



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

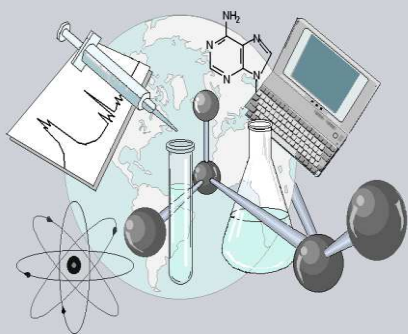
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Análise direta de óleos vegetais brutos e refinados na forma de microemulsões para a determinação de ferro por espectrometria de absorção atômica em chama”

Dissertação apresentada por **Marília Bellanda Galuch** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, FEVEREIRO/2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Análise direta de óleos vegetais brutos e refinados na forma de microemulsões para a determinação de ferro por espectrometria de absorção atômica em chama”

Dissertação apresentada por **Marília Bellanda Galuch** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Egea Garcia



MARINGÁ, FEVEREIRO/2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR, Brasil)

G181a Galuch, Marília Bellanda
Análise direta de óleos vegetais brutos e refinados na forma de microemulsões para a determinação de ferro por espectrometria de absorção atômica / Marília Bellanda Galuch. -- Maringá, 2016. 55 f.: il. col. figs. tabs.

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Egea Garcia.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós Graduação em Química, 2016.

1. Microemulsão (óleo vegetal). 2. Óleos vegetais. 3. Ferro. 4. Espectrometria de absorção atômica (F AAS). I. Garcia, Edivaldo Egea, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós Graduação em Química. III. Título.

CDD 23.ed. 543.5

MRP-003518



Universidade Estadual de Maringá

Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Marília Bellanda Galuch**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 29 de fevereiro de 2016.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Edivaldo Egea Garcia
Presidente - DQI/UEM

Profa. Dra. Juliana Carla Garcia Moraes
Membro - DQI/UEM

Prof. Dr. Johny Paulo Monteiro
Membro - UTFPR

DEDICATÓRIA

À minha família

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Edivaldo Egea Garcia, pela orientação, competência, sabedoria, amizade, disponibilidade e ensinamentos com que conduziu a realização deste trabalho;

Ao meu marido, pais e irmã, que, cada um a seu modo, apoiaram-me incondicionalmente;

Aos professores doutores Juliana Carla Garcia Moraes e Vítor de Cinque Almeida, pelas contribuições por ocasião do exame de qualificação;

Aos professores doutores Johny Paulo Monteiro, Juliana Carla Garcia Moraes, Elton Guntendorfer Bonafe e Willian Ferreira da Costa, por aceitarem avaliar o texto final do meu trabalho de mestrado;

A todos os professores do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, pelos conhecimentos transmitidos, fundamentais para a minha formação;

Aos meus amigos e parceiros de pesquisa, Angelica de Fátima Bortolato Piccioli, Eduardo Sobieski Neto e Nayara Cristine Saldan, pela amizade e participação durante a realização deste trabalho;

À Natália Fier, por sempre estar presente nos momentos em que solicitei apoio operacional;

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Química, Claudemir e Cristina, pela prestatividade em todos os momentos;

À Capes, pelo apoio financeiro;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE FIGURAS..... | 7 |
| LISTA DE TABELAS..... | 8 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 9 |
| RESUMO | 10 |
| ABSTRACT..... | 11 |
| 1. Introdução..... | 12 |
| 1.1. Óleos vegetais | 12 |
| 1.1.1. Óleo de soja..... | 12 |
| 1.1.2. Óleo de canola..... | 13 |
| 1.1.3. Óleo de girassol | 13 |
| 1.1.4. Óleo de milho | 13 |
| 1.1.5. Óleo de algodão | 13 |
| 1.1.6. Azeite de oliva | 14 |
| 1.2. Processo de refinamento de óleos vegetais | 14 |
| 1.3. Presença de íons metálicos em óleos vegetais | 15 |
| 1.4. Determinação de Fe em amostras de óleos vegetais | 17 |
| 1.5. Microemulsões..... | 24 |
| 1.6. Espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS) | 26 |
| 2. Objetivos | 27 |
| 2.1. Objetivo geral..... | 27 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 27 |
| 3. Parte Experimental..... | 28 |
| 3.1. Reagentes, soluções e amostras | 28 |
| 3.2. Instrumentação e condições de operação | 28 |
| 3.3. Preparação das microemulsões | 29 |
| 3.4. Avaliação da estabilidade química das microemulsões | 30 |
| 3.5. Avaliação do procedimento de calibração para a determinação de Fe nas microemulsões por F AAS | 30 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.6. | Validação do procedimento analítico proposto..... | 31 |
| 3.7. | Tratamento estatístico dos resultados..... | 32 |
| 4. | Resultados e discussão..... | 33 |
| 4.1. | Preparação das microemulsões | 33 |
| 4.2. | Avaliação da estabilidade química das microemulsões | 35 |
| 4.3. | Otimização do procedimento de calibração | 37 |
| 4.3.1. | Avaliação da estabilidade do sinal analítico para as microemulsões de óleo mineral leve..... | 38 |
| 4.3.2. | Avaliação do efeito dos diferentes meios de calibração para a obtenção da curva analítica | 40 |
| 4.4. | Validação do método analítico..... | 44 |
| 4.4.1. | Determinação dos Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) | 44 |
| 4.4.2. | Experimentos de adição e recuperação (exatidão)..... | 45 |
| 4.5. | Determinação de Fe em amostras de óleos vegetais na forma de microemulsões por F AAS | 47 |
| 5. | Conclusões..... | 49 |
| 6. | Referências..... | 51 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Etapas do mecanismo da auto-oxidação de ácidos graxos e acilgliceróis. Em que: RH: acilgliceróis; RO●: radical alcóxi; ROOH: hidroperóxidos; ROO●: radical peróxido. Fonte: Choe e Min (2006). 16
- Figura 2. Estruturas de microemulsões: a) microemulsão do tipo O/A; b) microemulsão bicontínua; c) microemulsão do tipo A/O; em que a cor cinza representa a fase oleosa, e a cor branca representa a fase aquosa. Fonte: Damasceno et al. (2011). 25
- Figura 3. Aspecto visual do óleo vegetal puro e óleo vegetal sob as formas de emulsão e micromulção, em que A) óleo bruto de milho; B) emulsão de óleo bruto de milho; C) microemulsão de óleo bruto de milho. 34

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Técnicas analíticas e procedimentos de preparo de amostras empregados para a determinação de Fe em amostras de óleos vegetais. | 21 |
| Tabela 2. Condições instrumentais empregadas na análise direta de amostras de óleos vegetais na forma de microemulsões para a determinação de Fe por F AAS. | 29 |
| Tabela 3. Quantidades de reagentes utilizados para o preparo de microemulsões OM e OM+, e soluções BA e PA..... | 31 |
| Tabela 4. Experimentos realizados para a otimização das quantidades dos reagentes necessários para o preparo de microemulsões das amostras de óleos vegetais. | 34 |
| Tabela 5. Estabilidade do sinal analítico para adições de 0,500 mg L ⁻¹ e 1,00 mg L ⁻¹ de Fe em microemulsões de óleos vegetais brutos e refinados. | 36 |
| Tabela 6. Intensidades de absorvância obtidos por F AAS para as microemulsões OM e OM+ adicionadas de 0,500 mg L ⁻¹ de Fe (média ± desvio padrão; n = 3)..... | 39 |
| Tabela 7. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para a determinação de Fe nas microemulsões de óleos vegetais brutos e de óleo mineral leve por F AAS, empregando-se o procedimento de calibração externa e o método de adição de analito. | 41 |
| Tabela 8. Experimentos de adição e recuperação realizados para microemulsões de óleos vegetais adicionadas de 0,100, 0,200 e 0,500 mg L ⁻¹ de Fe, analisadas diretamente por F AAS (média ± desvio padrão; n = 3)..... | 46 |
| Tabela 9. Análise direta de amostras de óleos vegetais na forma de microemulsões para a determinação de Fe por F AAS (média ± desvio padrão; n = 3)..... | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|---|
| A/O | Microemulsão do tipo água em óleo |
| F AAS | Espectrometria de absorção atômica em chama (do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>) |
| GF AAS | Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>) |
| HR-CS F AAS | Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (do inglês <i>High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry</i>) |
| ICP OES | Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>) |
| ICP-MS | Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>) |
| LOD | Limite de detecção (do inglês <i>Limit of Detection</i>) |
| LOQ | Limite de quantificação (do inglês <i>Limit of Quantification</i>) |
| ME | Microemulsão |
| O/A | Microemulsão do tipo óleo em água |
| R | Fator de correlação |
| RSD | Desvio padrão relativo |

RESUMO

A concentração de ferro (Fe) está diretamente ligada à qualidade, estabilidade oxidativa, sabor, valor nutricional, e, principalmente, à toxicidade dos óleos vegetais. Mesmo que em baixas concentrações, a presença de Fe diminui a estabilidade oxidativa dos óleos e gorduras. Neste trabalho, foi proposto um método analítico rápido, simples, e de relativo baixo custo, para a análise direta de óleos vegetais brutos e refinados na forma de microemulsões para a determinação de Fe por espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS). As microemulsões foram preparadas utilizando-se 250,0 µL de amostra de óleo vegetal, 4,40 mL de 1-propanol, 250,0 µL de Triton® X-100 e 100,0 µL de solução de HNO₃ 50% (v v⁻¹). As microemulsões apresentaram estabilidade em termos de sinal analítico por, pelo menos, 3h. Durante a otimização do procedimento de calibração, foram testados quatro possíveis meios para a preparação das soluções de referência, selecionando-se o meio referente à solução composta por 4,65 mL de 1-propanol, 250,0 µL de Triton® X-100 e 100,0 µL de solução de HNO₃ 50% (v v⁻¹) como meio de preparo das soluções padrão aquosas de Fe empregadas no procedimento de calibração externa. O método analítico proposto foi aplicado para a determinação da concentração total de Fe em amostras de óleos vegetais brutos e/ou refinados de milho, girassol, soja, canola, algodão e, também, de azeites de oliva extravirgens e refinados. As concentrações totais de Fe determinadas variaram de $2,72 \pm 0,05$ a $3,74 \pm 0,11$ mg kg⁻¹, e as repetibilidades representadas como desvio padrão relativo (RSD) variaram de 1,8% a 5,2%. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos para a determinação de Fe nas microemulsões das amostras de óleos vegetais foram de 0,020 mg L⁻¹ e 0,066 mg L⁻¹, respectivamente; e de 0,4 e 1,3 mg kg⁻¹ de Fe em óleo, respectivamente. A exatidão dos resultados obtidos foi avaliada mediante a realização de experimentos de adição e recuperação, e as recuperações obtidas variaram de 84% a 105%, indicando exatidão adequada para a aplicação do método analítico proposto.

Palavras-chave: análise direta; F AAS; ferro; óleos vegetais; microemulsão.

ABSTRACT

The concentration of iron (Fe) is directly connected to the quality, oxidative stability, flavor, nutritional value and, mainly, to the toxicity of the vegetable oils. Even that in low concentrations the presence of iron decreases the oxidative stability of the fats and oils. In this work, was proposed a quick analytical method, simple, and of relative low cost to the direct analysis of crude and refined vegetable oils in the form of microemulsions to the determination of Fe by flame spectrometry of atomic absorption. The microemulsions were prepared using 250.0 μL of vegetable oil sample, 4.40 mL of 1-propanol, 250.0 μL of Triton[®] X-100 and 100.0 μL of HNO_3 50% solution (v v^{-1}). The microemulsions have shown stability in the terms of analytical sign of up to three hours, at least. During the optimization of the calibration procedure, were tested four possible mediums to the preparation of the reference solutions, selecting the medium relative to the solution composed by 4.65 mL of 1-propanol, 250.0 μL of Triton[®] X-100 and 100.0 μL of HNO_3 50% solution (v v^{-1}) as means of preparations of the aqueous standard solutions of Fe used in the procedure of external calibration. The analytical method proposed was applied to the determination of the concentration of Fe in crude and/or refined vegetable oils samples of corn, sunflower, soybean, canola, cottonseed and, also, of extra virgin and refined olive oils. The total concentrations determined of Fe varied from 2.72 ± 0.05 to $3.74 \pm 0.11 \text{ mg kg}^{-1}$, and the repeatability represented as relative standard deviation (RSD) varied from 1.8% to 5.2%. The limits of detection (LOD) and of quantification (LOQ) obtained to the determination of Fe in the microemulsion of the vegetable oil samples were of 0.020 mg L^{-1} and 0.066 mg L^{-1} , respectively; and of 0.4 and 1.3 mg kg^{-1} of Fe in oil, respectively. The accuracy of the obtained results was evaluated by the realization of addition and recovery experiments, and the recuperations obtained varied from 84% to 105%, indicating properly accuracy for the application of the analytical method proposed.

Keywords: direct analysis; F AAS; iron; vegetable oils; microemulsion.

1. Introdução

1.1. Óleos vegetais

Os óleos são substâncias que, historicamente, participam da vida humana, quer compondo a alimentação, quer como matéria-prima de produtos como tintas, lubrificantes, combustíveis, medicamentos, entre outros. Muitos são os vegetais dos quais os óleos são extraídos, cujos processos de extração, inicialmente artesanais, vêm se aperfeiçoando mediante o desenvolvimento científico e tecnológico (RAMALHO e SUAREZ, 2012).

Pesquisas em âmbito mundial em áreas como Engenharia, Química e Agronomia, aliadas a grandes investimentos econômicos, têm possibilitado a substituição de gordura animal por óleos vegetais que, embora quimicamente tenham especificidades próprias, são concorrentes no que se refere aos seus usos (NUNES, 2007).

Os óleos brutos são extraídos de grãos, sementes, frutos, entre outros, e são refinados para consumo humano e animal. As gorduras hidrogenadas, derivadas de óleos, são utilizadas como matérias-primas na fabricação e industrialização de diferentes alimentos. Da mesma forma, os óleos refinados são utilizados na fabricação de produtos de diferentes naturezas, em escala industrial (JORGE, 2009).

Os óleos vegetais e gorduras são constituídos principalmente por triacilgliceróis, além de outros componentes minoritários, como ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, fosfolipídios, carotenóides, cerídios, clorofila, tocoferóis, metais, produtos de oxidação e contaminantes, como resíduos de pesticidas (GHAZANI e MARANGONI, 2013).

Por ser uma mistura complexa de uma grande quantidade de substâncias, é comum expressar a composição química dos óleos e gorduras em função dos ácidos graxos presentes, em vez de expressá-la em função de todos os compostos químicos contidos na mistura (RAMALHO e SUAREZ, 2012).

1.1.1. Óleo de soja

O Óleo de soja (*Glycine max*) é considerado o óleo vegetal mais consumido no mundo. No que se refere à sua composição, é constituído por, majoritariamente, 48% a

59% de ácido graxo linoleico (18:2n-6), 17% a 30% de ácido oleico (18:1n-9), 8% a 13,5% de ácido palmítico (16:0) e 3,5% a 8% de alfa-linolênico (18:3n-3) (BRASIL, 2006; JORGE, 2009).

1.1.2. Óleo de canola

Extraído das sementes de “canola” (*Brassica napus* e *Brassica campestris*), este óleo apresenta, majoritariamente, 53% a 70% de ácido oleico (18:1n-9), 15% a 30% de ácido linoleico (18:2n-6), 5% a 14% de ácido alfa-linolênico (18:3n-3), e de 2,5% a 7,0% de ácido palmítico (16:0) (BRASIL, 2006).

1.1.3. Óleo de girassol

Extraído das sementes de girassol (*Helianthus annuus*), os componentes majoritários variam de acordo com o tipo de melhoramento genético da matéria-prima. Há três tipos: baixo, médio e de alto conteúdo de ácido oleico (18:1n-9), variando de 14% a 90% em teor deste ácido graxo, e de 2,1% a 74% de ácido linoleico (18:2n-6) (BRASIL, 2006).

1.1.4. Óleo de milho

Extraído do gérmen do grão de milho (*Zea mays*), apresenta, majoritariamente, 34% a 65% de ácido linoleico (18:2n-6), 20% a 42% de ácido oleico (18:1n-9), 8,6% a 16,5% de ácido palmítico (16:0), 0,5% a 4% de ácido esteárico (18:0) e níveis de até 2% de ácido alfa-linolênico (18:3n-3) (BRASIL, 2006).

1.1.5. Óleo de algodão

Extraído das sementes do algodão (*Gossypium hirsutum* ou *Gossypium barbadense*), apresenta em sua constituição, majoritariamente, 21,4% a 26,4% de ácido palmítico (16:0), 14,7% a 21,7% de ácido oleico (18:1n-9), e de 46,7% a 58,2% de ácido linoleico (18:2n-6) (BRASIL, 2006).

1.1.6. Azeite de oliva

Extraído dos frutos da oliveira (*Olea europaea L.*), é constituído, majoritariamente, por 55% a 83% de ácido oleico (18:1n-9), 3,5% a 21% de ácido linoleico (18:2n-6) e 0,5% a 5,0% de ácido esteárico (18:0) (BRASIL, 1999).

1.2. Processo de refinamento de óleos vegetais

Dada a importância dos óleos vegetais e suas diversas aplicações industriais, os processos de extração e purificação foram desenvolvidos e aperfeiçoados ao longo do tempo, com o intuito de garantir a qualidade do produto com vistas à sua aceitação no consumo diário da população (JORGE, 2009)

Segundo Mandarino e Roessing (2001), a obtenção do óleo refinado, em escala industrial, ocorre em diferentes etapas. Após o armazenamento e preparo da matéria-prima, ocorre a extração. Nesta etapa, o óleo é parcialmente extraído da matéria-prima em prensas contínuas, empregando-se solvente orgânico. Por apresentar condições favoráveis à extração, utiliza-se o hexano como solvente extrator. Esse solvente é seletivo para triacilgliceróis, tem baixo ponto de ebulição e não reage com as partes dos equipamentos de extração, evitando-se, assim, a sua corrosão. Todavia, o hexano apresenta algumas desvantagens: é inflamável, tóxico, explosivo e de elevado custo relativo. Mas, atualmente, ainda é o solvente com melhor relação custo-benefício para a extração. O óleo originário desta etapa é denominado “óleo bruto”.

Ainda segundo Mandarino e Roessing (2001), para o consumo, o óleo bruto passa pelo processo de refinamento, cuja finalidade é melhorar a sua aparência, sabor, odor e estabilidade oxidativa. O processo de refinamento engloba as seguintes etapas:

- i) degomagem: adiciona-se ao óleo pré-aquecido, água quente e ácido fosfórico. Esta etapa tem por finalidade principal, a remoção de fosfatídeos, que são iniciadores de reações de deterioração dos óleos. No entanto, por serem quelantes, a remoção dos fosfatídeos resulta na eliminação de uma quantidade relativamente grande de metais. O óleo resultante dessa etapa é denominado óleo degomado;
- ii) neutralização: o objetivo desta etapa é a remoção significativa de ácidos graxos livres. Adiciona-se uma solução de hidróxido de sódio ao óleo

degomado, em quantidade suficiente para neutralizar os ácidos graxos livres e o ácido fosfórico residual, formando sabões. Em seguida, a mistura passa por um processo lavagem e de centrifugação, que separa os sabões do óleo; após a secagem a vácuo, o óleo passa a ser chamado de “óleo neutro seco”;

- iii) branqueamento: trata-se de um processo de adsorção das substâncias indesejáveis, como metais, carotenos, xantofilas, clorofila, polímeros, sabões residuais, aldeídos e fósforo. Ocorre na superfície de terras clarificantes, que são misturas de carvão ativado e argilas naturais, resultando no “óleo branqueado”;
- iv) desodorização: neste processo, conhecido como arraste a vapor, o óleo passa em contracorrente com o vapor de água e, durante esse contato, o vapor extrai as substâncias que conferem odor ao óleo. Essa etapa tem por finalidade remover, majoritariamente, tocoferóis e compostos produzidos no armazenamento e processamento do óleo, resultantes de oxidações e hidrólises, tais como aldeídos, cetonas e ácidos graxos oxidados. Após a desodorização, o óleo desodorizado é envasado; uma vez envasado, recebe a denominação de Óleo Refinado, pronto para o consumo.

1.3. Presença de íons metálicos em óleos vegetais

Nas matérias-primas utilizadas para a produção de óleos vegetais, os íons de metais podem estar presentes devido a fatores como: poluição ambiental, solo contaminado, uso de fertilizantes e pesticidas, água de irrigação contaminada, presença de estradas e indústrias próximas ao local de cultivo, entre outros. Durante as etapas do processo de refinamento de óleos, pode ocorrer a contaminação do produto por diferentes íons metálicos, tanto pelo contato do produto com equipamentos e embalagens que contêm tais substâncias, como pela adição de reagentes durante o processo de refinamento (GARRIDO et al., 1994; LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2011; NUNES et al., 2011; ACAR, 2012; LEGGLI et al., 2011; BAKIRCIOGLU et al., 2013; BAKIRCIOGLU et al., 2014; KUCUKKOLBASI et al., 2014).

Os óleos vegetais sofrem oxidação em quaisquer etapas de seu processamento e armazenagem, por meio de auto-oxidação e foto-oxidação (CHOE e MIN, 2006). A presença de íons de metais, tais como de cobre (Cu), ferro (Fe), níquel (Ni) e zinco (Zn), mesmo que em baixas concentrações, diminuem a estabilidade oxidativa desses óleos (PEHLIVAN et al., 2008; TRINDADE et al., 2015), pois aceleram o processo da auto-oxidação. Além disto, os íons de metais de transição podem catalisar a decomposição de hidroperóxidos, produtos formados na fase inicial da auto-oxidação (DÍAZ et al., 2003; CHOE e MIN, 2006; PEHLIVAN et al., 2008). Os íons dos metais Cu e Fe são os pró-oxidantes que aceleram mais eficientemente o período de indução do mecanismo de auto-oxidação (ANWAR et al., 2004), além de afetarem severamente a qualidade dos óleos (MURILLO et al., 1999).

A auto-oxidação de ácidos graxos e acilgliceróis ocorre mediante as três etapas distintas de reações, conforme indicadas na Figura 1.

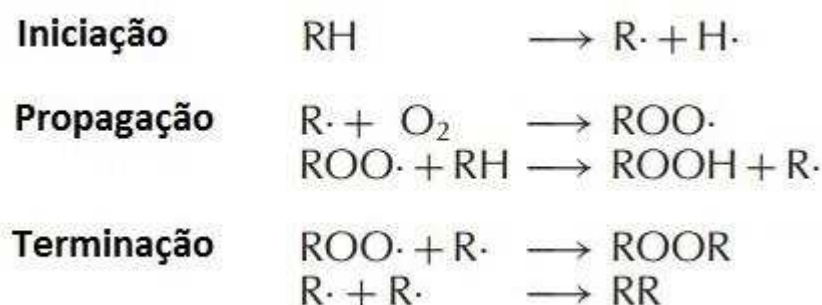
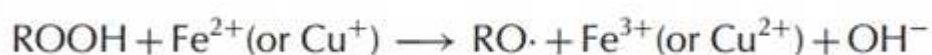


Figura 8. Etapas do mecanismo da auto-oxidação de ácidos graxos e acilgliceróis. Em que: RH: acilgliceróis; RO●: radical alcóxi; ROOH: hidroperóxidos; ROO●: radical peróxido. Fonte: Choe e Min (2006).

Na etapa de iniciação, formam-se radicais livres do ácido graxo devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do referido ácido. Esta etapa ocorre até que se atinja uma concentração suficiente de radicais livres no meio. Nessa etapa, os íons metálicos de transição catalisam a formação de radicais livres. Na propagação, segunda etapa desse mecanismo, os radicais livres $R\cdot$, instáveis, sofrem ataque do oxigênio atmosférico e são convertidos a radicais peróxidos e hidroperóxidos, que atuam como propagadores da reação. Na etapa terminação, dois radicais reagem entre si, formando produtos estáveis (RAMALHO e JORGE, 2006).

Na ausência de íons metálicos de transição e à temperatura ambiente, os hidroperóxidos são relativamente estáveis; porém, quando há a presença de tais íons e/ou a temperaturas relativamente altas, eles são decompostos com facilidade a radicais alcóxi (Figura 2), que, posteriormente, formam aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres, álcoois e hidrocarbonetos de cadeia curta (CHOE e MIN, 2006). Essas substâncias tanto prejudicam o sistema digestivo dos seres humanos, como interagem com os compostos presentes em alimentos, tais como: enzimas, proteínas e corantes, que sensibilizam alguns agentes cancerígenos (CASTILLO; JIMÉNEZ; EBDON, 1999; LEGGLI et al., 2011; LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2011).



Reação 1. Formação do radical alcóxi mediante a doação de elétron de íons metálicos de transição, em seu menor estado de valência. Fonte: Choe e Min (2006).

O Codex Alimentarius¹ estabelece como valor máximo permitido as concentrações de 1,5 mg kg⁻¹ e 5,0 mg kg⁻¹ de Fe em óleos refinados e virgens, respectivamente (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2003). São óleos virgens aqueles obtido por prensagem a quente, e purificados apenas por processos físicos (RAMALHO e SUAREZ, 2012).

1.4. Determinação de Fe em amostras de óleos vegetais

A determinação de Fe tornou-se uma das análises de rotina para o controle de qualidade de óleos vegetais (PINTO et al., 2006), considerando-se que a concentração desse elemento está diretamente ligada à qualidade, estabilidade oxidativa, sabor, valor nutricional e, principalmente, à toxicidade dos óleos (GARRIDO et al., 1994; NUNES et al., 2011; BAKIRCIOGLU et al., 2013; BAKIRCIOGLU et al., 2014).

Segundo Lepri et al. (2011), as técnicas analíticas mais comumente utilizadas e recomendadas para a determinação da concentração total de íons metálicos em amostras

¹ “Fórum internacional de normatização do comércio de alimentos estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU), por ato da Organização para a Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial de Saúde (OMS)” (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, s/d, p. 1).

de óleos vegetais são as espectrometrias de absorção atômica (AAS), a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES). Além das técnicas espectrométricas citadas, a literatura apresenta outras técnicas analíticas também capazes de serem aplicadas à determinação de elementos traço em amostras de óleos vegetais, tais como: espectrofotometria de absorção molecular, potenciometria, voltametria, análise por ativação neutrônica (NAA) e cromatografia.

Dentre as técnicas espectrométricas, a espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS) é amplamente empregada para a determinação de elementos traço em amostras oleosas, pelo seu relativo baixo custo, o que a torna viável para a realização de análises de rotina, além de possibilitar a obtenção de limites de detecção e quantificação suficientemente baixos (ACAR, 2012).

As análises de amostras de óleos vegetais para a quantificação de íons metálicos, de maneira geral, ainda são um desafio para a Química Analítica, tanto pelo fato das relativas baixas concentrações envolvidas com a determinação desses íons, quanto pelas dificuldades na realização das referidas análises químicas associadas, principalmente, à complexidade da matriz e à relativa elevada viscosidade desse tipo de amostra (NUNES et al., 2011; AMAIS et al., 2012; BARAN e YAŞAR, 2012).

Para minimizar os efeitos de matriz, causados sobre a determinação de íons metálicos nas análises das amostras de óleos vegetais, torna-se necessária a realização de uma adequada etapa de preparação, pois, o elevado teor de matéria orgânica desse tipo de amostras dificulta a sua análise pelas técnicas analíticas instrumentais citadas anteriormente, tal como observado para a técnica de F AAS (LYRA et al., 2010).

Alguns procedimentos podem ser empregados para o preparo de amostras de óleos vegetais, para eliminação ou minimização dos efeitos de matriz causados sobre as determinações de íons metálicos, tais como: digestão ácida convencional (JURANOVIC; BREINHOELDER; STEFFAN, 2002), digestão ácida assistida por micro-ondas (BENINCASA et al., 2007), diluição com solventes orgânicos (POLVILLO; ALBI e GUINDA, 1994), extração líquido-líquido (TOKAY e BAĞDAT, 2015), extração induzida por quebra de emulsão (HE et al., 2014), extração em fase sólida (CESUR e BATI, 2002), extração ácida (PEHLIVAN et al., 2008), emulsificação (LEGGI et al., 2011) e microemulsificação (NUNES et al., 2011).

O procedimento de microemulsificação, para o preparo de amostras oleosas, tem-se demonstrado promissor para a realização da análise direta desse tipo de amostra. Em relação a outros procedimentos de preparo convencionalmente empregados em amostras de óleos vegetais e outros tipos de óleos, a microemulsificação apresenta como vantagens: rapidez, menor manipulação das amostras, minimização de possíveis contaminações, redução do risco de perda dos analitos por volatilização – no caso de analitos relativamente voláteis –, eliminação da utilização de solventes orgânicos tóxicos, bem como a possibilidade do emprego de padrões aquosos para a realização dos procedimentos de calibração (NUNES et al., 2011; AMAIS et al., 2012).

Com relação à análise direta de amostras de óleos, a aplicação do procedimento de microemulsificação tem demonstrado vantagens se comparada à aplicação de procedimentos de análise direta que fazem o uso de diluição com solventes orgânicos, pois permite a utilização de padrões aquosos para a realização dos procedimentos de calibração. Além disso, permite a adição de soluções de ácidos fortes às microemulsões, o que evita a ocorrência de processos de perda do analito e auxilia a disponibilização dos analitos em solução, contribuindo para a obtenção de medidas analíticas mais precisas e exatas (LEITE et al., 2015).

Devido às características vantajosas, sob o ponto de vista analítico, da utilização do procedimento de preparo de amostras baseado na microemulsificação, para a análise de óleos vegetais para determinações de íons metálicos em concentrações traço, torna-se relevante a proposição e o desenvolvimento de um método simples, com pouca manipulação da amostra, eficaz e de relativo baixo custo, para o monitoramento de Fe em óleos vegetais brutos, recém-extraídos do vegetal, e refinados.

Para as indústrias de óleos comestíveis, espera-se que com o estudo desenvolvido neste trabalho, seja possível a aplicação do método de análise direta proposto para a realização de um controle rotineiro de possíveis corrosões e anormalidades no processo de produção, sendo uma ferramenta analítica útil, tanto para melhorar o material de constituição dos equipamentos usados para a produção em escala industrial de óleos vegetais comestíveis, como também para aprimorar o material de embalagens. Além disso, com o desenvolvimento do método analítico proposto, espera-se que seja possível a obtenção de informações relativas à qualidade dos óleos

produzidos, tanto em relação ao seu valor nutricional, como também em relação à sua toxicidade.

Na Tabela 1, são apresentados trabalhos publicados na literatura, com diferentes metodologias, incluindo o tipo de preparo de amostra e a técnica analítica utilizada, para a determinação de Fe em amostras de óleos de diferentes fontes vegetais. Observou-se que, na maioria dos trabalhos compilados da literatura, as amostras analisadas foram apenas de óleos vegetais refinados. Observou-se também que as concentrações de Fe determinadas nessas amostras variaram em uma faixa ampla, desde $0,0107 \pm 0,0002 \text{ mg kg}^{-1}$ (PEHLIVAN et al., 2008) a $23,3 \pm 0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ (CINDRIC; ZEINER; STEFFAN, 2007).

Tabela 1. Técnicas analíticas e procedimentos de preparo de amostras empregados para a determinação de Fe em amostras de óleos vegetais.

| AMOSTRA | Técnica analítica | Preparo de amostra | LOD (mg kg ⁻¹) | Fe (mg kg ⁻¹) | Referência |
|---|---------------------------------|--|-------------------------------|--|---|
| Óleos refinados de soja, girassol e milho | ICP OES | Extração ácida | - | 0,0129 ± 0,0004; 0,0107 ± 0,0002 e 0,0195 ± 0,0010, respectivamente | PEHLIVAN et al., 2008 |
| Óleos refinados de soja e girassol | GF AAS | Extração ácida | - | 0,052 ± 0,005 e 0,094 ± 0,003, respectivamente | LEONARDIS; MACCIOLA; FELICE, 2000 |
| Azeite de oliva | Ad-SSWV | Extração ácida, seguida de complexação | 0,014 | 0,324 ± 0,009 | DÍAZ et al., 2003 |
| Azeite de oliva | Espectrofotometria UV-Vis | Extração ácida, seguida de complexação | 0,057 | 0,295 ± 0,032 | DÍAZ et al., 2003 |
| Óleos refinados de soja e amendoim | Sistema SIA com detecção UV-Vis | Complexação em meio de solvente orgânico | 0,31* | 1,74 ± 0,03 e 1,08 ± 0,02, respectivamente | PINTO; SARAIVA; LIMA, 2006 |
| Óleos vegetais refinados | F AAS | Extração líquido-líquido | 0,0673 | Sem aplicação | TOKAY e BAĞDAT, 2015 |
| Óleos refinados de soja, girassol, milho e canola | F AAS | Extração líquido-líquido | 0,09 | 0,70 ± 0,01; 0,49 ± 0,02; 0,38 ± 0,02 e < LOQ, respectivamente | BARAN e YAŞAR, 2013 |

| AMOSTRA | Técnica analítica | Preparo de amostra | LOD (mg kg ⁻¹) | Fe (mg kg ⁻¹) | Referência |
|---|-------------------|--|-------------------------------|---|--|
| Óleos refinados de girassol, milho e canola | ICP OES | Extração induzida por quebra de emulsão | - | 8,920 ± 1,608; 8,398 ± 3,518 e 8,004 ± 4,211, respectivamente | BAKIRCIOGLU; KURTULUS; YURTSEVER, 2013 |
| Óleos refinados de soja, girassol, milho e canola | ICP-MS | Extração induzida por quebra de emulsão | 0,000271* | 0,019 ± 0,005; 0,060 ± 0,003; 0,0726 ± 0,004 e 0,177 ± 0,005, respectivamente | HE et al., 2014 |
| Óleos refinados de soja, girassol e canola | HR-CS F AAS | Extração líquido-líquido assistida por ultrassom | 0,061 | 1,75 ± 0,11; 0,96 ± 0,01 e 0,27 ± 0,08, respectivamente | TRINDADE et al., 2015 |
| Óleo refinado de argan | ICP OES | Digestão ácida assistida por micro-ondas | 0,0024* | 0,9 ± 0,3 | GONZÁLVEZ et al., 2010 |
| Azeites de oliva | ICP-MS | Digestão ácida assistida por micro-ondas | 0,0028 | 0,464 ± 0,003 a 1,614 ± 0,044 | BENINCASA et al., 2007 |
| Óleo refinado de soja e girassol | ICP OES | Digestão ácida assistida por micro-ondas | 0,41 | 23,3 ± 0,15 e 15,3 ± 0,34, respectivamente | CINDRIC; ZEINER; STEFFAN, 2007 |
| Óleos refinados de soja, girassol e milho | F AAS | Digestão ácida assistida por micro-ondas | 0,015 | 1,52 ± 0,14; 1,51 ± 0,18 e 1,87 + 0,22, respectivamente | ACAR, 2012 |

| AMOSTRA | Técnica analítica | Preparo de amostra | LOD (mg kg⁻¹) | Fe (mg kg⁻¹) | Referência |
|---|---|--|-------------------------------------|--|--|
| Óleo refinado de girassol | GF AAS | Diluição com solvente orgânico | 0,044 | 0,185± 0,035 a 0,188 ± 0,035 | POLVILLO; ALBI; GUINDA, 1994 |
| Óleo bruto e refinado de soja | ICP OES | Diluição com n-propanol e HNO ₃ concentrado | 0,01 | 8,56 ± 0,34 e < 0,03, respectivamente | CHAVES et al., 2011 |
| Óleos refinados de soja e girassol | Cromatografia de troca iônica com detecção UV-Vis | Saponificação, seguida de fotólise com radiação UV | 0,02 | 2,675 ± 0,055 e 0,575 ± 0,006, respectivamente | BULDINI; FERRI; SHARMA, 1997 |
| Óleos refinados de soja, girassol, milho e canola | F AAS | Emulsificação | 1,00 | 2,98 ± 0,15; 1,50 ± 0,38; 1,81 ± 0,18 e 1,61 ± 0,47, respectivamente | LEGGLI et al., 2011 |
| Azeite de oliva | ICP OES | Emulsificação | - | 0,510 ± 0,029 | ANTHEMIDIS; ARVANITIDIS; STRATIS, 2005 |
| Óleos refinados de soja e girassol | HR-CS F AAS | Microemulsificação | 0,62 | 2,26 ± 0,20 e < 2,1, respectivamente | NUNES et al., 2011 |

^a LOD = limite de detecção; * mg L⁻¹

Vale ressaltar que não se encontra relatado na literatura algum método analítico para a análise direta de amostras de óleos vegetais na forma de microemulsões para a determinação de Fe por F AAS.

1.5. Microemulsões

As microemulsões são constituídas por água e óleo estabilizados por um agente tensoativo e/ou um agente co-tensoativo (geralmente solventes orgânicos de baixa massa molar) (NUNES et al., 2011; AMAIS et al., 2012), tal como um álcool ou uma amina (LYRA et al., 2010). A quantidade de tensoativo e/ou co-tensoativo necessária para a formação de microemulsões é alta, se comparada à de emulsões. Mas, quando seus constituintes são misturados em razões apropriadas, sua formação é espontânea, contrariamente ao que ocorre para a formação de emulsões (CAPEK, 2004; BURGUERA e BURGUERA, 2012; DALVIN, 2012).

Na literatura específica da área que trata sobre microemulsões, não há unanimidade na definição do seu conceito. Em pesquisas da Área de Química Analítica, o conceito mais recorrente em publicações é o de que microemulsões são sistemas opticamente transparentes e termodinamicamente estáveis (CAPEK, 2004; SALAGER et al., 2005; LYRA et al., 2010; DAMASCENO et al., 2011; NUNES et al., 2011; BURGUERA e BURGUERA, 2012; CUNHA et al., 2012; LIMA; SILVA; TEIXEIRA, 2015; LEITE et al. 2015). Além desses aspectos, Lyra et al. (2010) e Cunha et al. (2012) acrescentam que microemulsões são sistemas de baixa viscosidade.

Há microemulsões com três tipos de estrutura (Figura 2): microemulsão óleo em água (O/A), cuja fase oleosa está dispersa na fase aquosa; microemulsão água em óleo (A/O), cuja fase aquosa está dispersa na fase oleosa; e a microemulsão bicontínua, cujo microdomínio de fase oleosa e aquosa estão conectados aleatoriamente (BURGUERA e BURGUERA, 2012).

Segundo Burguera e Burguera (2012), a palavra “microemulsão” refere-se ao tamanho das gotículas de uma fase em outra. Porém, de acordo com Salager et al. (2005), o termo "microemulsão" é impróprio, pois microemulsões não podem ser consideradas pequenas gotículas dispersas em uma fase contínua, além de frisar que microemulsões não são casos especiais de uma emulsão regular.

Outra diferença, em relação ao conceito de formação da microemulsão, diz respeito à área interfacial água/óleo. Segundo Tenjarla (1999), Capek (2004) e Burguera e Burguera (2012), a formação de uma microemulsão envolve um grande aumento de área interfacial. No entanto, a tensão interfacial é fortemente reduzida — devido à adição de grandes quantidades de tensoativo e/ou co-tensoativo — de modo a compensar a entropia de dispersão. Assim, a energia livre de formação de gotículas é menor que zero, explicando sua formação espontânea. Em contrapartida, segundo Daltin (2012), na formação da microemulsão não há aumento de área de interface, mas sim uma redução. Para este pesquisador, a redução da área de interface deve-se à solubilização micelar, em que as moléculas de óleo se alojam entre as cadeias lipofílicas das micelas do tensoativo. Dessa forma, as interfaces entre óleo e água deixam de existir, e a energia de interface é a menor possível, formando-se espontaneamente a microemulsão.

Independentemente das diferentes teorias e conceitos em relação à formação de microemulsões, sua aplicação na Química Analítica vem crescendo com o intuito de simplificar o procedimento de preparo de amostras na determinação de espécies de íons metálicos em amostras apolares com elevado teor de matéria orgânica (BURGUERA e BURGUERA, 2012).

Dentre as vantagens da utilização de microemulsificação como procedimento de preparo de amostras apolares para a determinação de íons metálicos, comparada à utilização da emulsificação, pode-se citar a espontaneidade da formação de microemulsões e a sua estabilidade termodinâmica.

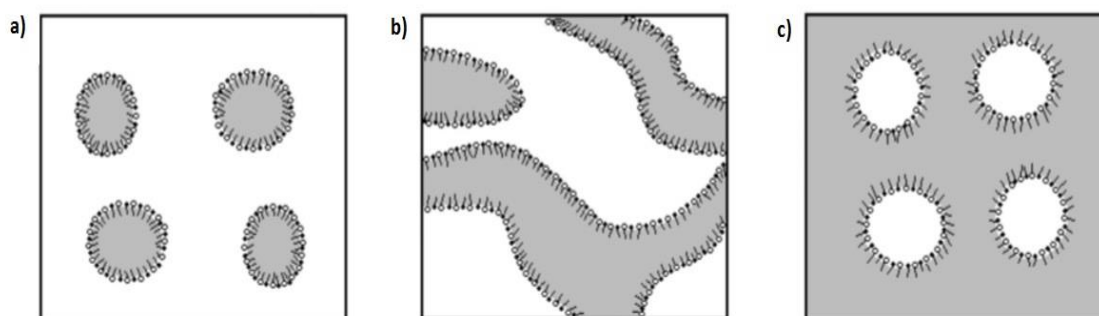


Figura 9. Estruturas de microemulsões: a) microemulsão do tipo O/A; b) microemulsão bicontínua; c) microemulsão do tipo A/O; em que a cor cinza representa a fase oleosa, e a cor branca representa a fase aquosa. Fonte: Damasceno et al. (2011).

1.6. Espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS)

Segundo Skoog, Holler e Nieman (2002), a espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS) é uma técnica analítica destrutiva, empregada em análises elementares. A amostra, na forma de solução, é aspirada por meio de um capilar, e convertida em uma névoa (aerossol) na câmara de nebulização. O aerossol formado é transportado por um fluxo de gases até o sistema de atomização (chama) onde será dessolvatado. As partículas sólidas formadas volatilizam-se e se dissociam, gerando, majoritariamente, espécies atômicas em fase gasosa, no estado fundamental e neutras, coexistindo com espécies atômicas neutras, excitadas e/ou ionizadas, que são espécies indesejáveis na obtenção do sinal analítico, pois contribuem para a diminuição do sinal de absorção atômica.

A medida do sinal de absorvância para analito presente no sistema de atomização é realizada quando este se encontra na forma atômica, em fase gasosa, neutra e no estado fundamental, sendo possível quantificá-lo de acordo com a Lei de Lambert-Beer, que estabelece relação direta entre o sinal de absorvância obtido e concentração do analito (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A interferência física, causada pela matriz de uma amostra em medidas por F AAS, é ocasionada por variações na viscosidade e na tensão superficial das soluções analisadas, diminuindo a eficiência de formação do aerossol e, conseqüentemente, a eficiência de transporte do analito até o sistema de atomização. Desta forma, o processo com que o aerossol é formado e transportado até o referido sistema é diretamente responsável pela precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação obtidos em uma determinação. Por isso, é necessária a realização da sua otimização, para que as interferências físicas sejam diminuídas ou eliminadas (JESUS, 2008).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um procedimento analítico rápido, simples e de baixo custo relativo para a análise direta de amostras de óleos vegetais na forma de microemulsões, para a determinação de Fe por espectro espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS).

2.2. Objetivos específicos

Otimizar a composição e estabilidade química das microemulsões de óleos vegetais;

Otimizar a velocidade de aspiração das microemulsões — etapa de introdução de amostra;

Otimizar o procedimento de calibração externa para a determinação de Fe em amostras de óleos vegetais sob a forma de microemulsões;

Avaliar a exatidão da metodologia proposta, através de experimentos de adição e recuperação;

Determinar os LOD e LOQ do método analítico proposto;

Preparar microemulsões de amostras de óleos vegetais brutos e/ou refinados de diferentes fontes vegetais e, também, de azeites de oliva extravirgens e refinados;

Determinar a concentração total de Fe nas microemulsões das amostras de óleos vegetais.

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes, soluções e amostras

Para o preparo das microemulsões e soluções, foram utilizados frascos e vidrarias previamente lavados e descontaminados, utilizando-se banhos de detergente neutro 5% (v v⁻¹) (Merck[®], Extran[®] MA 02) e de HNO₃ 10% (v v⁻¹), respectivamente. Após 24 h de imersão nos referidos banhos, os frascos e vidrarias foram abundantemente enxaguados com água ultrapura, obtida por destilação e posterior purificação em um sistema Milli-Q[®] (Millipore), e secados à temperatura ambiente.

No preparo das microemulsões e/ou soluções foi utilizada água ultrapura, 1-propanol (Sigma-Aldrich[®], 99,5%), Triton[®] X-100 (Merck[®], P.A.), óleo mineral leve (TEDIA[®], Mineral Oil, Light, MR1284-002) e ácido nítrico ultrapuro, obtido por purificação em sistema de destilação de ácidos DuoPUR[®] (Milestone, Sorisole, Itália), a partir do qual foram preparadas soluções ácidas de menor concentração.

Soluções de referência (padrão) de Fe foram preparadas mediante diluições apropriadas a partir de uma solução estoque de Fe (1000 ± 4) mg L⁻¹ (Specsol[®]), e foram utilizadas nos procedimentos de calibração para a obtenção das curvas analíticas.

Amostras de óleos de soja, girassol, milho e de canola, brutos e refinados, de um mesmo lote do processamento industrial, foram fornecidas pelo laboratório de controle de qualidade de uma indústria de óleos vegetais localizada na cidade de Maringá, Paraná.

Amostras de azeites de oliva extravirgens e refinados, e de óleo refinado de algodão foram adquiridas no comércio local da região de Maringá, Paraná.

3.2. Instrumentação e condições de operação

Neste trabalho foi empregado um espectrômetro de absorção atômica com chama (Varian[®] SpectrAA-240FS, Austrália), equipado com uma lâmpada de deutério para a correção do sinal de fundo e alimentado com acetileno (99,7%, Linde[®]) e ar. Como fonte de radiação, foi utilizada uma lâmpada de cátodo oco multielementar (Cu, Fe, Mn e Zn) (Varian[®] SpectrAA lamp).

As amostras foram diretamente analisadas na forma de microemulsões, empregando-se o processo de introdução contínua de amostra, e os sinais de absorvância foram registrados em altura de pico de absorção atômica. As condições instrumentais

utilizadas nas medidas por F AAS foram aquelas sugeridas pelo fabricante do equipamento, exceto com relação ao valor da taxa de aspiração, e estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições instrumentais empregadas na análise direta de amostras de óleos vegetais na forma de microemulsões para a determinação de Fe por F AAS.

| Parâmetros instrumentais | |
|---|---------------------|
| Comprimento de onda (nm) | 248,3 |
| Corrente de operação da lâmpada (mA) | 10,0 |
| Largura da fenda espectral (nm) | 0,2 |
| Razão do fluxo dos gases da chama Ar/C ₂ H ₂ (L min ⁻¹) | 13,5 / 2 |
| Taxa de aspiração (mL s ⁻¹) | 0,13 |
| Corretor de sinal de fundo | Lâmpada de deutério |

3.3. Preparação das microemulsões

Para o preparo das microemulsões de óleos vegetais, foram testadas, aleatoriamente, dez diferentes proporções de: fase apolar (250,0 µL a 1100,0 µL de amostra de óleo vegetal); tensoativo (100,0 µL a 800,0 µL de Triton[®] X-100) e de co-tensoativo (2,80 mL a 4,40 mL de 1-propanol), sendo fixado o volume da fase polar (100,0 µL de solução aquosa acidificada). Selecionou-se experimentalmente a composição química mais adequada, e as microemulsões de óleos vegetais utilizadas para as determinações de Fe foram preparadas utilizando-se 250,0 µL de amostra, 4,40 mL de 1-propanol, 250,0 µL de Triton[®] X-100 e 100,0 µL de solução de HNO₃ 50% (v v⁻¹).

Para simular as microemulsões de óleo vegetal, duas microemulsões de óleo mineral leve, com diferentes constituições, foram otimizadas e denominadas OM e OM+. A microemulsão OM foi preparada com a utilização de 250,0 µL de óleo mineral leve, 4,40 mL de 1-propanol, 250,0 µL de Triton[®] X-100 e 100,0 µL de solução de HNO₃ 50% (v v⁻¹), e a microemulsão OM+ foi preparada utilizando 350,0 µL de óleo mineral leve, 4,28 mL de 1-propanol, 270,0 µL de Triton[®] X-100 e 100,0 µL de solução de HNO₃ 50% (v v⁻¹).

Quando necessário, o padrão inorgânico de Fe foi adicionado às microemulsões, em pequenos volumes, junto à solução de HNO_3 50% (v v⁻¹), para evitar a desestabilização termodinâmica do sistema. A quantidade total adicionada de fase aquosa acidificada na microemulsão foi sempre de 100,0 μL , considerando-se a adição ou não da solução do padrão aquoso de Fe.

Todas as microemulsões foram preparadas em frascos graduados de polipropileno de 15 mL (Corning[®]), e homogeneizadas com a utilização de agitador do tipo vórtex (IKA[®], Vortex 1), durante 1 min, em rotação máxima.

3.4. Avaliação da estabilidade química das microemulsões

Com o intuito de se avaliar a estabilidade do sinal analítico, em termos de absorvância, foram realizadas análises de estabilidade para as microemulsões de óleos vegetais brutos e refinados de soja, milho, girassol e canola, contendo a adição de Fe nas concentrações de 0,500 mg L^{-1} e 1,00 mg L^{-1} . Para essa avaliação, as medidas de absorvância foram realizadas a cada 60 min, em um período de 8 h.

3.5. Avaliação do procedimento de calibração para a determinação de Fe nas microemulsões por F AAS

Para a otimização do procedimento de calibração externa, foi avaliada a utilização das seguintes soluções, como diferentes meios para a preparação das soluções padrão de Fe, empregadas na preparação da curva analítica: meios das microemulsões OM e OM+, meio da solução do branco analítico (BA) e meio de 1-propanol acidificado (PA). O preparo das microemulsões OM e OM+ e soluções BA e PA foram realizados adicionando-se os volumes de reagentes apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Quantidades de reagentes utilizados para o preparo de microemulsões OM e OM+, e soluções BA e PA.

| Microemulsão ou solução | Óleo mineral leve (μL) | Triton[®] X-100 (μL) | 1-propanol (mL) | HNO₃ 50% (v v⁻¹) (μL) |
|--|---|--|----------------------------|--|
| OM | 250,0 | 250,0 | 4,40 | 100,0 |
| OM+ | 350,0 | 270,0 | 4,28 | 100,0 |
| BA | - | 250,0 | 4,65 | 100,0 |
| PA | - | - | 4,90 | 100,0 |

Primeiramente, realizou-se a avaliação da estabilidade das microemulsões OM e OM+, com relação à estabilidade do sinal analítico representado em termos das absorvâncias obtidas para os diferentes meios, contendo $0,500 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe, a partir de medidas por F AAS após um período de 4 h e de 20 h.

Em seguida, foi avaliada a existência ou não de interferências sobre a aquisição dos sinais de absorvância a partir da obtenção de curvas analíticas, empregando-se o procedimento de calibração externa. Essas curvas de calibração foram preparadas com soluções padrão aquosas de Fe, preparadas nos meios OM, OM+, BA e PA supracitados, cujas concentrações variaram de $0,100 \text{ mg L}^{-1}$ a $1,00 \text{ mg L}^{-1}$. O procedimento de calibração de adição de analito também foi utilizado para a obtenção de curvas analíticas em meios de microemulsões de óleos brutos de milho, girassol, soja e canola, considerando-se a mesma faixa de concentrações de Fe, para fins de comparação das sensibilidades analíticas.

3.6. Validação do procedimento analítico proposto

A validação do procedimento analítico proposto foi realizada mediante a obtenção dos seguintes parâmetros:

- Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método analítico. Calculou-se o LOD e o LOQ de acordo com as recomendações da IUPAC, em que $LOD = 3 \times \sigma_{\text{branco}}/b$ e $LOQ = 10 \times \sigma_{\text{branco}}/b$; sendo σ_{branco} = desvio padrão da média de dez medidas obtidas para dez soluções do branco analítico, e b = sensibilidade da curva analítica (AMAIS et al., 2012).
- Sensibilidade, representada pelo coeficiente angular da equação da curva de calibração, obtida por regressão linear, pelo procedimento de calibração externa;
- Repetibilidade, avaliada pela precisão (desvio padrão relativo, RSD) das medidas realizadas para as microemulsões em um mesmo dia, para a obtenção de um sinal analítico médio;
- Linearidade do método, que é representada por uma faixa de concentrações de Fe em meio da solução de referência. A faixa linear varia da concentração correspondente ao LOQ até a máxima concentração que permite uma relação direta entre o sinal analítico, em termos de absorvância, e a concentração do analito.
- Exatidão, avaliada pelas porcentagens de recuperação obtidas a partir de experimentos de adição e recuperação, realizados nas microemulsões das amostras contendo adições de $0,100 \text{ mg L}^{-1}$, $0,200 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,500 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe.

3.7. Tratamento estatístico dos resultados

Quando houve a necessidade de comparar duas médias experimentais, para verificar a existência de diferença com significado estatístico entre os valores, aplicou-se o teste t de Student “para duas amostras” em um nível de 95% de confiança. Este teste leva em consideração que o desvio padrão populacional não é o mesmo para o conjunto de medidas (HARRIS, 2012).

4. Resultados e discussão

4.1. Preparação das microemulsões

Primeiramente, com a finalidade de analisar-se diretamente amostras de óleos vegetais na forma de microemulsões, foi realizada uma revisão bibliográfica para se verificar quais os reagentes e as suas proporções empregadas para o preparo de microemulsões de amostras de óleos de diferentes naturezas (AUCÉLIO et al., 2004; SOUZA et al., 2006; JESUS, 2008; LYRA et al., 2010; NUNES et al., 2011; CUNHA et al., 2012; LEITE et al., 2015; LIMA; SILVA; TEIXEIRA, 2015). A partir dessa revisão, foram testados diferentes volumes de amostra, n-propanol, solução aquosa acidificada e Triton[®] X-100, para a obtenção da formação de microemulsões das amostras de interesse. Tais volumes foram definidos a partir de valores aproximados aos utilizados em pesquisas que tratavam da utilização de microemulsões como procedimento de preparo de amostras de biodiesel e óleos vegetais, para a determinação de elementos traço. Dez testes foram realizados para a obtenção das microemulsões, alterando-se as proporções dos reagentes utilizados para esse fim, sem, necessariamente, obedecer a um critério específico. As proporções dos reagentes, bem como os resultados dos testes, estão sendo apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Experimentos realizados para a otimização das quantidades dos reagentes necessários para o preparo de microemulsões das amostras de óleos vegetais.

| Experimento | Óleo vegetal (μL) | 1-propanol (mL) | Triton® X-100 (μL) | HNO ₃ 50% (v v ⁻¹) (μL) | Resultado ^a |
|-------------|-------------------|-----------------|--------------------|--|------------------------|
| 1 | 250,0 | 4,40 | 250,0 | 100,0 | ME |
| 2 | 350,0 | 4,28 | 270,0 | 100,0 | ME |
| 3 | 450,0 | 4,15 | 300,0 | 100,0 | ME |
| 4 | 750,0 | 3,20 | 700,0 | 350,0 | E |
| 5 | 750,0 | 3,25 | 800,0 | 200,0 | E |
| 6 | 750,0 | 3,45 | 600,0 | 200,0 | E |
| 7 | 1000,0 | 3,20 | 700,0 | 100,0 | ME |
| 8 | 1100,0 | 2,80 | 100,0 | 100,0 | E |
| 9 | 1100,0 | 3,00 | 800,0 | 100,0 | E |
| 10 | 1100,0 | 3,08 | 720,0 | 100,0 | E |

^aME = microemulsão; E = emulsão.

Entre os dez experimentos realizados, apenas os experimentos 1, 2, 3 e 7 resultaram em microemulsões visivelmente transparentes e estáveis. Para os demais experimentos, formaram-se emulsões instáveis, resultando em uma rápida separação das fases aquosa e de óleo. O aspecto visual de óleos vegetais puros, bem como de óleos vegetais sob as formas de emulsão e microemulsão, respectivamente, estão apresentados pela Figura 3. Pode-se observar a transparência da microemulsão (C), enquanto que a emulsão (B) mostra-se opaca e leitosa.

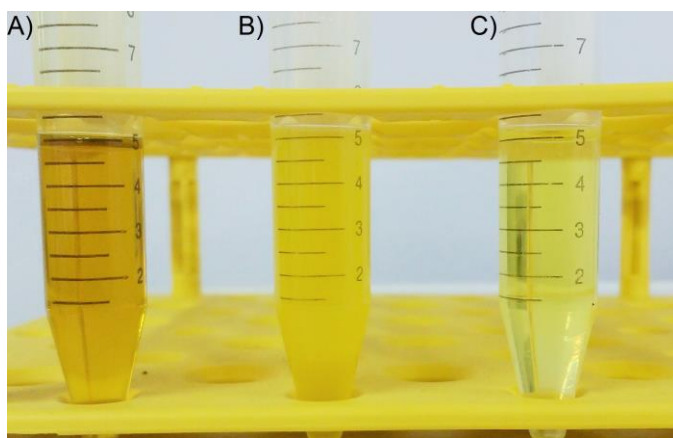


Figura 10. Aspecto visual do óleo vegetal puro e óleo vegetal sob as formas de emulsão e microemulsão, em que A) óleo bruto de milho; B) emulsão de óleo bruto de milho; C) microemulsão de óleo bruto de milho.

No processo de realização das medidas de absorvância por F AAS, a amostra é aspirada, nebulizada e transportada até o sistema de atomização. Nesse processo, a eficiência da etapa de introdução de amostra está diretamente ligada à sensibilidade e exatidão das medidas. Como a microemulsão obtida mediante a realização do experimento 1 foi constituída por uma menor quantidade de óleo e de agente tensoativo em relação às quantidades empregadas nos outros experimentados apresentados na Tabela 4, e como esses dois líquidos possuem maior viscosidade em relação 1-propanol e água, esta foi a microemulsão selecionada para ser empregada durante a realização das análises.

Em vez da adição de soluções padrão organometálicas de Fe às microemulsões que necessitaram da presença desse elemento em sua composição, foi possível a adição de soluções padrão aquosas de Fe, sem a perda da estabilidade, a qual foi observada visualmente a partir da inobservância da separação de fases. A utilização de soluções de padrões aquosos possibilitou ainda o barateamento das análises, devido ao menor custo relativo desses padrões em relação ao custo dos padrões organometálicos, além da obtenção de maior estabilidade para as microemulsões (NUNES et al., 2011; AMAIS et al., 2012). Foi possível, ainda, a obtenção de uma microemulsão acidificada com ácido nítrico, que evita perdas do analito por hidrólise e por processos de adsorção na superfície do frasco utilizado para o seu preparo. As perdas do analito em solução acidificada são bem menores em relação às perdas que ocorrem em soluções neutras ou alcalinas (KRUG, 2010).

4.2. Avaliação da estabilidade química das microemulsões

Em procedimentos de análise, é importante que as amostras permaneçam estáveis quimicamente por um período de 3h, para que a estabilidade seja considerada suficiente durante a realização de medidas analíticas (NUNES et al., 2011).

Com o intuito de se avaliar a estabilidade do sinal analítico em termos de sinal de absorvância, foram realizadas análises de estabilidade para microemulsões de óleos vegetais contendo a adição de Fe nas concentrações de $0,500 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,00 \text{ mg L}^{-1}$. Para essa avaliação, as medidas de absorvância foram realizadas a cada 60 min, em um período de 8 h.

A partir desse estudo, verificou-se que as microemulsões dos óleos brutos e refinados de canola, girassol e soja e, também, do óleo refinado de milho, em relação às concentrações adicionadas de Fe de 0,500 mg L⁻¹ e 1,00 mg L⁻¹, mantiveram-se estáveis por aproximadamente 6h e 4h, respectivamente. As microemulsões de óleo bruto de milho, porém, mantiveram-se estáveis durante 4h e 3h, para as concentrações adicionadas de Fe de 0,500 mg L⁻¹ e 1,00 mg L⁻¹, respectivamente, ou seja, durante tempos relativamente menores em relação à estabilidade observada para as demais microemulsões. Tais resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Estabilidade do sinal analítico para adições de 0,500 mg L⁻¹ e 1,00 mg L⁻¹ de Fe em microemulsões de óleos vegetais brutos e refinados.

| Microemulsão | Estabilidade (h) | |
|---------------------------|--|---|
| | Adição de 0,500 mg L ⁻¹ de Fe | Adição de 1,00 mg L ⁻¹ de Fe |
| Óleo bruto de soja | 6 | 4 |
| Óleo bruto de girassol | 6 | 4 |
| Óleo bruto de canola | 6 | 4 |
| Óleo bruto de milho | 4 | 3 |
| Óleo refinado de soja | 6 | 4 |
| Óleo refinado de girassol | 6 | 4 |
| Óleo refinado de canola | 6 | 4 |
| Óleo refinado de milho | 6 | 4 |

A diminuição da estabilidade do sinal analítico obtido para as microemulsões adicionadas de 1,00 mg L⁻¹ de Fe em relação à estabilidade do sinal analítico obtida para as microemulsões adicionadas de 0,500 mg L⁻¹ de Fe pode ser explicada em termos das reações de oxidação dos óleos vegetais catalisadas por íons de Fe. Conforme anteriormente descrito na seção 1.3 do texto desta dissertação, as reações de oxidação em acilgliceróis são catalisadas por íons do referido elemento. Nesse processo, quanto maior a concentração íons de Fe, mais rápida é a degradação dos acilgliceróis, e quanto mais susceptível à oxidação é o acilglicerol, maior é a velocidade de oxidação (CHOE e MIN, 2006). Além disso, segundo Melo (2009), na degradação de óleos vegetais, são observadas mudanças na viscosidade.

Como a viscosidade da solução aspirada na análise por F AAS está diretamente relacionada à eficiência da aspiração, nebulização e transporte do aerossol formado até o

sistema de atomização, pode-se sugerir uma explicação para a observação da referida diminuição da estabilidade do sinal analítico, em termos da ocorrência de uma maior taxa de oxidação do óleo contaminado com uma maior concentração de Fe, contribuindo para um aumento da viscosidade do meio e, conseqüentemente, para o transporte de uma menor quantidade absoluta do analito até a chama.

Pode ser destacado, também, que as concentrações de Fe adicionadas em microemulsão de óleo bruto de milho mantiveram-se mais instáveis, ou seja, sofreram maior alteração ou diminuição em relação às concentrações de Fe adicionadas nos outros tipos de microemulsões. Tal observação talvez possa ser explicada em função de uma maior presença de substâncias mais susceptíveis à oxidação em óleo bruto de milho, porém, tal explicação poderia ser confirmada apenas mediante a realização de estudos complementares, os quais não foram realizados.

4.3. Otimização do procedimento de calibração

Após a definição das quantidades dos reagentes a serem empregados para a formação e obtenção das microemulsões de amostras de óleos vegetais, foi necessária a realização da otimização do preparo de uma solução/microemulsão de referência (meio de referência), a ser empregada no processo de calibração do método analítico proposto para a determinação de Fe por F AAS, com a finalidade de simular a matriz da amostra, minimizando a diferença entre os níveis de eficiência com que as amostras e soluções de referência seriam aspiradas e levadas até o sistema de atomização.

Tal estudo, justificou-se pelo fato de o meio de referência não ser preparado com a adição de óleo vegetal, cuja elevada viscosidade relativa influencia a eficiência do processo de nebulização e transporte do aerossol da amostra até o sistema de atomização (chama). Por isso, foram avaliados quatro possíveis meios de referência (microemulsões OM e OM+ e soluções BA e PA), a fim de simular as microemulsões de óleos vegetais, obtendo uma compatibilização das eficiências de aspiração, nebulização e transporte do aerossol dos diferentes tipos de microemulsões até a chama (etapa de introdução da amostra).

Dessa forma, torna-se possível a comparação de sinais analíticos obtidos para as soluções/microemulsões de referência utilizadas para a obtenção da curva analítica com aqueles obtidos para as amostras. Portanto, o processo consistiu na otimização de um

meio que simulasse a matriz da amostra, em termos de eficiência da etapa da introdução da amostra no espectrômetro de absorção atômica com chama.

Durante a otimização do procedimento de calibração, foi avaliada a utilização de quatro possíveis meios de referência:

- a) microemulsão denominada OM;
- b) microemulsão denominada OM+;
- c) solução de propanol acidificada, denominada PA;
- d) solução do branco, denominada BA.

Avaliando-se a utilização dos quatro possíveis meios de referência, buscou-se selecionar um deles para a preparação das soluções de referência de Fe, empregadas no processo de calibração do método analítico proposto, para a obtenção da curva analítica.

Para tanto, o meio de referência selecionado deve-se ajustar à matriz da amostra da melhor forma possível em termos de eficiência de formação do aerossol e transporte do analito até o sistema de atomização do espectrômetro de absorção atômica com chama, evitando-se variações nas taxas de aspiração e atomização. O preparo das microemulsões OM e OM+, bem como o preparo das soluções PA e BA foram previamente apresentados na Tabela 3.

Avaliou-se, primeiramente, a possibilidade da obtenção de microemulsões das amostras, preparadas com os óleos vegetais, e da obtenção de microemulsões de referência, preparadas com diferentes quantidades de óleo mineral leve (microemulsões OM e OM+), que possibilitassem obter as eficiências muito próximas de introdução do analito no sistema de atomização a partir da sua aspiração pelo espectrômetro de absorção atômica com chama. Para isso, iniciou-se a otimização do procedimento de calibração, avaliando-se a utilização das microemulsões OM e OM+.

4.3.1. Avaliação da estabilidade do sinal analítico para as microemulsões de óleo mineral leve

Em uma tentativa de obtenção de compatibilização entre as eficiências de introdução das microemulsões de óleos vegetais e de óleo mineral leve, foi avaliada a

utilização de duas microemulsões de óleo mineral (OM e OM+), preparadas mediante duas diferentes quantidades do referido óleo. Após o preparo das microemulsões, avaliou-se a obtenção de sinais de absorvância (sinal analítico) nos tempos de 4 h e 20 h para ambas as microemulsões contendo diferentes volumes de óleo mineral, as quais foram adicionadas de $0,500 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe. Os resultados obtidos dessa análise estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Intensidades de absorvância obtidos por F AAS para as microemulsões OM e OM+ adicionadas de $0,500 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe (média \pm desvio padrão; n = 3).

| Microemulsão* | Absorvância | RSD (%) | Intervalo de medida (h) |
|---------------|---------------------|---------|-------------------------|
| OM | $0,0396 \pm 0,0010$ | 2,5 | 4 |
| OM+ | $0,0409 \pm 0,0010$ | 2,4 | 4 |
| OM | $0,0413 \pm 0,0010$ | 2,4 | 20 |
| OM+ | $0,0286 \pm 0,0006$ | 2,1 | 20 |

* OM: microemulsão preparada com a adição de $250,0 \mu\text{L}$ de óleo mineral leve; OM+: microemulsão preparada com a adição de $350,0 \mu\text{L}$ de óleo mineral leve.

Foi realizada uma análise estatística para comparação dos resultados apresentados na Tabela 6, aplicando-se o teste t em um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), considerando-se que o desvio padrão populacional não é o mesmo para o conjunto de medidas (HARRIS, 2012). No nível de confiança considerado, não foi observada diferença significativa entre os sinais de absorvância médios obtidos para as microemulsões OM e OM+, quando preparadas e analisadas em um intervalo de 4 h. Por isso, pode-se dizer que apesar de serem constituídas por quantidades diferentes de óleo mineral leve, as duas diferentes microemulsões comportaram-se de forma semelhante no sistema de introdução de amostras do espectrômetro de absorção atômica com chama. Porém, quando preparadas e analisadas em um intervalo de 20 h, foi observada diferença significativa entre os valores médios de absorvância obtidos para as microemulsões OM e OM+. Pode-se observar que a microemulsão contendo $100,0 \mu\text{L}$ a mais de óleo mineral leve, OM+, não manteve sua estabilidade em termos de sinal analítico, em um período de 20 h. Já a microemulsão OM manteve a sua estabilidade durante esse mesmo período.

Mediante os resultados apresentados na Tabela 6, observou-se que a eficiência da introdução das microemulsões OM e OM+ contendo $0,500 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe, por aspiração contínua no espectrômetro de absorção atômica com chama, possibilitou a obtenção de uma mesma taxa de transporte do analito até o sistema de atomização (chama), devido à obtenção de médias significativamente iguais para as medidas de absorvância realizadas.

Desse modo, os experimentos realizados para otimização do procedimento de calibração externa, a ser empregado no método analítico proposto, passaram a ser realizados utilizando-se a microemulsão OM, por apresentar estabilidade em termos do sinal analítico, proporcionada, provavelmente devido à utilização em sua preparação de uma menor quantidade de óleo mineral e de agente tensoativo. Por consequência, é possível sugerir uma diminuição no custo da análise, devido a redução da quantidade dos referidos reagentes.

4.3.2. Avaliação do efeito dos diferentes meios de calibração para a obtenção da curva analítica

Uma vez descartada a microemulsão OM+, prosseguiu-se o estudo com vistas à otimização do procedimento de calibração para o método proposto, avaliando-se os demais meios que poderiam ser empregados como referência. Esses três meios foram: a) propanol acidificado (PA); b) branco analítico (BA); c) microemulsão OM.

Foram preparadas curvas analíticas para a determinação de Fe, obtidas com a utilização de soluções de referência preparadas nos meios da microemulsão OM, da solução PA e da solução BA. As sensibilidades de determinação do método analítico proposto, obtidas a partir de cada uma das três curvas analíticas mencionadas, foram comparadas às sensibilidades das curvas analíticas obtidas pelo método de adição de analito em meio de microemulsões das amostras de óleo bruto de canola, girassol, milho e de soja. Optou-se pela realização da comparação com as microemulsões dos óleos vegetais brutos, devido à sua maior complexidade, em termos de matriz, em relação aos óleos refinados.

Conforme anteriormente mencionado, as microemulsões mantiveram-se estáveis por um período de aproximadamente até 4h, após o seu preparo, e, por isso, as amostras foram preparadas e analisadas por F AAS, respeitando-se o referido tempo permitido para a análise.

As curvas analíticas foram obtidas utilizando-se soluções padrão de Fe preparadas nos possíveis meios de referência BA, OM e PA, mediante aplicação do procedimento de calibração externa (sem a adição de analito) e, também, do método de calibração de adição de analito. Os resultados obtidos referentes aos parâmetros analíticos de cada curva estão sendo apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para a determinação de Fe nas microemulsões de óleos vegetais brutos e de óleo mineral leve por F AAS, empregando-se o procedimento de calibração externa e o método de adição de analito.

| Meio | Método de calibração ^a | Equação de regressão linear ^b | RSD ^b ^c (%) | RSD ^a ^d (%) | r ^e |
|-------------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| Microemulsão OM | Sem adição de analito | $A = 0,0654.C + 0,0012$ | 2,3 | 33,3 | 0,9988 |
| BA ^f | Sem adição de analito | $A = 0,0654.C + 0,0005$ | 1,1 | 4,0 | 0,9998 |
| PA ^g | Sem adição de analito | $A = 0,0617.C + 0,0009$ | 2,0 | 88,9 | 0,9986 |
| Microemulsão Óleo de soja | Adição de analito | $A = 0,0741.C + 0,0106$ | 2,0 | 0,9 | 0,9993 |
| Microemulsão Óleo de milho | Adição de analito | $A = 0,0634.C + 0,0121$ | 3,8 | 3,3 | 0,9996 |
| Microemulsão Óleo de girassol | Adição de analito | $A = 0,0721.C + 0,0130$ | 1,7 | 8,6 | 0,9995 |
| Microemulsão Óleo de canola | Adição de analito | $A = 0,0713.C + 0,0021$ | 1,1 | 52,4 | 0,9995 |

^a Curvas analíticas obtidas com soluções padrão de Fe 0,100; 0,200; 0,500; 0,700 e 1,00 mg L⁻¹; ^b A = absorvância e C = concentração Fe (mg L⁻¹); ^c RSD do coeficiente angular da curva analítica; ^d RSD do coeficiente linear da curva analítica; ^e coeficiente de correlação da curva analítica; ^f branco analítico; ^g solução de propanol acidificado.

Mediante observação das curvas analíticas obtidas pelo método de calibração de adição de analito para todas as amostras de óleos vegetais brutos, verificou-se que as sensibilidades de determinação obtidas a partir das referidas curvas foram semelhantes entre si, considerando-se:

a) a aplicação do método analítico proposto em análises de rotina;

b) que as quatro curvas de calibração obtidas pelo método de adição de analito não foram obtidas em um mesmo momento, mas sim em tempos distintos em um período de dez dias;

c) que as quatro curvas foram obtidas utilizando-se microemulsões de óleos vegetais brutos, associados a matrizes relativamente complexas;

d) que as sensibilidades de determinação foram aceitáveis, obtendo-se um coeficiente de variação 6,7% entre elas.

Dessa forma, pode-se dizer que, em função da maior complexidade do óleo vegetal bruto utilizado para o estudo de comparação supracitado, os resultados obtidos podem ser extrapolados e considerados para a análise direta de microemulsões preparadas a partir de amostras de óleos relativamente menos complexas, tais como as de óleos vegetais refinados, independentemente da fonte vegetal considerada.

Mediante os resultados apresentados na Tabela 7, pode-se verificar que a inclinação (sensibilidade de determinação) da curva analítica obtida em meio da solução PA, constituída apenas por solução acidificada de 1-propanol, é menor em relação às sensibilidades obtidas a partir das curvas analíticas obtidas em meio da solução BA e da microemulsão OM, indicando possivelmente que a adição de surfactante eleva a sensibilidade de calibração. Este fato pode ser explicado em razão da diminuição da tensão superficial do meio, ocasionada pela adição do surfactante Triton[®] X-100, aumentando, assim, a eficiência de nebulização e transporte do líquido até o sistema de atomização (chama) do espectrômetro de absorção atômica. Dessa forma, descartou-se a possibilidade de utilizar a solução PA como solução de referência para preparação das soluções padrão da curva analítica.

Além disso, observando-se a Tabela 7, foi verificado que as sensibilidades de calibração das curvas analíticas preparadas empregando-se os meios de microemulsão OM e solução BA não se apresentaram estatisticamente diferentes, em um nível de

confiança de 95%, aplicando-se o teste t. Tal resultado indicou que a microemulsão OM comportou-se de forma semelhante à solução BA no sistema de introdução de amostras considerado.

Foi observado, também, que a repetibilidade das medidas obtidas para o primeiro ponto da curva analítica em meio da solução BA foi maior em relação à repetibilidade das medidas obtidas para o primeiro ponto da curva analítica em meio de microemulsão OM. Esses resultados podem ser observados pelos valores de RSD dos coeficientes lineares das curvas analíticas: 33,3% para o meio de microemulsão OM, e 4,0% para o meio de solução BA.

Com base nas observações acima e considerando-se que: a) a microemulsão OM é constituída de 250,0 μL de óleo mineral leve, 4,40 mL de 1-propanol, 250,0 μL de Triton[®] X-100 e 100,0 μL de solução de HNO_3 50% ($v v^{-1}$); b) a solução BA é constituída de 4,65 mL de 1-propanol, 250,0 μL de Triton[®] X-100 e 100,0 μL de solução de HNO_3 50% ($v v^{-1}$), pode-se considerar que a adição de óleo mineral leve para a preparação de microemulsões não dificulta a eficiência de aspiração e transporte do líquido até o sistema de atomização, pois a sensibilidade de determinação foi a mesma para as duas curvas analíticas obtidas em meio de solução BA e microemulsão OM, indicando que o aumento de viscosidade proveniente da adição de óleo é de magnitude proporcional à diminuição da viscosidade do sistema na formação de microemulsões. Portanto, a utilização da microemulsão OM como meio de referência do procedimento de calibração a ser empregado para a análise direta das amostras de óleos vegetais brutos e refinados na forma de microemulsões por F AAS pode ser descartada.

Em razão dos resultados apresentados na Tabela 7, portanto, selecionou-se a solução BA para ser o meio de referência para a preparação das soluções padrão a serem empregadas no procedimento de calibração externa, pelo fato de a sensibilidade (inclinação) da curva analítica obtida nesse meio ser próxima às sensibilidades das curvas obtidas pelo método de calibração por adição de analito para amostras de óleos vegetais.

Os coeficientes de variação entre as sensibilidades das curvas analíticas obtidas pelo método de adição de analito, comparado aos valores de sensibilidade para a curva analítica obtida em meio da solução BA, variaram de 2,2% a 8,8%. Já as razões entre as sensibilidades das curvas de calibração por adição de analito e a sensibilidade da curva de calibração normal (BA), variaram de 0,97 a 1,13.

Em análises de rotina, torna-se vantajosa a utilização de métodos analíticos que sejam rápidos, de fácil realização e de baixo custo relativo. Neste trabalho, além das amostras de óleos vegetais brutos e refinados terem sido analisadas diretamente na forma de microemulsões para a determinação de Fe, em concentrações relativamente baixas por F AAS, o método proposto permitiu a utilização do procedimento de calibração externa para a realização da calibração, empregando-se soluções de referência preparadas em meio da solução do branco analítico (BA). Isso contribui para uma simplificação do processo de calibração, conferindo-lhe maior praticidade e rapidez.

4.4. Validação do método analítico

4.4.1. Determinação dos Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ)

Os limites de detecção e de quantificação são figuras de mérito que fazem parte da caracterização de uma metodologia analítica (AMAIIS et al., 2012), e representam as concentrações mínimas de analito que podem ser detectadas e quantificadas, respectivamente, pelo método analítico.

Os valores de LOD e o LOQ determinados para o método analítico proposto foram de $0,020 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,066 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe em microemulsão, respectivamente, e de $0,4$ e $1,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de Fe em óleo, respectivamente.

Gonzálvez et al. (2010) desenvolveram um método para a determinação de Fe em amostras de óleos vegetais por ICP OES, utilizando a digestão ácida assistida por micro-ondas como procedimento de preparo de amostra, para o qual obtiveram um LOQ de $0,0079 \text{ mg L}^{-1}$, valor aproximadamente 10 vezes menor que o LOQ obtido pelo método proposto neste trabalho para a determinação de Fe, o qual foi de $0,066 \text{ mg L}^{-1}$.

Portanto, pode-se dizer que o método proposto pode ser empregado como uma alternativa viável e atrativa para a determinação de concentrações relativamente baixas de Fe, destacando-se a vantagem de envolver a aplicação de um procedimento de análise direta de amostras de óleos vegetais. Assim, elimina-se a necessidade de utilização de procedimentos de digestão, possibilitando a redução de processos de contaminação e de manipulação da amostra, bem como diminui-se o tempo de análise e de custos envolvidos na sua realização.

4.4.2. Experimentos de adição e recuperação (exatidão)

Para avaliar a exatidão do método analítico proposto e, também, a existência de interferências de matriz na determinação de Fe, microemulsões de amostras de óleos vegetais brutos e refinados de canola, girassol, milho e de soja foram enriquecidas com três níveis diferentes de concentrações de Fe iguais a 0,100 mg L⁻¹, 0,200 mg L⁻¹ e 0,500 mg L⁻¹.

As recuperações obtidas, apresentadas na Tabela 8, variaram de 84% a 105%, indicando ausência ou ocorrência de interferências de matriz dentro dos limites aceitáveis. A faixa aceitável de recuperações, quando o analito está presente em concentrações entre 0,1 mg L⁻¹ a 10,0 mg L⁻¹, é de 80% a 110%, definidos pelo manual de políticas e procedimentos da Association of Official Analytical Chemist (AOAC), Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures (1998) AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD.

Considerando-se que foram analisados óleos de diferentes fontes vegetais e, portanto, associados a matrizes relativamente distintas entre si, sob a mesma forma, e que as recuperações variaram de 84% a 105%, os resultados obtidos indicaram uma robustez relativa método analítico proposto.

Tabela 8. Experimentos de adição e recuperação realizados para microemulsões de óleos vegetais adicionadas de 0,100, 0,200 e 0,500 mg L⁻¹ de Fe, analisadas diretamente por F AAS (média ± desvio padrão; n = 3)

| Amostra | Adição de Fe, mg L ⁻¹ | | |
|---------------------------|----------------------------------|---------|---------|
| | 0,100 | 0,200 | 0,500 |
| Óleo bruto de soja | 89 ± 3 | 94 ± 2 | 91 ± 2 |
| Óleo bruto de milho | 90 ± 4 | 88 ± 3 | 84 ± 2 |
| Óleo bruto de girassol | 92 ± 1 | 92 ± 4 | 90 ± 2 |
| Óleo bruto de canola | 104 ± 2 | 100 ± 4 | 102 ± 1 |
| Óleo refinado de soja | 103 ± 3 | 96 ± 4 | 93 ± 3 |
| Óleo refinado de milho | 105 ± 6 | 98 ± 2 | 93 ± 2 |
| Óleo refinado de girassol | 99 ± 7 | 90 ± 4 | 95 ± 2 |
| Óleo refinado de canola | 101 ± 3 | 96 ± 5 | 101 ± 5 |

Observou-se que as recuperações obtidas para as adições de 0,200 mg L⁻¹ e 0,500 mg L⁻¹ de Fe em microemulsões de óleo bruto de milho foram as menores, sendo iguais a (88 ± 3) % e (84 ± 2) %, respectivamente. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de as microemulsões de óleo bruto de milho serem menos estáveis do que as demais microemulsões avaliadas, em termos de sinal analítico, considerando-se a adição de Fe em maiores concentrações, tal como sugerido na discussão realizada na seção 4.2 deste trabalho.

Partindo-se do princípio de que as amostras de óleos brutos são relativamente mais complexas em comparação às amostras de óleos refinados, e que o procedimento analítico proposto envolve a análise direta de amostras de óleos vegetais, sem a eliminação da matriz, pode-se considerar como analiticamente aceitáveis as menores recuperações de 84% e 88%, obtidas para as microemulsões de amostras de óleo bruto. Além disso, esses valores então contidos na faixa de recuperações aceitáveis, em função da quantidade de analito, de 80% a 110% (GONZÁLEZ; HERRADOR; ASUERO, 2010; MARTÍN-CAMEÁN et al., 2014).

Baseando-se nos resultados apresentados na Tabela 8, foi possível observar que os valores de recuperações para as adições de 0,10 mg L⁻¹ de Fe em microemulsões de óleo refinado de milho e soja, e de óleo bruto de canola, foram os maiores e iguais a 105 ± 6, 103 ± 3 e 104 ± 2, respectivamente. Possivelmente, as maiores recuperações citadas para o referido menor valor de adição de Fe podem estar ligadas ao fato de que as concentrações originais de Fe nas três amostras de óleos, que receberam as adições, apresentaram-se abaixo do LOQ do método proposto. Também, a própria adição de 0,100 mg L⁻¹ de Fe estava associada a uma concentração muito próxima ao LOQ, contribuindo, dessa forma, para a obtenção de resultados relativamente menos exatos, porém, aceitáveis do ponto de vista analítico. Supracitado, foram associadas a resultados exatos, as recuperações entre 80% e 110%.

4.5. Determinação de Fe em amostras de óleos vegetais na forma de microemulsões por F AAS

O método analítico proposto para a análise direta de amostras de óleos vegetais na forma de microemulsões para a determinação de Fe foi aplicado para a análise de amostras de óleos brutos e refinados de canola, girassol, milho e soja, de um mesmo lote de processamento industrial, ou seja, foram determinadas as quantidades de Fe nesses óleos antes e após o seu processo de refinamento. Também foram determinadas as concentrações de Fe em amostras de óleo refinado de algodão, azeite de oliva refinado, dois tipos de azeites de oliva extravirgens e em óleo composto refinado (85% de soja e 15% de azeite de oliva), todos adquiridos no comércio da cidade de Maringá, Paraná. Os resultados obtidos estão sendo apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Análise direta de amostras de óleos vegetais na forma de microemulsões para a determinação de Fe por F AAS (média \pm desvio padrão; n = 3).

| Amostra | Fe (mg kg ⁻¹) | RSD (%) |
|-------------------------------|---------------------------|---------|
| Óleo bruto de soja | 2,72 \pm 0,05 | 1,8 |
| Óleo bruto de milho | 3,74 \pm 0,11 | 2,9 |
| Óleo bruto de girassol | 3,67 \pm 0,19 | 5,2 |
| Óleo bruto de canola | < LOQ | - |
| Óleo refinado de soja | < LOQ | - |
| Óleo refinado de milho | < LOQ | - |
| Óleo refinado de girassol | < LOQ | - |
| Óleo refinado de canola | < LOQ | - |
| Óleo refinado de algodão | < LOQ | - |
| Azeite de oliva refinado | < LOQ | - |
| Azeite de oliva extravirgem 1 | < LOQ | - |
| Azeite de oliva extravirgem 2 | < LOQ | - |

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 9), foi possível realizar a determinação de Fe apenas em óleos brutos de soja, milho e girassol. Nestes três óleos, foram reduzidas as quantidades de Fe após o processo industrial de refinamento, tendo em vista que as concentrações de Fe nos óleos refinados de girassol, milho e soja, foram menores do que o LOQ determinado para o método proposto. Isso permite dizer que o processo de refinamento dos óleos em escala industrial que deu origem aos óleos

analisados, foi eficaz na remoção de Fe, cujos íons metálicos provocam a diminuição da estabilidade oxidativa de óleos.

O RSD que representa a repetibilidade das medidas realizadas por F AAS, em amostras de óleos vegetais introduzidos sob a forma de microemulsões, variou de 1,8% a 5,2%. A faixa de valores de RSD determinada neste trabalho foi semelhante à faixa de precisões determinada em método proposto por Nunes et al. (2011), cujos valores variaram de 6% a 8%. O método proposto por Nunes et al. (2011) também utilizou o preparo de amostras na forma de microemulsões, porém as determinações de Fe foram realizadas pela técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS F AAS).

Para as demais amostras analisadas na forma de microemulsões (Tabela 9), a concentração de Fe apresentou-se abaixo do LOQ determinado para o método proposto neste trabalho, não podendo, portanto, ser quantificada.

5. Conclusões

A utilização do método analítico proposto para a análise direta de amostras de óleos vegetais brutos e refinados na forma de microemulsões para a determinação de Fe por F AAS possibilita a minimização da quantidade de reagentes utilizada para a realização das análises, como também envolve a utilização de equipamento mais simples para a preparação das microemulsões (apenas um agitador do tipo vórtex), em comparação a outros métodos analíticos, os quais fazem o uso de equipamentos de maior custo e/ou mais sofisticados para os procedimentos de digestão das amostras.

Por ser um método simples, rápido e de relativo baixo custo, o método proposto de análise direta é viável para ser utilizado em análises de rotina, como em análises de controle de qualidade de óleos vegetais, respeitando-se o tempo de estabilidade das microemulsões das amostras, de 3 h.

Os experimentos de recuperação realizados possibilitaram a obtenção de valores que variaram de 84% a 105%. Desta forma, o método analítico proposto é adequado para determinações de Fe com exatidões aceitáveis. Por se tratar de um método de análise direta de amostras complexas, para a quantificação de Fe em nível traço, seu emprego torna-se vantajoso, por aliar menores custos, praticidade e exatidão adequados.

Por fim, os LOD e LOQ obtidos para o método analítico proposto por este estudo foram de $0,020 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,066 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe em microemulsão, respectivamente, e de $0,4$ e $1,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de Fe em óleo, respectivamente. A linearidade do método apresentou-se em uma faixa relativamente ampla de concentrações, variando de $0,066 \text{ mg L}^{-1}$ a $8,00 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe nas microemulsões.

6. Referências

- ACAR, O. Evaluation of cadmium, lead, copper, iron and zinc in Turkish dietary vegetable oils and olives using electrothermal and flame atomic absorption spectrometry. **Grasas y Aceites**, v. 63, n. 4, p. 383-393, 2012.
- AMAI, R. S.; GARCIA, E. E.; MONTEIRO, M. R.; NÓBREGA, J. A. Determination of Ca, Mg, and Zn in biodiesel microemulsions by FAAS using discrete nebulization. **Fuel**, v. 93, p. 167-171, 2012.
- ANTHEMIDIS, A. N.; ARVANITIDIS, V.; STRATIS, J. A. On-line emulsion formation and multi-element analysis of edible oils by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 537, p. 271-278, 2005.
- ANWAR, F.; KAZI, T. G.; SALEEM, R.; BHANGER, M. I. Rapid determination of some trace metals in several oils and fats. **Grasas y Aceites**, v. 55, n. 2, p. 160-168, 2004.
- AUCÉLIO, R. Q.; DOYLE, A.; PIZZORNO, B. S.; TRISTÃO, M. L. B.; CAMPOS, R. C. Electrothermal atomic absorption spectrometric method for the determination of vanadium in diesel and asphaltene prepared as detergentless microemulsions. *Microchemical Journal*, v. 78, p. 21-26, 2004
- AOAC. **Peer-verified methods program, manual on policies and procedures**. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, 1998.
- BAKIRCIOGLU, D.; KURTULUS, Y. B.; YURTSEVER, S. Comparison of extraction induced by emulsion breaking, ultrasonic extraction and wet digestion procedures for determination of metals in edible oil samples in Turkey using ICP-OES. **Food Chemistry**, v. 138, p. 770-775, 2013.
- BAKIRCIOGLU, D.; TOPRAKSEVER, N.; KURTULUS, Y. B. Determination of zinc in edible oils by flow injection FAAS after extraction induced by emulsion breaking procedure. **Food Chemistry**, v. 151, p. 219-224, 2014.
- BARAN, E. K.; YAŞAR, S. B. Determination of iron in edible oil by FAAS after extraction with a schiff base. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 528-534, 2013.
- BARAN, E. K.; YAŞAR, S. B. Zinc and nickel determination in liquid edible oils by FAAS after the extraction. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, p. 1320-1326, 2012.
- BENINCASA, C.; LEWIS, J.; PERRI, E.; SINDONA, G.; TAGARELLI, A. Determination of trace element in Italian virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, p. 366-370, 2007.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a2190900474588939242d63fbc4c6735/RDC_482_1999.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 28/01/2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 49, de 22 de dezembro de 2006.

BULDINI, P. L.; FERRI, D.; SHARMA, J. L. Determination of some inorganic species in edible vegetable oils and fats by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 789, p. 549-555, 1997.

BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M. Analytical applications of emulsions and microemulsions. **Talanta**, v. 96, p. 11-20, 2012.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, p. 125-155, 2004.

CASTILLO, J. R.; JIMÉNEZ, M. S.; EBDON, L. Semiquantitative simultaneous determination of metals in olive oil using direct emulsion nebulization. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, p. 1515-1518, 1999.

CESUR, H.; BATI, B. Solid-phase extraction of copper with lead 4-benzylpiperidinedithiocarbamate on microcrystalline naphthalene and its spectrophotometric determination. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 26, p. 599-605, 2002.

CHAVES, E. S.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C. de; CURTIUS, A. J.; VANHAECKE, F. Determination of trace elements in biodiesel and vegetable oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry following alcohol dilution. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 66, p. 73-79, 2011.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 169-186, 2006.

CINDRIC, I. J.; ZEINER, M.; STEFFAN, I. Trace elemental characterization of edible oils by ICP-AES and GF AAS. **Microchemical Journal**, v. 85, p. 136-139, 2007.

Codex Alimentarius Commission. **Alinorm 03/17**: Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Sixth Session, Rome, Italy, 30 June – 7 July, 2003.

CUNHA, F. A. S.; SOUSA, R. A.; HARDING, D. P.; CADORE, S.; ALMEIDA, L. F. Automatic microemulsion preparation for metals determination in fuel samples using a flow-batch analyzer and graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 727, p. 34-40, 2012.

DALTIN, D. Tensoativos: química, propriedades e aplicações. São Paulo: **Blucher**, 2011. 327p.

DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n.1, p. 9-18, 2011.

DÍAZ, T. G.; GUIBERTEAU, A.; SOTO, M. D. L.; ORTIZ, J. M. Spectrophotometric and adsorptive stripping square wave voltammetric determination of iron in olive oils, as complex with 5,5-dimethylcyclohexane-1,2,3-trione 1,2-dioxime 3-thiosemicarbazone (DCDT). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3743-3747, 2003.

GARRIDO, M. D.; FRIAS, I.; DIAZ, C.; HARDISSON, A. Concentrations of metals in vegetable edible oils. **Food Chemistry**, v. 50, p. 237-243, 1994.

GHAZANI, S. M.; MARANGONI, A. G. Minor components in canola oil and effects of refining on these constituents: a review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, p. 923-932, 2013.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards. **Talanta**, v. 82, p. 1995-1998, 2010.

GONZÁLVEZ, A.; GHANJAOU, M. E.; RHAZI, M. E.; GUARDIA, M. de la. Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy determination of trace element composition of argan oil. **Food Science and Technology International**, v. 16, n. 1, p. 65-71, 2010.

HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*, 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 920p.

HE, Y.; CHEN, J.; ZHOU, Y.; WANG, X.; LIU, X. Extraction induced by emulsion breaking for trace multi-element determination in edible vegetable oils by ICP-MS. **Analytical Methods**, v. 6, p. 5105-5111, 2014.

JESUS, A. de. **Desenvolvimento de método analítico para a determinação de metais em biodiesel e óleos vegetais por espectrometria de absorção atômica com chama**. 2008. 49f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

JORGE, N. **Química e tecnologia de óleos vegetais**. São Paulo: Cultura Acadêmica: Universidade Estadual Paulista, 2009, 165 p.

JURANOVIC, I.; BREINHOELDER, P.; STEFFAN, I. Determination of trace elements in pumpkin seed oils and pumpkin seeds by ICP-AES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 18, p. 54-58, 2003.

KRUG, F. J. Erros sistemáticos no preparo de amostras. In: KRUG, F. J. (Ed). **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1. Ed. rev. Piracicaba, 2010.

KUCUKKOLBASI, S.; TEMUR, O.; KARA, H.; KHASKHELI, A. R. Monitoring of Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II) during refining of some vegetable oils using differential pulse anodic stripping voltammetry. **Food Analytical Methods**, v. 7, p. 872-878, 2014.

LEGLLI, C. V. S.; BOHRER, D.; NASCIMENTO, P.C. do; CARVALHO, L. M. de. Flame and graphite furnace atomic absorption spectrometry for trace element determination in vegetable oils, margarine and butter after sample emulsification. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 5, p. 640-648, 2011.

LEITE, C. C.; ZMOZINSK, A. V.; VALE, M. G. R.; SILVA, M. M. Determination of Fe, Cr and Cu in used lubricating oils by ET AAS using a microemulsion process for sample preparation. **Analytical Methods**, v. 7, p. 3363-3371, 2015.

LEONARDIS, A. de; MACCIOLA, V.; FELICE, M. de. Copper and iron determination in edible vegetable oils by graphite furnace atomic absorption spectrometry after extraction with diluted nitric acid. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 371-375, 2000.

LEPRI, F. G.; CHAVES, E. S.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S.; CURTIUS, A. J.; OLIVEIRA, L. C. C. de; CAMPOS, R. C. de. Determination of trace elements in

vegetable oils and biodiesel by atomic spectrometric techniques—a review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 46, p.175-206, 2011.

LIMA, A. S.; SILVA, D. G.; TEIXEIRA, L. S. G. Determination of cadmium in biodiesel using microemulsion and electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 4122, p. 1-8, 2015.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; ORTEGA-BARRALES, P.; FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA, M. L.; DOMÍNGUEZ-VIDAL, A.; RUIZ-MEDINA, A. Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1257-1262, 2011.

LYRA, F. H.; CARNEIRO, M. T. W. D.; BRANDÃO, G. P.; PESSOA, H. M.; CASTRO, E. V. de. Determination of Na, K, Ca and Mg in biodiesel samples by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) using microemulsion as sample preparation. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 180-185, 2010.

MARTÍN-CAMEÁN, A.; JOS, A.; CALLEJA, A.; GIL F.; IGLESIAS-LINARES, A.; SOLANO, E.; CAMEÁN, A. M. Development and validation of an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method for the determination of cobalt, chromium, copper and nickel in oral mucosa cells. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 73-79, 2014.

MANDARINO, J. M. G.; ROESSING, A. C. **Tecnologia para produção do óleo de soja**: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos. Londrina: Embrapa, 2001.

MELO, M. A. M. F. **Avaliação das propriedades de óleos vegetais visando a produção de biodiesel**. 2010. 114f. Dissertação (Mestrado em Química) — Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Codex Alimentarius**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/internacional/negociacoes/multilaterais/codex-alimentarius>>. Acesso em: 19 set. 2015.

MURILLO, M.; BENZO, Z.; MARCANO, E.; GOMEZ, C. GARABOTO, A.; MARINA, C. Determination of copper, iron and nickel in edible oils using emulsified solutions by ICP-AES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, p. 815-820, 1999.

NUNES, S. P. Produção e consumo de óleos vegetais no Brasil. **Deser – Departamento de Estudos Sócio-Econômicos Rurais**. Boletim Eletrônico. Conjuntura Agrícola, n. 159, jun./2007. Disponível em:

<<http://www.deser.org.br/documentos/doc/Produ%20e%20consumo%20de%20%C3%93leos%20vegetais.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2016.

NUNES, L. S.; BARBOSA, J. T. P.; FERNANDES, A. P.; LEMOS, V. A.; SANTOS, W. N. L. dos; KORN, M. G. A.; TEIXEIRA, L. C. G. Multi-element determination of Cu, Fe, Ni and Zn content in vegetable oils samples by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry and microemulsion sample preparation. **Food Chemistry**, v. 127, p. 780-783, 2011.

PEHLIVAN, E.; ARSLAN, G.; GODE, F.; ALTUN, T.; ÖZCAN, M. M. Determination of some inorganic metals in edible vegetable oils by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). **Grasas Y Aceites**, v. 53, n. 3, p. 239-244, 2008.

PINTO, P. C. A. G.; SARAIVA, L. M. F. S.; LIMA, J. L. F. C. A flow sampling strategy for the analysis of oil samples without pre-treatment in a sequential injection analysis system. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, p. 377-383, 2006.

POLVILLO, M. M.; ALBI, T.; GUINDA, A. Determination of trace elements in edible vegetable oils by atomic absorption spectrophotometry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 4, p. 347-353, 1994.

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. A química dos óleos e gorduras e seus processos de extração e refino. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 2-15, 2012.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006

SALAGER, J.; ANTÓN, R. E.; SABATINI, D. A.; HARWELL, J. H.; ACOSTA, E. J.; TOLOSA, L. I. Enhancing solubilization in microemulsions - state of the art and current trends. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 8, n. 1, p. 3-21, January, 2005.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental, 5. ed. Porto Alegre: **Bookman**, 2002. 628p.

SOUZA, R. M. de; MELIANDE, A. L. S.; SILVEIRA, C. L. P. da; AUCÉLIO, R. Q. Determination of Mo, Zn, Cd, Ti, Ni, V, Fe, Mn, Cr and Co in crude oil using inductively coupled plasma optical emission spectrometry and sample introduction as detergentless microemulsions. **Microchemical Journal**, v. 82, p. 137-141, 2006.

TENJARLA, S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 16, n. 5, p. 461-521, 1999.

TOKAY, F.; BAĞDAT, S. Determination of iron and copper in edible oils by flame atomic absorption spectrometry after liquid-liquid extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 92, p. 317-322, 2015.

TRINDADE, A. S. N.; DANTAS, A. F.; LIMA, D. C. FERREIRA, S. L. C.; TEIXEIRA, L. S. G. Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction for determination of Cu, Fe, Ni and Zn in vegetable oils by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 185, p. 145-150, 2015.