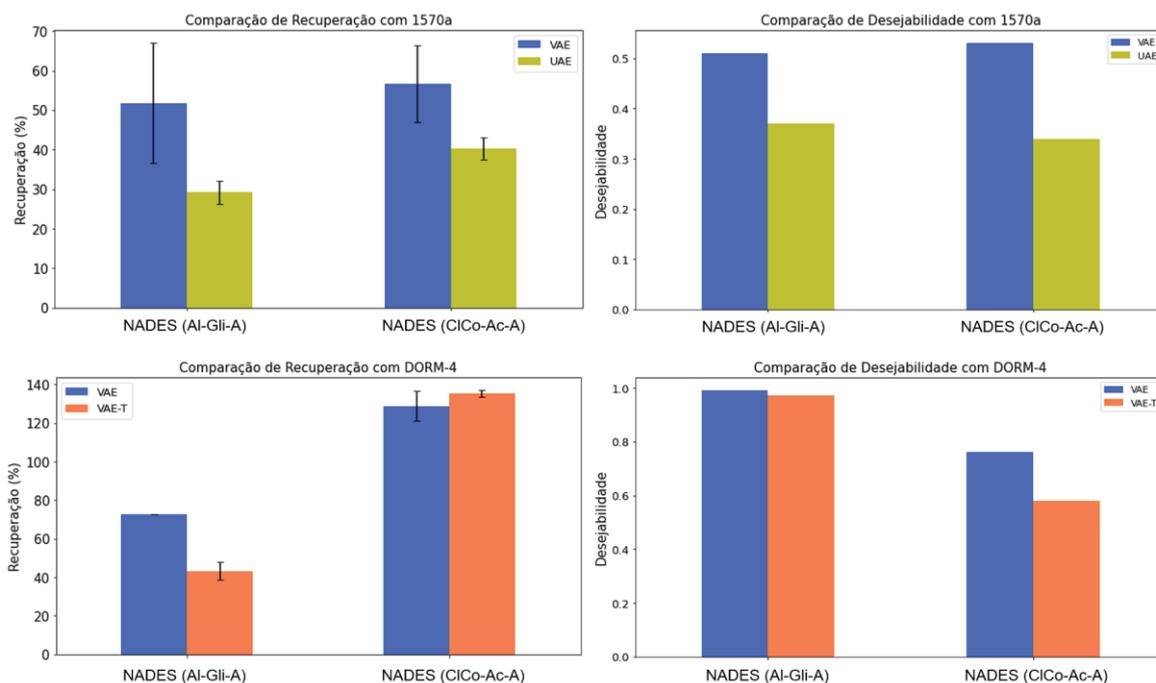
Quando se comparou a eficiência de extração para o Cd com ou sem em Temperatura Elevada (VAE-T e VAE) pode-se verificar que não apresentou diferença significativa aplicando-se o Teste F (nível de confiança 95%), exceto para a recuperação de Cd com NADES (Al-Gli-A) no material certificado DORM-4. Desta forma, pode-se constatar que o método de preparo de amostras proposto com

agitação por vórtex, (VAE) se mostrou bem adequado, não havendo a necessidade da elevação da temperatura e de ondas ultrassônicas para a extração dos analitos da matriz para a fase aquosa.

Os DES em geral, por conta das interações entre as espécies HBA e HBD, ou seja, por conta das interações de ligação de hidrogênio, apresentam capacidade de dissolver e solvatar compostos polares e fracamente polares como ingredientes farmacêuticos, óxidos metálicos, dióxido de carbono e espécies elementares inorgânicas. (SOROURADDIN, 2020, AHMADI-JOUIBARI, 2020, JAJIRANI, 2022). Contudo, esse poder extrator que é conferido aos NADES pode ser alterado conforme seu constituinte precursor, logo é de se esperar que o comportamento em relação a eficiência de extração seja diferente para NADES (Al-Gli-A) e NADES (CoCl-Ac) por apresentar constituintes tão distintos, como observado nesse estudo.

Além disso deve ser levado em consideração que, a elevação da temperatura dos DES acarreta na diminuição na interação de ligação de hidrogênio (JAJIRANI, 2022), como pode ser observado na diminuição da viscosidade da solução. Este enfraquecimento de interação geralmente acompanha uma diminuição da polaridade do solvente, tornando menos eficiente a extração de espécies polares, como os elementos metálicos. Este fenômeno explica o comportamento da extração de VAE ser superior quando comparado ao VAE-T de Cd em DORM-4 com NADES (Al-Gli-A).

Figura 22: Valores de Recuperação obtidos para o analito Cd, empregando-se diferentes métodos de preparo de amostras (VAE, VAE-T, UAE), utilizando os NADES (Al-Gli-A) e NADES (ClCo-Ac-A) em amostras certificadas de proteínas de peixe (DORM-4, Nist) e folhas de espinafre (1560a, Nist).



4.7. Avaliação do tubo de grafite

O aspecto visual do tubo de grafite foi avaliado durante as análises, e a sua aparência após sucessivas medidas analíticas (queimas) pode ser observada na Figura 23.

Figura 23: Forno -de grafite após sucessivas análises (queimas), aproximadamente 500 queimas) com NADES (Al-Gli-A), na proporção molar (mol)1:1:10.



Uma camada sólida e escura pode ser observada, proveniente do resultado das sucessivas análises das folhas de espinafre (*Spinacia Oleracea*) em meio de NADES (Al-Gli-A). Isto mostra uma carga significativa de matéria orgânica inserida no tubo, e certamente estratégias para remoção desse residual de carbono em sua maior parte, foram adotadas no intuito de se manter as condições robustas de análise e também a vida útil do tubo de grafite, reduzindo possíveis efeitos de memória.

Nesse contexto, estudos empregando H_2O_2 30% m v⁻¹ foram realizados, adicionando 20 μL a cada aproximadamente 50 análises dentro do programa de aquecimento padrão (*default*) do equipamento, o que se mostrou eficiente, pois não foi verificado comprometimento nos desvios padrões das análises e/ou na vida útil do tubo de grafite. Para os NADES (CICo-Ac-A), nenhuma camada de carga orgânica foi observada após as medidas analíticas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Os NADES na proporção molar (mol) 1:1:10 (componente 1: componente 2: água) apresentaram-se como uma solução incolor, homogênea e ausente de precipitados, características desejáveis para os extratores/solventes empregados no preparo de amostras. Os espectros FTIR indicaram a preservação dos reagentes precursores nos NADES sintetizados, incluindo no período mensal avaliado (cinco meses).

A agitação por vórtex a temperatura ambiente no preparo de amostras se mostrou muito eficiente, levando a resultados reproduzíveis e com baixos valores de RSD, além de ser uma estratégia de preparo de amostras simples e de baixo custo.

A análise conjunta dos parâmetros: recuperação, SBR e m_0 , foram fundamentais na avaliação das interferências espectrais e/ou não espectrais no sinal dos analitos no GFAAS, bem como as técnicas de calibração multivariada, tratamentos e modelagens estatísticas foram muito eficientes não só para nortear às otimizações realizadas, mas também foram úteis na elucidação da avaliação e comparação dos NADES estudados no preparo de amostras na determinação de As, Cd e Pb em tecido vegetal no que diz respeito aos parâmetros avaliados.

Destes resultados, foram observados efeitos de sinergia dos NADES estudados com o modificador químico $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, principalmente para NADES (CICo-Ac-A), aos quais atingiu recuperações dentro do valor desejado (na faixa de 95,25 a 95,89%) nas determinações de Cd e Pb em todos os MRC's utilizados neste estudo. Este fenômeno pode ser atribuído ao ácido cítrico em que já foi relatado na literatura sua capacidade de atuar como modificador químico em análises por GFAAS na determinação de elementos como Pb (ACAR, LIMA, 2020), por exemplo.

Para o elemento As, limitações do equipamento GFAAS quando ao método de corretor de fundo dificultou os estudos realizados com o elemento. Todavia recuperações dentro da faixa aceita por agências regulamentadoras foram atingidas (117,33 %) quando utilizado NADES (CICo-Ac-A) no preparo de amostras (ANVISA, 2017).

Desta forma, abre-se um leque de possibilidades no sentido de ressignificar esta classe de modificadores químicos, já bem consolidados na literatura, colocando os NADES que atuam não só na extração do analito, mas também como eficientes modificadores para os analitos nas determinações por GFAAS.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. et al. Heavy metal removal from aqueous solution by advanced carbon nanotubes: critical review of adsorption applications. **Separation and Purification Technology**, v. 157, p. 141-161, 2016. ISSN 1383-5866.

ABBOTT, A. P. et al. Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 29, p. 9142-9147, 2004. ISSN 0002-7863.

ABBOTT, A. P. et al. Solubility of metal oxides in deep eutectic solvents based on choline chloride. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 51, n. 4, p. 1280-1282, 2006. ISSN 0021-9568.

ABO-HAMAD, A. et al. Potential applications of deep eutectic solvents in nanotechnology. **Chemical Engineering Journal**, v. 273, p. 551-567, 2015. ISSN 1385-8947.

ACAR, Orhan et al. Cadmium, lead, copper and manganese determination in human deciduous teeth by electrothermal atomic absorption spectrometry using a lanthanum, palladium and citric acid mixture as chemical modifier. **International Journal of Environmental and Analytical Chemistry**, v. 88, n. 12, p. 869-878, 2008.

AHMADI-JOUIBARI, Toraj; NOORI, Negar; FATTAHI, Nazir. Assessment of toxic metal ions in tea samples using new microextraction technique based on the solidified deep eutectic solvent followed by GFAAS. **Toxin Reviews**, v. 40, n. 4, p. 1084-1093, 2021.

AKRAMIPOUR, Reza et al. Speciation of organic/inorganic mercury and total mercury in blood samples using vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on the freezing of deep eutectic solvent followed by GFAAS. **Talanta**, v. 186, p. 17-23, 2018.

ALMEIDA, Tarcísio S. et al. Direct analysis of particulate matter (PM10) for the determination of Be, Cd and Pb using high resolution-continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry: Assessment of the potential correlation between analyte content and meteorological parameters. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 172, p. 105951, 2020.

ALTUNAY, N.; ELIK, A.; GÜRKAN, R. Natural deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted-microextraction for extraction, pre-concentration and analysis of methylmercury and total mercury in fish and environmental waters by spectrophotometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 36, n. 7, p. 1079-1097, 2019. ISSN 1944-0049.

ALTUNAY, Nail; ELIK, Adil; BINGÖL, Deniz. Simple and Green Heat-Induced Deep Eutectic Solvent Microextraction for Determination of Lead and Cadmium in Vegetable Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry: a Multivariate Study. **Biological trace element research**, p. 1-8, 2020.

ANASTAS, Paul; EGHBALI, Nicolas. Green chemistry: principles and practice. *Chemical Society Reviews*, v. 39, n. 1, p. 301-312, 2010.

ANVISA. **Resolução de diretoria colegiada - RDC N° 487**, de 26 de março de 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-487-de-26-de-marco-de-2021-311593455>. Acesso em: 04 de novembro, 2021

AROSO, I. M. et al. Natural deep eutectic solvents from choline chloride and betaine—Physicochemical properties. *Journal of Molecular Liquids*, v. 241, p. 654-661, 2017. ISSN 0167-7322.

AZCARATE, Silvana M. et al. NADES-modified voltammetric sensors and information fusion for detection of honey heat alteration. *Food Control*, p. 109144, 2022.

BAFGHI, Mohammad Reza Fattahi et al. A new approach towards simultaneous extraction of individual analytes based on the simultaneous application of multiple magnetic sorbents. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 35, n. 12, p. 2974-2981, 2020.

BARTH, Andreas. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007.

BENVENUTTI, Laís; ZIELINSKI, Acácio Antonio Ferreira; FERREIRA, Sandra Regina Salvador. Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES?. *Trends in Food Science & Technology*, v. 90, p. 133-146, 2019.

BEHBAHANI, Mohammad et al. Application of solvent-assisted dispersive solid phase extraction as a new, fast, simple and reliable preconcentration and trace detection of lead and cadmium ions in fruit and water samples. *Food chemistry*, v. 187, p. 82-88, 2015.

BIGLARI, M.; SHIRINI, F.; MAHMOODI, N. O.; ZABIHZADEH, M. A choline chloride-based deep eutectic solvent promoted three- component synthesis of tetrahydrobenzo [b] pyran and pyrano [2 , 3-d] pyrimidinone (thione) derivatives. *Journal of Molecular Structure*, v. 1205, p. 127652, 2020. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127652>>.

BOSILJKOV, T. et al. Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioproducts Processing*, v. 102, p. 195-203, 2017. ISSN 0960-3085.

BRANDÃO, Geisamanda Pedrini et al. Direct determination of nickel in petroleum by solid sampling—graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 386, n. 7, p. 2249-2253, 2006.

BUSTOS, Daniel E. et al. Use of slow atomization ramp in high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of Cd and Ni in slurry powdered chocolate samples. *Talanta*, p. 123547, 2022.

BUTCHER, David J. Innovations and developments in graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). **Applied Spectroscopy Reviews**, p. 1-18, 2021.

BUTCHER, David J. Recent highlights in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 52, n. 9, p. 755-773, 2017.

BYRNE, John P. et al. Chemical modification by ascorbic acid and oxalic acid in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 9, p. 1267-1272, 1993.

BYRNE, John P. et al. Mechanisms of chloride interferences in atomic absorption spectrometry using a graphite furnace atomizer investigated by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. Part 2. Effect of sodium chloride matrix and ascorbic acid chemical modifier on manganese. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 8, n. 4, p. 599-609, 1993.

CARIATI, Larissa SS; BUORO, Rafael M. Evaluation of ionic natural deep eutectic solvents (NADES) modified binders towards the chemical properties of carbon paste electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 109, p. 106605, 2019.

CHANDRAN, D. et al. Deep eutectic solvents for extraction-desulphurization: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 275, p. 312-322, 2019. ISSN 0167-7322.

CHERIGUI, E. A. M. et al. On the control and effect of water content during the electrodeposition of Ni nanostructures from deep eutectic solvents. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 122, n. 40, p. 23129-23142, 2018. ISSN 1932-7447.

COMMISSION, C. A. Working document for information and use in discussions related to contaminants and toxins in the GSCTFF. **CODEX: Rome**, Italy, 2011.

CROUCH, S. R.; HOLLER, F. J. Fundamentos de química analítica. **Pioneira Thomson Learning**, 2006. ISBN 9788522104369.

CUADROSRODRÍGUEZ, Luis; JIMÉNEZCARVELO, Ana M.; FERNÁNDEZ-RAMOS, M. D. Multivariate thinking for optical microfluidic analytical devices—A tutorial review. **Microchemical Journal**, p. 105959, 2021.

DA SILVA, D. T. et al. Natural deep eutectic solvents as a biocompatible tool for the extraction of blueberry anthocyanins. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 103470, 2020. ISSN 0889-1575.

DAI, Y. et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 61-68, 2013. ISSN 0003-2670.

DE MATTOS, Julio Cezar Paz et al. Influence of citric acid as chemical modifier for lead determination in dietary calcium supplement samples by graphite

furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 60, n. 5, p. 687-692, 2005.

DE LA CALLE-GUNTINAS, M. B. et al. A study of hydride forming elements in the determination of As by hydride generation atomic absorption spectrometry and minimization of Sb and Se interference by α -hydroxyacids and KI. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 47, n. 10, p. 1165-1172, 1992.

DWAMENA, A. K. Recent advances in hydrophobic deep eutectic solvents for extraction. **Separations**, v. 6, n. 1, p. 9, 2019.

EL ACHKAR, Tracy; GREIGE-GERGES, Hélène; FOURMENTIN, Sophie. Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. **Environmental Chemistry Letters**, p. 1-12, 2021.

ELIK, A.; DEMIRBAS, A.; ALTUNAY, N. Developing a new and simple natural deep eutectic solvent based ultrasonic-assisted microextraction procedure for determination and preconcentration of As and Se from rice samples. **Analytical Methods**, v. 11, n. 27, p. 3429-3438, 2019.

FIERRO, Pedro; NYER, Evan K. The Water Encyclopedia: Hydrologie Data and Internet Resources. **CRC press**, 2007.

FILATOVA, D. G. et al. Present-day possibilities of high-resolution continuous-source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of analytical chemistry**, v. 75, n. 5, p. 563-568, 2020.

GE, L. et al. Solubility of luteolin in several imidazole-based ionic liquids and extraction from peanut shells using selected ionic liquid as solvent. **Separation and Purification Technology**, v. 135, p. 223-228, 2014. ISSN 1383-5866.

GE, Xiang et al. Deep eutectic solvents (DESs)-derived advanced functional materials for energy and environmental applications: challenges, opportunities, and future vision. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 5, n. 18, p. 8209-8229, 2017.

GHILANE, J. et al. Electrochemical oxidation of primary amine in ionic liquid media: Formation of organic layer attached to electrode surface. **Electrochemistry communications**, v. 12, n. 2, p. 246-249, 2010. ISSN 1388-2481.

GOMEZ, F. J. V. et al. A Greener Approach to Prepare Natural Deep Eutectic Solvents. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 22, p. 6122-6125, 2018. ISSN 2365-6549.

GOMEZ, Federico José Vicente et al. Enhanced electrochemical detection of quercetin by natural deep eutectic solvents. **Analytica Chimica Acta**, v. 936, p. 91-96, 2016.

GONG, Z. et al. Arsenic speciation analysis. **Talanta**, v. 58, n. 1, p. 77-96, 2002. ISSN 0039-9140.

GONZALEZ, M. H. et al. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. **Talanta**, v. 79, n. 2, p. 396-401, 2009. ISSN 0039-9140.

GORDON, C. M. New developments in catalysis using ionic liquids. **Applied Catalysis A: General**, v. 222, n. 1, p. 101-117, 2001. ISSN 0926-860X.

GUTIÉRREZ, M. C. et al. Freeze-Drying of Aqueous Solutions of Deep Eutectic Solvents: A Suitable Approach to Deep Eutectic Suspensions of Self-Assembled Structures. **Langmuir**, v. 25, n. 10, p. 5509-5515, 2009. ISSN 0743-7463.

HABIBOLLAHI, Mohammad Hossein et al. Extraction and determination of heavy metals in soil and vegetables irrigated with treated municipal wastewater using new mode of dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidified deep eutectic solvent followed by GFAAS. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 2, p. 656-665, 2019.

HUSÁKOVÁ, Lenka et al. Palladium–citric acid–ammonium fluoride as a matrix modifier for overcoming of interferences occurring during the direct determination of Sn in aqua regia extracts from environmental samples by D2-ETAAS. **Talanta**, v. 77, n. 4, p. 1504-1509, 2009.

HUANG, Q. et al. Improved catalytic lifetime of H₂SO₄ for isobutane alkylation with trace amount of ionic liquids buffer. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 5, p. 1464-1469, 2015. ISSN 0888-5885.

IEGGLI, C. V. S. et al. Determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc and iron in emulsified chocolate samples by flame atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1189-1193, 2011.

IKEDA, Masayuki et al. Cadmium exposure in general populations in Japan: a review. **Food Safety**, v. 3, n. 4, p. 118-135, 2015.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**. 2020. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeracao=00774&num_documento=008>; acessado em novembro de 2021

JACKSON, Michael; MANTSCH, Henry H. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 30, n. 2, p. 95-120, 1995.

JAGIRANI, Muhammad Saqaf; SOYLAK, Mustafa. Deep eutectic solvents-based adsorbents in environmental analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 116762, 2022.

JIANG, Wei et al. Mechanism and optimization for oxidative desulfurization of fuels catalyzed by Fenton-like catalysts in hydrophobic ionic liquid. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 382, p. 8-14, 2014.

KALHOR, Payam; GHANDI, Khashayar. Deep eutectic solvents for pretreatment, extraction, and catalysis of biomass and food waste. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4012, 2019.

KALIA, K. et al. Effects of Extraction Methods on Phenolic Contents and Antioxidant Activity in Aerial Parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and Quantification of Its Phenolic Constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10129-10134, 2008. ISSN 0021-8561.

KARAFFA, L. S. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. **RSC Publishing**, 2013. ISBN 1849736707.

KERTON, F. M.; MARRIOTT, R. Alternative solvents for green chemistry. **Royal Society of chemistry**, 2013. ISBN 1849735956.

KIM, Jihyun et al. Prenatal Exposure to Lead and Chromium is Associated with IL-13 Levels in Umbilical Cord Blood and Severity of Atopic Dermatitis: COCOA Study. **Immune network**, v. 19, n. 6, 2019.

KRIEGEROVÁ, Katarína et al. Determination of lead in human placenta tissue employing slurry sampling and detection by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**, v. 12, n. 34, p. 4235-4244, 2020.

KRUG, F. J. Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. **F. J. Krug**, 2008. ISBN 9788590810506.

KUMAR, Adep K.; PARIKH, Bhumika S.; PRAVAKAR, Mohanty. Natural deep eutectic solvent mediated pretreatment of rice straw: bioanalytical characterization of lignin extract and enzymatic hydrolysis of pretreated biomass residue. **Environmental science and pollution research**, v. 23, n. 10, p. 9265-9275, 2016.

LIAO, Meichao et al. A greener and sustainable route for medicinal plant analysis: Recycle utilization of hydrophobic deep eutectic solvent. **Microchemical Journal**, v. 178, p. 107372, 2022.

LIMA, Ariana MS; ARAÚJO, Dominique GGR; FERREIRA, Sérgio LC. Use of tartaric acid–citric acid–sucrose as chemical modifier for the determination of lead in several matrices employing ET AAS. **Microchemical journal**, v. 126, p. 368-372, 2016.

LIU, W. et al. A highly efficient vortex-assisted liquid–liquid microextraction based on natural deep eutectic solvent for the determination of Sudan I in food samples. **RSC advances**, v. 9, n. 30, p. 17432-17439, 2019.

LIU, Y. et al. Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. **Journal of natural products**, v. 81, n. 3, p. 679-690, 2018. ISSN 0163-3864.

LUO, Y. et al. Investigation on feasibility of ionic liquids used in solar liquid desiccant air conditioning system. **Solar Energy**, v. 86, n. 9, p. 2718-2724, 2012. ISSN 0038-092X.

MA, Xiaoguo; ZHANG, Zhanxia. Wavelet smoothing applied to the determination of trace arsenic, lead, antimony and selenium in environmental water by ICP-OES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, n. 6, p. 738-742, 2004.

MACCHIONI, Valentina et al. Lactic acid-based deep natural eutectic solvents for the extraction of bioactive metabolites of *Humulus lupulus* L.: Supramolecular organization, phytochemical profiling and biological activity. **Separation and Purification Technology**, v. 264, p. 118039, 2021.

MACHADO, Raquel C. et al. Solid sampling: advantages and challenges for chemical element determination—a critical review. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 35, n. 1, p. 54-77, 2020.

MANFRO, Iuri Dias et al. Determination of lithium in dried blood spots and dried plasma spots by graphite furnace atomic absorption spectrometry: Method development, validation and clinical application. **Talanta**, v. 216, p. 120907, 2020.

MARATTA MARTÍNEZ, Sergio Ariel et al. Photocatalytic preconcentration of Bi on TiO₂ nanoparticles. **Acta, Part B: Atom. Spectrosc.** 2020.

MARTINS, Mônia AR; PINHO, Simão P.; COUTINHO, João AP. Insights into the nature of eutectic and deep eutectic mixtures. **Journal of Solution Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 962-982, 2019.

MEETING, J. F. W. E. C. O. F. A.; ORGANIZATION, W. H. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants: Seventy-third Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **World Health Organization**, 2011. ISBN 9241209607.

MENEZES, Iohanna MN Ribeiro et al. Simple and Robust GFAAS Methods for Determination of As, Cd, and Pb in Hemp Products Using Different Sample Preparation Strategies. **Food Analytical Methods**, p. 1-11.

MICHELSEN-CORREA, Stephani; MARTIN, Clyde F.; KIRK, Andrea B. Evaluation of Fetal Exposures to Metals and Metalloids through Meconium Analyses: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 4, p. 1975, 2021.

MINAMISAWA, H. et al. Preconcentration and determination of cadmium by GFAAS after solid-phase extraction with synthetic zeolite. **Analytical sciences**, v. 22, n. 5, p. 709-713, 2006. ISSN 0910-6340.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/DIRETORIA COLEGIADA (BRASIL). Resolução RDC nº 166, de 24 de julho. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 25 jul. 2017. Seção 1, p. 87.

MOREIRA, Luana S. et al. Enhanced extraction of arsenic and cadmium from environmental samples using a natural deep eutectic solvent and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, p. 1-12, 2020.

NASCIMENTO, P. A. et al. Simple GFAAS Method for Determination of Pb, As, and Cd in Cannabidiol Extracts Used for Therapeutic Purposes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2020.

NI, Rui et al. Magnetic carbon nanotube modified with polymeric deep eutectic solvent for the solid phase extraction of bovine serum albumin. *Talanta*, v. 206, p. 120215, 2020.

NIAN, B.; CAO, C.; LIU, Y. How *Candida antarctica* lipase B can be activated in natural deep eutectic solvents: experimental and molecular dynamics studies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 95, n. 1, p. 86-93, 2019. ISSN 0268-2575 1097-4660.

NIAN, B.; CAO, C.; LIU, Y. Synergistic Catalytic Synthesis of Gemini Lipoamino Acids Based on Multiple Hydrogen-Bonding Interactions in Natural Deep Eutectic Solvents-Enzyme System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 68, n. 4, p. 989-997, 2020. ISSN 0021-8561.

NÓBREGA, J. A. et al. Sample preparation in alkaline media. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 61, n. 5, p. 465-495, 2006. ISSN 0584-8547.

NOGUEIRA, R. et al. Arsenic Speciation in Fish and Rice by HPLC-ICP-MS Using Salt Gradient Elution. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 29, n. 8, p. 1593-1600, 2018. ISSN 0103-5053.

NOMURA, C. S.; SILVA, C. S. D.; OLIVEIRA, P. V. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão. *Química Nova*, v. 31, n. 1, p. 104-113, 2008. ISSN 0100-4042.

OBADIA, I. ILO activities in the area of chemical safety. *Toxicology*, v. 190, n. 1-2, p. 105-115, 2003. ISSN 0300-483X.

OLIVEIRA, E. D. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 14, n. 2, p. 174-182, 2003. ISSN 0103-5053.

ORESTE, E. Q. et al. Evaluation of sample preparation methods for the determination of Cd, Cr and Pb in ceramic tableware by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Analytical Letters*, v. 53, n. 3, p. 436-458, 2020. ISSN 0003-2719.

ORESTE, E. Q. et al. Sample preparation methods for determination of Cd, Pb and Sn in meat samples by GFAAS: use of acid digestion associated with a cold finger apparatus versus solubilization methods. *Analytical Methods*, v. 5, n. 6, p. 1590-1595, 2013.

OSOWSKA, N.; RUZIK, L. New Potentials in the Extraction of Trace Metal Using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES). **Food Analytical Methods**, v. 12, n. 4, p. 926-935, 2019. ISSN 1936-9751.

PAIVA, A. et al. Natural deep eutectic solvents—solvents for the 21st century. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 5, p. 1063-1071, 2014. ISSN 2168-0485.

PANIĆ, M. et al. Green asymmetric reduction of acetophenone derivatives: *Saccharomyces cerevisiae* and aqueous natural deep eutectic solvent. **Biotechnology letters**, v. 41, n. 2, p. 253-262, 2019. ISSN 0141-5492.

PANIĆ, Manuela et al. Natural deep eutectic solvent as a unique solvent for valorisation of orange peel waste by the integrated biorefinery approach. **Waste Management**, v. 120, p. 340-350, 2021.

PĂUCEAN, A. et al. Monitoring lactic acid concentrations by infrared spectroscopy: A new developed method for *Lactobacillus* fermenting media with potential food applications. **Acta alimentaria**, v. 46, n. 4, p. 420-427, 2017.

PERCEVAULT, Lucie et al. Electrochemical determination and antioxidant capacity modulation of polyphenols in deep eutectic solvents. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9, n. 2, p. 776-784, 2020.

PEREIRA, Joana et al. Selective terpene based therapeutic deep eutectic systems against colorectal cancer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 175, p. 13-26, 2022.

PERIC, B. et al. (Eco)toxicity and biodegradability of selected protic and aprotic ionic liquids. **Journal of Hazardous Materials**, v. 261, p. 99-105, 2013. ISSN 0304-3894.

PIRSAHEB, Meghdad; FATTAHI, Nazir. Development of a liquid-phase microextraction based on the freezing of a deep eutectic solvent followed by HPLC-UV for sensitive determination of common pesticides in environmental water samples. **RSC advances**, v. 8, n. 21, p. 11412-11418, 2018.

POLEZER, Gabriela et al. Atomic absorption spectrometry methods to access the metal solubility of aerosols in artificial lung fluid. **Applied Spectroscopy**, v. 74, n. 8, p. 932-939, 2020.

RAHMAN, A.; KUMARATHASAN, P.; GOMES, J. Infant and mother related outcomes from exposure to metals with endocrine disrupting properties during pregnancy. **Science of the Total Environment**, v. 569, p. 1022-1031, 2016.

RAHMAN, Md Sajjadur et al. Formulation, structure, and applications of therapeutic and amino acid-based deep eutectic solvents: An overview. **Journal of Molecular Liquids**, v. 321, p. 114745, 2021.

RAI, Prabhat Kumar et al. Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. **Environment international**, v. 125, p. 365-385, 2019.

REN, Hongwei et al. Nitrogen-rich carbon quantum dots (N-CQDs) based on natural deep eutectic solvents: Simultaneous detection and treatment of trace Co²⁺ under saline conditions. **Science of The Total Environment**, v. 811, p. 152389, 2022.

RODRIGUES, Luiz F. et al. Feasibility of DS-GF AAS for the determination of metallic impurities in raw material for polymers production. **Talanta**, v. 218, p. 121129, 2020.

RUTKOWSKA, M.; NAMIEŚNIK, J.; KONIECZKA, P. Chapter 10 - Ultrasound-Assisted Extraction. In: PENA-PEREIRA, F. e TOBISZEWSKI, M. (Ed.). *The Application of Green Solvents in Separation Processes*: Elsevier, 2017. p.301-324. ISBN 978-0-12-805297-6.

SANTANA, A. P. et al. Natural deep eutectic solvents for sample preparation prior to elemental analysis by plasma-based techniques. **Talanta**, v. 199, p. 361-369, 2019. ISSN 0039-9140.

SANTANA, A. P. et al. Synthesis of natural deep eutectic solvents using a mixture design for extraction of animal and plant samples prior to ICP-MS analysis. **Talanta**, p. 120956, 2020. ISSN 0039-9140.

SANTANA, A. P. R. et al. Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, p. 111452, 2019. ISSN 01677322.

SANTANA-MAYOR, Álvaro et al. Deep eutectic solvents. The new generation of green solvents in analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 116108, 2020.

SAKTI, Aditya Sindu; SAPUTRI, Fadlina Chany; MUN'IM, Abdul. Optimization of choline chloride-glycerol based natural deep eutectic solvent for extraction bioactive substances from *Cinnamomum burmannii* barks and *Caesalpinia sappan* heartwoods. **Heliyon**, v. 5, n. 12, p. e02915, 2019.

SETIAWAN, Heri et al. Application of Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) for Sappan Wood (*Caesalpinia sappan* L.) extraction to test for inhibition of DPP IV activity. **J. Res. Pharm**, v. 24, p. 380-388, 2020.

SHISHOV, Andrey; GERASIMOV, Artur; BULATOV, Andrey. Deep eutectic solvents based on carboxylic acids for metals separation from plant samples: Elemental analysis by ICP-OES. **Food Chemistry**, v. 366, p. 130634, 2022.

SKOOG, D. A. et al. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. **Cengage Learning**, 2013. ISBN 9781285607191.

SMITH, C.; LIVINGSTON, S.; DOOLITTLE, D. An international literature survey of "IARC Group I carcinogens" reported in mainstream cigarette smoke. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 10-11, p. 1107-1130, 1997. ISSN 0278-6915.

SCHREITER, Norbert et al. Determination of germanium in plant and soil samples using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry (HR CS GFAAS) with solid sampling. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 220, p. 106674, 2021.

SHALTOUT, Abdallah A.; BOUSLIMI, Jamel; BESBES, Hatem. The challenges of Se quantification in bean samples using line and continuum sources atomic absorption spectrometry. **Food chemistry**, v. 328, p. 127124, 2020.

SOROURADDIN, Saeed Mohammad; FARAJZADEH, Mir Ali; OKHRAVI, Tohid. Development of dispersive liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent using as complexing agent and extraction solvent: application for extraction of heavy metals. **Separation Science and Technology**, v. 55, n. 16, p. 2955-2966, 2020.

SYED, Usman T. et al. On the role of components of therapeutic hydrophobic deep eutectic solvent-based nanoemulsions sustainably produced by membrane-assisted nanoemulsification for enhanced antimicrobial activity. **Separation and Purification Technology**, v. 285, p. 120319, 2022.

THOMAS, Fabian; KAYSER, Oliver. Natural deep eutectic solvents enhance cannabinoid biotransformation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 180, p. 108380, 2022.

THUY PHAM, T. P.; CHO, C.-W.; YUN, Y.-S. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: **A review**. **Water Research**, v. 44, n. 2, p. 352-372, 2010. ISSN 0043-1354.

TUNDO, P. et al. Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview. **Pure and applied Chemistry**, v. 72, n. 7, p. 1207-1228, 2000. ISSN 1365-3075.

VALASQUES, G. S. et al. Multivariate optimization for the determination of cadmium and lead in crude palm oil by graphite furnace atomic absorption spectrometry after extraction induced by emulsion breaking. **Microchemical Journal**, v. 153, p. 104401, 2020. ISSN 0026-265X.

VAN BEIK, J. et al. Alkaline solubilization and ultrasound assisted extraction for Cr and Pb determination in leather by atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**, v. 9, n. 22, p. 3284-3289, 2017.

VAN OSCH, Dannie JGP et al. Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. **Green Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 4518-4521, 2015.

VARDHAN, K. H.; KUMAR, P. S.; PANDA, R. C. A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. **Journal of Molecular Liquids**, p. 111197, 2019. ISSN 0167-7322.

WANG, Kaiyuan; LAM, Frank. Quadratic RSM models of processing parameters for three-layer oriented flakeboards. **Wood and fiber science**, v. 31, n. 2, p. 173-186, 1999.

WANG, Y.; PENG, B.; ZHAO, J.; WANG, M.; ZHAO, L. Efficient extraction and determination of prenylflavonol glycosides in *Epimedium pubescens* Maxim. using deep eutectic solvents. **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 3, p. 375–383, 2020.

WEI, Xiaoxiao et al. Poly (deep eutectic solvent)-functionalized magnetic metal-organic framework composites coupled with solid-phase extraction for the selective separation of cationic dyes. **Analytica Chimica Acta**, v. 1056, p. 47-61, 2019.

WELZ, Bernhard et al. High-resolution continuum source AAS: The better way to do atomic absorption spectrometry. **John Wiley & Sons**, 2005.

WELZ, B.; SPERLING, M. Atomic absorption spectrometry. **John Wiley & Sons**, 2008. ISBN 3527611681.

XIONG, Zhili et al. Ultrasound-assisted deep eutectic solvent as green and efficient media for the extraction of flavonoids from *Radix scutellariae*. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 644-650, 2019.

YAO, Li et al. Optimization of ultrasound-assisted magnetic retrieval-linked ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of cadmium and lead in water samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of industrial and engineering chemistry**, v. 56, p. 321-326, 2017.

YOUNG, Jamie L.; CAI, Lu. Implications for prenatal cadmium exposure and adverse health outcomes in adulthood. **Toxicology and Applied Pharmacology**, p. 115161, 2020.

ZHANG, W.-H. et al. Choline chloride and lactic acid: A natural deep eutectic solvent for one-pot rapid construction of spiro[indoline-3,4'-pyrazolo[3,4-b]pyridines]. **Journal of Molecular Liquids**, v. 278, p. 124-129, 2019. ISSN 01677322.

ZHANG, Rui et al. Simultaneous determination of lead and copper in *Polygonatum kingianum* by ICP OES combined with natural deep eutectic solvent-based magnetic dispersive micro solid phase extraction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 37, n. 8, p. 1730-1737, 2022.

ANEXO 1.

Curvas de Calibração com NADES

Figura 24: Curva de calibração de As, Cd e Pb utilizando NADES (Al-Gli-A) e NADES (ClCo-Ac-A) com a diluição utilizada no preparo de amostra otimizado (1:10, NADES:solução HNO₃ 1%).

