



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Fabiana Luvizon

Aplicação de solventes eutéticos profundos para extração de metais em amostras biológicas – Uma alternativa ambientalmente amigável para determinação de cádmio e chumbo por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite

Florianópolis
2022

Fabiana Luvizon

Aplicação de solventes eutéticos profundos para extração de metais em amostras biológicas – Uma alternativa ambientalmente amigável para determinação de cádmio e chumbo por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo S. Chaves

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Luvizon, Fabiana

Aplicação de solventes eutéticos profundos para extração de metais em amostras biológicas - Uma alternativa ambientalmente amigável para determinação de cádmio e chumbo por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite / Fabiana Luvizon ; orientador, Eduardo S. Chaves, 2022.

79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Química. 2. Solvente eutético profundo. 3. Cádmio. 4. Chumbo. 5. Química Verde. I. S. Chaves, Eduardo . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Química. III. Título.

Fabiana Luvizon

Aplicação de solventes eutéticos profundos para extração de metais em amostras biológicas – Uma alternativa ambientalmente amigável para determinação de cádmio e chumbo por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Dr^a. Vanessa Egéa dos Anjos
Universidade Estadual de Ponta-Grossa

Prof. Dr. Luciano Vitali
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Química Analítica.



Documento assinado digitalmente
Giovanni Finoto Caramori
Data: 25/04/2022 12:58:27-0300
CPF: 280.927.338-30
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química



Documento assinado digitalmente
Eduardo Sidinei Chaves
Data: 22/04/2022 14:31:39-0300
CPF: 004.185.439-09
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Eduardo S. Chaves
Orientador

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado à minha família que tornou tal realização possível, amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela minha vida e pelas minhas oportunidades.

Agradeço imensamente à minha família, que me acompanhou nesta jornada cheia de dificuldades e empecilhos em meio a uma pandemia, que sempre me incentivou, encorajou e me deu todo suporte necessário para concluir mais esta etapa. Em especial, agradeço minha mãe, Fátima Pinheiro, por sempre me ouvir, aconselhar e, principalmente, por ser minha maior fonte de inspiração. Amo vocês mais que tudo!

Agradeço ao meu noivo, Bernardo Germer, por ter estado ao meu lado nessa caminhada, afinal, se não fosse pela realização deste trabalho, não teríamos nos conhecido. Agradeço pela sua paciência, auxílio, conselhos, encorajamento, força, caronas e suporte em todos os momentos que precisei de força e que pensei em desistir, amo você!

Agradeço também ao meu orientador e amigo, professor Eduardo, que sempre me encorajou, incentivou e me apoiou para chegar até aqui. Tenho certeza que se não fosse a positividade e auxílio dele, não chegaria até aqui em meio a este caminho que foi tão turbulento. Admiro sua pessoa profissional e também pessoal, obrigada pela amizade acima de tudo!

Agradeço pelo colegas e amigos que o grupo LEMA/LARES me proporcionou, por todo o companheirismo e trocas de conhecimentos, aos meus amigos e demais familiares por todo incentivo e conselhos, vocês fazem a diferença sempre!

Gostaria também de agradecer à UFSC pela oportunidade, à CAPES pelo auxílio financeiro e à todos os demais professores e colegas do programa que de alguma forma fazem parte desta conquista.

Não sou muito boa com as palavras, mas gostaria que todos que, de alguma forma, fizeram parte desta jornada soubessem que sou grata por ter pessoas maravilhosas ao meu lado. Obrigada por tudo!

“Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como você o encara é que faz a diferença.” (Franklin, Benjamin)

RESUMO

Os Solventes Eutéticos Profundos (DESs) e Solventes Eutéticos Profundos Naturais (NADESs) apresentam ampla aplicação, inclusive em processos de extração, e atendem a grande maioria dos princípios da Química Verde e da Química Analítica Verde. Estes solventes são obtidos por meio de uma síntese simples, rápida e com baixo custo energético. Adicionalmente, os DES e NADES podem apresentar alta compatibilidade para análises com diferentes técnicas analíticas, incluindo a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS). Nesse sentido, a determinação de metais após extração com DES/NADES por técnicas espectrométricas é uma alternativa conexa com os princípios da GC. O presente trabalho propõe a investigação de três diferentes DESs, derivados do cloreto de colina, variando a combinação e a razão molar dos reagentes aceptores e doadores de hidrogênio, para extração de Cd e Pb em amostras biológicas e posterior determinação por GF AAS. O DES formado por cloreto de colina e ácido oxálico (ChCl:Ox) na proporção 1:1 apresentou a melhor eficiência de extração dos analitos. Este foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho (IV), calorimetria exploratória diferencial e densidade. No programa de temperaturas otimizado, foram utilizadas temperaturas de pirólise iguais a 600 e 900 °C e atomização de 1900 e 2100 °C, para Cd e Pb, respectivamente, usando 15 µg de Pd como modificador químico em solução. A extração foi realizada com 40 mg de amostra, 400 µL de DES, submetidos ao aquecimento a 95 ± 5 °C por 30 min, posteriormente as amostras foram diluídas e a concentração dos analitos determinada por GF AAS. Os limites de detecção obtidos foram de 0,002 µg g⁻¹ e 0,041 µg g⁻¹, para o Cd e Pb, respectivamente, os limites de quantificação obtidos foram de 0,006 µg g⁻¹ para o Cd e 0,125 µg g⁻¹ para o Pb. A exatidão do método foi avaliada por meio da análise das amostras de referência, na condição otimizada, a extração dos analitos apresentou uma recuperação entre 58-68 % para o Cd e 91-110 % para o Pb. O método foi avaliado, do ponto de vista da química verde através da aplicação das métricas estrela verde e eco-escala. Embora o método não tenha apresentado valores de recuperações aceitáveis para Cd, o mesmo apresentou potencial para extração e determinação de Pb em amostras biológicas e vai ao encontro dos princípios de uma química ambientalmente amigável.

Palavras-chave: Solventes Eutéticos Profundos, Cádmio, Chumbo, Química Verde.

ABSTRACT

Deep eutectic solvents (DES) and natural deep eutectic solvents (NADES) have wide application, including in extraction processes, and meet the majority of Green Chemistry (GC) and Green Analytical Chemistry (GAC) principles. These solvents are obtained through a simple, fast and low-cost energy synthesis. Additionally, DES and NADES are highly compatible with different analytical techniques, including graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS). In this sense, the determination of metals after extraction with DES/NADES by spectrometric techniques is an alternative connected with the principles of GC. The present work proposes the investigation of three different DESs derivatives from choline chloride, varying the combination and molar ratio of the hydrogen acceptor and donor reagents, for the extraction of Cd and Pb in biological samples and subsequent determination by GF AAS. The DES formed by choline chloride and oxalic acid (ChCl:Ox) in the 1:1 molar ratio showed the best efficiency of analyte extraction. It was characterized by infrared spectroscopy (IR), differential scanning calorimetry (DSC) and density. In the optimized temperature program, pyrolysis temperatures of 600 and 900 °C and atomization of 1900 and 2100 °C were used for Cd and Pb, respectively, using Pd 15 µg as modifier in solution. The extraction was performed with 40 mg of sample, 400 µL of DES, heated at 95 ± 5 °C for 30 min, then the samples were diluted, and the analytes determined by GF AAS. The detection limits obtained were $0,002 \mu\text{g g}^{-1}$ and $0,041 \mu\text{g g}^{-1}$ for Cd and Pb, respectively, the quantification limits obtained were $0,006 \mu\text{g g}^{-1}$ for Cd and $0,125 \mu\text{g g}^{-1}$ for Pb. The accuracy of the method was evaluated through the analysis of the reference samples, in the optimized condition, the extraction of the analytes showed a recovery between 58-68 % for Cd and 91-110 % for Pb. The method was evaluated, from the point of view of GC, through the application of green star and eco-scale metrics. Although the method did not show acceptable recovery values for Cd, it showed potential for extractions of Pb in biological samples and meets the principles of an environmentally friendly chemistry.

Keywords: Deep Eutectic Solvents, Cadmium, Lead, Green Chemistry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exemplos de compostos químicos que podem ser utilizados na síntese de DES. (A) compostos que podem ser utilizados como doadores de hidrogênio e (B) compostos que podem ser utilizados como aceptores de hidrogênio.	18
Figura 2- Diagrama de fases sólido-líquido para uma mistura binária entre um sal e um composto doador de hidrogênios (HBD) que representam a formação de um DES. T _m representa o ponto de fusão.	19
Figura 3- Número de trabalhos publicados em relação ao ano de publicação em relação a diferentes filtros aplicados de forma acumulativa. Os filtros aplicados foram (A) DES*, (B) DES em química analítica, (C) aplicações de DES em extrações na área de química analítica e (D) aplicações de DES em extrações de metais em química analítica.	16
Figura 4- Representação dos DESs sintetizados pela mistura de (A) ChCl: U, (B) ChCl: Ox e (C) ChCl: La, em quatro razões molares distintas.	27
Figura 5. Extração de (A) Cd e (B) Pb a partir de 20 mg de amostra de rim de porco (BCR 186), 500 µL do respectivo DES, submetido à uma hora de aquecimento em 95 ± 5°C.	29
Figura 6- Espectro de infravermelho obtido para o (—) DES- ChCl:Ox (1:1), (—) Cloreto de colina (ChCl) e (—) Ácido oxálico (Ox).	31
Figura 7. Curvas de pirólise e atomização para solução aquosa (-▲-), solução aquosa e DES (-●-) e solução aquosa, DES e extrato (-■-), para concentrações de (A) 4 µg L ⁻¹ de Cd e 15 µg de Pd, temperatura atomização para curva de pirólise 1800 °C. Temperatura de pirólise para curva de atomização 600 °C e (B) 40 µg L ⁻¹ de Pb e 15 µg de Pd. Temperatura atomização para curva de pirólise 2100 °C. Temperatura de pirólise para curva de atomização 800 °C.	35
Figura 8. Gráfico de Pareto das variáveis analisadas pelo planejamento 2 ³ para 95 % de confiança.	38
Figura 9. Superfícies de resposta- múltipla resposta. Planejamento 2 ³ (A) Tempo de Ultrassom versus Volume de DES (B) Temperatura versus Tempo de Ultrassom (C) Volume de DES versus Temperatura.	39
Figura 10. Otimização tempo de extração de Cd e Pb a partir de 40 mg de amostra de rim de porco. Condições de extração: 400 µL do DES ChCl: Ox (1:1), temperatura de	

aquecimento $95 \pm 5^\circ\text{C}$. Cd - Pirólise 600°C e atomização do Cd 1900°C , Pb – Pirólise 900°C e atomização 2100°C41

Figura 11. Estrela Verde (EV) obtida a partir da análise da síntese do DES utilizado na metodologia proposta, as ponta representam os princípios da química verde.46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação das propriedades físico-químicas dos DESs com a variação da temperatura, para o DES de cloreto de colina (ChCl) (HBA) e ácido oxálico (HBD) (1:1).....	20
Tabela 2. Aplicações de diferentes DESs, e NADESs em matrizes diversas, na área de química analítica envolvendo quantificação de compostos inorgânicos. Valores de LOD apresentados na respectiva ordem pela qual os analitos estão representados.	15
Tabela 3. Relação das razões molares de HBDs que foram estudadas em relação ao ChCl (HBA) e listagem das temperaturas de fusão dos HBDs.....	22
Tabela 4. Variáveis e níveis avaliados no planejamento 2^3	24
Tabela 5. Programa de temperatura otimizado para Cd por GF AAS.	25
Tabela 6. Programa de temperatura otimizado para Pb por GF AAS.	25
Tabela 7. Avaliação da técnica de calibração para determinação de Cd e Pb por GF AAS após extração com DES.....	36
Tabela 8. Experimentos do planejamento fatorial 2^3 , com as variáveis codificadas, reais e múltipla resposta para extração de Cd e Pb em amostras biológicas.	37
Tabela 10. Figuras de mérito para determinação de Cd e Pb por GF AAS, utilizando Pd como modificador, calibração externa com padrões aquosos. (R= coeficiente de correlação linear; LOD= limite de detecção; LOQ= limite de quantificação; RSD= desvio padrão relativo).	42
Tabela 11. Concentrações certificadas, determinadas de Cd e porcentagem de recuperação, em quatro diferentes amostras de referência certificadas.	43
Tabela 12. Concentrações certificadas, determinadas de Pb e porcentagem de recuperação, em quatro diferentes amostras de referência certificadas.	43
Tabela 13. Atribuição de pontos de penalidade para obtenção da pontuação da eco-escala para a metodologia proposta.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- DES - Solvente Eutético Profundo (*Deep Eutectic Solvent*);
- LI's - Líquidos Iônicos;
- NADES - Solvente Eutético Profundo Natural (*Natural Deep Eutectic Solvent*);
- HBD - Doador de Hidrogênio (*Hydrogen Bond Donor*);
- HBA - Aceptores de Hidrogênio (*Hydrogen Bond Acceptor*);
- DLLME - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*);
- RP-DLLME - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva em Fase Reversa (*Reverse Phase Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*);
- HLLME - Microextração Líquido-Líquido Homogênea (*Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction*);
- LPME - Microextração em Fase Líquida (*Liquid Phase Microextraction*);
- LLE - Extração Líquido-Líquido (*Liquid-liquid extraction*);
- UA - Assistido por Ultrassom (*Ultrasound-Assisted*);
- VA - Assistido por Vórtex (*Vortex-Assisted*);
- MAE - Extração assistida por micro-ondas (*microwave-assisted extraction*);
- TMAH - Hidróxido de tetrametilamônio (*tetramethylammonium hydroxide*)
- UV-VIS - Ultravioleta Visível (*Ultraviolet-Visible*);
- AAS - Espectrometria de Absorção Atômica (*Atomic Absorption Spectrometry*);
- F AAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (*Flame Atomic Absorption Spectrometry*);
- GF AAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (*Graphite furnace Atomic Absorption Spectrometry*);
- HG-AAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos (*Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*);
- ET AAS- Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (*Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry*);
- HR-CS AAS - Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (*High Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*)
- HR-CS MAS - Espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua (*High Resolution Continuum Source Molecular Absorption Spectrometry*)

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*);

ICP-MS - Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

ICP OES - Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (*Inductively Coupled Plasma- Optical Emission Spectrometry*)

ChCl - Cloreto de colina;

La - Ácido láctico;

Ox - Ácido oxálico;

TAC - Cloreto de trioctilmetilamônio;

BE - Butil 4- hidroxibenzoato;

TDP - Cloreto de trihexil-tetradecil fosfônio (*Trihexyl(tetradecyl)phosphonium chloride*);

TIO - Ácido tioasalicílico;

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimetry*); GC - Química Verde (*Green Chemistry*)

GAC - Química Analítica Verde (*Green Analytical Chemistry*)

EV - Estrela Verde

IPE - Índice de Preenchimento de Estrela

LOQ - limite de quantificação (*Limit of Quantification*)

LOD - Limite de detecção (*Limit of Determination*)

EPA - Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO (DES) E SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO NATURAL (NADES).....	17
2.1.1	Propriedades e síntese	17
2.1.2	Aplicações dos DESs e NADESs	15
2.2	DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	15
2.2.1	Espectrometria de Absorção Atômica	16
2.3	QUÍMICA VERDE	18
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVO GERAL.....	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4	EXPERIMENTAL	21
4.1	INSTRUMENTAÇÃO.....	21
4.2	REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS.....	21
4.3	PROCEDIMENTOS	22
4.3.1	Síntese dos DESs	22
4.3.2	Caracterização	22
4.3.3	Otimização da extração	23
4.3.3.1	<i>Otimização multivariada</i>	23
4.3.4	Determinação da concentração de Cd e Pb	24
4.3.5	Avaliação da verdura química	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
5.1	SÍNTESES DOS DESs	26
5.2	AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO COM DIFERENTES DESs.....	28

5.3	CARACTERIZAÇÃO DO DES CHCL:OX	30
5.4	CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS E DE EXTRAÇÃO	32
5.4.1	Curvas de pirólise e atomização	32
5.4.2	Curvas de calibração	36
5.4.3	Otimização multivariada da extração	36
5.4.4	Otimização do tempo de aquecimento	40
5.5	FIGURAS DE MÉRITO	41
5.6	VERIFICAÇÃO DA EXATIDÃO	43
6	ANÁLISE DA VERDURA QUÍMICA	44
6.1	ESTRELA VERDE	45
6.2	ECO-ESCALA	46
7	CONCLUSÃO.....	48
8	PERSPECTIVAS	48
9	REFERÊNCIAS.....	50
ANEXOS	57
APÊNDICES.....	63

1 INTRODUÇÃO

A crescente problemática ambiental, tais como aumento de gases poluentes, geração de resíduos em larga escala e altos riscos à saúde humana mantém a química no foco de mídias nacionais e internacionais, por ser a esta atribuída responsabilidade. Embora a química também seja utilizada como solução para diversos outros danos e alternativas para melhor uso de bens de consumo, uma visão negativa desta, muitas vezes é difundida erroneamente ofuscando seus benefícios. Nesta perspectiva, como forma de minimizar os danos causados por processos químicos, governos começaram a desenvolver programas de incentivo e reconhecimento para o desenvolvimento de processos menos agressivos, tanto para o meio ambiente, quanto para a saúde do operador.

Neste sentido, a busca por alternativas para metodologias tradicionais tornou-se foco de pesquisa e dentre estas, passou-se a buscar alternativas mais ambientalmente amigáveis para os solventes orgânicos voláteis convencionais, que apresentam alta toxicidade e são utilizados nas mais diversas áreas da química. Em um primeiro momento, os Líquidos Iônicos (ILs, *Ionic Liquids*) ganharam destaque e mostraram potencial para diversas aplicações. Posteriormente, passaram a dividir o espaço com uma nova classe de solventes denominadas Solventes Eutéticos Profundos (DESs, *Deep Eutectic Solvents*) ou ainda, Solventes Eutéticos Profundos Naturais (NADESs, *Natural Deep Eutectic Solvents*), que pertencem a mesma classe de solventes, porém são sintetizados a partir de reagentes de fontes naturais, sendo que ambos atendem aos princípios da Química Verde (GC, *Green Chemistry*) e da Química Analítica Verde (GAC, *Green Analytical Chemistry*).

Os DESs apresentam vantagens frente aos solventes orgânicos, e frente aos ILs, tais como síntese rápida e de baixo custo, biodegradabilidade, biocompatibilidade além de ampla aplicabilidade nas mais diversas áreas, tais como eletrodeposição, processamento de biodiesel, produção de nanomateriais, captura de gases prejudiciais, catalisadores de reação e como solventes extratores. A extração de elementos traço, para posterior determinação por diferentes técnicas analíticas, são de grande importância, pois possibilitam o controle da concentração de elementos que possuem potencial toxicidade. Elementos como Cd e Pb, possuem grande potencial tóxico e de bioacumulação, causando efeitos prejudiciais à saúde humana, entre estes

danos ao sistema gastrointestinal, neurológico, renal e hepático. Sendo assim, o controle destes em amostras ambientais e biológicas é essencial.

Diversas técnicas analíticas são reportadas na literatura para a determinação de elementos traço. Entre estas técnicas destacam-se a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, *Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry*), espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS, *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS, *Graphite furnace Atomic Absorption Spectrometry*). Apesar da técnica de ICP-MS e ICP OES apresentarem capacidade de análise multielementar, possibilitando aumento da frequência analítica, e alta sensibilidade, em análises de amostras complexas, como matrizes biológicas, a técnica requer uma etapa de preparo de amostras mais laboriosa. Desta forma, a GF AAS apresenta-se como alternativa para análises de amostras complexas com nenhum ou mínimo preparo prévio, pois conta com um programa de temperaturas que permite o tratamento *in situ* da amostra.

A etapa de preparo de amostras é considerada uma etapa crítica dos procedimentos analíticos. Ao se tratar de matrizes biológicas, a alta complexidade deste tipo de matriz torna a etapa de preparo de amostra essencial para que haja compatibilidade com a técnica de análise e, também, torna a mesma um desafio para os pesquisadores, uma vez que o desenvolvimento de métodos analíticos não é trivial. Sendo assim, o uso de DES como solvente extrator combinado à técnica de GF AAS, possibilita a determinação de elementos traço em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$, além de minimizar os procedimentos da etapa de preparo de amostras, o uso de solventes de baixa toxicidade, compatível com técnicas de microextração e, até, sintetizados a partir de reagentes naturais, tornam as metodologias ambientalmente amigáveis.

Nesta perspectiva, o presente trabalho visa avaliar a aplicação de solventes eutéticos profundos hidrofílicos para extração de Cd e Pb de amostras biológicas, para posterior quantificação por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, considerando os princípios da química verde e química analítica verde.

2 REVISÃO DA LITERATURA

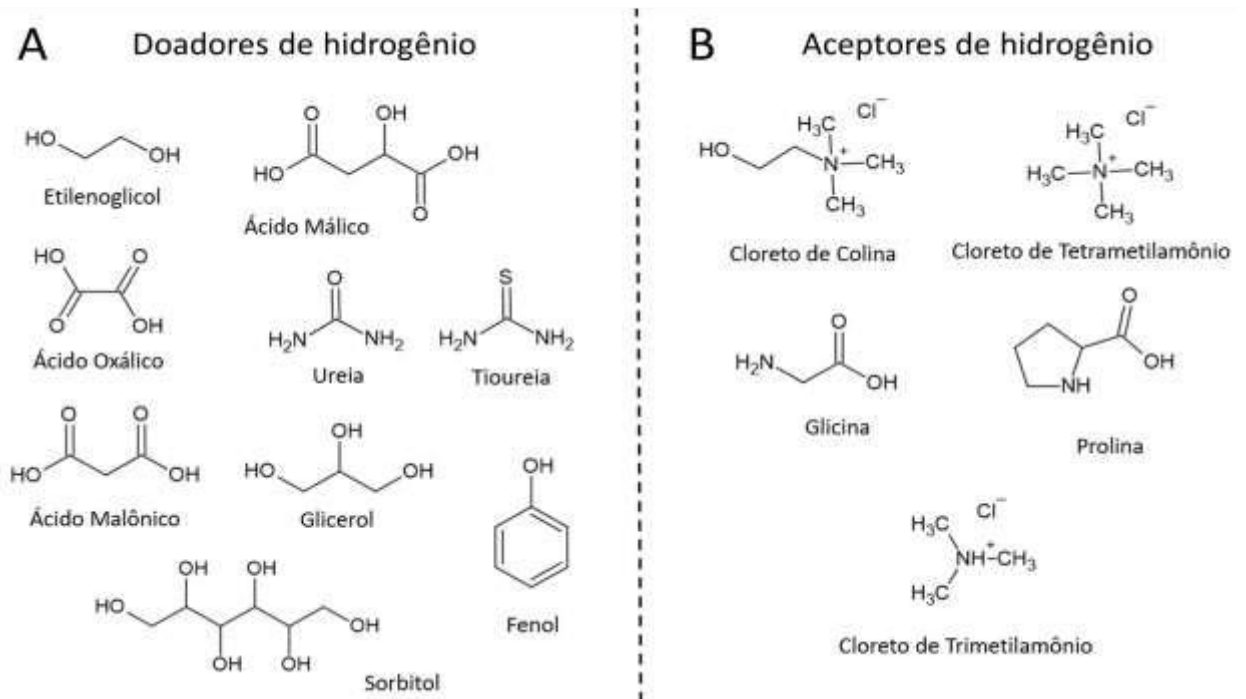
2.1 SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO (DES) E SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO NATURAL (NADES)

2.1.1 Propriedades e síntese

Os DES foram relatados pela primeira vez na literatura por ABBOTT *et al.*, 2003 como uma nova classe de ILs, que são sais orgânicos, constituídos por íons, que apresentam-se líquidos à temperatura ambiente (YAVIR *et al.*, 2020). DESs são sintetizados a partir de uma mistura de componentes, que podem ser sais ou não, e apresentam-se no estado líquido a temperatura ambiente. Uma das principais diferença entre ILs e os DESs é o tipo de interação intermolecular entre os constituintes destes, enquanto que nos ILs a complexação ocorre por ligações iônicas, nos DESs a complexação se dá por ligações de hidrogênio. Outras diferenças em relação os ILs que cabem aqui serem citadas, é o custo de síntese, no qual é inferior para os DESs, e menor toxicidade (GARCÍA *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2018).

DES são obtidos através da complexação entre determinadas proporções de um sal orgânico com um ou mais compostos orgânicos doadores de hidrogênio, dos quais, pelo menos um, apresenta-se sólido à temperatura ambiente (SOCAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2020). Embora a complexação já seja reportada na literatura entre três constituintes, a forma mais comumente empregada dos DESs, são os constituídos por misturas binárias (LIU; CHEN; XING, 2014). Essa complexação resulta em um solvente que possui menor ponto de fusão do que qualquer um dos reagentes de partida individuais (LIU *et al.*, 2018; PAIVA *et al.*, 2014). Os sais orgânicos devem ser aceptores de hidrogênio (HBAs do inglês *Hydrogen Bond Acceptor*), tais como sais de aminas quaternárias, já os compostos orgânicos doadores de hidrogênio (HBDs do inglês *Hydrogen Bond Donor*) podem ser amidas, ácidos carboxílicos, álcoois e carboidratos (LI; ROW, 2019). Na Figura 1 abaixo consta exemplos de compostos que podem atuar como HBA e HBD.

Figura 1- Exemplos de compostos químicos que podem ser utilizados na síntese de DES. (A) compostos que podem ser utilizados como doadores de hidrogênio e (B) compostos que podem ser utilizados como aceptores de hidrogênio.



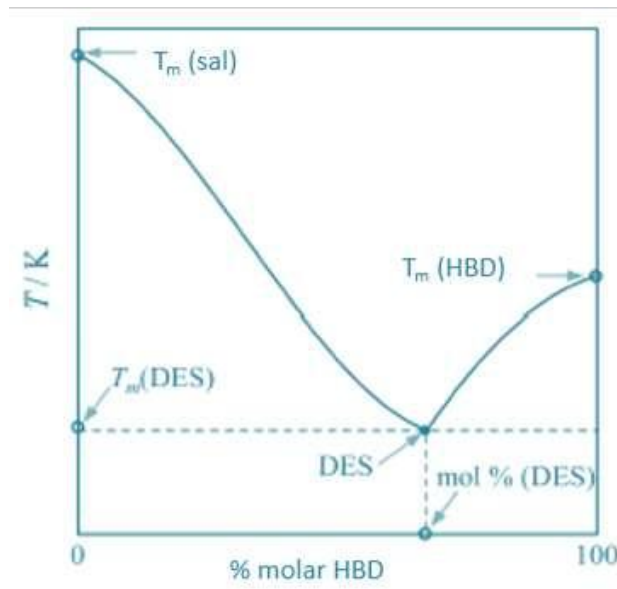
Fonte: Adaptado de TANG *et al.*, 2014.

Tendo em vista que há muitas possibilidades de combinações de frações molares entre HBAs e os HBDs, bem como diferentes compostos que podem ser combinados para a síntese do DES, é importante conhecer as propriedades físico-químicas dos solventes formados, pois estas influenciam diretamente na sua aplicabilidade (LONGO; CRAVEIRO, 2018).

Sendo uma das principais características de um DES, o abaixamento do ponto de fusão é consequência da deslocalização das cargas. No momento em que a complexação entre os constituintes é efetiva, a interação dos grupos aniônicos com os catiônicos é enfraquecida, uma vez que os HBDs agem como agentes complexantes formando ligações de hidrogênio com os ânions. Sendo assim, há uma redução da força de Coulomb, na energia de rede do sistema, já que essas ligações de hidrogênio interferem na capacidade de cristalização dos compostos iniciais, e na entropia do sistema, uma vez que há formação de uma fase líquida, resultando na diminuição do ponto de fusão formando um eutético (SOCAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2020).

A Figura 2 representa um diagrama de fases sólido-líquido para um DES hipotético. Nela pode-se observar, através da linha tracejada, propriedades de uma mistura eutética, tais como a composição do solvente formado e o ponto de fusão, sendo este mais baixo do que ambos os constituintes individuais como anteriormente relatado.

Figura 2- Diagrama de fases sólido-líquido para uma mistura binária entre um sal e um composto doador de hidrogênios (HBD) que representam a formação de um DES. T_m representa o ponto de fusão.



Fonte: Adaptado de GARCÍA *et al.*, 2015.

O tipo de HBD e a fração molar deste na composição do DES apresenta influência em muitas propriedades. Por exemplo, quanto mais forte forem as ligações de hidrogênio dos HBDs e ânions maior será a densidade, pois a mobilidade será reduzida, em geral, a maioria dos DESs hidrofílicos apresentam maior densidade do que a água (LI; ROW, 2019).

A viscosidade é uma propriedade muito importante a ser analisada nos DESs, ela pode ser facilmente ajustável variando-se as frações molares dos grupos aceptores e doadores de hidrogênio e/ou o tipo de sal e de HBDs utilizado na síntese. A alta viscosidade desses solventes, em comparação com demais solventes orgânicos, pode ser atribuída à rede de ligações de hidrogênio que restringe a mobilidade. Logo, um acréscimo na fração molar dos grupos HBDs, levam à um acréscimo na viscosidade (LI; ROW, 2019). Esta é uma importante propriedade a ser

analisada ao sintetizar um DES, pois dependendo a aplicação, solventes muito viscosos não seriam ideais.

A condutividade está diretamente ligada à mobilidade dos íons em solução, os mesmos fatores que aumentam a viscosidade e a densidade de um DES contribuem para a redução da sua condutividade. A polaridade dos DESs pode variar de acordo com o HBD utilizado, em geral, por apresentarem alta afinidade por doadores de elétrons ou prótons, estes solventes tendem a ser miscíveis em solvente próticos e não miscíveis em solvente apróticos. O que leva a uma outra característica desses solventes, pois solventes apróticos podem ser usados para extrair moléculas de baixa ou média polaridade permitindo a reutilização dos DESs. Embora seja uma boa técnica para o reuso de tais solventes, esse método faz necessário o uso de um segundo solvente que por sua vez pode não ser ambientalmente amigável (LIU et al., 2018; SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2020).

As propriedades físico-químicas dos DESs têm relação direta com a temperatura (Tabela 1). Pode-se observar que a medida em que a temperatura aumenta, a viscosidade e densidade dos DES diminuem e, conseqüente, haverá aumento da condutividade.

Tabela 1. Relação das propriedades físico-químicas dos DESs com a variação da temperatura, para o DES de cloreto de colina (ChCl) (HBA) e ácido oxálico (HBD) (1:1).

Propriedade	Temperatura (°C)				
	25	35	45	55	65
Densidade (g/cm ³)	1,2665	1,2592	1,2519	1,2449	1,2482
Viscosidade (cP)	6119,00	2344,00	1021,25	509,97	301,95

Fonte: Adaptado de PINHEIRO (2021).

Outra propriedade importante a ser analisada em um DES é em relação a sua hidrofiliicidade e hidrofobicidade, esta propriedade pode definir e direcionar aplicação de determinado solvente, bem como auxiliar no planejamento da síntese. Embora haja na literatura um grande número de trabalhos reportados utilizando DES, FLORINDO; BRANCO e MARRUCHO (2019) observaram que, na maioria desses há utilização de DESs hidrofílicos e os hidrofóbicos passaram a serem reportados a partir de 2015, em baixo número (VAN OSCH et al., 2015). Em suma, a diferença entre estes solventes

está no tamanho da cadeia alquílica dos reagentes de partida, enquanto DESs hidrofílicos são formados por reagentes de cadeia pequena, os DESs hidrofóbicos são constituídos por sais de amônio quaternário com cadeias alquílicas longas, ou HBA sendo um compostos natural hidrofóbico e HBDs de cadeias alquílicas longas (CHEN; HUANG; FANG, 2022; FLORINDO; BRANCO; MARRUCHO, 2019).

Com relação as propriedades físico-químicas, os hidrofóbicos apresentam densidades semelhantes e inferiores à da água, diferentemente dos hidrofílicos, anteriormente citados, que apresentam maiores valores de densidades. De forma geral, o aumento das cadeias alquílicas causam diminuição da densidade. Ao analisar a variação da viscosidade quando comparado um DES hidrofóbico à um hidrofílico, observa-se que a viscosidade varia em função da estrutura química do HBA (FLORINDO; BRANCO; MARRUCHO, 2019).

Além dos DESs, os Solventes Eutéticos Profundos Naturais (NADES) também estão presentes na literatura. Estes possuem as mesmas características e propriedades dos DESs, porém seus constituintes são compostos naturais, como ácidos orgânicos, aminoácidos e açúcares (MARCUS, 2017). Tanto os DESs, quanto os NADESs encontram-se cada vez mais presentes na literatura, sendo aplicados em diferentes áreas, bem como para matrizes diversas.

2.1.2 Aplicações dos DESs e NADESs

Apesar de serem relatados na literatura desde 2003, na Figura 3A pode-se observar que, em bases de dados, os trabalhos envolvendo DES aparecem somente de 2004 em diante. Tal fato é explicado pela forma de funcionamento dessas plataformas de buscas, neste caso Web of Science. Ao procurar pelo tópico “Deep Eutectic Solvent*¹” a plataforma busca por trabalhos em que os DESs aparecem no título, nas palavras chaves e/ou nos resumos. Como o trabalho de ABBOTT *et al.* (2003) foi a primeira aparição desses solventes, a busca não o inclui por trazer o nome somente no corpo do texto.

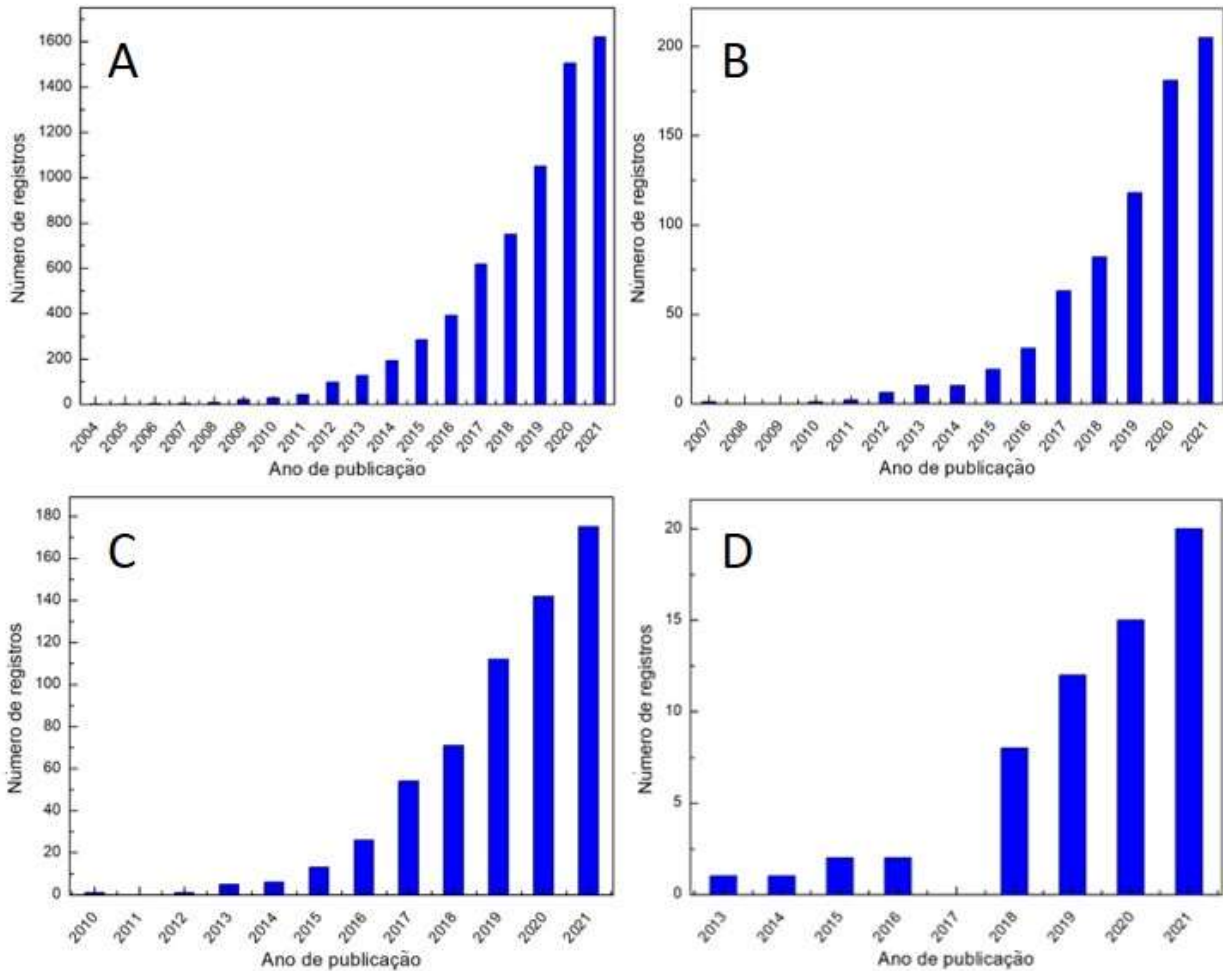
Desde então, um número significativamente crescente de trabalhos envolvendo estes solventes foram reportados à literatura nas mais diversas áreas. Percebe-se que em química analítica (Figura 3B), os trabalhos começaram a serem reportados em 2007 com um aumento significativo até o ano atual (2021) e sua aplicação como solvente extrator em 2010 (Figura 3C), sendo exclusivamente extrações de compostos orgânicos, uma vez que o uso de DES para extrações de compostos inorgânicos é uma aplicação ainda mais recente, 2013, segundo as pesquisas realizadas. Trabalhos a serem publicados em 2022 não constaram nas pesquisas.

Os dados apresentados trazem a realidade de um aumento gradativo do uso desses solventes nas mais diversas aplicações, tendo em vista que além de apresentarem baixo custo de síntese e facilidade desta, a síntese desses solventes atendem aos princípios da Química Verde (Anexo A), pois não há formação de resíduos (P1), há economia atômica, ou seja, todos os reagentes fazem parte do produto formado, sem formação coprodutos (P2), em geral as substâncias envolvidas são mais ambientalmente amigáveis e biodegradáveis (P3; P5; P10; P12), não há derivatizações (P8) nem necessidade de uso de catalisadores para a síntese (P9), além de a síntese requerer somente alterações de temperatura e a pressão é mantida ambiente (P6). Além de ir ao encontro dos princípios da química verde, os DESs podem ser aplicados de forma miniaturizada, como a partir de técnicas de

¹ A utilização do asterisco ao final do tópico de busca indica a base de dados que a busca deve incluir variações da palavra, como plural e termos complementares. Sendo assim, os NADESs estão inclusos na pesquisa.

microextração, nas quais as quantidades de solvente utilizado são consideravelmente menores.

Figura 3- Número de trabalhos publicados em relação ao ano de publicação em relação a diferentes filtros aplicados de forma acumulativa. Os filtros aplicados foram (A) DES*, (B) DES em química analítica, (C) aplicações de DES em extrações na área de química analítica e (D) aplicações de DES em extrações de metais em química analítica.



* Pesquisa que inclui variações, tais como plural e singular da palavra de busca.

Fonte: Adaptado Web of Science, 2021.

Como anteriormente relatado, os DESs e NADESs têm estado presentes na literatura desde 2003 e suas aplicações apresentam-se em larga escala nas mais diversas áreas, tais como farmácia, biotecnologia, ciências ambientais, engenharia química, bioquímica, ciência e tecnologia de alimentos e em química, sendo dentre desta como catalisadores de reações, processamento de biodiesel, eletrodeposição, eletropolimento de metais, produção de nanomateriais, captura de gases prejudiciais

e como solventes extratores. Sendo esta última aplicação o objeto de estudo nesse trabalho, procurou-se na literatura trabalhos que utilizaram os solventes eutéticos como extratores e, de modo a se aproximar mais da natureza deste trabalho, refinou-se a busca de aplicações ao uso destes como extratores de metais. Alguns dos trabalhos encontrados estão representados na Tabela 2.

Alguns trabalhos como os de SOROURADDIN; FARAJZADEH; DASTOORI (2019) e SOROURADDIN; FARAJZADEH; OKHRAVI (2020) reportam o uso destes atrelados a técnicas de microextração que corroboram com uma metodologia ambientalmente amigável. Embora demais trabalhos apresentados que não utilizam técnicas de microextrações, observa-se que ainda assim, os volumes utilizados de DES são pequenos.

Os DESs apresentaram um grande potencial de substituição aos solventes orgânicos tradicionalmente utilizados para extração, compatibilidade com diferentes técnicas incluindo GF AAS e aplicabilidade em larga variedade de amostras, bem como matrizes diversas e complexas, como é o caso dos materiais biológicos.

Tabela 2. Aplicações de diferentes DESs, e NADESs em matrizes diversas, na área de química analítica envolvendo quantificação de compostos inorgânicos. Valores de LOD apresentados na respectiva ordem pela qual os analitos estão representados.

DES/ NADES	Amostra	Analitos	Preparo de amostra	Técnica de análise	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	Referência
Mentol:Sorbitol: Ácido Mandélico (1:2:1)	Leite	Cd (II), Pb (II) e Cu (II)	DLLME	F AAS	0,38; 0,40 e 0,42	SOROURADDIN; FARAJZADEH; DASTOORI, 2019
TAC:BE (1:3)	Água	Cr (VI)	LLE	UV-VIS	0,24	SHI <i>et al.</i> , 2020
ChCl:Fenol (1:2)	Chá de tília	Co (II)	LPME	SQT-F AAS	2,0	TEKIN <i>et al.</i> , 2020
ChCl:Glicerol (1:3)	Farinha de arroz e folhas de tomate	Se (VI)	VA-HLLME	HG-AAS	0,0035	ALTUNAY; ELIK; KAYA, 2020
ChCl:Fenol (1:2)	Água	Cr (III) e Cr (VI)	UA-LPME e VA- LPME	F AAS	0,4	FASIHI <i>et al.</i> , 2020
Ácido glicólico:Ácido Mandélico (2:1)	Óleos comestíveis	Cd (II) e Zn (II)	RP-DLLME	F AAS	0,12 e 0,18	SOROURADDIN; FARAJZADEH; OKHRAVI, 2020

Tabela 2 - Continuação

DES/ NADES	Amostra	Analitos	Preparo de amostra	Técnica de análise	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	Referência
ChCl:U (1:2)	Óleos comestíveis	Pb (II) e Cd (II)	LPME	ET AAS	8,0 e 0,2*	KARIMI et al., 2015
ChCl:U (1:2)	Óleos comestíveis	Pb (II), Co (II), Ni (II) e Mn (II)	LPME	MS-FAAS	2,4; 4,6; 7,5 e 1,0	SOYLAK; KOKSAL, 2019
TDP:TIO (1:2)	Água	Pb (II), Cd (II), Co (II) e Ni (II)	UA-DLLME-SAP	HPLC	0,05; 0,13; 0,06 e 0,11	WERNER, 2019
ChCl:Fenol (1:3)	Água e peixes de água doce	Hg (II) e CH ₃ Hg (I)	UA-LPME	ET AAS	0,073 e 0,091	THONGSAW et al., 2019
Prolina:Ácido málico(2:1)	Arroz	As (III) e Se (IV)	UAME	HG-AAS	0,0017 e 0,003	ELIK; DEMIRBAS; ALTUNAY, 2019
ChCl:Ox (1:2)	Material marinho biológico	Cu, Fe, Ni e Zn	MAE	ICP OES	0,08; 0,56; 0,04 e 0,23**	GHANEMI et al., 2014

Tabela 2 - Continuação

ChCl:Ox (1:2)	Solo	As, Cr, Mo, Sb, Se e V	UA	ICP OES	0,1; 0,04; 0,06; 0,03; 0,09 e 0,009**	MATONG; NYABA; NOMNGONGO, 2017
---------------	------	---------------------------	----	---------	--	--------------------------------------

* ng kg⁻¹, ** µg g⁻¹, NI Não Informado

Fonte: A autora, 2020.

2.2 DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Elementos traço são assim denominados por estarem presentes em baixas concentrações no ambiente ($< 100 \mu\text{g g}^{-1}$), alguns são considerados essenciais, do ponto de vista biológico, porém, alguns atingem facilmente concentrações tóxicas que podem causar impactos negativos, uma vez que são elementos contaminantes da água e do solo e apresentam grande potencial bioacumulador, como é o caso do Be, Cd, Ni, Hg e Pb (BOSCH et al., 2016).

O acúmulo desses elementos acarreta em danos à saúde, pois afetam o sistema gastrointestinal, neurológico, renal e hepático dos seres humanos, aumentam a incidência de doenças crônicas, deformidade e câncer, sendo ainda mais agressivos em crianças e gestantes (LIANG et al., 2019). Desta forma o controle dos mesmo é essencial uma vez que a contaminação pode ser proveniente de diversas fontes, mas especialmente por meio dos alimentos, tornando indispensável o controle destes elementos em amostras biológicas (DE SÁ et al., 2020).

Embora a ingestão de alimentos seja a principal fonte de obtenção de nutrientes para o corpo humano, a mesma também é fonte de elementos potencialmente tóxicos, já que os alimentos são expostos à contaminação de ocorrência natural no meio ambiente e em decorrência das fases de processamento aos quais são submetidos (RATHER et al., 2017). Sabendo-se do potencial tóxicos de elementos traço, o controle dos mesmos em amostras biológicas é de extrema importância tendo em vista a potencialidade da bioacumulação destes, uma vez que o consumo de alimentos contaminados é responsável por mais de 90 % da exposição humana em relação ao contato dérmico e inalação (SAHA et al., 2016).

Espectrometria de absorção atômica (AVRAM, O. R.; CARAGEA, G.; VARZARU, 2021; TUDOSIE et al., 2021), ICP OES (GHANEMI et al., 2014; KIANI et al., 2021) e ICP-MS (MAHBOOB et al., 2022; TAKASAKI et al., 2011) são as técnicas amplamente utilizadas para determinação de elementos traços em amostras biológicas.

Embora técnicas como a ICP-MS apresente vantagens frente a GF AAS e F AAS como, por exemplo, maior sensibilidade e a capacidade multielementar, que facilita e otimiza os tempos de análises, a necessidade de uma etapa mais laboriosa de preparo de amostra se torna necessária para a compatibilidade da mesma com o equipamento de análise (BATISTA et al., 2009). Sendo assim, a GF AAS ganha destaque por, além

de ser uma técnica difundida com baixos limites de detecção, possibilita a análise de amostras complexas em decorrência do programa de temperaturas que permite o tratamento *in situ* da amostra, promovendo a separação do solvente, através da etapa de secagem, e da matriz, através da etapa de pirólise, antes da atomização do analito.

2.2.1 Espectrometria de Absorção Atômica

Após a primeira descrição de processos de absorção e emissão de radiação por átomos em chamas por Kirchhoff e Bunsen na década de 1860, a emissão óptica manteve-se no foco dos espectroscopistas. Quase um século depois, Alan Walsh começou seus primeiros experimentos constatando muitas vantagens da absorção sobre a emissão atômica, tais como menores temperaturas de atomização e menores limites de detecção (U, 1999). Na década de 50, Walsh propôs o primeiro modelo de espectrômetro de absorção atômica e desde então a técnica vêm sendo estudada e aprimorada para o aumento da sensibilidade, redução de interferências e alcance de melhores limites de detecção e quantificação (WELZ et al., 2007).

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é atualmente uma técnica largamente utilizada para análises elementar nas mais diversas amostras. A técnica baseia-se no princípio de que átomos livres no estado gasoso, gerados em um atomizador, são capazes de absorver radiação em uma frequência específica que é emitida por uma fonte (BORGES et al., 2005).

Os atomizadores mais comuns em AAS são a chama e o forno de grafite. Ambos são amplamente utilizados para fins analíticos, porém a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) por proporcionar maior sensibilidade, possibilitando limites de detecção na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ – ng L^{-1} , se torna mais atrativa do que a espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) que é indicada para determinações em níveis de mg L^{-1} (FILATOVA et al., 2020).

Na GF AAS a atomização dos analitos da amostra ocorre em um tubo de grafite que pode ser aquecido de forma longitudinal ou transversal, sendo o aquecimento transversal o ideal para manter uma temperatura uniforme dentro do atomizador, minimizando perdas de analito por condensação em extremidades frias ou recombinações atômicas. A amostra é inserida no forno de grafite e submetida à um programa de temperatura, no qual a temperatura, tempo e velocidade de aquecimento

são controlados. Este é constituído pelas etapas de secagem, para eliminação de solvente; pirólise, na qual a matriz é eliminada; atomização, para a formação dos átomos livres dos analitos; e uma etapa de limpeza para remoção de resíduos evitando o efeito de memória. Etapas de pirólise e atomização podem ser otimizadas através de curvas de pirólise e atomização (RADA-MENDOZA et al., 2021).

Visando solucionar os problemas relacionados com a baixa intensidade de emissão dos instrumentos de fonte de linha, indisponibilidade de lâmpadas para alguns elementos e impossibilidade de determinações multielementares, os primeiros equipamentos de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS, do inglês *High Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*) foram reportados. Estes equipados com uma lâmpada de arco-curto de xenônio como fonte de radiação que emite radiação eletromagnética entre 190 e 900 nm, possibilita o monitoramento de diversas espécies químicas e ainda determinações de forma simultânea (WELZ et al., 2003). Por oferecer vantagens frente aos equipamentos com fonte de linha tradicionais, tais como maior estabilidade do sinal, correção de fundo mais eficiente, possibilidade de determinação de não-metals e ainda a determinação multielementar manteve a técnica em evidência e, atualmente, a técnica é utilizada tanto para determinação de espécies atômicas, quanto moleculares (HR-CS MAS, do inglês *High Resolution Continuum Source Molecular Absorption Spectrometry*) (RESANO; FLÓREZ; GARCÍA-RUIZ, 2013).

Embora técnicas como a HR-CS AAS apresente vantagem frente a técnica de GF AAS, esta continua sendo vastamente utilizada para determinação de metais em amostras diversas. Como o trabalho de GALVÃO; FELSNER (2021) que utilizou a técnica de GF AAS para determinação de cromo em melado de cana, obtendo recuperações entre 102-103% e limite de detecção e quantificação iguais a $7,2 \text{ ng g}^{-1}$ e $22,0 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente. SALIMI et al. (2020) realizaram a determinação de Cd e Pb em amostras de águas residuais obtendo valores iguais a 0,01 e 0,1 de limites de detecção para Cd e Pb, respectivamente e ULLAH et al. (2017) que determinaram Pb, Cd e Cr em amostras de ração de peixes utilizando GF AAS, obtendo limites de detecção iguais a 0,078, 0,010 e $0,022 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Na espectrometria de absorção atômica, vale destacar que a atomização com forno de grafite (GF AAS), possibilita análise de matrizes diversas, com nenhum ou mínimo preparo de amostra indo ao encontro dos princípios da química verde, evitando

o uso em excesso de reagentes tóxicos, preparo de amostras laboriosos com alto custo energético e formação em excesso de resíduos.

2.3 QUÍMICA VERDE

Recentemente, questões ambientais têm recebido crescente destaque no âmbito nacional e internacional, bem como no industrial e acadêmico. O controle de gases poluentes, efeitos prejudiciais à saúde e ao meio ambiente, bem como a larga geração de resíduos, tornou estas questões pautas de eventos e reuniões de líderes mundiais. Com a crescente industrialização e necessidade de fiscalização e controle, programas foram sendo criados para incentivar o desenvolvimento de metodologias menos agressivas ao meio ambiente, desde 1991 com o programa “Rotas Sintéticas Alternativas para Prevenção de Poluição”, criado pela agência ambiental norte-americana (EPA). Outros programas foram criados a partir de então visando incentivar e conscientizar o planejamento de sínteses com mínima geração de resíduos. Este direcionamento para o desenvolvimento de atividades industriais, atreladas à química, passou a ser denominado química verde que reúne princípios para o desenvolvimento de metodologias ambientalmente amigáveis (LENARDÃO et al., 2003) .

O desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas e metodologias de sínteses buscam abranger, tanto quanto possível, os princípios da GC. Os 12 princípios da GC apresentam-se descritos no livro “*Green Chemistry: Theory and Practice*”, citados por LENARDÃO et al. (2003), visam a eliminação ou redução do uso ou geração de substâncias perigosas em todas as etapas da síntese, desde a seleção de reagentes de partida até o planejamento do produto esperado com bom rendimento, baixa geração de resíduos, com boa eficiência energética e baixa periculosidade ao operador e ao meio ambiente.

Sabendo-se que a etapa de preparo de amostras é considerada uma etapa crítica nos procedimentos analíticos, do ponto de vista da química analítica verde, uma vez que nas metodologias tradicionais há alto consumo de reagentes de alta periculosidade, alto gasto energético e larga geração de resíduos, houve a necessidade de reformular os 12 princípios da GC uma vez que estes não foram, originalmente, formulados para avaliar procedimentos analíticos, que, na maioria das vezes, não incluem sínteses. Neste sentido, foram desenvolvidos os 12 princípios da Química

Analítica Verde que são aplicáveis aos procedimentos analíticos e, em suma, objetivam procedimentos com nenhum ou mínimo preparo de amostra.

Indo ao encontro do desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas e metodologias de sínteses e análises, as diferentes áreas da química passaram a buscar formas de mensurar o quão vantajoso a nova metodologia seria frente à diminuição de perigos físicos, ao operador e ao meio ambiente, estas seriam. Sendo assim, o desenvolvimento de métricas passou a ser largamente pontuado na literatura como forma de transcrever uma análise qualitativa para quantitativa das metodologias de sínteses e demais análises. Como exemplo de métricas utilizadas para a transposição supracitada, pode-se citar a Estrela Verde (EV) e a Eco-escala, desenvolvidas com o objetivo de mensurar, respectivamente, o quão verde é a síntese ou o procedimento analítico. O uso de tais métricas incentiva a busca por metodologias mais verdes, uma vez que para a construção destas se faz necessário consultar as Fichas de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) na qual constam informações, tais como de periculosidade do composto utilizado e acerca da biodegradabilidade do mesmo, que na maioria das vezes, são informações não valorizadas.

Munidos de ferramentas adequadas, a análise da verdura química torna-se indispensável no meio acadêmico, principalmente na busca por novas metodologias, pois, além de visarem uma metodologia mais verde, auxiliam na conscientização dos profissionais frente a própria saúde e a saúde do meio ambiente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicação de solventes eutéticos profundos hidrofílicos para extração de cádmio e chumbo de amostras biológicas para posterior quantificação por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, considerando os princípios da química verde e química analítica verde.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Sintetizar diferentes DESs com características hidrofílicas, variando a combinação e a razão molar dos reagentes aceptores e doadores de hidrogênio;
- ii. Avaliar a eficiência da extração de diferentes DESs para extração de Cd e Pb em amostras biológicas;
- iii. Caracterizar o DES de melhor eficiência na extração dos analitos através da calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise por infravermelho (IV) e , densidade;
- iv. Avaliar o comportamento térmico do cádmio e chumbo em meio aquoso e nos extratos com DES por meio das curvas de pirólise e atomização e a técnica de calibração para quantificação dos analitos em amostras biológicas por GF AAS;
- v. Otimizar as condições de extração dos analitos com DES em amostras biológicas, considerando o efeito do tempo de extração, da massa da amostra e do volume de DES;
- vi. Determinar as figuras de mérito do método proposto: faixa de trabalho, faixa linear de trabalho, coeficiente de determinação, RSD, LOD e LOQ;
- vii. Verificar a exatidão do método desenvolvido por meio da análise de amostras de referência com concentrações certificadas dos analitos;
- viii. Avaliar do ponto de vista da Química Verde (GC), a veracidade da síntese dos DESs empregando a Estrela Verde (EV) e o uso de DES como solventes extratores empregando a Eco-escala;

4 EXPERIMENTAL

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

Todos os reagentes utilizados para as sínteses de DES foram previamente secos em estufa modelo (Biomatic, Brasil) e armazenados em dessecador de vidro. Para a pesagem dos reagentes de partida dos Solventes Eutéticos Profundos (DESs) utilizou-se a balança modelo ATX224 (Shimadzu, Brasil), para as sínteses utilizou-se uma chapa de aquecimento modelo TE- 0854 (TECNAL, Brasil) e Vórtex modelo CRV- 45X (CAPP, Dinamarca). No processo de extração, as amostras foram pesadas em tubos de polipropileno de 15 mL, submetidas ao aquecimento em uma chapa de aquecimento modelo TE- 0854 (TECNAL, Brasil), centrifugadas em uma centrífuga microprocessada modelo Q222TM216 (QUIMIS, Brasil). A medição foi realizada em espectrômetro AAnalyst 100 (Perkin Elmer, EUA) de fonte de linha com uso de forno de grafite como atomizador. Utilizou-se uma lâmpada de cátodo oco específica para cada elemento estudado. Sendo, para o Cd operando a 10 mA e monitorando a linha principal, 228,8 nm, e para o Pb operando a 4 mA com monitoramento da linha secundária, 283,3 nm. Utilizou-se um forno de grafite com plataforma e recobrimento pirolítico de aquecimento longitudinal. A caracterização do DES utilizado no trabalho foi análises de infravermelho (Bruker Alpha), calorimetria exploratória diferencial (DSC) (Shimadzu, DSC-50) e densidade utilizando uma balança analítica modelo M254Ai (Bel Engineering, Itália).

4.2 REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS

Todos os reagentes utilizados possuem mínimo grau analítico de pureza. Para a síntese dos DESs foram utilizados cloreto de colina 99,0% (Merck, Alemanha), ureia P.A.- A.C.S. (Nuclear, Brasil), ácido láctico 85-90 % (Merck, Alemanha) e ácido oxálico 99,0 % (Merck, Alemanha). Como modificador químico, utilizou-se solução de paládio padrão de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ de $10,0 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ (Merk, Alemanha). Todos os extratos foram acidificados com ácido nítrico bidestilado e água ultrapura obtida em um purificador modelo Milli-Q plus (Merk Millipore, EUA) foi utilizada no preparo de soluções e padrões de calibração bem para diluição das amostras.

A amostra utilizada para o desenvolvimento do método consistiu em um material certificado de referência de rim de porco (BCR- 186). Já as amostras nas quais o

método de extração desenvolvido foi aplicado para verificação da exatidão foram: músculo bovino (8414), rim de porco (BCR-186), tecido de ostra (1566b), tecido de mexilhão (CE-278).

4.3 PROCEDIMENTOS

4.3.1 Síntese dos DESs

Nenhum dos reagentes utilizados nesta etapa passou por preparos prévios e/ou purificações, apenas secagem em estufa e armazenamento em dessecador do cloreto de colina e do ácido oxálico, por serem higroscópicos. De modo a obter as razões molares estipuladas para estudo entre os grupos HBDs e os HBAs (Tabela 3), as massas previamente estabelecidas, foram pesadas em balança analítica em tubos de polipropileno de 15 mL. Para síntese, os tubos contendo os reagentes foram submetidos ao aquecimento em banho-maria e mantidos em uma temperatura de $90 \pm 5^\circ\text{C}$. Paralelamente ao aquecimento, os tubos foram submetidos a agitação com vórtex para garantir homogeneização e interação efetiva entre os reagentes. Ao observar a formação de um líquido incolor e homogêneo, indicando a formação do DES, os tubos foram retirados do banho Maria e reservados. Todos os DES sintetizados apresentaram característica hidrofílica, estes podem ser classificados como NADES, pois utilizam reagentes provenientes de fontes naturais.

Tabela 3. Relação das razões molares de HBDs que foram estudadas em relação ao ChCl (HBA) e listagem das temperaturas de fusão dos HBDs.

HBD	Temperatura de fusão ($^\circ\text{C}$)	Razão molar (ChCl:HBD)
Ureia	133,0	1:1; 1:2; 1:3 e 1:4
Ácido Oxálico	189,5	1:1; 1:2; 1:3 e 1:4
Ácido Lático	16,8	1:1; 1:2; 1:3 e 1:4

Fonte: A autora (2020).

4.3.2 Caracterização

A caracterização do DES que apresentou melhor eficiência de extração foi realizada por calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho (IV) e densidade.

As análises de DSC e IV foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química, localizada na UFSC campus Reitor João David Ferreira Lima, localizado no bairro Trindade, Florianópolis-SC, pelo técnico responsável. Demais análises foram realizadas no laboratório LEMA/LARES.

A análise de densidade dos DES ChCl:Ox (1:1) foi realizada a partir do uso de um picnômetro de 5 mL. Em uma balança analítica pesou-se o picnômetro e a balança foi tarada. Em sequência pesou-se o picnômetro novamente, desta vez contendo o DES e anotou-se a massa. Sabendo-se o volume do picnômetro e a massa do DES contido no mesmo, pode-se calcular a densidade.

4.3.3 Otimização da extração

O procedimento para extração de Cd e Pb nas amostras biológicas selecionadas baseou-se no trabalho de HABIBI et al. (2013) que visou determinar Cu, Fe e Zn em peixes. Primeiramente, realizou-se uma otimização multivariada avaliando as variáveis volume de DES, tempo e temperatura de ultrassom. Posteriormente, o tempo de aquecimento (5, 15, 30, 60 e 90 min) em banho-maria a 95 ± 5 °C foi também avaliado.

Nas condições otimizadas a extração consistiu em adicionar 150 µL do DES à um tubo de polipropileno de 15 mL, em sequência adicionou-se a amostra, 40 ± 7 mg e posteriormente 250 µL de DES, totalizando 400 µL de DES. Pérolas de vidro de 1 mm foram adicionadas para auxiliar na homogeneização e, conseqüentemente, interação do DES com a amostra. Na sequência os tubos foram submetidos ao aquecimento, 95 ± 5 °C, em banho Maria, por 30 minutos. Paralelamente ao aquecimento, os tubos foram submetidos, periodicamente (a cada 3 minutos), à agitação com vórtex. Após o tempo de aquecimento, avolumou-se as soluções para 1,5 mL com água ultrapura, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm 10 minutos. Separou-se o sobrenadante as amostras foram diluídas adequadamente para ambos os analitos e as concentrações dos analitos determinadas por GF AAS. Todas as soluções finais foram acidificadas, com 1% de HNO₃ bidestilado.

4.3.3.1 Otimização multivariada

Para otimização de forma multivariada, optou-se pelo planejamento 2³ com ponto central, no qual visou identificar as condições ideais de extração. Neste foram

estudados três níveis (-1, 0, +1) para três variáveis (volume de DES, tempo de ultrassom e temperatura). Os valores definidos para os três níveis foram embasados em referenciais teóricos e testes preliminares, respeitando os limites dos equipamentos utilizados. O banho ultrassônico disponível para uso, atinge uma temperatura máxima de 90 °C e não consegue manter a mesma estabilizada, desta forma, o nível máximo foi de 80 °C. As Tabelas 4 apresenta as variáveis e seus níveis avaliados.

Tabela 4. Variáveis e níveis avaliados no planejamento 2³.

	-1	0	+1
V_{DES} (µL)	400	600	800
Tempo de US (min)	5	30	55
Temperatura (°C)	30	55	80

A função multi-reposta (MR) foi aplicada aos resultados obtidos de modo a obter uma condição simultânea para extração de ambos os analitos, Cd e Pb (FERREIRA et al., 2008). A Equação 1 foi aplicada para tal finalidade, na qual Rec (%) representa a porcentagem de recuperação para cada analito e os valores, 74,76 e 108,82 são os valores máximos de recuperação obtidos para Cd e Pb, respectivamente.

$$MR = Rec (\%) \frac{Cd}{74,76} + Rec (\%) \frac{Pb}{108,8} \quad \text{Equação 1}$$

4.3.4 Determinação da concentração de Cd e Pb

As determinações foram realizadas por GF AAS utilizando Pd como modificador químico em solução. Para as medições foram injetados, com auxílio de um amostrador automático, 10 µL da solução de modificador de Pd e 20 µL da solução de amostra e/ou padrão aquoso. Para a quantificação dos analitos foram avaliadas as técnicas de calibração externa com padrões aquosos, simulação da matriz, contendo padrões aquosos e o DES, e por adição de analito, na qual a curva foi preparada por padrões aquosos, DES e o extrato da amostra. As faixas de calibração para Cd e Pb, respectivamente, foram de 1,0 a 8,0 µg L⁻¹ e de 5,0 a 100,0 µg L⁻¹.

Os programas de temperaturas utilizados para o Cd e Pb encontram-se descrito nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5. Programa de temperatura otimizado para Cd por GF AAS.

Etapa	Temperatura, °C	Rampa, s	Permanência, s	Vazão de gás, mL/min
Secagem	90	7	10	250
Secagem	130	10	10	250
Pirólise	600	50	25	250
Atomização	1900	0	5	0
Limpeza	2400	1	5	250

Fonte: A autora (2021).

Tabela 6. Programa de temperatura otimizado para Pb por GF AAS.

Etapa	Temperatura, °C	Rampa, s	Permanência, s	Vazão de gás, mL/min
Secagem	100	10	50	250
Pirólise	900	20	30	250
Atomização	2100	0	5	0
Limpeza	2400	1	5	250

Fonte: A autora (2021).

4.3.5 Avaliação da verdura química

A avaliação da verdura química da metodologia proposta foi dividida em duas partes. A primeira delas, visou avaliar, do ponto de vista da Química Verde (GC), a partir da aplicação da métrica Estrela Verde (EV), a síntese dos DESs. Em um segundo momento, a análise da verdura química foi voltada ao procedimento analítico aplicado, sendo analisado, desta vez, do ponto de vista da GAC a partir da aplicação da métrica eco-escala.

Para a construção da EV, deve-se levar em consideração todos os reagentes e substâncias envolvidas na síntese bem como ter conhecimento de alterações de temperatura e pressão do sistema. Para a construção da mesma, cada princípio é analisado individualmente e a ele são atribuídas pontuações, nas quais o 3 representa nível máximo de verdura e 1 representa nível mínimo. A atribuições dessas pontuações são baseadas no Anexo B e C e as informações acerca das substâncias envolvidas podem ser facilmente encontradas nas Fichas de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ). Após a atribuições de pontuações, a métrica é obtida em forma de estrela na qual cada ponta representa um princípio da química verde.

Cabe ressaltar que a estrela obtida para sínteses de substâncias já conhecidas, como é o caso do DES ChCl:Ox (1:1), os princípios 4 e 11 não são analisados, pois estes referem-se a síntese de novos compostos. Sendo assim, obteve-se uma EV com 10 pontas.

Embora a EV possibilite uma análise qualitativa e sejam atribuídos valores à cada princípio individualmente, de forma a quantificar o procedimento de síntese como um todo, calcula-se o Índice de Preenchimento de Estrela (IPE) segundo a Equação 2. Quanto mais próximo de 100 for o IPE obtido, mais verde é a síntese.

$$\text{IPE} = 100 \times \frac{\text{Área verde da estrela}}{\text{Área verde da estrela de verdura química máxima}} \quad \text{Equação 2}$$

Para a construção da eco-escala, também deve-se identificar todas as substâncias envolvidas no procedimento analítico, bem como técnicas e equipamentos, pois nesta, há consideração do consumo energético das técnicas de preparo e de análise. Diferentemente da EV, na qual observa-se as frases de perigo nas FISPQs, para construção da eco-escala deve-se observar a quantidade de pictogramas de perigo que a substância contém, a palavra de advertência e a quantidade de reagentes utilizados. Estes resultam em uma pontuação que é atribuída as substâncias envolvidas no procedimento analítico. Demais pontuações de penalidade são atribuídas com base no trabalho de GAŁUSZKA et al. (2012) e seguem a tabela de referência que consta no Anexo E.

Após a atribuição de todos os pontos de penalidade, a soma destes deve ser descontada de 100 para a obtenção de um valor final da eco-escala, no qual a obtenção de um valor >75 pontos classifica o procedimento analítico com verdura química excelente, <75 e >50 pontos, considera-se uma verdura química aceitável e <50 pontos uma verdura química inadequada.

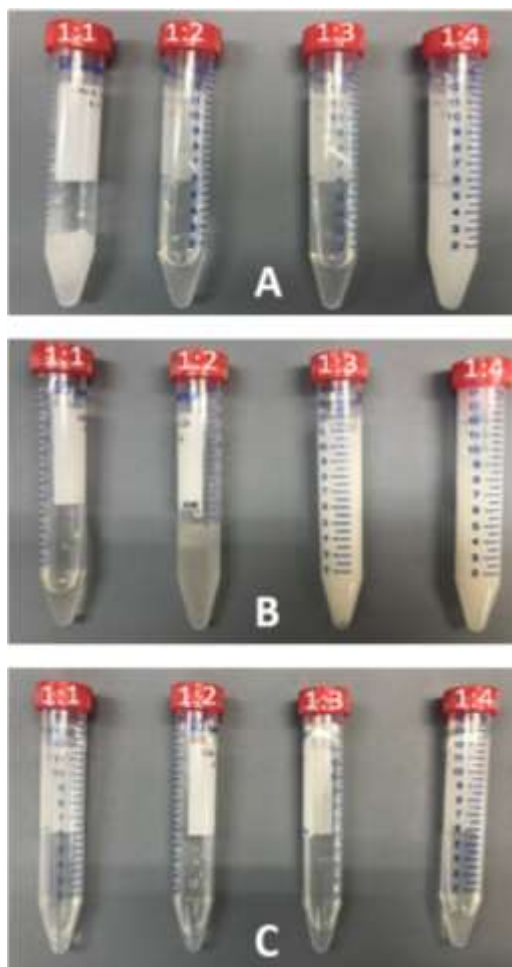
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 SÍNTESE DOS DESs

Os testes para obtenção dos DESs foram realizados utilizando cloreto de colina (ChCl) como HBA e a ureia (U), o ácido oxálico (Ox) e o ácido láctico (La) como potenciais HBDs, em razões molares que variação entre 1:1 a 1:4 (HBA:HBD).

Considerando as mesmas condições de síntese descritas no item 4.3.1 da parte experimental, nem todos os testes resultaram em DES, conforme pode está ilustrado na Figura 4. Estes reagentes de partida para obtenção dos DESs foram escolhidos com base em referenciais teóricos, de acordo com a aplicabilidade de cada um deles já reportada na literatura e suas propriedades.

Figura 4- Representação dos DESs sintetizados pela mistura de (A) ChCl: U, (B) ChCl: Ox e (C) ChCl: La, em quatro razões molares distintas.



Fonte: A autora (2020).

Idealmente, a razão molar adequada de HBA e HBD o DES resultante deve estar no estado líquido a temperatura ambiente. Observa-se na Figura 4A que a formação do DES com ureia só foi possível utilizando que a razão molar 1:2 (ChCl :U). Observou-se, e um primeiro momento a obtenção de um líquido incolor para a razão molar 1:3 também, porém após um tempo em repouso a temperatura ambiente, a mesma voltou

a solidificar-se. Sendo assim, todas as demais razões molares, com exceção da 1:2 não resultaram na formação do DES.

Em relação aos DESs obtidos a partir da síntese de ChCl e Ox, representados na Figura 4B, pode-se observar que, com exceção da razão molar 1:1 (ChCl:Ox), todos os demais apresentaram-se sólidos a temperatura ambiente. Embora a razão molar 1:2 não se apresente completamente no estado sólido imediatamente após a síntese, após cerca de 30 minutos, ocorreu solidificação completa, inviabilizando a sua utilização. Na Figura 4C, observa-se que as quatro razões molares estudadas para os DESs sintetizados por ChCl e La, apresentaram-se na forma líquida a temperatura ambiente.

Observa-se na literatura trabalhos de aplicações de DESs como solventes extratores, que reportam o uso das razões molares 1:1 e 1:2 (ChCl:Ox). Ao realizar estudos, através da literatura, das propriedades físico-químicas dos DESs, pode-se embasar os resultados obtidos, como os trabalhos de GILMORE et al. (2018), QIN et al. (2019) e ABBOTT et al. (2004). Contudo, segundo QIN et al. (2019), DESs sintetizados por um HBD com característica de ácido dicarboxílico, como é o caso do ácido oxálico, a composição eutética se dá em razão molar de 1:1.

Embora na literatura já seja reportado outras metodologias de síntese de DES que apresentam menores riscos de formação de impurezas, como ésteres e HCl quando sintetizados a partir do ChCl como HBA e ácidos carboxílicos como HBD, como o método por moagem, o método proposto por ABBOTT et al. (2003) que consiste no aquecimento e agitação até a formação de um líquido homogêneo e incolor é comumente reportado na literatura (FLORINDO et al., 2014). Uma síntese simples, que foi eficaz para a formação dos DESs no presente trabalho. Pode-se observar que a síntese destes é, de fato, muito simples e prática, pouco laboriosa, não requer o uso de demais reagentes indo ao encontro de princípios da química verde. Consequentemente, a utilização dos DESs como solventes extratores em técnicas de preparo de amostra apresentaram grande potencial como alternativas ambientalmente amigáveis.

5.2 AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO COM DIFERENTES DESs

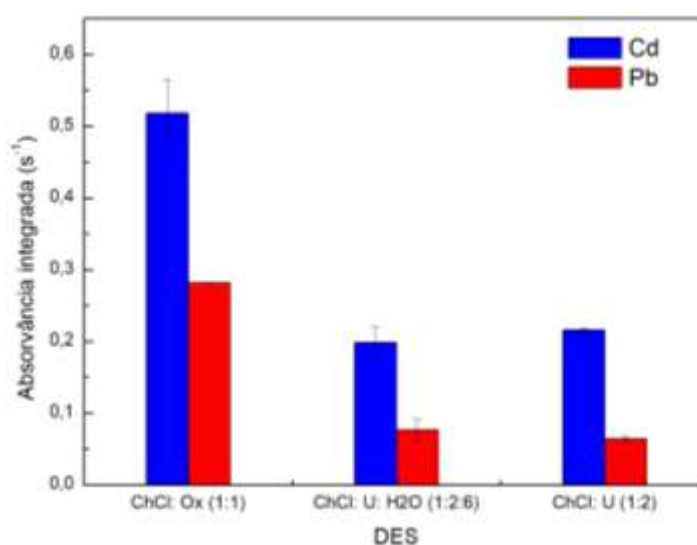
Sabendo-se que nem todas as razões estudadas entre as diferentes combinações entre os HBDs e o HBA apresentaram-se líquidas a temperatura ambiente, as otimizações foram realizadas somente com os DESs que apresentaram-

se líquidos a temperatura ambiente, são estes ChCl: U (1:2); ChCl: Ox (1:1); ChCl: La (1:1); ChCl: La (1:2); ChCl: La (1:3); ChCl: La (1:3).

De modo a definir qual das combinações de reagentes apresentaria melhor eficiência de extração dos analitos da amostra, os procedimentos descritos no item 4.3.3 foram realizados para cada solvente que se apresentou líquido a temperatura ambiente. Ao realizar as medições, verificou-se que os valores dos brancos obtidos para os DESs compostos por ácido láctico eram muito altos e a subtração do sinal analítico do branco poderia não ser adequada. Desta forma, optou-se por retirar estes DESs dos estudos posteriores, uma vez que as limitações do trabalho não possibilitariam maiores estudos e substituição dos reagentes por outros de maior grau de pureza.

Embasado em referências teóricas, adicionou-se também a esta etapa de otimizações, o DES ChCl:U:H₂O (1:2:6), este escolhido por ser um DES de mais fácil manuseio uma vez que a adição da água diminui a viscosidade do mesmo (SMITH et al., 2019). A Figura 5, representa os resultados obtidos a partir da extração de Cd e Pb com os diferentes DESs.

Figura 5. Extração de (A) Cd e (B) Pb a partir de 20 mg de amostra de rim de porco (BCR 186), 500 µL do respectivo DES, submetido à uma hora de aquecimento e $95 \pm 5^\circ\text{C}$. As barras de erro representam o desvio padrão (n=3).



Como pode-se observar o DES composto por ChCl e Ox apresentou maiores valores de absorvância indicando maior extração dos analitos da amostra. Embora não se saiba exatamente a forma como os elementos se encontram na amostra biológica, uma possível explicação para os resultados obtidos é a alta constante de formação de óxidos apresentada para os analitos, Cd e Pb, e a alta capacidade do DES ChCl:Ox de solvatação dessas espécies como observado por SINGH et al. (2021), MATONG; NYABA; NOMNGONGO (2017) e GHANEMI et al. (2014), em amostras geológicas. Assim, o DES composto por ChCl:Ox na proporção molar de 1:1 foi selecionado e caracterizado para utilização nos experimentos subsequentes.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO DES CHCL:OX

Sabendo-se que as propriedades físico-químicas e estruturais dos DESs estão diretamente relacionadas com a sua capacidade extratora, objetiva-se nesta sessão caracterizar o DES escolhido como melhor solvente extrator (ChCl:Ox 1:1) de modo a justificar os resultados obtidos a partir das suas características e comportamento como solvente. Deste modo as análises estruturais e físico-químicas realizadas foram: densidade, calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia de infravermelho (IV).

Após realizado o procedimento da análise da densidade do DES, obteve-se uma densidade igual a $1,64 \text{ g cm}^{-3}$. Como pode-se observar ao adicionar água ao DES e através do valor de densidade obtido, percebe-se que o valor encontrado está de acordo com o reportado na literatura, a qual afirmam que, para a maioria dos DESs hidrofílicos, a densidade é maior do que a da água e o aumento do número de hidroxilas no HBD resulta na formação de mais ligações de hidrogênio, explicando uma maior densidade (HANSEN et al., 2021).

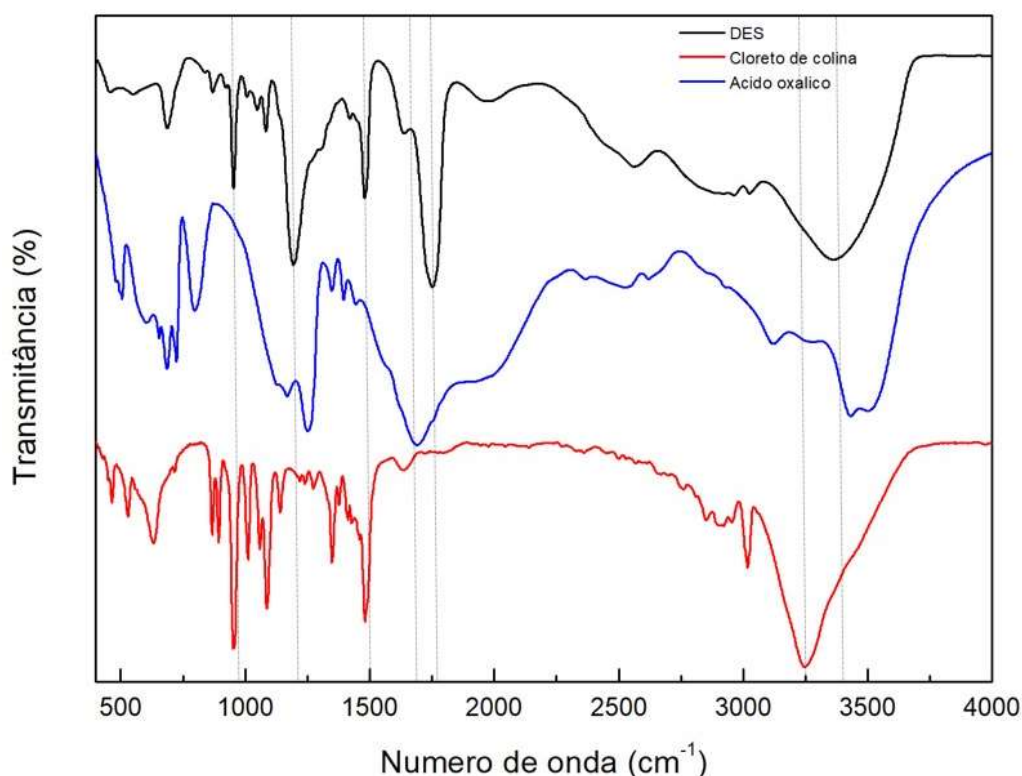
Análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) permitem analisar as energias nas quais ocorrem fenômenos como a cristalização, fusão, ponto eutético, transição vítrea, entre outros. As análises de DSC foram realizadas e os termogramas obtidos encontram-se no Anexo A.

Através dos termogramas obtidos, pode-se observar que as temperaturas de fusão dos reagentes, sendo elas, aproximadamente, $190 \text{ }^\circ\text{C}$ para o ácido oxálico e $312 \text{ }^\circ\text{C}$ para o cloreto de colina, são muito próximas dos valores da literatura, $189,5$ e $302 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Já a temperatura de fusão observada no termograma do DES

ChCl:Ox (1:1) aparece em torno de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, demonstrando a formação de uma mistura eutética, uma vez que a esta é menor do que ambos os constituintes individualmente e que estão de acordo com a definição encontrada no *Compendium of Chemical Terminology* da IUPAC, na qual afirma que uma reação eutética ocorre entre duas fases sólidas resultando em uma única fase líquida (BOOK, 2014; PAVEGLIO, G. C., 2016)

A análise por IV é uma importante ferramenta para elucidar acerca da estrutura e características das ligações químicas, desta forma realizou-se a análise por espectrometria de infravermelho (IV) para os reagentes de partida do DES, ChCl e Ox, bem como para o DES sintetizado obtido ChCl:Ox (1:1). Os espectros obtidos encontram-se representados na Figura 6.

Figura 6- Espectro de infravermelho obtido para o (—) DES- ChCl:Ox (1:1), (—) Cloreto de colina (ChCl) e (—) Ácido oxálico (Ox).



Ao analisar o espectro obtido para o ChCl (—), observa-se a frequência próxima a 3250 cm^{-1} , associada à ligação OH-Cl, já o pico observado em torno de 1500 cm^{-1} refere-se a ligação N-C. No espectro obtido para o Ox (—) observa-se uma sobreposição de bandas próximo de 3500 cm^{-1} típicas de ácidos carboxílicos em decorrência das fortes ligações intermoleculares de hidrogênio. Neste ainda observa-

se, nas frequências próximas a 1200 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} , bandas características das ligações C-O e C=O, respectivamente (PINHEIRO, 2021; SAHA; DEY; CHAKRABORTY, 2019).

Em relação ao espectro obtido para o DES (—), espera-se que haja uma combinação dos espectros dos reagentes. Próximo a 1750 cm^{-1} , observa-se um pico agudo que indica a presença do grupo C=O pertencente ao éster, bem como as frequências entre $1300\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$, que representam a ligação C-O do éster, apresentando deslocamento em relação ao ácido carboxílico evidenciando a formação do éster como já reportado a possibilidade por FLORINDO et al. (2014) e RODRIGUEZ et al. (2019). As frequências próximas a 1000 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} evidenciam a preservação da ligação C-N da colina (SAHA; DEY; CHAKRABORTY, 2019). O espectro obtido foi muito semelhante ao obtido por SAHA; DEY; CHAKRABORTY (2019).

A viscosidade, definida como a resistência ao escoamento, é um parâmetro importante para ser avaliado nos DESs, pois esta, como influencia na taxa de fluxo do solvente, pode acarretar na inutilização do mesmo para algumas aplicações, uma vez que se o DES apresentar alta viscosidade o manuseio do mesmo é dificultado, tanto na etapa de preparo de amostras, quanto na introdução da mesma nos equipamentos para determinação (SINGH et al., 2021). Após as primeiras sínteses realizadas, percebeu-se que a viscosidade do DES ChCl:Ox (1:1) era elevada e que o manuseio da mesma seria uma limitação/dificuldade encontrada, logo, optou-se por trabalhar com o mesmo a quente, já que a viscosidade diminui com o aumento da temperatura uma vez que as forças intermoleculares são enfraquecidas. Infelizmente, não foi possível medir a viscosidade do DES sintetizado, porém é reportado por SAHA; DEY; CHAKRABORTY (2019) a viscosidade do DES composto por ChCl e Ox é igual a 37 cP, ao compararmos este valor com a viscosidade da água, por exemplo, que apresenta um valor igual a 1,002 cP, pode-se perceber a alta viscosidade do DES ChCl: Ox (1:1).

5.4 CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS E DE EXTRAÇÃO

5.4.1 Curvas de pirólise e atomização

Os analitos Cd e Pb são elementos termicamente instáveis e, embora a própria matriz da amostra possa ser um estabilizante térmico para estes, deve-se tomar o

cuidado para que os mesmos não sejam perdidos durante a etapa de pirólise do programa de temperaturas, aplicado em análises por GF AAS. Desta forma, é essencial a otimização adequada das etapas de pirólise e atomização, por meio das curvas de pirólise e atomização, para garantir a eliminação eficiente da matriz e adequada geração de átomos livres dos analitos no estado gasoso (BORGES et al., 2006). Para otimização do programa de temperaturas utilizou-se solução padrão dos analitos em meio aquoso, solução aquosa adicionada de DES e extrato das amostras com DES.

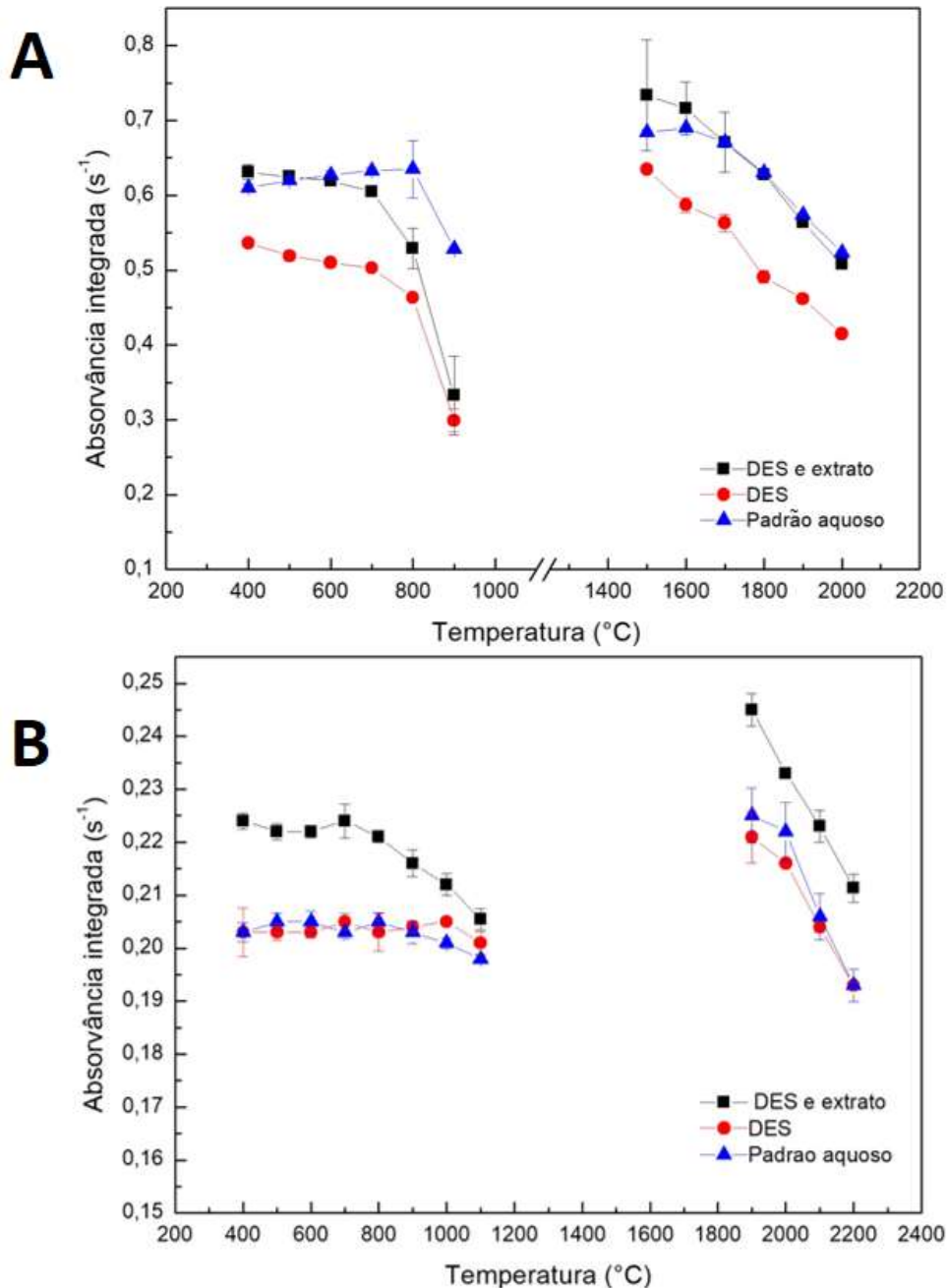
Sabendo-se da instabilidade térmica dos analitos, bem como a natureza complexa da matriz da amostra, o modificador universal de Pd/Mg estava sendo utilizado, porém, ao realizar testes preliminares com as diferentes amostras de referência certificadas, observou-se um sinal de fundo intenso. Após vários testes, optou-se por utilizar apenas do $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, que permitiu a estabilização térmica dos analitos sem a presença de fundo (AMORIM FILHO et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2018).

A partir das curvas de pirólise e atomização obtidas, representadas na Figura 7a para o Cd e Figura 7b para o Pb, pode-se perceber que a presença da matriz da amostra e do DES não influenciam de forma muito representativa no comportamento térmico dos analitos, uma vez que observa-se perfis muito semelhantes para ambas as curvas.

Sabendo-se que a curva de pirólise visa determinar a temperatura máxima aplicável para eliminação da matriz, sem que ocorra perda de sinal do analito, observa-se que, para o Cd, a temperatura que antecede a queda do sinal, na curva que contém o extrato da amostra, é de 600 °C, sendo a temperatura de pirólise adotada como ótima. Já para o Pb, embora observe-se uma leve queda no sinal para a temperatura de 900 °C, esta foi definida como ótima pelo sinal transiente simétrico correspondente e por, em temperaturas menores, observar a formação fumaça em temperaturas de pirólise ainda próximas de 800 °C. As curvas de atomização são realizadas para determinar a mínima temperatura para obtenção da máxima formação de átomos livre do analito em estado gasoso. Embora as sensibilidades dos sinais obtidos, ao aumentar a temperatura, tenha sido decrescente em termos de valores de absorvância, ao analisar os espectros obtidos, observa-se que os picos obtidos não retornaram completamente para a base, indicando a atomização incompleta dos analitos, fazendo com o que a área integrada sob a curva seja maior, conseqüentemente acarretando em maiores

valores de absorvância integrada. O mesmo comportamento foi observado para ambos os analitos. Sendo assim, a maior temperatura possível para obtenção da completa atomização dos átomos dos analitos foi em 1900 °C para o Cd e 2100 °C para o Pb.

Figura 7. Curvas de pirólise e atomização para solução aquosa (-▲-), solução aquosa e DES (-●-) e solução aquosa, DES e extrato (-■-), para concentrações de (A) 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e 15 μg de Pd, temperatura atomização para curva de pirólise 1800 $^{\circ}\text{C}$. Temperatura de pirólise para curva de atomização 600 $^{\circ}\text{C}$ e (B) 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb e 15 μg de Pd. Temperatura atomização para curva de pirólise 2100 $^{\circ}\text{C}$. Temperatura de pirólise para curva de atomização 800 $^{\circ}\text{C}$. As barras de erro representam o desvio padrão (n=3).



5.4.2 Curvas de calibração

Para a quantificação de Cd e Pb, foram avaliadas diferentes técnicas de calibração, sendo a calibração externa, por meio da diluição de padrões aquosos, calibração com simulação da matriz, contendo padrões aquosos e o DES, e por adição de analito.

Sabendo-se que a curva de adição de analito é considerada a técnica de calibração ideal, uma vez que a amostra se encontra presente em todas as soluções de calibração, utilizou-se os valores obtidos para a mesma como referência de comparação para as demais técnicas de calibração avaliadas.

Baseado na comparação realizada por AZEVEDO SILVA et al. (2010), observa-se que os desvios entre as inclinações das curvas calibração externa e simulação de matriz tanto para o Cd, quanto para o Pb, em relação a curva de adição de analito, são menores que 10 %. Sendo que as concordâncias entre as curvas aquosas e a curva de referência foram de 98,06 % e 97,30 %, para Cd e Pb, respectivamente e em relação a simulação de matriz as concordâncias obtidas foram de 104,85 % e 96,14 % para Cd e Pb, respectivamente. Tais dados evidenciam a possibilidade do uso de quaisquer uma das curvas para determinação dos analitos. Tendo em vista a maior simplicidade da técnica de calibração externa, esta foi utilizada sem perdas de sensibilidade e com aumento da frequência analítica, uma vez que a mesma curva pode ser utilizada para todas as amostras.

Tabela 7. Avaliação da técnica de calibração para determinação de Cd e Pb por GF AAS após extração com DES. (AQ: aquosa; SM: simulação de matriz e AA: adição de analito)

	Cd			Pb		
	AQ	SM	AA	AQ	SM	AA
Faixa calibração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,0 – 8,0			5,0 -100,0		
Intercepto	0,035	0,026	0,116	0,033	0,029	0,047
Inclinação ($\text{s L } \mu\text{g}^{-1}$)	0,071	0,076	0,072	0,004	0,004	0,004
R²	0,9940	0,9930	0,9970	0,9994	0,9997	0,9980

5.4.3 Otimização multivariada da extração

A influência do volume de DES, tempo e temperatura de ultrassom na extração de Cd e Pb de amostras biológicas (BCR 186) foi avaliada por meio de um planejamento

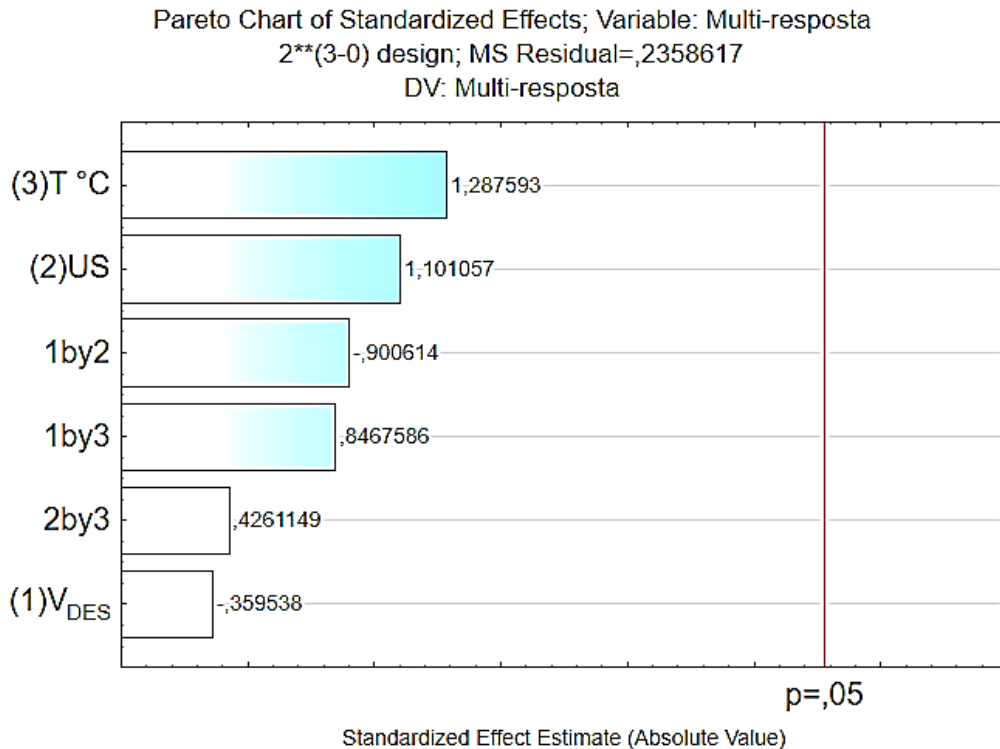
2³ com ponto central. A influência dessas variáveis foi avaliada por meio de uma função multi-reposta (MR) a qual foi aplicada aos resultados obtidos de modo a obter uma condição de compromisso para extração os analitos. Os experimentos do planejamento fatorial, variáveis codificadas, reais e as respectivas MRs estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Experimentos do planejamento fatorial 2³, com as variáveis codificadas, reais e múltipla resposta para extração de Cd e Pb em amostras biológicas (V_{DES}: Volume de DES; US: ultrassom; MR: multi-resposta).

Experimento	V_{DES} (μL)	Tempo de US (min)	Temperatura (°C)	MR
1	-1 (400)	-1 (5)	-1 (30)	0,821
2	+1 (800)	-1 (5)	-1 (30)	0,449
3	-1 (400)	+1 (55)	-1 (30)	1,095
4	+1 (800)	+1 (55)	-1 (30)	0,638
5	-1 (400)	-1 (5)	+1 (80)	0,559
6	+1 (800)	-1 (5)	+1 (80)	1,302
7	-1 (400)	+1 (55)	+1 (80)	1,659
8	+1 (800)	+1 (55)	+1 (80)	1,250
9	0 (600)	0 (30)	0 (55)	1,694
10	0 (600)	0 (30)	0 (55)	0,777
11	0 (600)	0 (30)	0 (55)	1,569

A otimização multivariada indicou que nenhuma das variáveis estudadas no procedimento de extração apresentou significância, nem mesmo a interação entre duas variáveis, como representado no gráfico de Pareto (Figura 8).

Figura 8. Gráfico de Pareto das variáveis analisadas pelo planejamento 2^3 para 95 % de confiança.

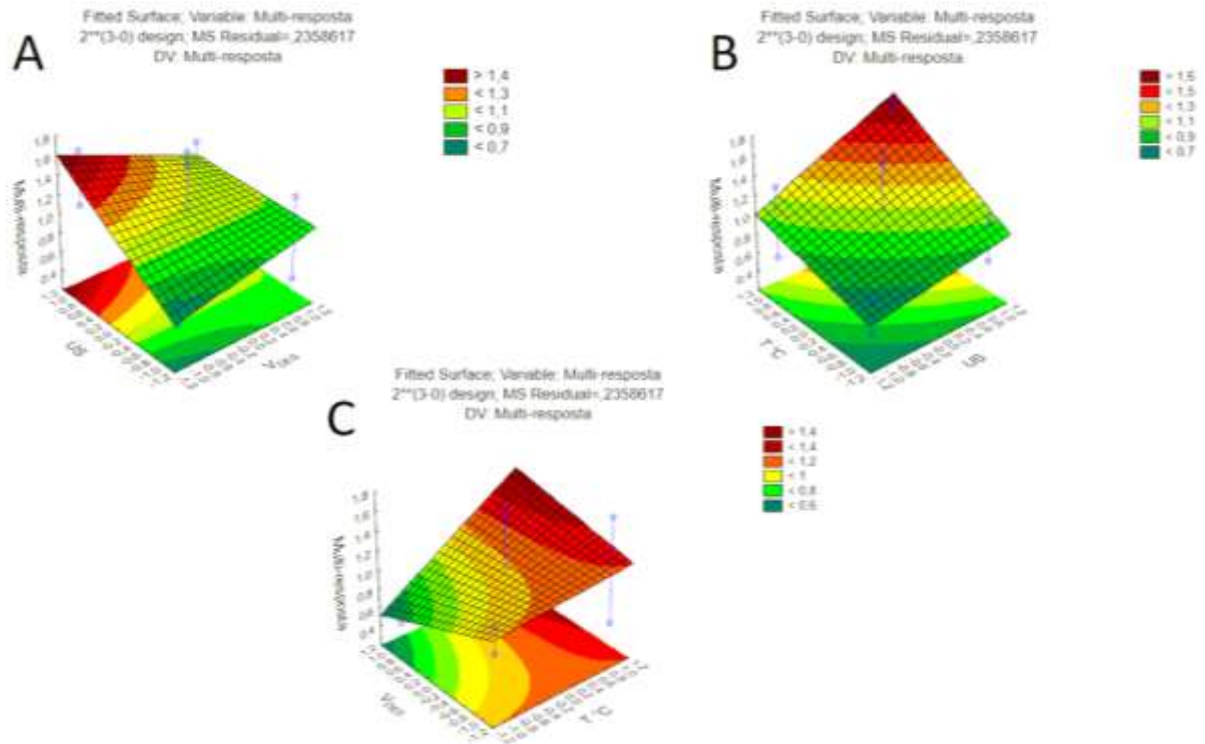


Como pode-se observar, tanto a partir do gráfico de Pareto quanto pelas superfícies de respostas obtidas para o planejamento (Figura 9), embora não significativas, observa-se que quanto maior a temperatura e o tempo de US há uma indicação de melhora na extração, em contra partida, quanto menor o volume de DES utilizado, melhor seria para a recuperação dos analitos, mantendo-se o cuidado para que o volume de solvente extrator seja suficiente para completa dissolução da amostra.

Sabe-se que a utilização da energia ultrassônica como energia auxiliar para procedimentos de extração é amplamente aplicada por afetar positivamente o desempenho da extração, uma vez que favorece o contato entre o solvente e a amostra, por meio o aumento da superfície sólida, proveniente do rompimento do sólido, como utilizado por YILMAZ; SOYLAK (2014) para extração de ferro de amostras biológicas (ZHANG; TANG; ROW, 2014). Além da energia ultrassônica, a temperatura também apresenta potencial para auxiliar no processo de extração, uma vez que auxilia na dissolução da amostra sólida no solvente extrator (HABIBI et al., 2013). Sabendo-se da alta viscosidade dos DESs, o uso de temperaturas acima da ambiente também auxilia na extração por diminuir a viscosidade do solvente, acarretando na melhor solubilização

da amostra no solvente, aumentando a interação e, conseqüentemente, aumentando a eficiência da extração (KARIMI et al., 2015).

Figura 9. Superfícies de resposta- múltipla resposta. Planejamento 2^3 (A) Tempo de Ultrassom *versus* Volume de DES (B) Temperatura *versus* Tempo de Ultrassom (C) Volume de DES *versus* Temperatura.



Estudos reportados na literatura indicam que as variáveis selecionadas para estudo têm forte implicação no processo de extração, porém pode-se justificar os resultados obtidos pelas condições em que os experimentos foram realizados e algumas constatações feitas no decorrer destes. Uma das limitações encontradas foi em relação ao ultrassom utilizado para os experimentos que não atinge temperatura maior que 90 °C, sendo extremamente difícil alcançar e manter-se constante, logo, pode-se ocasionar em perdas de eficiência de extração em decorrência do citado. Ainda, observou-se que a utilização de um maior volume de DES proporciona maior dissolução das amostras, em contra partida, ao separar e diluir as soluções dos experimentos contento maiores volumes de DES (600 μ L e 800 μ L), a solução resultante ao ser transferida ao copo amostrador e ficar em contato direto com o ar em sala refrigerada, se solidificava no fundo do copo, fato que não ocorreu quando a proporção de diluição de DES em água era mantida em pelo menos 1:3. Logo, o volume

de 400 μL foi o ideal, aliado ao uso de pérolas de vidro para auxiliar na interação DES/amostra, garantindo a completa homogeneização da amostra, nessas condições, não foram observados problemas de solidificação dos extratos diluídos.

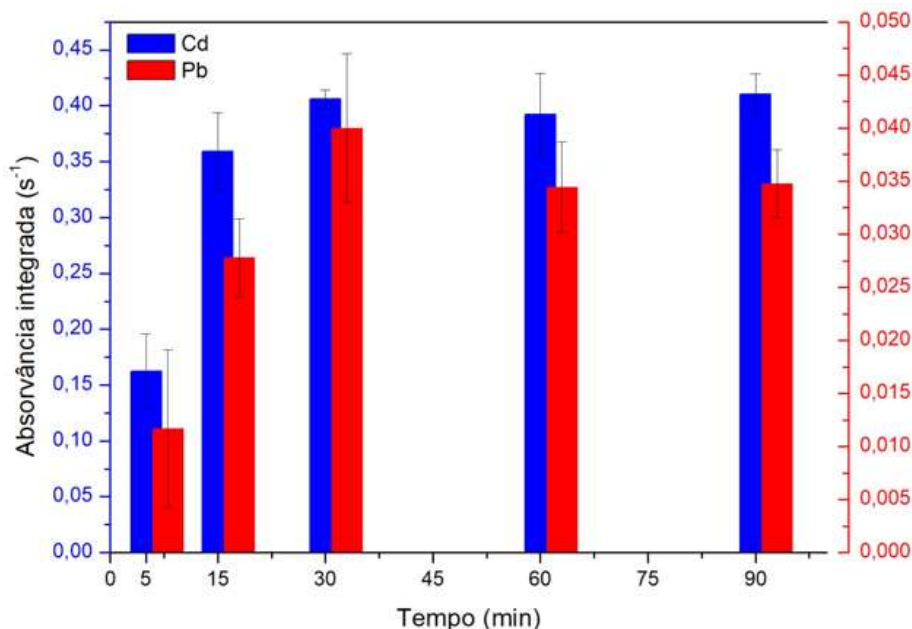
Tendo em vista as limitações encontradas, em fazer uso do US simultaneamente ao aquecimento, e testes preliminares, que apresentaram boas recuperações submetendo as soluções de extração somente ao aquecimento. Desta forma, optou-se por dar continuidade a otimização da etapa de extração de forma univariada, sendo o tempo de extração a única variável a ser estudada utilizando a temperatura descrita na literatura ($95 \pm 5^\circ\text{C}$) (HABIBI et al., 2013).

5.4.4 Otimização do tempo de aquecimento

Tendo em vista a alta viscosidade do DES ChCl:Ox (1:1) verificou-se que a dissolução e extração eram favorecidas em temperaturas elevadas, uma vez que nestas condições há diminuição da viscosidade do solvente (KARIMI et al., 2015). Desta forma, a utilização de temperaturas elevadas é preferida por favorecer a extração.

Fixada a temperatura de extração em $95 \pm 5^\circ\text{C}$, otimizou-se o tempo em que as amostras, junto ao DES, foram submetidas a diferentes tempos de aquecimento (5, 15, 30, 60 e 90 minutos) em banho-maria. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 10.

Figura 10. Otimização tempo de extração de Cd e Pb a partir de 40 mg de amostra de rim de porco. Condições de extração: 400 μL do DES ChCl: Ox (1:1), temperatura de aquecimento $95 \pm 5^\circ\text{C}$. Cd - Pirólise 600°C e atomização do Cd 1900°C , Pb – Pirólise 900°C e atomização 2100°C . As barras de erro representam o desvio padrão ($n=3$).



O teste de Tukey foi realizado para os experimentos realizados e através deste observou-se que o único tempo que apresentou diferença significativa dos demais, para 95% de confiança, foi 5 minutos de extração, para ambos os analitos. Desta forma, quaisquer um dos demais tempos estudados poderiam ser selecionados como tempo de extração ideal, porém optou-se por 30 minutos de extração, para ambos analitos uma vez que a extração deste é realizada de forma simultânea, pois este tempo apresentou maior solubilização da amostra, quando comparado com as replicadas submetidas à 15 minutos de aquecimento.

5.5 FIGURAS DE MÉRITO

As figuras de mérito determinadas para o método proposto encontram-se dispostas na Tabela 10. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados considerando, respectivamente, 3,3 e 10 vezes o desvio padrão de dez medições consecutivas do branco da amostra, dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração.

Tabela 9. Figuras de mérito para determinação de Cd e Pb por GF AAS, utilizando Pd como modificador, calibração externa com padrões aquosos. (R^2 = coeficiente de determinação; LOD= limite de detecção; LOQ= limite de quantificação; RSD= desvio padrão relativo).

	Cd	Pb
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,002 – 8,0	0,041 -100,0
R^2	0,9969	0,9988
LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,002	0,041
LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,006	0,125
RSD (% , n=3)	0,6 - 20,7	3,2 - 15,8

Comparando-se os valores obtidos com os da literatura, observa-se que os LODs e LOQs obtidos foram semelhantes aos determinados por PERELONIA et al. (2021) que para Cd obteve valores entre 0,0011- 0,0189 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,0036-0,0626 $\mu\text{g g}^{-1}$ para LOD e LOQ, respectivamente. Para Pb os valores entre 0,0205- 0,0480 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,0683- 0,1598 $\mu\text{g g}^{-1}$, LOD e LOQ respectivamente, foram obtidos para análises de diversas amostras biológicas por GF AAS.

O trabalho de BATISTA et al. (008), que analisou unhas humanas após solubilização com TMAH, reporta LODs próximos aos encontrados no presente trabalho. Segundo os autores, foram obtidos de LODs para Cd iguais a 0,0001 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,024 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas análises por ICP-MS e ETAAS, respectivamente. Para Pb os foram obtidos LODs de 0,0015 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,13 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, por ICP-MS e ETAAS. Tendo em vista as comparações feitas acima, pode-se afirmar que o método proposto é adequado para determinação de Cd em Pb em amostras biológicas.

A baixa precisão, observada por meio de altos valores de RSDs, pode estar relacionada com a dificuldade de homogeneizar a amostra no DES uma vez que sua alta viscosidade, mesmo em altas temperaturas, pode dificultar o processo de extração. A utilização de pérolas de vidro pode minimizar esta limitação e a utilização de um número maior de pérolas, bem como a agitação durante o tempo de aquecimento podem contribuir para a uma maior precisão.

5.6 VERIFICAÇÃO DA EXATIDÃO

Para todas as amostras, realizou-se os experimentos em quadruplicata. De modo a identificar dentro do conjunto de dados possíveis *outliers*, aplicou-se o teste Q para 95% de confiança. Dentro dos conjuntos de dados, os que apresentaram um valor de $Q > Q_{\text{crítico}}$, foram descartados e não entraram no cálculo das médias e desvios determinados, estes encontram-se dispostos na Tabela 11 para o Cd e na Tabela 12 para o Pb. Os valores obtidos para o teste Q encontram-se no Apêndice 1A.

Tabela 10. Concentrações certificadas, determinadas de Cd e porcentagem de recuperação, em quatro diferentes amostras de referência certificadas.

Amostras	Certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)
Proteína de peixe (n=3)	0,290 \pm 0,020	0,189 \pm 0,001	65
Rim de porco (n=4)	2,710 \pm 0,150	1,850 \pm 0,156	68
Tecido de ostra (n=4)	2,480 \pm 0,008	1,440 \pm 0,297	58
Tecido de mexilhão (n=4)	0,348 \pm 0,007	0,210 \pm 0,042	60

Tabela 11. Concentrações certificadas, determinadas de Pb e porcentagem de recuperação, em quatro diferentes amostras de referência certificadas.

Amostras	Certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)
Músculo bovino (n=4)	0,308 \pm 0,240	0,419 \pm 0,066	110
Rim de porco (n=4)	0,306 \pm 0,011	0,279 \pm 0,021	91
Tecido de ostra (n=4)	0,308 \pm 0,009	0,319 \pm 0,010	104
Tecido de mexilhão (n=4)	2,000 \pm 0,040	2,120 \pm 0,204	106

Realizou-se o teste t visando comparar estatisticamente os resultados determinados com as concentrações expressas nos certificados, para isso foi aplicado o teste t para 95 % de confiança em um grau de liberdade igual a 3 (n=4) e grau de liberdade igual a 2 (n=3) para as concentrações de Cd na amostra de proteína de peixe, pois uma replicata foi descartada no teste Q. Os valores de t obtidos para as médias dos resultados foram comparados com o valor de tabela de $t_{\text{crítico}}$ igual a 3,18 (GL=3) e

$t_{\text{crítico}}$ igual a 4,30 (GL=2). Para o Cd, apenas a concentração determinada para a amostra de rim de porco não apresentou diferença significativa, para todas as demais amostras foi obtido um t maior que o $t_{\text{crítico}}$, evidenciando que há diferença entre a concentração determinada e o valor certificado, desta forma observa-se que a otimização da extração de Cd necessita de maiores estudos e otimizações futuras.

Já para os testes aplicados para análise de Pb nas amostras, todos os valores de t calculados foram menores que o $t_{\text{crítico}}$, comprovando a inexistência de diferença significativa entre a concentração determinada e a expressa no certificado. Desta maneira, pode-se afirmar que os resultados obtidos para determinação de Pb utilizando DES como solvente extrator e GF AAS são estatisticamente satisfatórios e concordantes com os valores certificados. Os valores obtidos para o teste t encontram-se no Apêndice 1B.

Outra maneira de avaliar os valores de concentração obtidos é em relação à porcentagem de recuperação dos analitos. Nas Tabelas 11 e 12 encontram-se os valores de porcentagem de recuperação obtidos entre os valores certificados e determinados para as amostras. Pode-se observar que todos os valores de recuperações obtidos para Cd apresentaram-se abaixo da faixa aceitável de 80-110 %, ressaltando a necessidade de otimizações futuras do processo de extração para este analito. Entretanto, os valores obtidos para o Pb reforçam o constatado anteriormente que o método desenvolvido utilizando DES como solvente extrator, é eficiente para diversas amostras biológicas (SCHULZ et al., 2017; TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004).

6 ANÁLISE DA VERDURA QUÍMICA

Atualmente, o desenvolvimento de metodologias, tanto no ramo acadêmico quanto industrial, que sejam ambientalmente amigáveis e que ofereçam menor risco à saúde do operador e menores prejuízos ao meio ambiente são preferíveis e seguem no foco das pesquisas. Neste sentido os DESs são reportados na literatura como uma alternativa ambientalmente amigável para solventes tóxicos vastamente utilizados em metodologias tradicionais como a digestão ácida, extração Soxhlet, LLE e SPE.

Os DESs são apresentados como alternativas, porém poucos trabalhos trazem uma análise e/ou comparações que comprovem e enfatizem os benefícios, frente à química verde que os DESs agregam aos trabalhos em que são utilizados. Sendo

assim, o presente trabalho traz duas abordagens neste sentido que analisam, desde a síntese dos DESs através da EV, até à aplicação destes em metodologias analíticas através da métrica eco-escala. Estas serão discutidas nas sessões seguintes.

6.1 ESTRELA VERDE

A Estrela Verde (EV) é uma métrica holística de natureza gráfica utilizada para a determinação do grau de verdura de experimentos laboratoriais baseado nos 12 princípios da Química Verde (GQ) (ANEXO B). Tendo em vista a necessidade de avaliar do ponto de vista verde reações químicas de síntese, desenvolvimento de novos produtos, processos de fabricações, entre outros, a EV foi desenvolvida durante a tese para obtenção de grau doutora em ensino e divulgação das ciências pela Doutora Dominique Azevedo Costa (COSTA, 2011) e posteriormente reformulada à configuração atual.

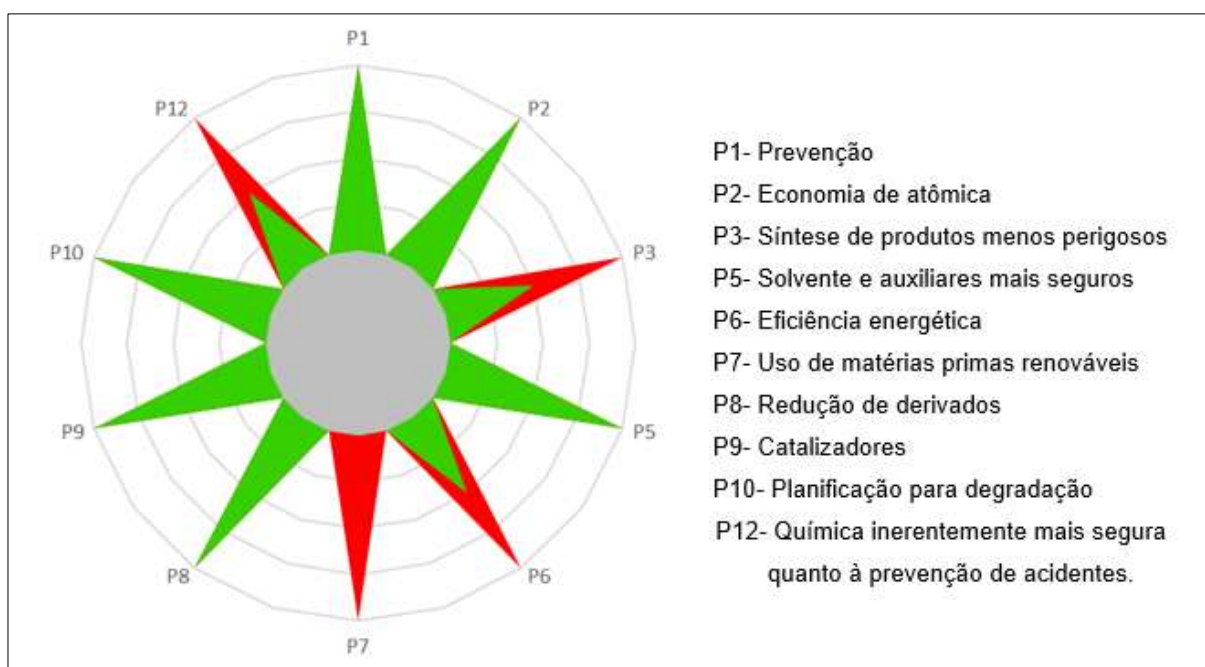
Para a obtenção da EV, deve-se considerar todas as substâncias envolvidas, tais como reagentes, produtos, resíduos, catalisadores, coprodutos, agentes de purificação, solventes e secantes. Informações acerca dos riscos e danos para a saúde, ambiente, perigos físicos, fonte de obtenção (matéria prima renovável ou não) e degradabilidade são analisadas. Todas essas informações podem ser obtidas através das Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ), encontradas facilmente nos sites dos fornecedores dos reagentes e produtos químicos.

A ideia central da EV é a construção de uma estrela com tantas pontas quanto os princípios utilizados na avaliação de verdura, a verdura de cada ponta é proporcional ao grau de cumprimento do respectivo princípio, sendo o nível 1 de mínima verdura e o nível 3 de máxima verdura, ou seja, quanto maior for a área verde obtida, maior é a benignidade da síntese. Vale ressaltar que dos 12 princípios da GQ, o princípio 4 e o 11 não foram analisados uma vez que na síntese dos DESs não há formação de novos produtos químicos. A análise dos demais princípios, atribuição das respectivas pontuações e a respectiva construção da métrica, encontram-se na Figura 11. As pontuações a serem atribuídas em relação ao código de perigo encontram-se no Anexo C.

Após a obtenção da EV, calculou-se o Índice de Preenchimento de Estrela (IPE) obtendo-se um valor igual a 75. Sendo 100 o IPE máximo, pode-se concluir que a verdura da síntese dos DESs apresenta excelente verdura, uma vez que não há

utilização de catalisadores, não há formação de coprodutos, nem há necessidade de utilização de solventes e substâncias auxiliares, os reagentes envolvidos apresentam riscos moderados à saúde do operador e ao meio ambiente e são biodegradáveis, comprovando o já reportado na literatura sobre benignidade e simplicidade da síntese desta classe de solventes (SINGH et al., 2021).

Figura 11. Estrela Verde (EV) obtida a partir da análise da síntese do DES utilizado na metodologia proposta, as pontas representam os princípios da química verde.



6.2 ECO-ESCALA

A eco-escala aplicada à química analítica é resultado de reformulações de métricas que visavam, em suma, quantificar metodologias, principalmente de sínteses, na área de química. Sabendo-se do potencial toxicidade atribuída à processos analíticos, postulou-se os 12 princípios da Química Analítica Verde (Anexo D) que assumem que um procedimento analítico ideal deve ser caracterizado pela eliminação ou minimização de reagentes, consumo de energia e geração de resíduos.

Sendo assim, a eco-escala apresenta-se como uma ferramenta de análise quantitativa eficiente para avaliação de processos analíticos. Nesta são atribuídas pontuação determinadas pontos de penalidade à cada etapa do procedimento analítico e, ao final da análise, o somatório dos pontos de penalidade deve ser subtraído de 100, valor que caracteriza um procedimento ideal. Desta forma, quanto mais a pontuação

obtida se afasta desse máximo, menos ambientalmente amigável é o procedimento analisado.

A Tabela 13 apresentada abaixo traz a atribuição dos pontos de penalidade para cada etapa da metodologia desenvolvida no presente trabalho. Para este, obteve uma pontuação igual a 95, caracterizando a verdura do mesmo como excelente indo ao encontro dos referenciais teóricos que destacam tal qualidade de metodologias utilizando DES. A tabela de referência encontra-se no Anexo E.

Tabela 12. Atribuição de pontos de penalidade para obtenção da pontuação da eco-escala para a metodologia proposta.

	Reagentes	Sub-total	Total
Quantidade	ChCl	1	Quantidade X Perigo
	Ox	1	
	Pd(NO ₃) ₂	1	
Perigo	ChCl	0	0
	Ox	1	1
	Pd(NO ₃) ₂	0	0
Energia	GF AAS		1
Risco ocupacional	Emissão de vapores e gases para o ar		3
Resíduo			Quantidade X Característica
Quantidade		0	
Característica		3	0
Somatório dos pontos			5
Eco-escala			95

7 CONCLUSÃO

A utilização de DES como solvente extrator para Cd e Pb de amostras biológicas apresentou resultados promissores para ambos os analitos, embora a extração do Cd necessite de otimizações adicionais para garantir a extração eficiente do analito. Tendo em vista a alta complexidade de matrizes biológicas e as dificuldades e limitações encontradas para a análise destas, principalmente na etapa de preparo de amostras, os DESs e NADESs apresentam-se como uma alternativa com grande potencial para processos de extração.

O DES sintetizado a partir de ChCl:Ox (1:1) foi determinado como a combinação ideal para a extração de Cd e Pb. O desenvolvimento de uma metodologia empregando DES como solvente extrator e determinação por GF AAS, mostrou-se eficaz para quantificação de Pb. Obteve-se limites de detecção e quantificação na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$, adequados para determinação de Cd e Pb em amostras biológicas.

A síntese dos DESs corrobora ao reportado na literatura, dispondo de uma síntese pouco laboriosa, rápida e de acordo com os princípios da química verde. A metodologia desenvolvida e empregada no presente trabalho foi analisada do ponto de vista da química verde e apresentou resultados satisfatórios, IPE igual a 75 e eco-escala igual a 95, comprovando a excelente verduza química da metodologia proposta utilizando DES como solvente extrator. Por fim, cabe ressaltar que o DES utilizado no presente trabalho (ChCl:Ox 1:1) é um NADES, sendo os reagentes de partida de fontes naturais, este não apresenta riscos à saúde do operador além de ser biodegradável e biocompatível.

8 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados inconsistentes obtidos para o Cd, o presente trabalho deixa como perspectiva a otimização da metodologia de extração para o Cd, tais como a otimização da razão massa de amostra e volume de solvente extrator. Além disso, pretende-se buscar alternativas para resolver as limitações encontradas no que diz respeito à viscosidade dos DESs. Outra perspectiva do presente trabalho é a otimização do uso de pérolas de vidro utilizadas no processo de extração, para auxiliar na homogeneização da amostra com o DES, bem como otimizar o tempo de agitação e/ou providenciar a agitação simultaneamente e não paralelamente ao aquecimento.

Em relação à caracterização do DES, fica como perspectiva a determinação da viscosidade e da condutividade para enriquecer a comparação com o reportado na literatura.

9 REFERÊNCIAS

ABBOTT, A. P. et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical Communications**, v. 9, n. 1, p. 70–71, 2003.

ABBOTT, A. P. et al. Deep Eutectic Solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 29, p. 9142–9147, 2004.

ALTUNAY, N.; ELIK, A.; KAYA, S. Alcohol-DES based vortex assisted homogenous liquid-liquid microextraction approach for the determination of total selenium in food samples by hydride generation AAS: Insights from theoretical and experimental studies. **Talanta**, v. 215, n. March, p. 120903, 2020.

AMORIM FILHO, V. R. et al. Simultaneous determination of Cd and Pb in antibiotics used in sugar-cane fermentation process by GFAAS. **Eletica Quimica**, v. 31, n. 2, p. 7–12, 2006.

AVRAM, O. R.; CARAGEA, G.; VARZARU, C. A. Copper and its role in the human body – the importance of establishing copper concentrations in the body. **Romanian Journal of Military Medicine**, n. Abril, p. 127–133, 2021.

AZEVEDO SILVA, J. S. et al. Calibration techniques and modifiers for the determination of Cd, Pb and Tl in Biodiesel as microemulsion by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 4, p. 620–626, 2010.

BATISTA, B. L. et al. Simultaneous determination of Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in nail samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature: Comparison with ETAAS. **Talanta**, v. 76, n. 3, p. 575–579, 2008.

BATISTA, B. L. et al. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Analytica Chimica Acta**, v. 646, n. 1–2, p. 23–29, 2009.

BOOK, G. **Compendium of Chemical Terminology**. [s.l: s.n.].

BORGES, D. L. G. et al. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, v. 1, n. 18, p. 58–67, 2005.

BORGES, D. L. G. et al. Determination of lead in biological samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 21, n. 8, p. 763–769, 2006.

BOSCH, A. C. et al. **Heavy metals in marine fish meat and consumer health: A review** *Journal of the Science of Food and Agriculture* John Wiley and Sons Ltd, , 15 jan. 2016.

CHEN, C. C.; HUANG, Y. H.; FANG, J. Y. **Hydrophobic deep eutectic solvents as green absorbents for hydrophilic VOC elimination** *Journal of Hazardous Materials*, 2022.

COSTA, D. A. **Métricas de Avaliação da Química Verde**. [s.l.] Universidade do Porto, 2011.

DE SÁ, I. P. et al. Determination of Trace Elements in Meat and Fish Samples by MIP OES Using Solid-Phase Extraction. **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 1, p. 238–248, 1 jan. 2020.

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

FASIHI, M. et al. Deep eutectic-based vortex-assisted/ultrasound-assisted liquid-phase microextractions of chromium species. **Journal of the Iranian Chemical Society**, n. 0123456789, 2020.

FERREIRA, H. S. et al. Pre-concentration procedure for determination of copper and zinc in food samples by sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 77, n. 1, p. 73–76, 2008.

FILATOVA, D. G. et al. Present-Day Possibilities of High-Resolution Continuous-Source Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 563–568, 2020.

FLORINDO, C. et al. Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 2, n. 10, p. 2416–2425, 2014.

FLORINDO, C.; BRANCO, L. C.; MARRUCHO, I. M. **Quest for Green-Solvent Design: From Hydrophilic to Hydrophobic (Deep) Eutectic Solvents** *ChemSusChem*, 2019.

GAŁUSZKA, A. et al. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 61–72, 2012.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.

GALVÃO, F.; FELSNER, M. L. Direct determination of chromium in cane syrup by GF AAS. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, p. 2–14, 2021.

GARCÍA, G. et al. Deep eutectic solvents: Physicochemical properties and gas separation applications. **Energy and Fuels**, v. 29, n. 4, p. 2616–2644, 2015.

GHANEMI, K. et al. Ultra-fast microwave-assisted digestion in choline chloride-

oxalic acid deep eutectic solvent for determining Cu, Fe, Ni and Zn in marine biological samples. **Analytical Methods**, v. 6, n. 6, p. 1774–1781, 2014.

GILMORE, M. et al. A comparison of choline:urea and choline:oxalic acid deep eutectic solvents at 338 K. **Journal of Chemical Physics**, v. 148, n. 19, 2018.

GUILHERME CANEPPELE PAVEGLIO. Síntese, caracterização e aplicação de solventes eutéticos em reações envolvendo formação ou drivatização de heterociclos. p. 239, 2016.

HABIBI, E. et al. A novel digestion method based on a choline chloride-oxalic acid deep eutectic solvent for determining Cu, Fe, and Zn in fish samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 762, p. 61–67, 2013.

HANSEN, B. B. et al. Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 3, p. 1232–1285, 2021.

KARIMI, M. et al. Deep eutectic liquid organic salt as a new solvent for liquid-phase microextraction and its application in ligandless extraction and preconcentration of lead and cadmium in edible oils. **Talanta**, v. 144, p. 648–654, 2015.

KIANI, A. et al. Probabilistic Health Risk Assessment of Trace Elements in Baby Food and Milk Powder Using ICP-OES Method. **Biological Trace Element Research**, n. 0123456789, 2021.

LENARDÃO, E. J. et al. “Green chemistry” - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123–129, 2003.

LI, G.; ROW, K. H. Utilization of deep eutectic solvents in dispersive liquid-liquid micro-extraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 120, p. 115651, 2019.

LIANG, G. et al. Analysis of heavy metals in foodstuffs and an assessment of the health risks to the general public via consumption in Beijing, China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 6, p. 909, 2019.

LIU, Y. et al. Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 3, p. 679–690, 2018.

LIU, Y. T.; CHEN, Y. A.; XING, Y. J. Synthesis and characterization of novel ternary deep eutectic solvents. **Chinese Chemical Letters**, v. 25, n. 1, p. 104–106, 2014.

LONGO, L. S.; CRAVEIRO, M. V. Deep eutectic solvents as unconventional media for multicomponent reactions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 10, p. 1999–2025, 2018.

MAHBOOB, S. et al. Assessment of heavy metals pollution in seawater and sediments in the Arabian Gulf, near Dammam, Saudi Arabia. **Journal of King Saud University - Science**, v. 34, n. 1, p. 101677, 2022.

MARCUS, Y. Unconventional Deep Eutectic Solvents: Aqueous Salt Hydrates. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 12, p. 11780–11787, 2017.

MARTÍNEZ, D. et al. Determination of cadmium and lead in wine samples by means of dispersive liquid–liquid microextraction coupled to electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 67, p. 178–183, 2018.

MATONG, J. M.; NYABA, L.; NOMNGONGO, P. N. Determination of As, Cr, Mo, Sb, Se and V in agricultural soil samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after simple and rapid solvent extraction using choline chloride-oxalic acid deep eutectic solvent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, n. September 2016, p. 152–157, 2017.

PAIVA, A. et al. Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 2, n. 5, p. 1063–1071, 2014.

PERELONIA, K. B. S. et al. Validation of an analytical method for the determination of cadmium, lead and mercury in fish and fishery resources by graphite furnace and Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry. **Food Control**, v. 130, n. June, p. 108363, 2021.

PINHEIRO, D. M. L. **SOLVENTES EUTÉTICOS À BASE DE CLORETO DE COLINA: USO NA ELETRODEPOSIÇÃO DE PRATA E CARACTERIZAÇÃO TERMODINÂMICA**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2021.

QIN, H. et al. Overview of acidic deep eutectic solvents on synthesis, properties and applications. **Green Energy and Environment**, v. 5, n. 1, p. 8–21, 2019.

RADA-MENDOZA, M. et al. Atomic absorption spectrometry for the quantification of cadmium in thermoformed and biodegradable flexible films made from cassava (*Manihot esculenta crantz*). **Journal of Thermoplastic Composite Materials**, v. 34, n. 5, p. 657–670, 2021.

RATHER, I. A. et al. The sources of chemical contaminants in food and their health implications. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. NOV, 2017.

RESANO, M.; FLÓREZ, M. R.; GARCÍA-RUIZ, E. High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple lines. A critical review of current possibilities. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 88, p. 85–97, 2013.

RODRIGUEZ RODRIGUEZ, N. et al. **Degradation of Deep-Eutectic Solvents Based on Choline Chloride and Carboxylic Acids** **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, 2019.

SAHA, N. et al. Seasonal investigation of heavy metals in marine fishes captured from the Bay of Bengal and the implications for human health risk assessment. **Food Control**, v. 70, p. 110–118, 2016.

SAHA, S. K.; DEY, S.; CHAKRABORTY, R. Effect of choline chloride-oxalic acid based deep eutectic solvent on the ultrasonic assisted extraction of polyphenols from *Aegle marmelos*. **Journal of Molecular Liquids**, v. 287, p. 110956, 2019.

SALIMI, M. et al. Trace measurement of lead and cadmium ions in wastewater samples using a novel dithizone immobilized metal–organic framework-based μ -dispersive solid-phase extraction **Applied Organometallic Chemistry**, 2020.

SCHULZ, M. et al. Bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant potential of juçara fruits (*Euterpe edulis Martius*) subjected to in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 228, p. 447–454, 2017.

SHI, Y. et al. Highly efficient extraction/separation of Cr (VI) by a new family of hydrophobic deep eutectic solvents. **Chemosphere**, v. 241, p. 125082, 2020.

SINGH, M. B. et al. A mini review on synthesis, properties and applications of deep eutectic solvents. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 98, n. 11, p. 100210, 2021.

SMITH, P. J. et al. Ternary Deep Eutectic Solvent Behavior of Water and Urea Choline Chloride Mixtures. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 123, n. 25, p. 5302–5306, 2019.

SOCAS-RODRÍGUEZ, B. et al. Deep eutectic solvents. In: **Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. p. 123–177.

SOROURADDIN, S. M.; FARAJZADEH, M. A.; DASTOORI, H. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method based on a ternary deep eutectic solvent as chelating agent and extraction solvent for preconcentration of heavy metals from milk samples. **Talanta**, v. 208, n. September 2019, p. 120485, 2019.

SOROURADDIN, S. M.; FARAJZADEH, M. A.; OKHRAVI, T. Application of deep eutectic solvent as a disperser in reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of Cd(II) and Zn(II) ions from oil samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 93, n. March, p. 103590, 2020.

SOYLAK, M.; KOKSAL, M. Deep eutectic solvent microextraction of lead (II), cobalt (II), nickel (II) and manganese (II) ions for the separation and preconcentration in some oil samples from Turkey prior to their microsampling flame atomic absorption spectrometric determi. **Microchemical Journal**, v. 147, n. December 2018, p. 832–837, 2019.

TAKASAKI, Y. et al. Multielement analysis of micro-volume biological samples by ICP-MS with highly efficient sample introduction system. **Talanta**, v. 87, n. 1, p. 24–29, 2011.

TANG, B. et al. Deep eutectic solvent-based HS-SME coupled with GC for the analysis of bioactive terpenoids in *Chamaecyparis obtusa* leaves. **Chromatographia**,

v. 77, n. 3–4, p. 373–377, 2014.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535–552, 2004.

TEKIN, Z. et al. A green, accurate and sensitive analytical method based on vortex assisted deep eutectic solvent-liquid phase microextraction for the determination of cobalt by slotted quartz tube flame atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 310, n. November 2019, 2020.

THONGSAW, A. et al. Speciation of mercury in water and biological samples by eco-friendly ultrasound-assisted deep eutectic solvent based on liquid phase microextraction with electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 197, n. January, p. 310–318, 2019.

TUDOSIE, M. et al. Optimization of a GF-AAS method for lead testing in blood and urine: A useful tool in acute abdominal pain management in emergency. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 22, n. 3, p. 1–8, 2021.

U, B. W. Atomic absorption spectrometry - pregnant again after 45 years. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, p. 2081–2094, 1999.

ULLAH, A. K. M. A. et al. Development and validation of a GF-AAS method and its application for the trace level determination of Pb, Cd, and Cr in fish feed samples commonly used in the hatcheries of Bangladesh. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 8, n. 1, 2017.

VAN OSCH, D. J. G. P. et al. **Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants** **Green Chemistry**, 2015.

WELZ, B. et al. High-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry - What can we expect? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 220–229, 2003.

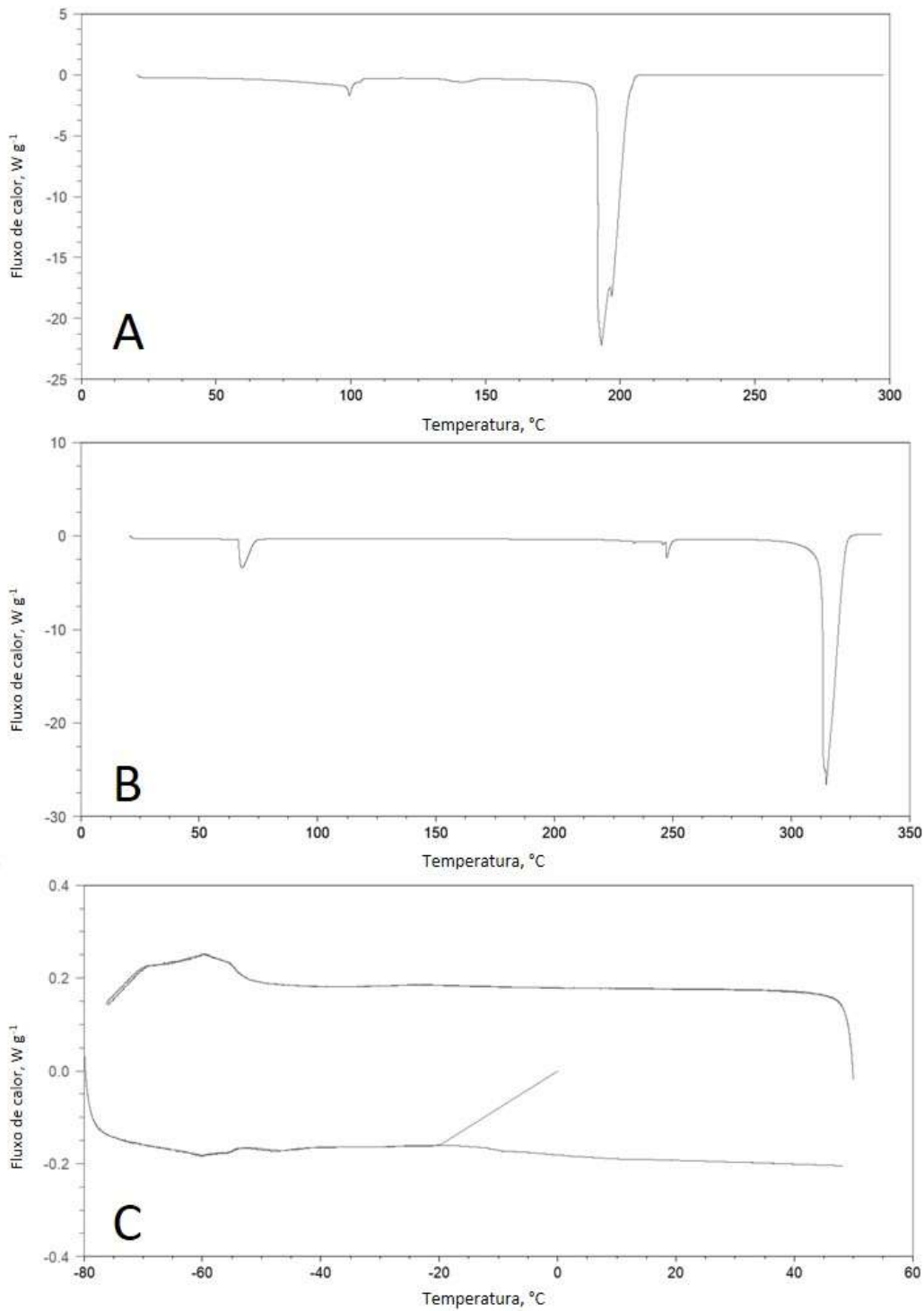
WELZ, B. et al. High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry - An analytical and diagnostic tool for trace analysis. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 9, p. 873–883, 2007.

WERNER, J. Ligandless, deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of the aqueous phase for preconcentration of lead, cadmium, cobalt and nickel in water samples. **Journal of Separation Science**, p. 1–24, 2019.

YAVIR, K. et al. Ionic liquids in the microextraction techniques: The influence of ILs structure and properties. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 130, 2020.

YILMAZ, E.; SOYLAK, M. Ultrasound assisted-deep eutectic solvent extraction of iron from sheep, bovine and chicken liver samples 1. 2014.

ZHANG, H.; TANG, B.; ROW, K. H. A Green Deep Eutectic Solvent-Based Ultrasound-Assisted Method to Extract Astaxanthin from Shrimp Byproducts. **Analytical Letters**, v. 47, n. 5, p. 742–749, 2014.

ANEXOS**A-** Termogramas de DSC obtidos para o ChCl (A), Ox (B) e ChCl:Ox (1:1) (C).

B- Princípios da química verde e seus critério de pontuação para três níveis de verdura, no qual pontuação igual a 3 representa verdura máxima e pontuação 1 representa verdura mínima.

Princípio da QV	Critérios	p
P1 – Prevenção	Todos os resíduos são inócuos (p=1, tabela 1)	3
	Resíduos que envolvam perigo moderado para a saúde e ambiente (p=2, tabela 1, pelo menos para uma substância, sem substâncias com p=3)	2
	Formação de pelo menos um resíduo que envolva perigo elevado para a saúde e ambiente (p=3, tabela 1a)	1
P2- Economia atômica	Reações sem reagentes em excesso ($\leq 10\%$) e sem formação de coprodutos	3
	Reações sem reagentes em excesso ($\leq 10\%$) e com formação de coprodutos	2
	Reações com reagentes em excesso ($>10\%$) e sem formação de coprodutos	2
	Reações com reagentes em excesso ($>10\%$) e com formação de coprodutos	1
P3 – Sínteses menos perigosas	Todas as substâncias envolvidas são inócuas (p=1, tabela 1a)	3
	As substâncias envolvidas apresentam perigo moderado para a saúde e ambiente (p=2, tabela 1, pelo menos para uma substância, sem substâncias com p=3)	2
	Pelo menos uma das substâncias envolvidas apresenta perigo elevado para a saúde e ambiente (p=3, tabela 1)	1
P5 – Solventes e outras substâncias auxiliares mais seguras	Os solventes e as substâncias auxiliares não existem ou são inócuas (p1, tabela 1)	3
	Os solventes e as substâncias auxiliares usadas envolvem perigo moderado para a saúde e ambiente (p=2, tabela 1, pelo menos para uma substância, sem substâncias com p=3)	2
	Pelo menos um dos solventes ou uma das substâncias auxiliares usadas envolve perigo elevado para a saúde e ambiente (p=3, tabela 1)	1
P6 – Planificação para conseguir eficácia energética	Temperatura e pressão ambientais	3
	Pressão ambiental e temperatura entre 0°C e 100°C que implique arrefecimento ou aquecimento	2
	Pressão diferente da ambiental e/ou temperatura muito afastada da ambiental	1
P7 – Uso de matérias primas renováveis	Todos os reagentes/matérias-primas envolvidos são renováveis (p=1, tabela 2)	3
	Pelo menos um dos reagentes/matérias-primas envolvidos é renovável, não se considera a água (p=1, tabela 2)	2
	Nenhum dos reagentes/matérias-primas envolvidos é renovável, não se considera a água (p=3, tabela 2)	1
P8 – Redução de derivatizações	Sem derivatizações ou com uma etapa	3
	Usa-se apenas uma derivatização ou duas etapas	2
	Usam-se várias derivatizações ou mais do que duas etapas	1
P9 – Catalizadores	Não se usam catalisadores ou os catalisadores são inócuos (p1, tabela 1)	3
	Utilizam-se catalisadores que envolvem perigo moderado para a saúde e ambiente (p=2, tabela 1)	2
	Utilizam catalisadores que envolvem perigo elevado para a saúde e ambiente (p=3, tabela 1)	1
P10 – Planificação para a degradação	Todas as substâncias envolvidas são degradáveis com os produtos de degradação inócuos (p=1, tabela 2)	3
	Todas as substâncias envolvidas que não são degradáveis podem ser tratados para obter a sua degradação com os produtos de degradação inócuos (p=2, tabela 2)	2
	Pelo menos uma das substâncias envolvidas não é degradável nem pode ser tratado para obter a sua degradação com produtos de degradação inócuos (p=3, tabela 2)	1
P12 – Química inerentemente mais segura quanto à prevenção de acidentes	As substâncias envolvidas apresentam perigo baixo de acidente químico (p=1, tabela 1b, considerando os perigos para a saúde e perigos físicos)	3
	As substâncias envolvidas apresentam perigo moderado de acidente químico (p=2, tabela 1, pelo menos para uma substância, considerando os perigos para a saúde e perigos físicos, e sem substâncias com p=3)	2
	As substâncias envolvidas apresentam perigo elevado de acidente químico (p=3, tabela 1, considerando os perigos para a saúde e perigos físicos)	1

Fonte: Portal Educa.

C- Pontuação para classificar os perigos das substâncias para a construção da EV.

Perigos		Pontuação Estrela verde	Perigos		Pontuação Estrela verde
H200	Físico	3	H318	Saúde	3
H201	Físico	3	H319	Saúde	2
H202	Físico	3	H320	Saúde	2
H203	Físico	3	H330	Saúde	3
H204	Físico	2	H331	Saúde	3
H205	Físico	3	H332	Saúde	2
H206	Físico	3	H333	Saúde	2
H207	Físico	3	H334	Saúde	3
H208	Físico	3	H335	Saúde	2
H220	Físico	3	H336	Saúde	2
H221	Físico	2	H340	Saúde	3
H222	Físico	3	H341	Saúde	3
H223	Físico	2	H350	Saúde	3
H224	Físico	3	H351	Saúde	3
H225	Físico	3	H360	Saúde	3
H226	Físico	2	H361	Saúde	3
H227	Físico	2	H362	Saúde	2
H228 (category 1)	Físico	3	H370	Saúde	3
H228 (category 2)	Físico	2	H371	Saúde	3
H229	Físico	2	H372	Saúde	3
H230	Físico	3	H373	Saúde	3
H231	Físico	2	H400	Ambiente	3
H232	Físico	3	H401	Ambiente	3
H240	Físico	3	H402	Ambiente	2
H241	Físico	3	H410	Ambiente	3
H242 (Type C & D)	Físico	3	H411	Ambiente	3
H242 (Type E & F)	Físico	2	H412	Ambiente	2
H250	Físico	3	H413	Ambiente	2
H251	Físico	3	H420	Ambiente	3
H252	Físico	2	EUH001	Físico	3
H260	Físico	3	EUH006	Físico	3
H261(category2)	Físico	3	EUH014	Físico	3
H261(category3)	Físico	2	EUH018	Físico	3
H270	Físico	3	EUH019	Físico	3
H271	Físico	3	EUH029	Saúde	3
H272(category2)	Físico	3	EUH031	Saúde	3
H272(category3)	Físico	2	EUH032	Saúde	3
H280	Físico	2	EUH044	Físico	3
H281	Físico	2	EUH059	Ambiente	3
H290	Físico	2	EUH066	Saúde	2
H300	Saúde	3	EUH070	Saúde	3
H301	Saúde	3	EUH071	Saúde	3
H302	Saúde	2	EUH201	Saúde	3
H303	Saúde	2	EUH201A	Saúde	2
H304	Saúde	3	EUH202	Saúde	3
H305	Saúde	2	EUH203	Saúde	2
H310	Saúde	3	EUH204	Saúde	2
H311	Saúde	3	EUH205	Saúde	2
H312	Saúde	2	EUH206	Saúde	3
H313	Saúde	2	EUH207	Saúde	3
H314	Saúde	3	EUH208	Saúde	2
H315	Saúde	2	EUH209	Físico	3
H316	Saúde	2	EUH209A	Físico	2
H317	Saúde	2			

Fonte: Portal Educa.

D- Os 12 princípios da GAC:

1. Técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar a necessidade de tratamento da amostra;
2. O tamanho mínimo da amostra e o número mínimo de amostras são metas;
3. Devem ser realizadas medições *in situ*;
4. Integração, em processos analíticos, de redução do consumo de energia e reagentes;
5. Métodos automatizados e miniaturizados devem ser preferíveis;
6. A derivatização deve ser evitada;
7. A geração de resíduos deve ser evitada sempre que possível e quando não possível uma gestão adequada destes deve ser fornecido;
8. Métodos multielementar ou multiparâmetros são preferidos frente à métodos monoelementar;
9. O uso de energia deve ser minimizado;
10. Reagentes obtidos de fonte renovável devem ser preferidos;
11. Reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos;
12. Segurança do operador deve ser aumentada.

Fonte: Adaptado GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK (2013).

E- Pontos de penalidade para calcular a eco-escala analítica.

	Reagentes	Sub-total	Total
Quantidade	<10 mL (g)	1	Quantidade X Perigo
	10-100 mL (g)	2	
	>100 mL (g)	3	
Perigo	Nenhum	0	
	Risco menos grave	1	
	Risco mais grave	2	
Energia	≤1,0 kWh por amostra		0
	≤1,5 kWh por amostra		1
	>1,5 kWh por amostra		2
Risco ocupacional	Processo analítico Hermético		0
	Emissão de vapores e gases para o ar		3
Resíduo Quantidade	Nenhum	0	
	<1 mL	1	Quantidade X Característica
	1-10 mL	3	
	>10 mL	5	
Característica	Reciclável	0	
	Degradável	1	
	Passivo	2	
	Não admite tratamento	3	
Somatório dos pontos			TOTAL

Fonte: Adaptado GAŁUSZKA et al. (2012).

F- Adaptado- Certificado de análise- BCR1 86: rim de porco.



JOINT RESEARCH CENTRE
Institute for Reference Materials and Measurements

CERTIFICATE OF ANALYSIS

ERM[®] - BB186

PIG KIDNEY		
	Mass Fraction	
	Certified value ^{1,2)} [mg/kg]	Uncertainty ^{2,3)} [mg/kg]
Cd	1.09	0.05
Cu	36.5	1.8
Fe	255	13
Mn	7.26	0.25
Pb	0.040	0.005
Se	10.3	0.9
Zn	134	5

1) Unweighted mean value of the means of accepted sets of data, each set being obtained in a different laboratory and/or with a different method of determination. The certified value and its uncertainty are traceable to the International System of Units (SI).

2) Certified mass fractions are corrected for the water content of the material (and expressed as dry mass), determined as described in the section "Instructions for use".

3) The certified uncertainty is the expanded uncertainty with a coverage factor $k = 2$ corresponding to a level of confidence of about 95 % estimated in accordance with ISO/IEC Guide 98-3, Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM:1995), ISO, 2008.

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date:

The minimum amount of sample to be used is 200 mg.

NOTE

European Reference Material ERM[®]-BB186 was produced and certified under the responsibility of the Institute for Reference Materials and Measurements of the European Commission's Joint Research Centre according to the principles laid down in the technical guidelines of the European Reference Materials[®] co-operation agreement between BAM-IRMM-LGC. Information on these guidelines is available on the internet (<http://www.erm-crm.org>).

Accepted as an ERM[®], Geel, 22 August 2012

Latest revision: October 2013

Signed: 

Prof. Dr. Hendrik Emons
European Commission
Joint Research Centre
Institute for Reference Materials and Measurements
Retieseweg 111
B-2440 Geel, Belgium



Registration No. 268-RM
ISO Guide 34 for the
production of reference materials

All following pages are an integral part of the certificate.

Page 1 of 4

APÊNDICES

1A- Valores calculados para os testes Q para Cd e Pb.

Amostra		1º	2ª	3ª	4ª
		Replicata	Replicata	Replicata	Replicata
Tecido de mexilhão	Cd	0,123	0,751	0,125	0,123
	Pb	0,607	0,608	0,063	0,063
Rim de porco	Cd	0,129	0,400	0,397	0,129
	Pb	0,224	0,249	0,224	0,527
Proteína de peixe	Cd	0,061	0,061	0,877 ^a	0,062
Tecido de ostra	Cd	0,056	0,771	0,056	0,173
	Pb	0,420	0,096	0,417	0,3019
Músculo bovino	Pb	0,730	0,187	0,083	0,083

^a Valor determinado acima do $Q_{\text{crítico}}$. Replicada descartada.

1B- Valores calculados de t para Cd e Pb.

Amostra	Cd	Pb
Tecido de mexilhão	6,69	1,20
Rim de porco	2,75	2,57
Proteína de peixe	156,0	-
Tecido de ostra	7,02	2,24
Músculo bovino	-	1,19