



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MILENA SANTOS DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DE VIOLETA GENCIANA EM ÁGUA DE
PISCICULTURA POR COLORIMETRIA DE IMAGEM DIGITAL
UTILIZANDO MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA DISPERSIVA
NA SERINGA COM VARIAÇÃO DE PRESSÃO.**

**JEQUIÉ – BA
DEZEMBRO DE 2023**

MILENA SANTOS DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DE VIOLETA GENCIANA EM ÁGUA DE PISCICULTURA POR
COLORIMETRIA DE IMAGEM DIGITAL UTILIZANDO MICROEXTRAÇÃO EM
FASE LÍQUIDA DISPERSIVA NA SERINGA COM VARIAÇÃO DE PRESSÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Prof. Dra. Rebeca Moraes Menezes
Coorientador: Dr. Jeferson Alves Barreto

JEQUIÉ – BA
DEZEMBRO DE 2023

Silva, Milena Santos da.

Determinação de violeta genciana em água de piscicultura por colorimetria de imagem digital utilizando microextração em fase líquida dispersiva na seringa com variação de pressão/ Milena Santos da Silva. - Jequié, 2023.

38f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação da Profa. Dra. Rebeca Moraes Menezes).

Rafaella Cândia Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

MILENA SANTOS DA SILVA

“Determinação de violeta genciana em água de piscicultura por colorimetria de imagem digital utilizando microextração em fase líquida dispersiva na seringa com variação de pressão”

COMISSÃO EXAMINADORA

Rebeca Moraes Menezes

Prof^a. Dr^a. Rebeca Moraes Menezes(UFBA, Salvador -
BA, 2018) (Orientadora)

Jeferson Alves Barreto

Prof. Dr. Jeferson Alves Barreto(UFF, Niterói – RJ,
2020)
(Coorientador)



Documento assinado digitalmente
CLARIVALDO SANTOS DE SOUSA
Data: 05/01/2024 11:47:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Clarivaldo Santos Sousa(UFBA, Salvador –
BA, 2005)

Marcos de Almeida Bezerra

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra(UFBA, Salvador –
BA, 2006)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em __/__/__

*Dedico este manuscrito, à mainha Léa Silva, a
senhora é minha fonte de inspiração, sinônimo
de força, fé e luz.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo seu infinito amor e sabedoria. Tú me destes o discernimento para conseguir finalizar esse mestrado, a trajetória não foi fácil e sem o senhor eu não conseguiria.

Aos meus pais Josinaldo e Léa, vocês são a minha fonte de inspiração, obrigada pelo cuidado e carinho. Mãe desculpa pela ausência durante esses anos e gratidão por segurar as pontas sem mim.

Aos meus irmãos Miler e Monique e as minhas pequenas Melissa e Mirela essas idas e vindas, nos afastaram um pouco, mas a certeza de voltar para casa e saber que tenho vocês me esperando me faz sentir melhor todos os dias. Minhas pequenas, vocês são o maior motivo para que eu continue nessa trajetória.

A Éder, obrigada por me incentivar, estivemos a maior parte do tempo separados pela distância, mas próximos em afeto. Gratidão pelo companheirismo!

Aos meus amigos e familiares, muito obrigada pela força e incentivo nesse processo, em especial a Daiane, Ana Cláudia, Jadson e Mickael, pelo carinho a Renata e Rafaela, pessoas que dividiram comigo sofrimentos e alegrias durante a minha estadia em Jequié, sentirei saudades.

Ao meu professor Valfredo Lemos, sem você eu nem teria iniciado essa jornada, obrigada pelos risos, carinho, preocupação, incentivo e contribuições durante esse tempo.

À professora Dra. Rebeca Moraes, obrigada pela contribuição na pesquisa, por dividir comigo as dores e preocupações com a pesquisa, obrigada pela sororidade.

Ao Dr. Jeferson Barreto, pela orientação na pesquisa.

Ao Laboratório de Química Analítica (LQA), bem como os colegas que estiveram comigo durante esse tempo em especial Érica, Laís, Iago e Uillian.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa no início do mestrado e pelo incentivo a pesquisa.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB pelo espaço físico concedido para o desenvolvimento deste trabalho e ao Programa de Pós-graduação em Química- PGQUI pela disponibilidade em me auxiliar sempre.

Às escolas nas quais leciono, pelo apoio durante esse processo.

Ao IFBA- Valença pela disponibilidade em me auxiliar, permitindo a coleta de água no local.

A banca examinadora (Marcos Bezerra e Clarivaldo Sousa) pelas sugestões neste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui!

*“O caminho para o progresso não é rápido nem
fácil” (Marie Curie).*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do corante violeta de genciana.....	15
Figura 2: Etapas do procedimento para determinação de violeta genciana por PV-IS-LPME e imagem digital	22
Figura 3: Influência do tipo de solvente na microextração de violeta de genciana utilizando solvente eutético	24
Figura 4: Gráfico dos efeitos padronizados para as variáveis estudadas usando o planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} no método de PV-IS-DLLME para determinação de violeta de genciana	27
Figura 5: Gráficos de contorno de (a) QS × pH, (b) TE × QS e (c) TE × pH da matriz de Doehlert com três variáveis do sistema de pré-concentração de violeta de genciana.	29
Figura 6: Imagens relativas aos extratos enriquecidos de DES com violeta genciana. a: $0 \mu\text{g L}^{-1}$; b: $5 \mu\text{g L}^{-1}$; c: $10 \mu\text{g L}^{-1}$; d: $25 \mu\text{g L}^{-1}$; e: $50 \mu\text{g L}^{-1}$; f: $100 \mu\text{g L}^{-1}$; g: $150 \mu\text{g L}^{-1}$; h: $200 \mu\text{g L}^{-1}$; i: $300 \mu\text{g L}^{-1}$	31
Figura 7: Curvas analíticas correspondentes aos canais RGB	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} utilizado na triagem das variáveis envolvidas na extração de violeta genciana usando a PV-IS-DLLME	25
Tabela 2: Resultados do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} utilizado na triagem das variáveis envolvidas na extração de violeta genciana usando a PV-IS-DLLME.....	26
Tabela 3: Matriz Doehlert utilizada na otimização das principais variáveis responsáveis pela extração de violeta genciana usando a PV-IS-DLLME	28
Tabela 4: Valores das variáveis utilizadas neste estudo	30
Tabela 5: Estudo de interferência causada por íons no processo de extração de violeta genciana	30
Tabela 6: Resumo dos parâmetros analíticos após otimização do método	32
Tabela 7: Resultados da aplicação do método nas amostras de água.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DES	Solventes eutéticos, do inglês Deep eutectic solvent
DIC	Colorimetria em Imagem digital, do inglês digital image colorimetry
DLLME	Microextração dispersiva líquido-líquido, do inglês dispersive liquide-liquid microextraction
LCV	Leuco cristal violeta
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês: Extratation Liquid-Liquid
LOD	Limites de detecção
LOQ	Limites de quantificação
LPME	Microextração de fase líquida, do inglês: Liquid-Phase Microextraction
MDF	Placa de fibra de baixa densidade, do inglês Medium-density fiberboard
pH	Potencial hidrogeniônico
PS	Proporção do solvente
PTFE	politetrafluoroetileno
PV-IS-DLPME	microextração em fase líquida dispersiva na seringa com variação de pressão, do inglês Pressure variation <i>in-syringe</i> dispersive liquid-phase microextraction
PV-IS-LPME	microextração em fase líquida na seringa com variação de pressão
QS	Quantidade de solvente
RGB	Do inglês red, green and blue
TE	Tempo de extração
THF	tetrahidrofurano
VG	Violeta de genciana
VS	Volume da seringa

DETERMINAÇÃO DE VIOLETA GENCIANA EM ÁGUA DE PISCICULTURA POR COLORIMETRIA DE IMAGEM DIGITAL UTILIZANDO MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA DISPERSIVA NA SERINGA COM VARIAÇÃO DE PRESSÃO.

RESUMO

Os corantes sintéticos são amplamente utilizados em diversas aplicações, classificando-se de acordo com a estrutura química e o uso pretendido. A violeta de genciana, conhecida também como cristal violeta, violeta básica ou metil violeta 10B, é um corante catiônico com propriedades antissépticas, bacteriostáticas, bactericidas e fungicidas. Apesar de suas várias utilidades, sua aplicação na aquicultura é proibida devido à sua característica genotóxica e cancerígena, conforme estabelecido por lei. Portanto, torna-se imprescindível o desenvolvimento de metodologias para monitorar os níveis de violeta genciana e garantir o controle de qualidade. Este estudo visa desenvolver um método para a determinação de violeta genciana em amostras de águas de piscicultura, empregando a pré-concentração com microextração em fase líquida dispersiva com variação de pressão em seringa (PV-IS-DLPME) utilizando solventes eutéticos e detecção por colorimetria de imagem digital. Variáveis como concentração e tipo de solvente foram identificadas por meio da análise univariada, enquanto que o volume da amostra e o volume da solução tampão seguiram os padrões descritos na literatura. Na otimização multivariada, utilizou-se um planejamento fatorial fracionário para rastrear as variáveis que mais influenciam o sistema: proporção do solvente (PS); pH; quantidade de solvente (QS); tempo de extração (TE) e volume da seringa (VS). Como resultados, o limite de detecção e quantificação obtido foi de 7,20 e 24,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente e Precisão (RSD %) de 1,29. A validação do método de extração de VG foi realizada por ensaios de recuperação na matriz, e o método desenvolvido foi aplicado para determinar VG em amostras de piscicultura.

Palavras-chave: Violeta de genciana; PV-IS-DLPME; solventes eutéticos; colorimetria por imagem digital.

**DETE DETERMINATION OF GENTIAN VIOLET IN FISH FARMING WATER BY
DIGITAL IMAGE COLORIMETRY USING MICROEXTRACTION IN DISPERSIVE
LIQUID PHASE IN A SYRINGE WITH PRESSURE VARIATION.**

ABSTRACT

Synthetic dyes find wide-ranging applications, classified based on their chemical structures and intended uses. Gentian violet, also referred to as crystal violet, basic violet, or methyl violet 10B, is a cationic dye known for its antiseptic, bacteriostatic, bactericidal, and fungicidal properties. Despite its versatile utility, its use in aquaculture is prohibited due to its genotoxic and carcinogenic nature, as stipulated by law. Hence, it becomes imperative to devise methodologies for monitoring gentian violet levels to ensure stringent quality control. This study endeavors to establish a method for quantifying gentian violet in samples obtained from fish farm waters. The approach involves preconcentration utilizing dispersive liquid-phase microextraction (DLPME) with pressure variation in a syringe (PV-IS-DLPME) using eutectic solvents alongside detection via digital image colorimetry. Univariate analysis identified variables such as solvent concentration and type, while sample and buffer volumes adhered to established literature standards. Multivariate optimization employed fractional factorial planning to pinpoint variables exerting the most significant influence within the system: solvent ratio (PS), pH, solvent quantity (QS), extraction time (TE), and syringe volume (VS). As a result the achieved limit detection and quantification was 7.20 and 24 $\mu\text{g L}^{-1}$, the precision (RSD%) of 1.29. Validation of the VG extraction method was conducted through recovery tests in the matrix, and the developed technique was successfully applied to determine VG concentrations in samples from fish farms.

Keywords: Gentian violet; PV-IS-DLPME; eutectic solvents; Digital image colorimetry.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
RESUMO	11
SUMÁRIO	13
1.0 INTRODUÇÃO	14
2.0 OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3.0 PARTE EXPERIMENTAL.....	20
3.1. Equipamentos.....	20
3.2. Reagentes e soluções	20
3.3 Síntese dos solventes eutéticos.....	21
3.4 Procedimento de microextração e detecção	21
3.5 Preparo de amostras.....	23
3.6. Otimização de variáveis.....	23
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. Variáveis fixadas e tipo de solvente extrator.....	24
4.2. Otimização multivariada	25
4.3. Seletividade	30
4.4. Características analíticas	31
4.5. Aplicação.....	33
5.0 CONCLUSÃO.....	33
6.0 REFERÊNCIAS.....	34

1.0 INTRODUÇÃO

Os corantes são compostos orgânicos que tem como característica apresentar absorção de luz na região do visível do espectro eletromagnético nas bandas de 400 a 700nm. Razão que segundo Paranhos (2011, p. 19), “aparecem coloridos, são detectáveis a olho nu e visíveis em alguns casos, mesmo em concentrações tão baixas quanto 1 ppm (1mg.L^{-1})”. Corantes sintéticos são amplamente utilizados em diversas aplicações, nas indústrias têxteis, de papéis, alimentícias, cosméticas, farmacêuticas, dentre outras (Nascimento, *et al.*, 2014).

Existem alguns aspectos na constituição dos corantes, tais como o tamanho da molécula, grupos funcionais, planariedade e número de grupos iônicos. Dentre esses aspectos, destaca-se a presença de grupos funcionais que podem se classificar em quatro grupos: (i) O cromóforo que é responsável pela cor, (ii) o auxocromo que possibilita intensidade nas cores, os mais comuns são: etila, nitro, amino, sulfônico, hidroxila, metóxi, etóxi, cloro e bromo. (iii) O grupo de ligações que proporciona a característica de ligação com a fibra e (iv) o grupo de solubilizantes que promove a solubilidade. (kimura *et al.*, 1999; Zamora, 2002).

Os corantes podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química e sua utilização. É possível então, classificá-los em três classes principais: corantes reativos são aqueles que reagem com o grupo funcional da fibra (corantes ácidos, básicos, reativos, direto e mordente), corantes que necessitam reação química antes da aplicação (corantes Vat, corantes a base de enxofre) e corantes especiais (disperso, solvente, pigmentos e corantes naturais) (Hendrickx; Boardman, 1995 Santos, *et al.*, 2007; Berrios; Arbiser, 2011).

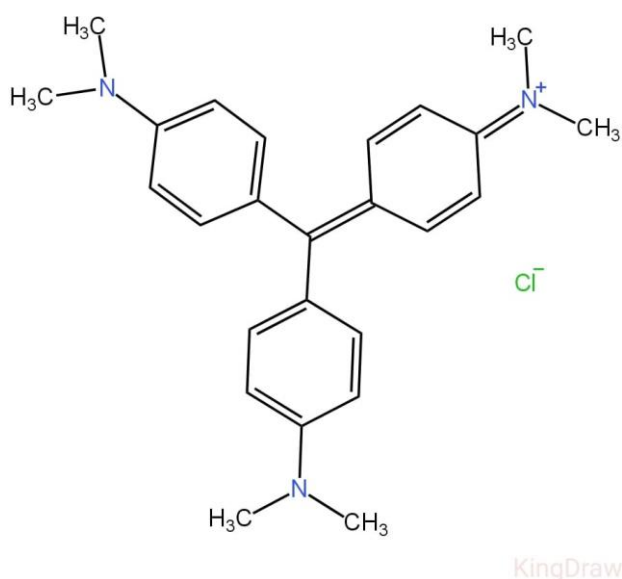
A classe catiônica apresenta estruturas com diferentes grupos substituintes aromáticos, os corantes dependem dos íons positivos na maioria das vezes cloridratos com uma carga positiva em sua molécula. O comportamento metracromático como consequência da formação de agregados estáveis em solução aquosa termodinamicamente é muito importante, essa característica que os corantes iônicos têm de se agregar é explicada pelas forças de Van der Waals, as ligações de hidrogênio, as forças intermoleculares e interações hidrofóbicas (Mello, 2006).

Esses agregados apresentam diferentes espectros eletrônicos de adsorção dos corantes em forma monomérica. As moléculas sofrem modificações nos estados eletrônicos, fundamental e excitado quando agregados em dímeros, e trímeros ou mais moléculas, surgem novas bandas no espectro de adsorção em comprimentos de onda maiores ou menores do que a banda do monômero. Diante disso as técnicas espectrofotométricas com adsorção UV-visível são bastante úteis no estudo desses sistemas (*ibid.*).

A violeta de Genciana (VG) (figura 1) é um corante roxo que foi sintetizado pela primeira vez pelo químico francês Charles Lauth em 1861 o qual o nomeou como Violeta de Paris, e em 1880, o farmacêutico alemão George Gubler o popularizou e o comercializou apenas para biólogos, nesse período o corante não era utilizado nas indústrias têxteis. (Maley; Arbiser, 2013; Nascimento, *et al.*, 2014).

Também conhecido como cloreto de hexametilpararosanilina, cristal violeta, violeta básica ou metil violeta 10B, a VG é um corante catiônico, que pertence ao grupo triarilmetanos, em que cada grupo amino contém dois grupos metila, estabilizados por ressonância. (*ibid.*). De fórmula molecular $C_{25}H_{30}ClN_3$, massa molar 407,979 g. mol^{-1} , apresenta absorvância máxima no espectro visível em 589 a 630nm, muito solúvel em água e clorofórmio e insolúvel em xileno (Góes, 2013). O valor da absorvidade molar descrito por Oliveira (2006) é de $0,95 \times 10^5$ L. mol^{-1} . cm^{-1} .

Figura 1- Estrutura do corante violeta de genciana



A VG é um corante, que pode causar irritação moderada nos olhos e no trato digestivo, em situações graves pode gerar insuficiência respiratória e renal, podendo causar cegueira permanente. Além de ser um corante carcinogênico e em contato com ambiente aquático pode provocar efeitos a longo prazo, a molécula pode sofrer biotransformação e biomagnificação gerando danos a cadeia alimentar quando descartado inadequadamente. (Góes, 2013).

Apresenta uma vasta aplicação na área comercial, tecnológica e médica. É utilizado em desinfecção, no tratamento de queimaduras, em lesões da pele e gengivas, também possibilita a identificação de bactérias através do método de coloração Gram, é usado em tingimentos de papel, couro, fibras acrílicas, carimbo de cortes de carne, em misturas de rações para as aves e amplamente utilizada na indústria têxtil. (Mori; Cassella, 2009,). Foi utilizada na oftalmologia por volta de 1890 por Jakob Stilling, devido os seus efeitos bactericidas (Berrios, *et al.*, 2011) ela também foi inserida no início da década de 30 na indústria da aquicultura, pois se acreditava na sua eficiência para tratamento de enfermidades em peixes, bem como no combate infecções fúngicas (Dowling, *et al.*, 2007).

Entretanto a VG está estruturalmente relacionada a outros corantes da mesma classe, sendo caracterizada por ser genotóxica e cancerígena. Ela é absorvida pelo tecido dos peixes devido à exposição à água e é reduzido à porção leuco (leuco cristal violeta-LCV) persistente, que também apresenta potencial carcinogênico, teratogênico e mutagênico para organismos. Atualmente, apesar dos seus efeitos contrários ao bem-estar, continua sendo utilizada ilegalmente na aquicultura (Dowling, *et al.*, 2007; Xiao, *et al.*, 2020; Andersen, *et al.*, 2009; Wu, *et al.*, 2021.).

A legislação Brasileira proíbe a utilização da VG, com a finalidade de aditivo tecnológico antifúngico destinado a alimentação animal. Bem como cancela registros concedidos à substância química VG, recolhe do comércio formulações que contenham VG para fins de alimentação animal e modifica os registros com a exclusão da substância, substituindo por outro de ação similar que preconiza a lei (Brasil, 2004).

Entendendo que a VG não pode ser utilizada para fins da aquicultura recomendada pela legislação e sabendo dos seus efeitos adversos,

faz-se necessário realizar o monitoramento dos níveis de VG nessas matrizes para que se possa ter o controle de qualidade. Algumas técnicas vêm sendo utilizadas para o monitoramento dos níveis de VG, tais como: leituras espectrofotométricas (Nascimento *et al.*, 2014; Santos, 2005; Mori; Cassella, 2009), cromatografia líquida (Dowling, *et al.*, 2007; Andersen, *et al.*, 2009; Faraji; Adeli; Noormohammadi, 2022.), surface-coated probe nanoelectrospray mass spectrometry (SCP-nanoESI-MS) (Xiao, *et al.*, 2020).

Existe uma constante busca pelo desenvolvimento de metodologias de preparo de amostras que apresentem simplicidade, rapidez, utilizem pequenos volumes de reagentes, permitam o tratamento de amostras, que proporcionem resultados precisos e exatos. Dentro deste cenário, a microextração em fase líquida (LPME) é uma alternativa que engloba todas essas características. Atualmente existe uma diversidade de técnicas de microextração em fase líquida e a microextração dispersiva em fase líquida (DLPME) tem sido aplicada em diversos estudos (Kokosa, 2013; Barreto, 2020a). A DLPME é uma técnica de extração e pré-concentração de analitos. Em que se utiliza um solvente dispersor que precisa ser miscível no solvente extrator, que é a fase orgânica. Ambos são inseridos na amostra, fase aquosa. A inserção desses solventes no sistema provoca uma dispersão no meio, ocorrendo uma turbidez. A DLLME possui uma variedade de formas no processo de trabalho: batelada, fluxo, fluxo-batelada e em seringa (Martins, 2012; Barreto, 2020a, Barreto *et al.*, 2020b).

Apesar das diversas vantagens obtidas com a DLPME, muitos procedimentos empregam o uso de solventes de extração e poluentes altamente nocivos. Assim, métodos mais ambientalmente corretos têm sido cada vez mais desenvolvidos e empregados (Santos *et al.*, 2022). Os solventes eutéticos profundos (deep eutectic solvents – DES) são uma alternativa bastante válida que vêm ganhando notoriedade nos últimos tempos, por exibirem várias vantagens, como baixo custo, baixa ou nenhuma toxicidade, pouca volatilidade, alto poder de extração, fácil preparo, não são inflamáveis, são biodegradáveis e ambientalmente corretos. (Garcia, 2024; Fattahi, 2024).

O DES é uma mistura de dois ou mais componentes para os quais a temperatura do ponto eutético está abaixo de uma mistura líquida ideal. Um atua como doador de ligações de hidrogênio e o outro como aceptor de ligações de

hidrogênio (o timol é um exemplo). Foram introduzidos em 2004 por Abbott et al, o primeiro DES desenvolvido foi baseado em cloreto de colina (ChCl), realizando combinações de ChCl/ureia, que apresentou comportamento hidrofílico, limitando a sua aplicação para extração de analito em amostras aquosas. Mas não demorou muito e em 2015 um DES com características hidrofóbicas surgiu. Desde então, uma de suas aplicações em química analítica tem sido como solventes de extração em fase líquida (Fattahi, 2024; Garcia, 2024). Com a utilização dessas técnicas algumas alternativas vão surgindo e as possibilidades e adaptações aos métodos de análise vêm crescendo. Pois, a busca por reduzir tempo de resposta e simplificar o procedimento analítico, tem sido um objetivo nos últimos tempos. Dentre as possibilidades e potencialidades está a cor, ela pode codificar informações em reações de separação ou identificação.

A quantificação das cores é realizada pela colorimetria, “ciência que estuda os processos relacionados à cor definindo métodos que permitem a decomposição, análise e descrição da luz visível para quantificar informações de cores para processamento e análise”. (Wyszecki; Stiles, 2000 *apud* Capitán- Vallvey et al., 2015, p. 9). Ao levar em consideração a utilização da cor nos processos de análise, dois fatores são considerados primordiais: o uso de dispositivos de imagem, que estão substituindo outras ferramentas analíticas e o desenvolvimento de sistemas analíticos rápidos, que proporciona a utilização fora dos laboratórios (Capitán-Vallvey et al., 2015; Costa et al., 2023).

A colorimetria de imagem digital (DIC) utiliza câmeras de smartphones e outros dispositivos eletrônicos habilitados a capturar imagens digitais RGB atrelados e gerenciados com hardware e software computacional para analisar as regiões de interesse (ROI), nas imagens que são selecionadas a priori. Um fator que deve ser levado em conta é a luz, que pode influenciar na qualidade das imagens e consequentemente nos resultados, que utilizam os pixels. Os pixels são convertidos em valores de cores que possibilita aplicação do método Lambert-Beer direito (*ibid*).

A partir da informação fornecida pela cor, “o parâmetro analítico é construído, e a informação analítica qualitativa ou quantitativa é extraída por meio da aplicação de otimização univariada, reconhecimento de padrões e/ou análise multivariada” (Capitán-Vallvey et al., 2015, p. 6). O sistema digital desta pesquisa foi otimizado utilizando a metodologia multivariada.

2.0 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um método para a determinação de violeta genciana em amostras de águas de piscicultura, utilizando pré-concentração com microextração em fase líquida dispersiva com variação de pressão em seringa e detecção por colorimetria de imagem digital.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Identificar e otimizar os parâmetros críticos da técnica de microextração em fase líquida dispersiva, como tipo e volume de solvente, tempo de extração e condições de pressão variável na seringa.

2.2.2. Realizar estudos para a determinação das características analíticas do método proposto.

2.2.3. Investigar a aplicabilidade do método em diferentes matrizes de amostras de águas de piscicultura.

2.2.4. Avaliar as características analíticas e as vantagens/desvantagens, para determinar a viabilidade do método proposto, como alternativa à detecção de violeta genciana em águas de piscicultura.

3.0. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipamentos

Uma centrífuga analógica, marca SP Labor (São Paulo, Brasil), modelo SP-32-T, foi utilizada em uma das etapas do procedimento, para sedimentação da fase aceptora. Um medidor de pH Quimis modelo Q400AS (Diadema, Brasil) foi usado para o ajuste e monitoramento do pH das soluções. Um sonicador ultrassônico marca UNIQUE, modelo USC-1450a, com frequência de 25 khz e um agitador vortex modelo QL 861 foram utilizados para preparo do DES fenol:colina. Um agitador magnético Fisatom 752A foi empregado para o preparo do DES mentol: timol. As imagens digitais foram obtidas por meio de um microscópio portátil multifuncional (modelo B007, Supereyes, Shenzhen, China), enquanto um sistema de captura de imagens foi elaborado para garantir condições ideais. Uma caixa de MDF (medium-density fiberboard) de cor branca, com dimensões de 17×9×14 cm, foi construída para minimizar interferências de luz e reflexos. A iluminação interna da caixa foi padronizada com LEDs brancos (5W), estrategicamente posicionados para garantir iluminação uniforme e a consistência das imagens durante os experimentos.

3.2. Reagentes e soluções

Os reagentes usados foram de alta pureza analítica, e as soluções foram feitas utilizando água ultrapura processada por um sistema Elga modelo Purelab Classic (High Wycombe, Reino Unido). As soluções de trabalho de violeta genciana foram preparadas dissolvendo o reagente analítico (Sigma, Aldrich, São Paulo, Brasil). Para o preparo dos solventes eutéticos, foram utilizados: fenol (Sigma, Aldrich), xilitol (Sigma, Aldrich), CHCl_3 (Finquímica), tricloroetileno (Vetec, Duque de Caxias, Brasil), ácido caprílico (Sigma, Aldrich), timol (Êxodo Científica) e mentol (Sigma, Aldrich). Tetrahidrofurano (Vetec) foi empregado como solvente dispersor. Para ajustar o pH do meio de extração, foi preparada uma solução de KCl/HCl (pH 2,0) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e soluções-tampão de acetato (pH 4,0, 5,0 e 6,0) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; fosfato (pH 7,0) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; borato (pH 8,0) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; e amoniacal (pH 9,0 e 10,0) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Toda a vidraria utilizada nos experimentos foi pré-tratada com uma solução de ácido nítrico (Vetec) a 10% (m m^{-1}) por 24 horas e enxaguada com água desionizada.

3.3 Síntese dos solventes eutéticos

Os solventes foram preparados usando diferentes combinações de reagentes, como ChCl-xilitol, timol-mentol e ChCl-fenol.

ChCl-fenol: Foram preparadas quatro misturas, em proporções diferentes: 1:1 (1,3963 g e 0,9411 g, respectivamente, em razões molares), 1:2 (1,3963 g e 1,8822 g), 1:3 (1,3963 g e 2,8233 g), e 1:4 (1,3963 g e 3,7644 g). As misturas foram submetidas à sonicação por aproximadamente 3 minutos, à temperatura ambiente, seguida de agitação brevemente em vórtex por 3 minutos.

O solvente eutético timol-mentol foi preparado em várias proporções: 1:1, combinando 0,1502 g de timol com 0,1562 g de mentol; 2:1, onde foram misturados 0,1502 g de timol e 0,3124 g de mentol; 3:1, utilizando 0,1502 g de timol e 0,4686 g de mentol; e 4:1, com 0,1502 g de timol e 0,6248 g de mentol. Todas as misturas passaram por aquecimento a 50 °C, durante aproximadamente 10 minutos ou até dissolução completa e ajuste da viscosidade conforme necessário.

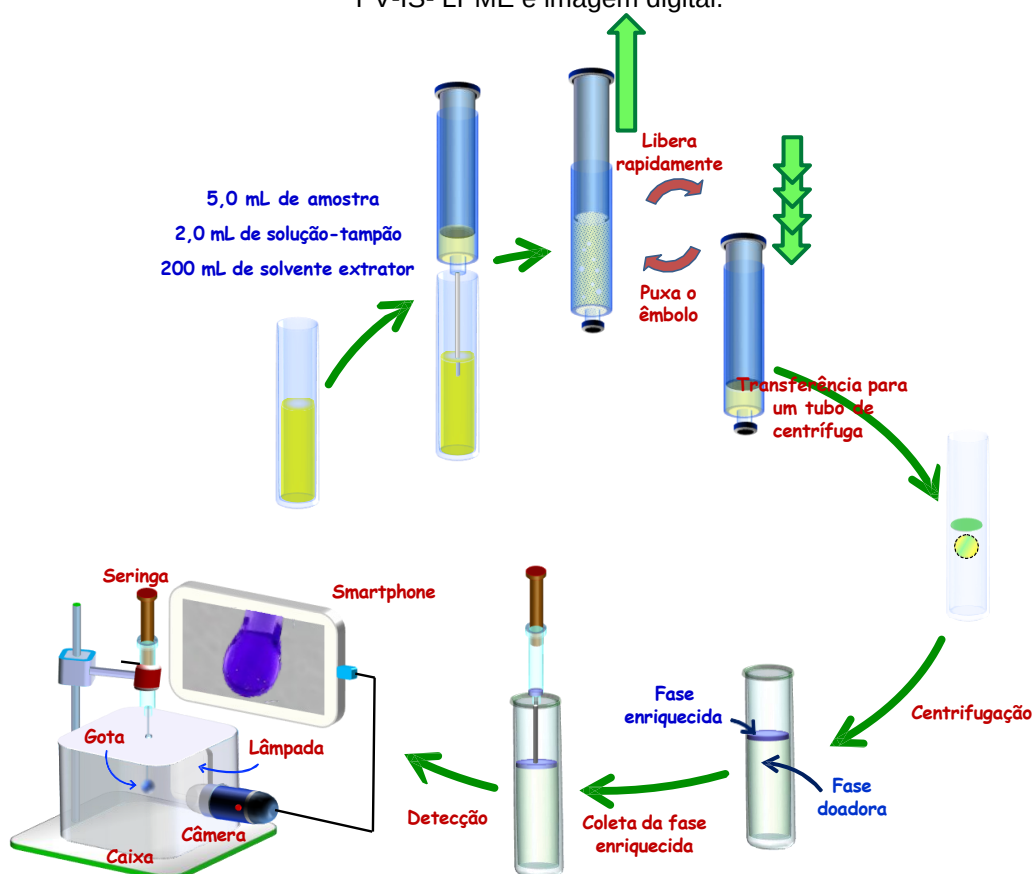
Para o DES ChCl-xilitol, foram testadas várias proporções. As misturas foram preparadas de forma análoga ao DES ChCl-fenol. No entanto, apenas a combinação 1:1 (1,3963 g de CHCl e 1,5215 g de xilitol) foi utilizada. Outras proporções resultaram em grandes quantidades de cristalização, devido à solubilização limitada do xilitol na fase aquosa.

3.4 Procedimento de microextração e detecção

O método de microextração foi iniciado mediante a adição de 5,0 mL da amostra (ou solução padrão contendo violeta genciana) em um tubo de ensaio contendo 2,0 mL de solução-tampão. Em seguida, o solvente extrator (e 1,0 mL do solvente dispersor THF, quando necessário) foi adicionado. A mistura foi aspirada utilizando uma seringa de vidro, que foi selada e teve seu êmbolo movido rapidamente por 15s. Essa ação criou uma variação rápida de pressão dentro da seringa, resultando na formação instantânea da emulsão. Este procedimento foi repetido por 20 ciclos, mantendo o êmbolo sempre em um ponto fixo na seringa (máximo da escala). Posteriormente, a mistura foi transferida para um tubo de centrifugação e centrifugada por 5,0 minutos a 3500 rpm para efetuar a separação das fases. A fase rica em analito foi aspirada por uma seringa de cromatografia

utilizando um capilar acoplado à ponta da seringa, formando assim uma gota. A gota enriquecida foi, então, analisada por colorimetria de imagem digital para a determinação da concentração de violeta genciana em amostras de água. A Figura 1 apresenta uma representação esquemática das etapas do procedimento descrito.

Figura 2- Etapas do procedimento para determinação de violeta genciana por PV-IS- LPME e imagem digital.



Fonte: Dados da pesquisa

As imagens obtidas foram salvas em formato JPG e avaliadas segundo o padrão de cores primárias formadas pelo modelo de cor RGB. A região de interesse das imagens digitais foi selecionada e processada pelo Chemostat. O valor padrão adotado para a área da região de interesse foi 64×64 pixels. Os valores de cores RGB extraídos foram avaliados com base na lei de Lambert- Beer.

3.5 Preparo de amostras

Foram coletadas amostras de água provenientes da piscicultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia (IFBA), localizado na região de Valença, Bahia, Brasil, para fins de análise. Todas as amostras foram coletadas e armazenadas cuidadosamente em frascos de politetrafluoroetileno (PTFE). Durante o processo de recuperação, as amostras passaram por filtração, sendo posteriormente submetidas ao método proposto.

3.6. Otimização de variáveis

Os dados iniciais foram adquiridos como sinais de pixels por meio do programa Chemostat e posteriormente processados pelo programa Microscope, sendo convertidos em sinais de absorvância. Para o desenvolvimento do método, foram realizadas uma avaliação preliminar univariada para as variáveis: concentração do analito e tipo de solvente. Além de uma otimização multivariada. Na otimização multivariada, empregou-se um planejamento fatorial fracionário para rastrear as variáveis mais influentes nos sistemas: proporção do solvente (PS); pH; quantidade de solvente (QS); tempo de extração (TE) e volume da seringa (VS).

Os dados experimentais foram processados com um nível de confiança de 95% no software STATISTICA 10. Duas abordagens de otimização multivariada foram adotadas: (i) um planejamento fatorial fracionário de dois níveis 2^{5-1} e (ii) a matriz Doehlert. O planejamento fatorial fracionário permitiu identificar as variáveis-chave no método de microextração, enquanto a matriz Doehlert auxiliou na determinação dos pontos ótimos das variáveis significativas. Todas as análises foram conduzidas com um nível de confiança de 95% no software STATISTICA 10.

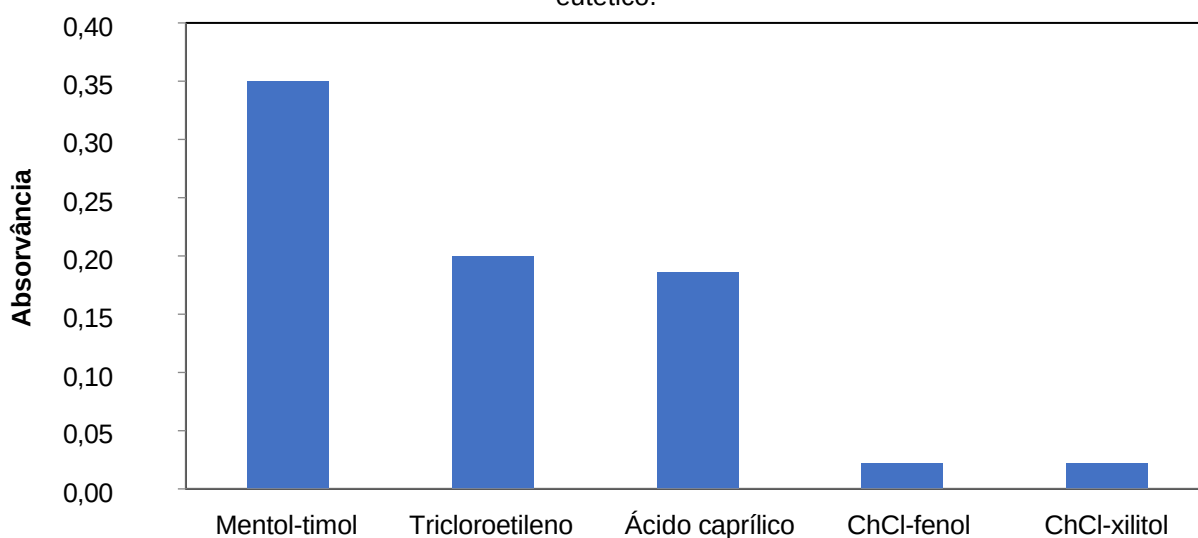
4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Variáveis fixadas e tipo de solvente extrator

Os experimentos de otimização foram executados utilizando soluções de violeta genciana a uma concentração de $75,00 \mu\text{g L}^{-1}$. Outros parâmetros mantidos constantes foram: o volume da fase doadora (5,0 mL), o volume da solução-tampão (2,0 mL) e o tempo de centrifugação (5,0 minutos). Esses valores foram estabelecidos com base em estudos anteriores (Barreto; De Assis; Santos; Cassella et al., 2020; Barreto; De Assis; Cassella; Lemos, 2019). Diferentes solventes foram submetidos a testes para a extração da violeta genciana, incluindo os três solventes eutéticos, um solvente clorado convencional (tricloroetileno) e um solvente com propriedades hidrofílicas ajustáveis (ácido caprílico). Durante a utilização do tricloroetileno, foi necessário empregar um solvente dispersante, o THF. A Figura 2 ilustra os resultados obtidos a partir da análise dos solventes extratores.

O DES mentol-timol foi selecionado devido à sua capacidade de proporcionar uma maior absorvância, conforme demonstrado nos resultados. Além disso, sua escolha foi respaldada pelo fato de ser um solvente ecologicamente correto, alinhando-se com preocupações ambientais.

Figura 3- Influência do tipo de solvente na microextração de violeta de genciana utilizando solvente eutético.



Fonte: Dados da pesquisa

4.2. Otimização multivariada

Os procedimentos de otimização foram executados de acordo com o item 3.6. O procedimento de pré-concentração por meio da PV-IS-DLLME sofre a influência de variáveis que impactam a eficácia da extração, tornando necessária a otimização desses parâmetros. Utilizou-se um planejamento fatorial de dois níveis fracionário com o propósito de avaliar a importância das variáveis nesse processo de extração. Essa abordagem fornece informações importantes dos parâmetros envolvidos com um número reduzido de experimentos, resultando em economia de tempo e recursos, em comparação com um planejamento fatorial completo, sem comprometer a tomada de decisões, a habilidade ou a análise dos resultados. As variáveis envolvidas no estudo foram: proporção entre os solventes mentol e timol (PS), quantidade da mistura de solventes (QS), pH, volume da seringa (VS) e tempo de extração (TE). Os domínios experimentais, representados pelos valores inferior (-1) e superior (+1) de cada variável, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1-Planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} utilizado na triagem das variáveis envolvidas na extração de violeta genciana usando a PV-IS-DLLME

Variável	Mínimo	Máximo
Proporção do solvente mentol: timol	1:1	4:1
pH	4	10
Quantidade de solvente (μ l)	50	300
Tempo de extração (s)	10	60
Capacidade da seringa (mL)	10	50

Fonte: Dados da pesquisa

Os resultados obtidos para a matriz experimental do planejamento fatorial fracionário estão apresentados na Tabela 2.

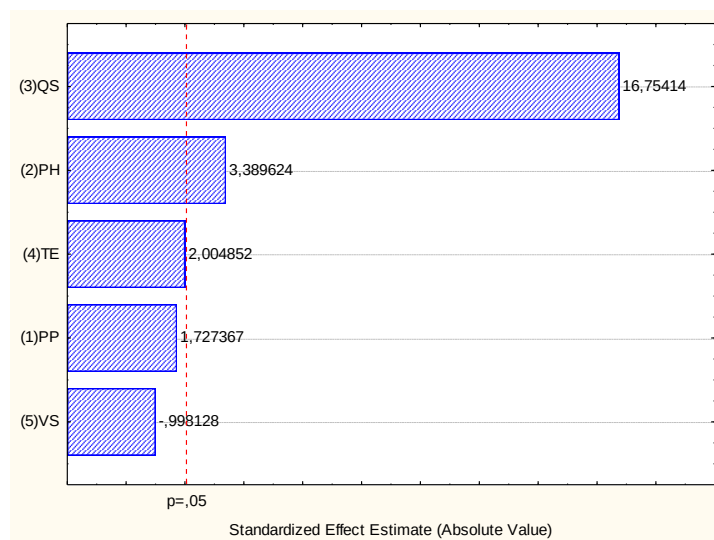
Tabela 1- Resultados do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} utilizado na triagem das variáveis envolvidas na extração de violeta genciana usando a PV-IS-DLLME.

Exp.	Proporção do DES	pH	Quantidade de solvente (μ l)	Tempo de extração (s)	Volume da seringa (mL)	Absorvância	
1	4:1	10	300	60	50	0,257711	0,278409
2	4:1	10	300	10	10	0,244923	0,184768
3	4:1	10	50	60	10	0,672097	1,255873
4	4:1	10	50	10	50	1,333669	1,933106
5	4:1	4	300	60	10	0,389967	0,266079
6	4:1	4	300	10	50	0,32177	0,312728
7	4:1	4	50	60	50	1,994637	1,963915
8	4:1	4	50	10	10	1,873376	1,862844
9	1:1	10	300	60	10	0,234338	0,213122
10	1:1	10	300	10	50	0,250877	0,213232
11	1:1	10	50	60	50	1,275506	1,646402
12	1:1	10	50	10	10	1,967912	1,998886
13	1:1	4	300	60	50	0,280042	0,351766
14	1:1	4	300	10	10	0,334632	0,298753
15	1:1	4	50	60	10	1,93607	1,932116
16	1:1	4	50	10	50	2,326348	2,348788

Fonte: Dados da pesquisa

A Figura 4, que apresenta o gráfico de Pareto, possibilita identificar dois fatores que demonstraram efeitos consideráveis e significativos dentro do espaço experimental estabelecido para o procedimento de microextração. Em destaque, a quantidade de solvente eutético exibiu um efeito positivo altamente significativo. Este resultado sugere que o aumento no volume da mistura mentol: timol contribui consideravelmente para a melhoria do processo de extração.

Figura 4- Gráfico dos efeitos padronizados para as variáveis estudadas usando o planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} no método de PV-IS-DLLME para determinação de violeta de genciana.



Fonte: Dados da pesquisa

Outras variáveis que mostraram relevância na extração da violeta genciana foi o pH. A influência do pH ocorre devido a concentração de íons H^+ e OH^- interagir com a violeta de genciana, podendo resultar na mudança de sua estrutura.

Dentro dos níveis analisados, o tempo de extração, embora não tenha se revelado um fator altamente significativo para a resposta analítica, demonstrou ter um efeito positivo na linha limite de $p=0,05$ em um intervalo de confiança de 95%. O tempo de extração (TE) é considerado um parâmetro de extrema importância ao avaliar um método de pré-concentração usando a PV-IS-DLPME. Resultado este que corrobora com o estudo feito por Barreto (2020a). Esta variável foi propositalmente incorporada ao planejamento Doehlert a fim de permitir uma avaliação mais precisa e completa.

A proporção do solvente eutético não apresentou efeito significativo em relação às variáveis anteriores, tornando sua inclusão no planejamento Doehlert desnecessária. Foi selecionada uma proporção de solvente eutético mentol: timol igual a 3:1 com base na eficiência de extração do analito observada em testes prévios. Embora o volume da seringa (VS) seja crucial na geração do fenômeno de dispersão do solvente eutético, não demonstrou significância no intervalo experimental estudado. Um volume adequado da seringa permite uma variação de pressão elevada, facilitando a extração eficiente da violeta de genciana. Além disso, de acordo com o gráfico de Pareto, esse parâmetro e suas interações não influenciaram na extração da violeta genciana utilizando a PV-IS-DLLME. Assim, o

volume da seringa utilizado foi de 20 mL.

A Tabela 3 mostra a matriz Doehlert usada para investigar as seguintes variáveis: Quantidade de solvente (QS) na faixa de 50 a 300 μL , pH variando de 4 a 10, tempo de extração (TE) entre 10 e 60 segundos. A superfície de resposta obtida pela aplicação do planejamento Doehlert indicou a presença de um ponto de sela, que mostrou uma inflexão entre as regiões mínima e máxima da superfície. De acordo com Bezerra *et al.*, (2008) e Barreto (2020a), o cálculo das coordenadas do ponto máximo não é apropriado para a identificação das condições otimizadas, sendo necessária uma inspeção visual dos gráficos de contorno conforme a Figura 5.

Tabela 3- Matriz Doehlert utilizada na otimização das principais variáveis responsáveis pela extração de violeta genciana usando a PV-IS-DLLME.

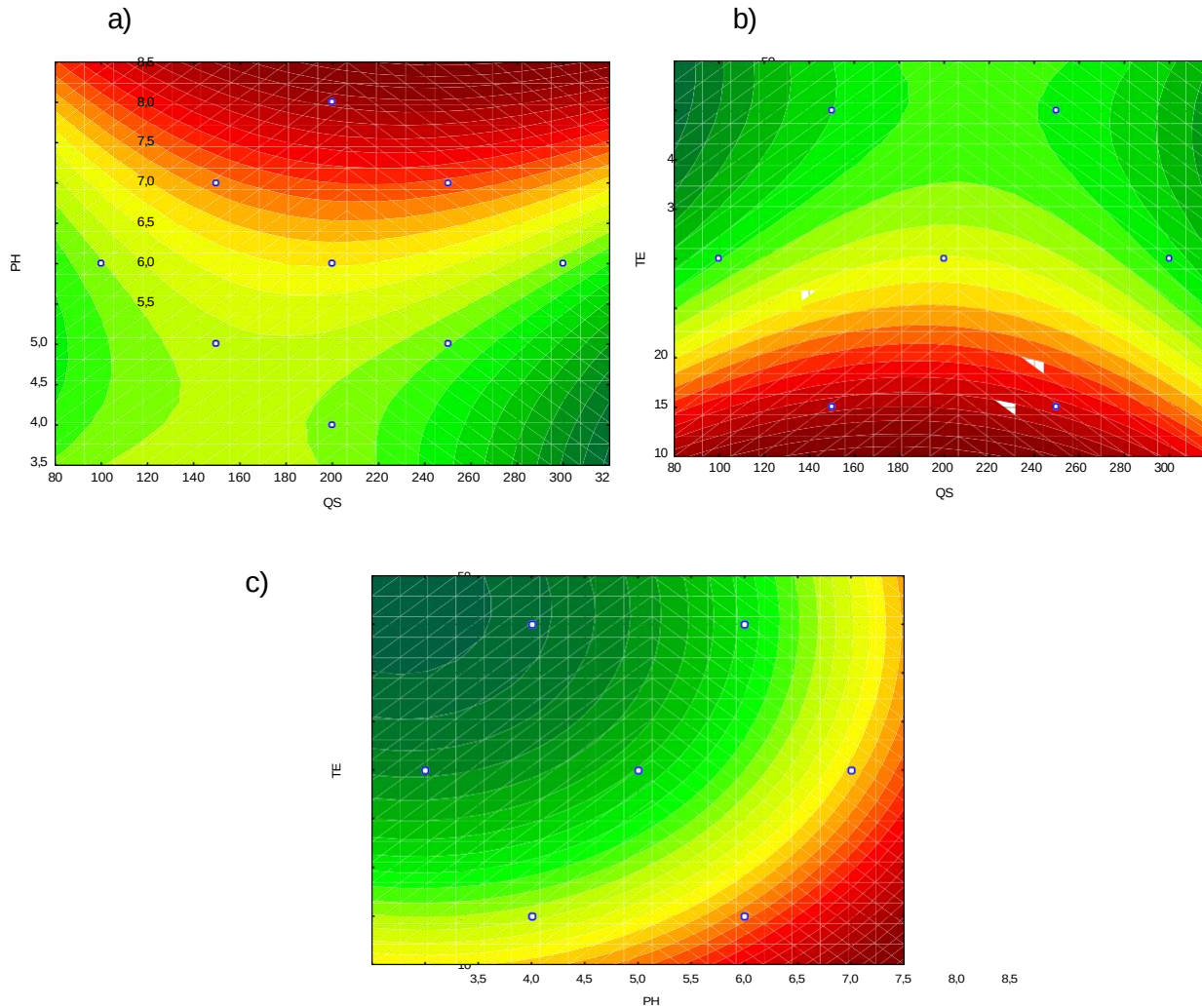
Experimento	pH	Tempo de Extração (s)	Quantidade de solvente (μL)	Absorvância	
1	8	30	200	0,388177	0,279565
2	7	15	150	0,64232	0,653411
3	7	45	150	0,518637	0,517529
4	7	15	250	0,366834	0,3588
5	7	45	250	0,210311	0,258918
6	6	30	100	0,37761	0,375235
7	6	30	200	0,355776	0,294014
8	6	30	300	0,213492	0,222037
9	5	15	150	0,527305	0,524117
10	5	45	150	0,260298	0,270926
11	5	15	250	0,214611	0,129332
12	5	45	250	0,165947	0,127805
13	4	30	200	0,309668	0,356857

Fonte: Dados da pesquisa

A Figura 5 representa graficamente as condições das variáveis em relação à absorvância do analito sob investigação. Na área de interesse, é perceptível uma tendência de aumento na resposta analítica. Os valores ideais identificados nessa área de avaliação foram os seguintes: pH 8,0, tempo de extração de 15 segundos e

quantidade de solvente eutético igual a 200 μL .

Figura 5- Gráficos de contorno de (a) QS $\times$ pH, (b) TE $\times$ QS e (c) TE $\times$ pH da matriz de Doehlert com três variáveis do sistema de pré-concentração de violeta de genciana.



Fonte: Dados da pesquisa

Após os procedimentos de otimização, os valores das variáveis recomendadas com base neste estudo são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- valores das variáveis utilizadas neste estudo.

Variável	Valor ótimo
Proporção do solvente mentol: timol	3:1
pH	8,0
Quantidade de solvente (μL)	200,0
Tempo de extração (s)	15,0
Capacidade da seringa (mL)	20,0

Fonte: Dados da pesquisa

Como já mencionado, a proporção do solvente escolhido foi de 3:1 por apresentar eficiência na extração, o pH, a quantidade de solvente e o tempo extração foram variáveis estudadas e identificadas por meio da matriz Doehlert.

A capacidade da seringa foi escolhida por analisar que uma seringa de 10mL apresentaria um curto espaço para realizar a pré concentração e seringas maiores que 20 mL, por serem mais volumosas apresentava dificuldades no manuseio.

4.3. Seletividade

Foram avaliadas diversas espécies químicas que poderiam influenciar a precisão da extração ou ocasionar variações nos sinais de absorvância.

Para a realização deste estudo, utilizou-se uma concentração de $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de violeta genciana. Cada íon foi introduzido em soluções que continham o componente analisado, e o sinal resultante foi comparado ao sinal proveniente da solução que continha exclusivamente o analito. Considerou-se interferência quando o sinal analítico apresentou uma variação de $\pm 10\%$ em relação ao sinal correspondente ao padrão de referência. Os resultados detalhados deste estudo estão apresentados na Tabela 5. Constatou-se que as substâncias testadas não manifestaram interferência nas quantidades avaliadas.

Tabela 5- Estudo de interferência causada por íons no processo de extração de violeta genciana

Espécie	Razão
Violeta de genciana: espécie	
Ca(II), Co(II), Cl(-I), Fe(II), K(I), Mg(II), Na(I), SO ₄ (-II) Ni(II), Zn(II), Cr(III), Cd(II), Hg (II), Mn(II), Pb(II)	1:10
Verde brilhante	1:2
Ponceau, rodamina B, verde de malaquita,	1:5

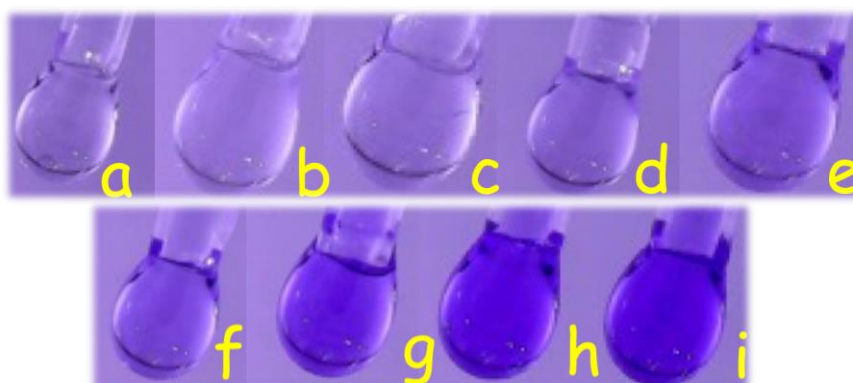
Fonte: Dados da pesquisa

A razão encontrada para o corante verde brilhante, pode estar relacionado, as características semelhantes ao violeta genciana. Ambos são corantes catiônicos, pertencentes à classe dos triarilmetanos. Esta semelhança pode ser um fator que cause interferências nas análises. Diferente dos metais, que apresentaram valores elevados.

4.4. Características analíticas

O desempenho analítico do método foi avaliado sob condições otimizadas, que incluíram a determinação das faixas lineares de calibração, o estabelecimento da equação da curva de calibração, e o cálculo dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Foram construídas curvas de calibração para a determinação da violeta genciana, abrangendo uma faixa de concentração de 5,0 a 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. As imagens referentes à fase enriquecida para cada ponto da curva analítica são apresentadas na Figura 6.

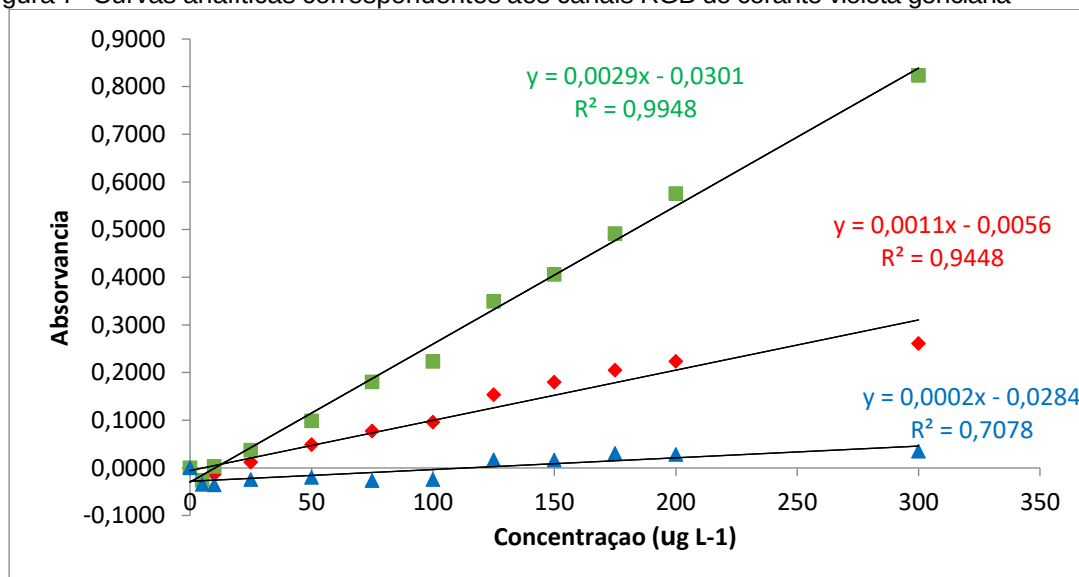
Figura 6- Imagens relativas aos extratos enriquecidos de DES com violeta genciana. a: 0 $\mu\text{g L}^{-1}$; b: 5 $\mu\text{g L}^{-1}$; c: 10 $\mu\text{g L}^{-1}$; d: 25 $\mu\text{g L}^{-1}$; e: 50 $\mu\text{g L}^{-1}$; f: 100 $\mu\text{g L}^{-1}$; g: 150 $\mu\text{g L}^{-1}$; h: 200 $\mu\text{g L}^{-1}$; i: 300 $\mu\text{g L}^{-1}$



Fonte: Dados da pesquisa

A Figura 7 apresenta as curvas analíticas associadas aos canais RGB, sendo crucial identificar a adequação de cada canal. Com este propósito, foram construídas curvas de calibração utilizando a absorvância efetiva de cada canal para determinar o canal mais adequado em termos de sensibilidade e dispersão dos dados. As curvas de calibração foram geradas para concentrações variando de 0,0 a 300,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Observa-se que a curva analítica do canal verde demonstrou uma inclinação maior, indicando maior sensibilidade e melhor linearidade. Consequentemente, os resultados deste canal foram processados para a obtenção dos sinais analíticos.

Figura 7- Curvas analíticas correspondentes aos canais RGB do corante violeta genciana



Fonte: Dados da pesquisa

A equação da curva de calibração do canal verde foi derivada utilizando o método de regressão linear, expressa como $A = 2,9 \times 10^{-3} C - 3,0 \times 10^{-2}$, em A representa o sinal de absorção e C indica a concentração de violeta genciana em $\mu\text{g L}^{-1}$. Os cálculos dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram realizados por meio da inclinação da curva de calibração utilizando as fórmulas $\text{LOD} = 3,3 \cdot \text{DP}/m$ e $\text{LoQ} = 10 \cdot \text{LoD}$. Os valores determinados para LOD e LOQ foram de 7,20 e 24,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A precisão do método foi avaliada como 1,29%, calculada em termos de desvio padrão relativo (RSD) a partir de 6 medições de uma solução de violeta genciana 75 $\mu\text{g L}^{-1}$. Um resumo dos parâmetros analíticos é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6- Resumo dos parâmetros analíticos após otimização do método

Equação de calibração	$A = 2,9 \times 10^{-3} C - 3,0 \times 10^{-2}$
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5 a 200
Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	7,20
Limite de quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	24,00
Precisão (RSD %)	1,29

Fonte: Dados da pesquisa

4.5. Aplicação

O método proposto foi empregado na determinação de violeta genciana em amostras de águas de piscicultura, as quais foram fortificadas com quantidades conhecidas desse composto para calcular a recuperação. Os resultados dessas análises estão detalhados na Tabela 7.

Tabela 7- Resultados da aplicação do método nas amostras de água.

Amostra	Quantidade de VG ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperação (%)
	Adicionada	Encontrada	
Água de piscicultura 1	0	<LOQ	--
	25	$25,29 \pm 0,7$	101
	50	$49,31 \pm 1,5$	99
	125	$141,57 \pm 1,3$	113
Água de piscicultura 2	0	<LOQ	--
	25	$26,05 \pm 0,8$	104
	50	$57,68 \pm 0,3$	115
	125	$145,78 \pm 2,0$	117
Água de piscicultura 3	0	$24,34 \pm 0,2$	--
	25	$50,70 \pm 1,9$	105
	50	$74,51 \pm 0,7$	100
	125	$149,49 \pm 2,1$	100

Fonte: Dados da pesquisa

Os testes t realizados demonstraram que os resultados obtidos através da metodologia proposta não apresentaram diferenças significativas, dentro do nível de confiança de 95%. Esses resultados atestam a precisão do método e sua aplicabilidade nas amostras analisadas. As recuperações indicaram que o método

proposto pode ser aplicado com precisão e confiança para determinar os níveis de violeta genciana nessas amostras, destacando sua utilidade na avaliação da qualidade dos produtos comercializados (peixes).

5.0 CONCLUSÃO

O sistema desenvolvido neste método demonstrou sucesso na determinação de violeta genciana em amostras de águas de piscicultura. As vantagens adquiridas, como baixo custo e alta eficiência, são complementadas pela plena adequação do método aos princípios da Química Verde, buscando reduzir o impacto ambiental das práticas químicas. Adicionalmente, as características analíticas do método o tornam altamente atrativo como alternativa aos procedimentos convencionais, geralmente dependentes de equipamentos mais complexos.

Uma das principais vantagens reside na extração do violeta genciana por PV-IS-DLLME sem a necessidade de um solvente dispersor ou energia externa, contribuindo para um processo mais ecológico e seguro. A inovadora associação entre o sistema LPME para determinação do violeta genciana e a detecção por DIC representa uma contribuição significativa para a Química Analítica.

O desenvolvimento de métodos de microextração utilizando DES como solventes extratores abre novas possibilidades para processos mais sustentáveis e ecologicamente corretos, fundamentais para aplicações químicas acessíveis e seguras do ponto de vista toxicológico. O método desenvolvido neste estudo evidencia vantagens analíticas e ecológicas promissoras, oferecendo potencial para futuras aplicações em diversas áreas e se destacando como uma alternativa viável e sustentável em comparação aos procedimentos tradicionais de análise. Uma perspectiva interessante é a exploração da abordagem deste trabalho para outros sistemas e componentes, como diferentes corantes, metais, ametais e compostos farmacêuticos.

6.0 REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, Wendy C. et al. Multiresidue method for the triphenylmethane dyes in fish: Malachite green, crystal (gentian) violet, and brilliant green. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, n. 1-2, p. 279-289, 2009.
- BARRETO, J. A.; DE ASSIS, R. D. S.; CASSELLA, R. J.; LEMOS, V. A. A novel strategy based on in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of nickel in chocolate samples. **Talanta**, 193, p. 23-28, 2019.
- BARRETO, J. A. Novas estratégias de microextração em fase líquida dispersiva para a determinação de elementos traço em amostras de alimentos. 2020. Doutorado (Doutorado em Química) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2020a.
- BARRETO, J. A.; DE ASSIS, R. D.; SANTOS, L. B.; CASSELLA, R. J. *et al.* Pressure variation in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction associated with digital image colorimetry: Determination of cobalt in food samples. **Microchemical Journal**, 157, p. 7, Sep 2020b.
- BERRIOS, Ricardo L.; ARBISER, Jack L. Novel antiangiogenic agents in dermatology. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 508, n. 2, p. 222-226, 2011
- BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, 76, n. 5, p. 965-977, 2008.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 34, de 13 de setembro de 2007. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, Secretaria de defesa agropecuária **Publicação DOU** nº34, de 14/09/2007, Seção 1. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-34-de-13-de-setembro-de-2007.pdf>. Acesso em: 01 dez 2023
- CAPITÁN-VALLVEY, Luis Fermín et al. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. **Analytica Chimica Acta**, v. 899, p. 23-56, 2015.
- CARVALHO, T. E. M. **Adsorção de corante aniônico de solução aquosa em cinza leve de carvão e zeólita de cinza leve de carvão**. 2010. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciência na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85134/tde-29082011-102142/pt-br.php>. Acesso em: 25 nov. 2023.
- COSTA, Rafael Conceição et al. A Method Based on Digital Image Colorimetry for Determination of Total Phenolic Content in Fruits. **Food Analytical Methods**, p. 1-10, 2023.
- DOTTA FILHO, A. C. **Capim-annoni (Eragrostis Plana Nees) in natura para remoção do corante Vileta de metila 10B de solução aquosa**. Dissertação de (Mestrado em engenharias) – Universidade Federal do Pampa, Alegrete, 2017.

Disponível em: <http://dspace.u-nipampa.edu.br:8080/jspui/bitstream/riu/1951/1/Augusto%20Cezar%20Dotta%20Filho%20-%202017.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2023.

DOWLING, Geraldine et al. Confirmatory analysis of malachite green, leucomalachite green, crystal violet and leucocrystal violet in salmon by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, n. 1-2, p. 411-419, 2007..

FARAJI, M.; ADELI, M.; NOORMOHAMMADI, F. Deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid micro-extraction for extraction of malachite green and crystal violet in water samples prior their determination using high performance liquid chromatography. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 102, n. 3, p. 681-689, Feb 19 2022. Article.

FATTAHI, Nazir et al. Standardization of the analytical procedure based on deep eutectic solvent for the extraction and measurement of tricyclic antidepressants drugs in post-mortem blood samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 238, p. 115811, 2024.

GARCÍA-ATIENZA, P. et al. Liquid phase microextraction based on natural deep eutectic solvents of psychoactive substances from biological fluids and natural waters. **Talanta**, v. 267, p. 125277, 2024.

GÓES, M. C. C. **Palha de carnaúba como removedor de corantes azul de metileno e cristal violeta**. 2013. 104 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013. Disponível em: <https://tede.bc.ufma.br/jspui/bitstream/tede/961/1/Dissertacao%20Mauro.pdf>. Acesso em 29 nov. 2023

HENDRICKX, I.; BOARDMAN, G. D. Pollution Prevention Studies In The textile Wet Processing Industry. **Department of Civil Engineering, Blacksburg**, Virginia, May 1995.

KIMURA, I. et al. Efeito do pH e do Tempo de Contato na Adsorção de Corantes Reativos por Microesferas de Quitosana, Polímeros: **Ciência e Tecnologia**, 1999, 1-7.

KOKOSA, J. M. Advances in solvent-microextraction techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 43, p. 2-13, 2013.

MALEY, A. M.; ARBISER, J. L. Gentian violet: a 19th century drug re-emerges in the 21st century. **Experimental Dermatology**, Copenhagen, v. 22, n. 12, p. 775–780, Dec. 2013.

MARTINS, Manoel Leonardo et al. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, 4(1): p. 35-51, Mar. 2012.

MELLO, P. H. **Estudo teórico sobre corantes catiônicos e possíveis modelos que expliquem a interação com a argila do tipo montmorilonita**. São Carlos, ISQC, 2006. 126 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75131/tde-18082006-143508/pt-br.php>. Acesso em: 10 Jan. 2019.

MORI, M.; CASSELLA, R. J. Estudo da sorção do corante catiônico violeta cristal por espuma de poliuretano em meio aquoso contendo dodecilsulfato de sódio. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 2039-2045, ago. 2009.

NASCIMENTO, J. F. S. et al. Análise espectrofotométrica do corante violeta de genciana. **Periódico Tchê Química**, v. 11, n. 22, 2014.

OLIVEIRA, C. S. **Propriedades fotoquímicas dos fotossensibilizadores cristais violeta e azul de metileno em sistemas microheterogêneos e em células cancerosas em cultura**. 2006. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-12062008-135805/en.php>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PARANHOS, A. P. S. **Estudo dos compostos de baixa massa molar, redutores de ferro, produzidos por basidiomicetos com potencialidade em descolorir corantes da indústria têxtil**. 2011. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo, 2011. Disponível em: http://arquivos.ambiente.sp.gov.br/pgibt/2013/09/Ana_Paula_Soares_Paranhos_MS.pdf. Acesso em: 29 nov. 2023.

SANTOS, G. S. et al. Identificação e quantificação do cristal violeta em aguardentes de mandioca (tiquira). **Química Nova**, v. 28, p. 583-586, 2005.

SANTOS, L. B. et al. Deep eutectic solvents in liquid-phase microextraction: Contribution to green chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 146, p. 116478, 2022.

WU, Xiaohai et al. Preparation of magnetic mesoporous metal-phenolic coordination spheres for extraction of crystal violet and leuco-metabolites in fish. **Journal of Chromatography A**, v. 1636, p. 461776, 2021.

WYSZECKI, Günther; STILES, Walter Stanley. **Color science: concepts and methods, quantitative data and formulae**. John wiley & sons, 2000.

XIAO, Xue et al. Analysis of trace malachite green, crystal violet, and their metabolites in zebrafish by surface-coated probe nanoelectrospray ionization mass spectrometry. **Talanta**, v. 217, p. 121064, 2020.

ZAMORA, P.; KUNZ, A. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis, **Quim. Nova** 2002 (25), 78-82.