

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JOSELÂNIO DE JESUS COUTINHO

**Microextração em fase líquida à base de solvente com
hidrofilicidade comutável para determinação de verde brilhante em
amostras de águas, mariscos e peixes**

JEQUIÉ – BA

DEZEMBRO / 2022

JOSELÂNIO DE JESUS COUTINHO

**Microextração em fase líquida à base de solvente com
hidrofilicidade comutável para determinação de verde brilhante em
amostras de águas, mariscos e peixes**

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 Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos

JEQUIÉ – BA

DEZEMBRO / 2022

C871m Coutinho, Joselânio de Jesus.

Microextração em fase líquida à base de solvente com hidrofilicidade comutável para determinação de verde brilhante em amostras de águas, mariscos e peixes / Joselânio de Jesus Coutinho.- Jequié, 2022.

43f.

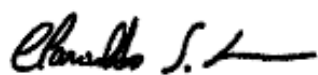
(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos)

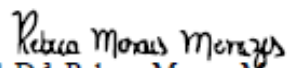
Rafaella Cândia Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA


Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos
Orientador—UESB (Jequié - BA)


Prof. Dr. Clarivaldo Santos Sousa
UFRB


Prof. Dr. Rebeca Moraes Menezes
UEFS

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Química em 28 / 12 / 2023

Dedico este manuscrito, a meu pai, Gilberto de Jesus Coutinho “Im Memorian”, e a minha querida mãe, Carmelita Bento de Jesus, pelo apoio, incentivo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder saúde e determinação para lutar por meus objetivos, bem como sabedoria para traçar novos desafios.

Aos meus pais, Carmelita Bento de Jesus e Gilberto de Jesus Coutinho “*Im Memorian*”, pelo afeto e apoio nos momentos de dificuldades, sempre me incentivando a nunca desistir de estudar, já que esta era a única ferramenta, que eles poderiam me proporcionar para alcançar minhas metas pessoais e profissionais.

À minha irmã, Carla Thaís de Jesus Caetano, por me encorajar nos momentos de tristeza, angústia e por acreditar em mim.

Aos familiares que torcem pelo meu sucesso.

Sou grato a Valfredo Azevedo Lemos, além de ser meu orientador, considero um grande amigo, ao qual tenho uma enorme estima e pela valiosa contribuição neste trabalho desenvolvido.

Aos honrosos amigos e colegas, Jeferson A. Barreto, Luana B. Santos, Rosivan S. Assis, Anderson S. Melo, Uneliton N. Silva e Márcio José pela amizade, ajuda, orientações e pelas resenhas feitas. Vocês são especiais.

À família LQA (Laboratório de Química Analítica) da UESB, pelo ambiente de trabalho alegre, agradável e por momentos de descontração compartilhado.

Aos discentes que ministrei aulas, durante o estágio supervisionado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de ingressar no curso de Mestrado em Química Analítica e poder desenvolver este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pelo espaço físico, por meio do LQA, no qual foram desenvolvidos todos os ensaios experimentais.

“O homem que não lê livros, não tem vantagem sobre o homem que não sabe ler” (Mark Twain).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características de um experimento em química analítica verde	12
Figura 2. Mecanismo de interação de moléculas entre um ácido graxo e a fase aquosa.	15
Figura 3. Estrutura molecular do verde brilhante.	18
Figura 4. Representação esquemática do sistema RGB	21
Figura 5. Representação do procedimento de microextração	26
Figura 6. Influência do solvente extrator na pré-concentração de BG.	287
Figura 7. Influência do pH na pré-concentração de BG.	278
Figura 8. Influência do volume de amostras na pré-concentração de BG.	29
Figura 9. Influência do volume de ácido octanóico na pré-concentração de BG.	30
Figura 10. Influência da proporção ácido sulfúrico X carbonato de sódio na pré-concentração de BG.	31
Figura 11. Curva de analítica de verde brilhante (0; 20; 50; 100; 200 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$).	32
Figura 12. Curvas analíticas correspondentes aos canais RGB.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos parâmetros analíticos após o processo de pré-concentração de BG.	33
Tabela 2. Estudo de interferência causada por íons no processo de extração de BG.	33
Tabela 3. Resultados da aplicação do método nas amostras de água.	35
Tabela 4. Resultados da aplicação do método nas amostras de peixes e mariscos.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BG	Verde brilhante (do inglês: Brilliant Green)
CG	Cromatografia Gasosa
[C ₄ MIM][PF ₆]	Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio
DES	Solvente eutético profundo (do inglês: Deep Eutectic Solvente)
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês: Dispersive Liquid-Liquid Microextraction).
DIC	Colorimetria de Imagem Digital (do inglês – Digital Image Colorimetry)
DPR	Desvio Padrão Relativo
HPLC:	Cromatografia líquida de alta performance (do inglês: High performance liquid chromatography)
JPEG	Grupo autor do padrão (do inglês: Joint Photographic Experts Group)
LED	Diodo emissor de luz (do inglês: Light - Emitting Diode)
LPME	Microextração de fase líquida (do inglês: Liquid-Phase Microextraction)
PTFE	Politetrafluoretileno
RGB	Vermelho, verde e azul (do inglês: Red, Green e Blue)
VOC's	Compostos Orgânicos Voláteis
UV-Vis	Espectrofotometria ultravioleta-visível (do inglês: Ultraviolet-visible spectrophotometry)
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês: Extratation Liquid-Liquid)
ROI	Região de Interesse (do inglês: Region Of interest)
SHS	Solvente de Hidrofilicidade Comutável (do inglês: Switchable Hydrophilicity Solvent)
SD-LPME	Microextração em fase líquida de gota suspensa (do inglês: Single Drop Liquid Phase Microextraction)
HF-LPME	Microextração em fase líquida de fibra oca (do inglês: Hollow Fiber based Liquid Phase Microextraction)
GC-ECD	Cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (do inglês: Gas-Chromatography with electron capture detection)

Microextração em fase líquida à base de solvente com hidrofiliabilidade comutável para determinação de verde brilhante em amostras de águas, mariscos e peixes.

Autor: Joselânio de Jesus Coutinho algumas

Orientador: Valfredo Azevedo Lemos

RESUMO

A busca pelos princípios da química verde tem crescido bastante, é válido citar algumas: evitar substâncias nocivas ao meio ambiente e ao ser humano, a diminuição de resíduos gerados durante ensaios químicos e a substituição de solventes. Um solvente precisa atender a diferentes critérios, para ser qualificado como um meio verde, como disponibilidade, baixa toxicidade, biodegradabilidade, entre outros. Neste trabalho, um sistema alternativo de microextração em fase líquida foi desenvolvido para determinação de verde brilhante (BG), utilizando um equipamento produzido com materiais de baixo custo e fácil de aquisição. O processo de microextração é baseado em um solvente de hidrofiliabilidade comutável (ácido octanóico), solvente pouco miscível na fase aquosa em uma forma, mas completamente miscível na fase aquosa em outra forma. A alternância entre essas duas formas hidrofóbica e hidrofílica pode ser obtida pela alteração na composição da solução, onde foi empregado o carbonato de sódio (Na_2CO_3) e o ácido sulfúrico (H_2SO_4). Os fatores como pH, volume de amostra, volume de solvente comutável e proporção ácido x base foram otimizadas para fornecer a melhor resposta analítica para a pré-concentração de BG. O limite de detecção obtido foi de $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$. Já o fator de enriquecimento foi de 250. A validação do método de extração de BG, foi promovida pela comparação com a técnica de espectrofotometria, o método desenvolvido foi aplicado para determinação de BG em amostras de águas, mariscos e peixes. O novo método criado é em associação à colorimetria por imagem digital, um método de detecção com um futuro promissor, já que é possível a análise de diversas matrizes. Esse método alternativo, é uma ferramenta sustentável, inovadora, efetiva, de baixo custo e ecologicamente correto.

Palavra-chave: imagem digital; pré-concentração; verde brilhante; água; peixe

Solvent-based liquid phase microextraction with switchable hydrophilicity for determination of brilliant green in water, shellfish and fish samples

Author: Joselânio de Jesus Coutinho

Advisor: Valfredo Azevedo Lemos

ABSTRACT

The search for the principles of green chemistry has grown a lot, it is worth mentioning a few: avoiding substances that are harmful to the environment and human beings, the reduction of waste generated during chemical tests and the replacement of solvents. A solvent needs to meet different criteria to be qualified as a green medium, such as availability, low toxicity, biodegradability, among others. In this work, an alternative liquid phase microextraction system was developed for the determination of brilliant green, using equipment produced with low cost and easy to acquire materials. The microextraction process is based on a switchable hydrophilicity solvent (octanoic acid), a solvent that is poorly miscible in the aqueous phase in one form, but completely miscible in the aqueous phase in another form. The alternation between these two hydrophobic and hydrophilic forms can be obtained by changing the composition of the solution, where sodium carbonate (Na_2CO_3) and sulfuric acid (H_2SO_4) were used. Factors such as pH, sample volume, switchable solvent volume and acid to base ratio have been optimized to provide the best analytical response for the BG preconcentration. The detection limit obtained was $1.4 \mu\text{g L}^{-1}$. The enrichment factor was 250. The validation of the BG extraction method was promoted by comparison with the spectrophotometry technique, the developed method was applied to determine BG in samples of water, shellfish and fish. The new method created is in association with colorimetry by digital image, a detection method with a promising future, since it is possible to analyze several matrices. This alternative method is a sustainable, innovative, effective, low cost and eco-friendly.

Keywords: digital image; preconcentration; brilliant green; water; fish.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	12
1.2 - Solvente com hidrofiliabilidade comutável (SHS)	14
1.3 - Microextração em fase líquida em gota suspensa (SD-LPME).....	15
1.4 - Microextração em fase líquida com base em fibra oca (HF-LPME)	16
1.5 - Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	17
1.6 – Verde brilhante (BG)	17
1.7 - Colorimetria por imagem digital (DIC)	19
2 - OBJETIVOS	22
2.1 - Geral	22
2.2 - Específicos.....	22
3 - PARTE EXPERIMENTAL.....	23
3.1 - Aparelhos e equipamentos	23
3.2 - Reagentes e soluções	23
3.3 - Preparo de amostras	24
3.4 – Síntese do solvente eutético	24
3.5 - Procedimento de pré-concentração	25
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 - Otimização das variáveis	27
4.2 - Tipo de solvente extrator	27
4.3 - Efeito do pH na extração de BG	28
4.4 - Quantidade de amostra	28
4.5 - Volume de ácido octanóico	29
4.6 - Proporção ácido versus carbonato	30
4.7 – Características analíticas e validação	31
4.8 –Aplicação do método proposto.....	34
5- CONCLUSÃO e PERSPECTIVAS	36
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1- INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem-se observado uma crescente busca por substâncias não tóxicas e ecologicamente correta, a fim de evitar substâncias nocivas ao meio ambiente e ao ser humano, além da diminuição de resíduos gerados durante ensaios químicos e a substituição de solventes que possam emitir compostos orgânicos voláteis (VOC's), estes fatores têm chamado muita atenção da sociedade de química nacional e internacional, pois são aspectos relevantes na Química Verde [1, 2].

O conceito de Química Verde está ligado ao desenvolvimento sustentável, na literatura, os primeiros vestígios dessa utilização feita por químicos, está relacionada a processos industriais e de produtos, relatado em 1999 [3-5]. O princípio desse novo ramo da química, deu-se originalmente devido ao uso de “Orgânicos Verdes”, sintetizados em diferentes áreas industriais da química, sendo, a indústria farmacêutica uma das principais [6].

Na Figura 1, é observado algumas características abordadas nesse ramo da química, especialmente em Química Analítica, na qual é comum o uso de reagentes orgânicos ou inorgânicos em síntese e em procedimentos experimentais. Então métodos e procedimentos analíticos tem buscado o uso de novos solventes para substituir solventes orgânicos convencionais. Neste contexto, solventes de hidrofilicidade comutável, líquidos iônicos, e solventes eutéticos, entre outros, são substâncias ou misturas que vem sendo bastante exploradas em química.

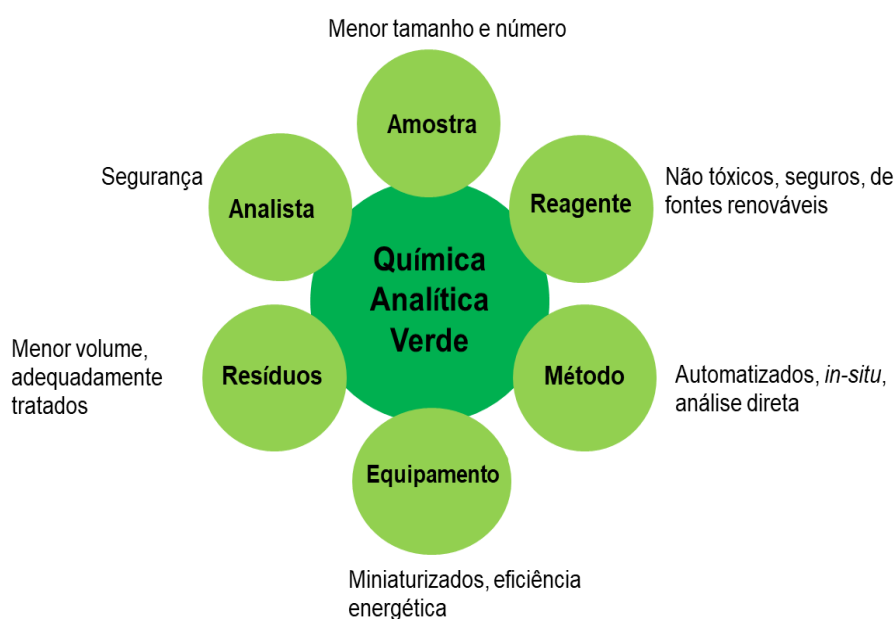


Figura 1. Características de um experimento em química analítica verde [6].

Abrangem também muitas questões relativas à minimização da geração de resíduos, ao consumo de energia, à miniaturização dos procedimentos e técnicas experimentais de pré-concentração [7-9]. A miniaturização, garante algumas vantagens, como por exemplo: pequenos volumes de amostras e solventes de extração utilizados nos experimentos, capacidade de automação do sistema, facilidade de operação, baixo custo de análise, redução ou extinção do uso de solventes orgânicos voláteis, e também, resultados livres de interferência, já que o preparo de amostras é de fundamental importância para a compatibilização com a técnica de análise escolhida [10, 11].

O uso de técnicas miniaturizadas desenvolveram-se a partir dos anos de 1990, empregada no trabalho sobre microextração em fase sólida com dessorção térmica usando fibra óptica de sílica fundida [12].

Novas metodologias e técnicas analíticas são capazes de analisar espécies em micro quantidades em inúmeros tipos de matrizes, como: águas, sedimentos, alimentos de forma geral, entre outros, vem sendo desenvolvidas. Para conhecer a concentração ou até mesmo diagnosticar a(s) espécie(s) presente(s) nessas matrizes. No entanto, esbarra-se nos obstáculos, devido estarem em concentrações ínfimas, problemas com contaminação, ou interferentes presentes na matriz, bem como, perda do analito por adsorção ou degradação durante os ensaios experimentais.

Derivada da tradicional extração líquido-líquido (LLE), a microextração em fase líquida (LPME) é um método de preparo de amostras, no qual é necessário apenas alguns microlitros de solvente para efetuar a pré-concentração/extração de diversos tipos de analitos em inúmeras matrizes. Essa metodologia oferece alguns benefícios, destaca-se, a rapidez na análise, simplicidade e baixo custo de operação, além de oferecer alto fator de enriquecimento e recuperação

Há relatos na literatura sobre a diversidade do uso da LPME em sistemas, que podem ser utilizados em junção à técnicas de detecção, como : um sistema de injeção em fluxo para determinação espectrométrica de elementos traços [13]. A LPME é dividida em três classes principais: microextração em fase líquida de gota suspensa (SD-LPME); microextração em fase líquida de fibra oca (HF-LPME) e a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) [14, 15].

1.2 - Solvente com hidrofiliidade comutável (SHS)

Nos últimos anos a comunidade científica tem se empenhando na busca por novos solventes, com menos impacto ao meio ambiente e com características adequadas aos processos de pré-concentração, no qual os SHS têm atraído a atenção de muitos pesquisadores, devido às suas propriedades, bastante adequadas para uso em processos de microextração [16].

A alternância entre as duas formas (hidrofóbica e hidrofílica) pode ser obtida por uma mudança na composição da solução. A mudança entre as formas torna essas substâncias bastante adequadas para uso em sistemas que envolvem a dispersão do solvente extrator [17, 18].

Os primeiros relatos sobre o estudo de SHS envolveram amidinas e aminas secundárias [19]. Essas substâncias podem ser alternadas entre as duas formas adicionando CO₂ e, em seguida, revertidas à sua forma não iônica por nitrogênio, gás inerte ou a adição de hidróxido de sódio. A aplicação de um SHS em sistema de LPME foi realizada em 2015 empregando o solvente imiscível em água, N,N-dimetilciclohexilamina, que foi solubilizado na proporção de 1:1 usando CO₂ como reagente [20]. Após a extração, a separação das fases foi induzida pela adição de hidróxido de sódio.

Ácidos carboxílicos também apresentam propriedades de SHS. Alterações na miscibilidade dessas substâncias podem ser induzidas, promovendo-se reações ácido-base após ajuste do pH do meio de extração. Esse processo conduz à formação de uma grande área superficial entre o solvente de extração e a fase aquosa, resultando em um rápido equilíbrio, seguido por separação de fases. A Figura 2 ilustra o mecanismo de um ácido graxo como solvente de hidrofobicidade comutável em um sistema de microextração [18, 21-23].

Nos últimos anos, a busca por solventes verdes no desenvolvimento de metodologias sustentável, ganhou alta proporção em seu uso nas extrações. Essas substâncias devem apresentar algumas características ideais para a pré-concentração, como: Ter boa miscibilidade na fase orgânica e imiscível na fase aquosa, densidade baixa e, seletivo para a extração do analito de interesse. Por possuírem toxicidade baixa, e como o resíduo gerado é pequeno, o descarte pode ser efetuado no meio ambiente com segurança, levando em comparação aos solventes tradicionais (orgânicos) que não devem ser descartados da mesma forma[16].

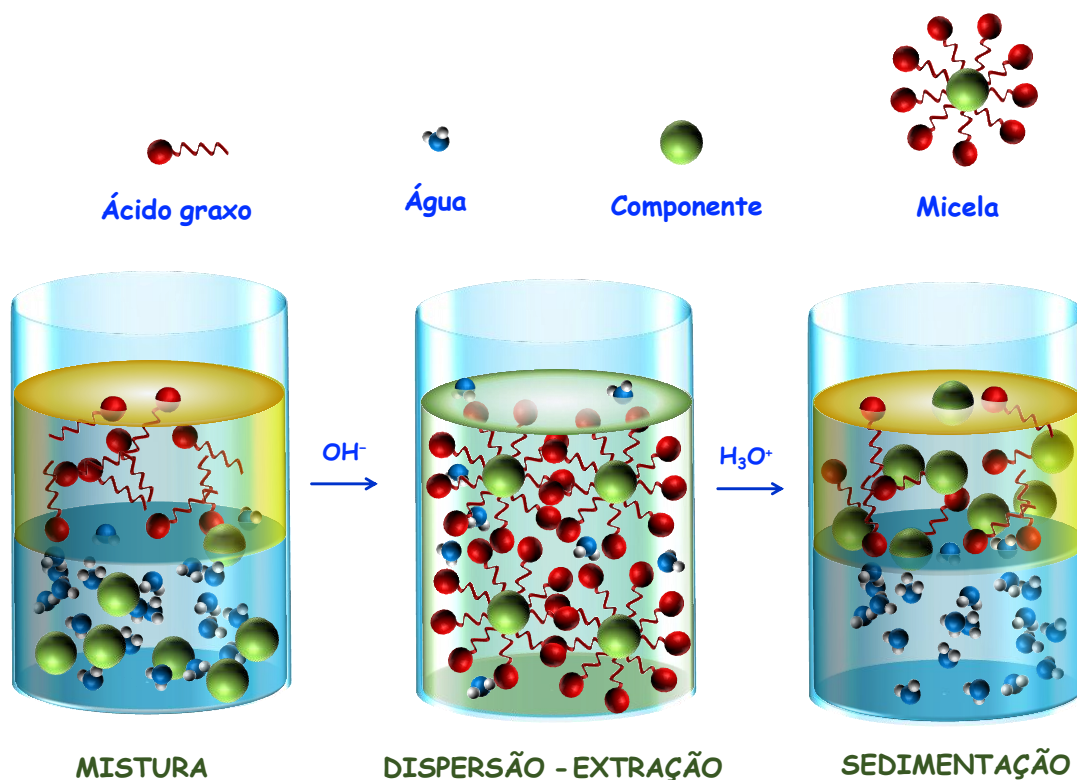


Figura 2. Mecanismo de interação de moléculas entre um ácido graxo e a fase aquosa.

Alguns sistemas LPME também têm empregado SHS. Um sistema foi desenvolvido para a determinação da ofloxacina em amostras de urina humana [21]. A conversão do ácido graxo em forma hidrofílica foi realizada com carbonato de sódio. Em seguida a injeção de ácido sulfúrico na solução diminuiu o valor do pH do meio, gerando microgotas de ácido graxo.

O desenvolvimento dos solventes de hidrofiliabilidade comutável é fundamental para alcançar aplicações químicas, seguras e ambientalmente corretas. O uso destes solventes atualmente é focado em aplicações como extração, separação e reação. As principais vantagens do uso de SHS em sistemas de microextração são a execução do processo em fase homogênea sem dispersão por solventes ou energia externa, e a fácil separação de fases sem equipamentos adicionais [21, 24-26].

1.3 - Microextração em fase líquida em gota suspensa (SD-LPME)

Na microextração em fase líquida em gota suspensa ocorre a formação de uma pequena microgota, ou seja, um volume diminuto da fase aceptora que é submersa na amostra líquida (fase doadora) e o sistema fixo para que a gota seja formada na ponta de uma seringa ou tubo capilar, outros trabalhos também utilizam

uma microseringa (seringa cromatográfica). Em seguida, quando a gota é formada e permanece estável, ocorre a extração do analito da fase aquosa para a fase aceptora [27, 28].

Os primeiros relatos abordando a SD-LPME foi descrito em 1996, a extração foi realizada em uma microgota de n-octano utilizado como solvente orgânico imisível em água para extração de 4- metilacetofenona em amostras de água [29].

Essa metodologia de preparo de amostras tem algumas vantagens: baixo custo, compatibilidade com as técnicas cromatográficas e espectroanalíticas, boa capacidade na extração de espécies inorgânicas e orgânicas e minimiza impactos ao meio ambiente [30].

Contudo, é relevante citar algumas desvantagens, entre essas estão: estabilidade da gota que pode ser perdida pela agitação vigorosa da amostra, o tempo e temperatura de pré-concentração devem ser bem ajustados; o volume da gota extraída é proporcional a taxa de evaporação do solvente [31].

Um sistema de microextração em gota suspensa acoplada a um sistema de detecção por imagem digital foi desenvolvido para determinação de vanádio em amostras de águas [32]. O desenvolvimento da microextração em gota suspensa, foi aplicado para análise de diversas matrizes e acoplamentos a sistemas cromatográficos [33].

1.4 - Microextração em fase líquida com base em fibra oca (HF-LPME)

A HF-LPME é desenvolvida com uma fibra porosa e oca, e totalmente preenchida com alguns microlitros de uma solução receptora (aquosa ou orgânica). A fibra atua como uma barreira física entre as fases e serve para suportar o baixo volume de solução receptora utilizada. A membrana preenchida é, então, inserida em uma fase doadora. Então os analitos são extraídos para a fase extratora e migram para a solução receptora.

A fase enriquecida é finalmente recolhida com o auxílio de uma microseringa e submetida à detecção. Os poros presentes na fibra servem como filtros para moléculas de grande massa molecular [34, 35].

Diversas matrizes usadas para estudo e técnicas cromatográficas que são utilizadas para análise, pode-se citar: pesticidas organoclorados em amostras de tomates, morangos e água, foi determinado, acoplando a técnica a cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (CG-ECD) [36]

1.5 - Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Na DLLME, ocorre a formação de um sistema trifásico de solventes. Este, é obtido, através da inserção rápida de uma mistura contendo o solvente extrator (hidrofóbico) ou seja, imiscível em água e um solvente dispersor (miscível na fase aquosa e no extrator). A microextração é formada pela dispersão do solvente por toda a amostra, aumentando a área de contato do solvente extrator com o analito presente na amostra, dessa forma a eficiência de extração da espécie de interesse é maior. Em 2006 a DLLME foi aplicada pela primeira vez em um sistema de pré-concentração de compostos orgânicos em amostras aquosas [37, 38].

As principais vantagens da DLLME são: operação simples, pequenas quantidades de reagentes, baixo custo e eficiência de extração. Apesar das vantagens, muitos procedimentos fazem o uso de solventes extratores poluentes e tóxicos. Métodos baseados na DLLME mais corretos, têm sido cada vez mais desenvolvidos. Alguns solventes tidos como verdes têm sido usados em DLLME.

Um sistema baseado na microextração líquido-líquido dispersiva em seringa para determinação de níquel em amostras de chocolate foi desenvolvido, utilizando a colorimetria de imagem digital como detecção [39]. A DLLME também foi associada com análise por imagem digital para determinação de cobalto em vitamina B12 e águas [40]. Foi desenvolvido um sistema utilizando um separador gás-líquido miniaturizado para uso em procedimentos de LPME: Determinação de mercúrio em alimentos [41].

Alguns solventes alternativos, não tóxicos têm sido usados em DLLME convencional, há também métodos com outros tipos de dispersão do solvente extrator, como: ultrassom, agitação magnética, efervescência e controle de temperatura.

1.6 – Verde brilhante (BG)

Os corantes trifenilmetanos, como o verde de malaquita, cristal violeta e verde brilhante são exemplos de substâncias sintéticas, usados desde o século 20, para colorir na indústria têxtil, tintas biológicas e, além da produção de papel, em que 800g a 1,0 kg é capaz de tingir uma tonelada de papel [42, 43]. Por muitos anos, o verde brilhante tem sido utilizado de forma ilegal na indústria da piscicultura, pelo fato de possuir ação antifúngica, antiparasitário e antimicrobiana, devido sua eficiência para prevenir feridas causadas por micróbios e no tratamento de certas anomalias em peixes, e claro o custo benefício baixo [44].

A União Europeia (EU) e a Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos da América (US-FDA), condenam o uso de BG, pois é um produto tóxico, tem propriedades carcinogênicas e mutagênicas, prejudicando o ser humano e causando poluição a biota aquática [45]. Pode provocar queimaduras permanentes nos olhos dos seres humanos e animais, por outro lado, o consumo por via oral, pode desencadear uma série de problemas no homem, náuseas, vômitos, diarreia, e mais, irritação no trato gastrointestinal. Outro fato é que em contato com a pele, ele pode causar dor e vermelhidão na área atingida. Então é pertinente o desenvolvimento de técnicas e métodos cada vez mais sensíveis e eficazes para detecção de BG em diversas matrizes, pois é importante verificar se há ou não a presença dessa espécie nas amostras, já que o BG causa poluição para o meio ambiente e afeta o bem-estar, saúde do homem [43].

Verde brilhante apresenta-se como um sólido verde de brilho intenso possui formula molecular $C_{27}H_{34}N_2O_4S$ e massa molar de 482,62 g/mol e, tem sua absorção máxima em comprimento de onda 625 nm [44]. A estrutura molecular do verde brilhante é apresentada na Figura 3.

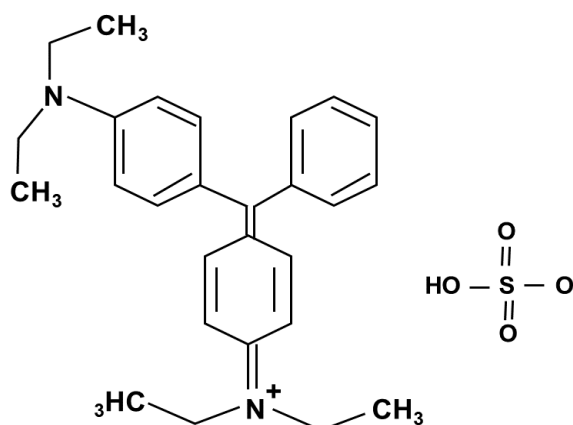


Figura 3. Estrutura molecular do verde brilhante.

A DLLME associada a líquido iônico foi empregada para determinação de verde brilhante e violeta cristal em amostras de águas e peixes usando o método de análise espectrofotométrico de primeira derivada de cruzamento zero [45]. Neste trabalho é observado a imagem da estrutura molecular das espécies estudadas pelos autores, além disso, descrevem uma série de técnicas que são utilizadas para análises dessas espécies trifenilmetanos, como, por exemplo, o uso da

espectrofotometria UV-Vis, eletroforese capilar, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, eletroquímica, eletroquimioluminescência, cromatografia líquida com detecção visível e fluorescência, há ainda utilização dos diversos tipos de técnicas cromatográficas, entre outros.

1.7 - Colorimetria por imagem digital (DIC)

O avanço dos anos, tem proporcionado o desenvolvimento científico, a produção de novas tecnologias analíticas, capazes de oferecer resultados confiáveis e de forma rápida, em outras palavras, em tempo real, usando equipamentos compactos e de baixo custo, promovendo a ciência. Nos tempos atuais, já é possível o uso dessas ferramentas no campo, no momento de coleta ou análise instantânea das amostras, fornecendo em segundos, as características presentes na matriz.

A coloração, no campo da ciência pode ser uma indicação de reação química ou pela variação de pH, ela serve para indicar o ponto final de titulações, identificação de compostos ou para separar substâncias, além de informar se uma solução é ácida ou alcalina através do papel tornassol (medida imprecisa), a cor também é usada nas análises espectrofotométricas e ainda, na cromatografia em camada delgada (CCD).

O primeiro indício do uso da cor em química analítica foi na década de 60, onde os autores avaliaram a cor em indicadores ácido-base e em complexos [46]. A DIC é bastante utilizada para análise de diversos tipos de amostra, é uma técnica versátil, pois permite ser acoplada a diferentes sistemas analíticos e possibilidade de ser automatizada, é de baixo custo, fácil de operar e possui certa rapidez nas análises (depende da quantidade de amostras)[47]

Um estudo da quantidade de trabalhos relacionado com o uso imagens digitais, foi realizado e contabilizou cerca de 587 artigos, foi ressaltado ainda que, de 2005 a 2015, houve um acréscimo de 87,5% no número de publicações e quais dispositivo eram utilizados para captura de imagens, como: scanners, câmera digitais, smartphones/celulares; webcams, dentre outros [47].

Fazendo uma comparação entre as técnicas analíticas de detecção, a DIC vem se destacando, pois não precisa de equipamentos robustos, nem utilização de gases e nem chama para as análises. A qualidade da imagem depende do sistema de iluminação presente no equipamento desenvolvido para aquisição das fotografias. Existem alguns softwares que são usados no tratamento dessas imagens: ImageJ; Matlab e chemostat. Portanto, esses softwares computacionais

são empregados para o fornecimento dos resultados em absorbância, isso é garantido devido a variação de cor, quando tem-se o analito em diferentes concentrações, levando em conta o sinal do branco [48, 49]

Para melhorar a qualidade da imagem e excluir imperfeições, é necessário uma série de cálculos matemáticos que corrige desfoque, níveis de cinza e reduz ruídos. O estudo dessas imagens é feito através da escolha das regiões de interesse (ROI), que a cor é produto de reações químicas, como na pré-concentração ou em soluções coloridas, a cor permite obter diversas informações qualitativas ou quantitativas a respeito do analito. Essas características são alcançadas pela calibração e por reconhecimento de padrões, que assimila as cores a uma determinada concentração presente da espécie de interesse [47]

Uma foto é composta por uma matriz X linhas e Y colunas, na qual possui uma finidade de pontos, comumente definido como pixel. A nitidez ou resolução de uma imagem está relacionada com duas propriedades presente nos pixels, a cor e posição. Dessa forma quanto maior o número de pixels, que é determinado pela quantidade de bits da imagem, melhor será a qualidade [47]

Para conhecer a concentração, o tratamento das imagens são feitas através de espaços de cores, usado nas análises, alguns sistemas de cores são utilizados: RGB (Red, Green, Blue), CMY (cyan, magenta, yellow), HSI (hue, saturation, intensity), CMYK (cyan, magenta, yellow, K-Black), entre outros, cada modelo de cor depende de como as informações são geradas para formar o pixel, e por isso cada sistema tem uma maneira de utilização diferente [47]

O sistema RGB é composto das cores primárias (vermelho, verde e azul), que a mistura de duas dessas cores, origina uma nova cor, tida como secundária (ciano, magenta e amarelo) formam o sistema CMY, entretanto a soma das cores $R+G+B$, resulta na cor branca, como pode ser observado na Figura 4. Já a mistura das cores $C+M+Y$ formam a cor preta. Cada cor R, G ou B, contribui com 8 bits, as três cores totalizam 24 bits, com intensidade de cor que varia de 0 a 255, para a formação de uma nova cor, gerando 256 níveis, na qual totaliza mais de 16,7 milhões de cores [50, 51]

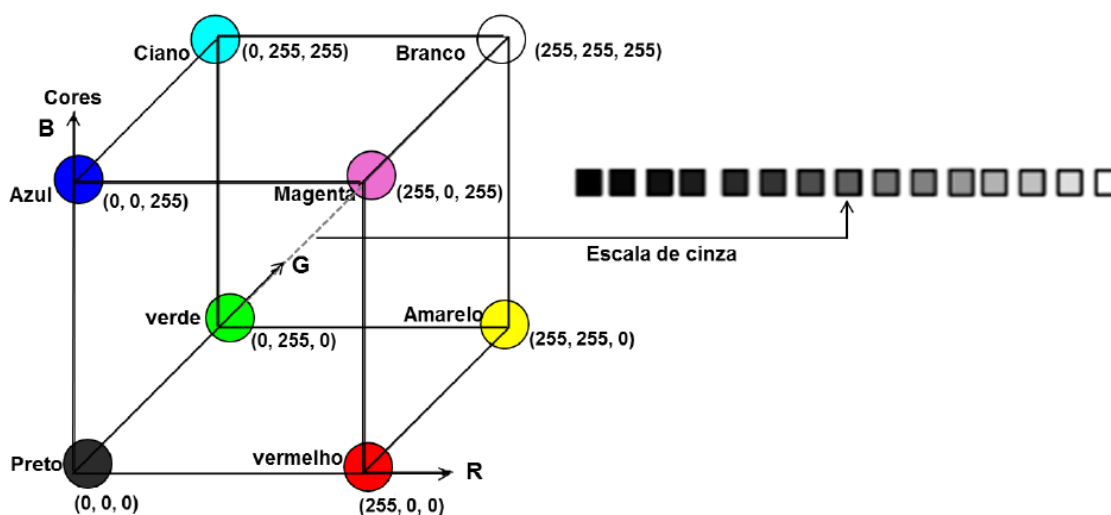


Figura 4. Representação esquemática do sistema RGB [50]

Esse sistema é o mais utilizado na colorimetria por imagem digital, convém destacar alguns trabalhos que desenvolveram-se usando essa técnica de detecção. Um sistema foi utilizado para a microextração em fase líquida baseada em líquido iônico assistido por vórtex: simples, de baixo custo e método ambientalmente amigável para especiação de antimônio em água [52]. Outro trabalho faz uso da técnica, que foi criado com um sensor colorimétrico baseado em papel impresso a jato de tinta acoplado smartphone para determinação de mercúrio (Hg^{2+}) [53]

2 - OBJETIVOS

2.1 - Geral

Desenvolver uma nova alternativa para determinação de verde brilhante em amostras de águas, mariscos e peixes, utilizando um sistema de microextração em fase líquida com um solvente de hidrofiliabilidade comutável, e detecção por colorimetria de imagem digital.

2.2 - Específicos

- Desenvolver método de microextração em fase líquida com efervescência para extração de verde brilhante
- Desenvolver método de baixo custo e simples acoplado a colorimetria de imagem digital
- Otimizar e validar o método proposto para extração e determinação de BG por colorimetria de imagem digital.
- Fazer comparação da eficiência da pré-concentração do método desenvolvido com a espectrofotometria UV-Vis.
- Aplicar o método otimizado em amostras de águas de piscicultura, poço, rio, água potável, mariscos e peixes para determinar verde brilhante.

3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Aparelhos e equipamentos

Um microscópio portátil multifuncional (Supereyes modelo B007, Shenzhen, China), foi utilizado para aquisição das imagens digitais. Um sistema para captura das imagens digitais, foi desenvolvido através de uma caixa com dimensões (17×9×14 cm) de fibra de média densidade (MDF) de cor branca para inibir os efeitos de interferência da luz e reflexão. A iluminação do sistema (caixa), é composto por seis LEDs (light-emitting diode) (5W) na cor branca, que foram fixados na parte superior da caixa, justamente, para uniformizar a iluminação no interior do sistema e assegurar a reprodutibilidade da imagem durante os ensaios experimentais.

Bombas de digestão parr (Moline, EUA) modelo 4745 foram usadas na digestão de amostras sólidas. Um medidor de pH modelo Quimis Q400AS (Diadema, Brasil) foi utilizado para medições de pH. A espectrofotometria foi a técnica escolhida para comparação das respostas, usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis 1900i (Shimadzu, China) a um comprimento de onda de 625 nm.

A mistura para a realização das sínteses dos DESs, foram preparadas utilizando-se um agitador vórtex Lab Dancer (Ika, Campinas, Brasil). A dispersão do solvente na fase aquosa foi realizada empregando-se banho de ultrassom Unique (Indaiatuba, São Paulo, Brasil), modelo USC1450, frequência de 25 kHz, potência ultrassônica 135 watts RMS. Uma centrífuga SP Labor (modelo SP-32 T, Presidente Prudente, Brasil) foi utilizada para a sedimentação da fase enriquecida.

3.2 - Reagentes e soluções

Foram utilizados reagentes de grau analítico e as soluções preparadas com água ultrapura processada por um sistema Elga modelo Purelab Classic. Soluções de trabalho de verde brilhante (Baker) foram preparadas por diluição da solução estoque (1000 µg mL⁻¹) preparadas diariamente.

Os materiais e vidrarias utilizados nos ensaios experimentais, foi-se previamente descontaminados com solução de ácido nítrico (Vetec) a 10% mv⁻¹ por 24 h e enxaguada com água desionizada.

Para síntese do solvente eutético foi utilizado: thymol (Merck), phenol (Sigma-Aldrich), cloreto de colina (Sigma-Aldrich); menthol (Merck), ácido octanóico (Labynt) e tetrahidrofurano (THF, Vetec, Duque de Caxias, Brasil).

Ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha), ácido sulfúrico (Merck), carbonato de sódio (Labynt, Diadema) foram preparadas e Peróxido de hidrogênio concentrado (Vetec) foram usados no procedimento.

Solução de KCl/HCl (pH 2,0) e soluções-tampão de acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0 a 6,0), fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0), borato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0), amoniacal $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 9,0) foram usados para ajustar o pH das soluções de verde brilhante.

3.3 - Preparo de amostras

Amostras de águas de piscicultura foram coletadas na região de Ibirataia, Bahia, Brasil. As amostras de água potável, poço e do Rio de Contas foram coletadas na cidade de Jequié, Bahia, Brasil. Estas amostras foram coletadas e armazenadas em frascos de politetrafluoretileno (PTFE). As amostras foram filtradas em papel filtro de $5 \mu\text{m}$ de porosidade, em seguida, as amostras foram transferidas para um balão de 25,0 mL, contendo 5,0 mL de soluções tampão de acetato pH 4,0, foram usadas para ajustar o pH, logo após, submetidas ao procedimento de pré-concentração.

Amostras de mariscos e peixes foram adquiridas no comércio local de Salvador, Bahia, Brasil. Destas, pesou-se aproximadamente (0,1 g) e transferidas para o copo de Teflon de bombas de digestão ácida. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de água ultrapura, 1,0 mL de ácido nítrico concentrado e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 30%. A bomba de digestão foi fechada, e o sistema foi mantido a 110°C em estufa por 6,0 h. Após resfriamento à temperatura ambiente, o pH foi ajustado para 4,0 com uma solução de NaOH $8,0 \text{ mol L}^{-1}$. O líquido resultante foi transferido para um balão volumétrico de 10,0 mL. O volume do balão foi finalmente completado com água ultrapura. Brancos de reagentes foram preparados de maneira similar às amostras.

3.4 – Síntese do solvente eutético

As misturas contendo CHCl_3 e fenol foram agitadas em vórtice à temperatura ambiente até o aparecimento de um líquido incolor e homogêneo. Os DES preparados foram mantidos em um banho de ultrassom por 5 a 10 segundos para a eliminação de bolhas de ar. O THF foi utilizado como emulsificante ao meio de extração, para a separação das fases, pois esse solvente é hidrofílico.

As misturas dos solventes hidrofóbicos como: timol e mentol, timol e $C_8H_{16}O_2$ e mentol e $C_8H_{16}O_2$ foram mantidas a $50^\circ C$ por 15 minutos até o aparecimento de um líquido homogêneo [54-56]. Para todos os solventes eutéticos foi utilizado o ultrassom para dispersão na fase aquosa e a centrifuga para separação da fase enriquecida.

3.5 - Procedimento de pré-concentração

Uma representação esquemática das etapas do sistema utilizado no procedimento é apresentada na Figura 5. Em um tubo de ensaio, adicionou-se 5,0 mL de uma solução de verde brilhante. Logo após, 70 μL do solvente ácido octanóico (caprílico) foram adicionados. Em seguida, acrescentou-se à mistura, 300 μL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e 400 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4). O sistema foi deixado em repouso por 2 minutos, tempo necessário para a formação da fase sobrenadante enriquecida. Então, utilizando uma seringa cromatográfica de 50 μL , à qual foi adaptado um capilar de PTFE na ponta, foi coletada uma alíquota. Então, a aquisição da imagem foi efetuada, através de uma gota gerada na ponta do capilar.

As fotografias foram arquivadas em formato JPEG, com resolução de 96 dpi para avaliação de dados RGB. As dimensões com tamanho de 640mm $\times$ 640mm e 32 bits. Então, uma região quadrada de interesse (ROI) foi determinada em um ponto fixo usando o software de computador Chemostat. O presente programa promove a obtenção de informações RGB para todos os pixels do ROI. Através desses dados é possível calcular o valor médio de cada canal de cor, vermelho (R), verde (G) e azul (B), devido à organização dos dados ser em histograma de cores. A curva analítica é caracterizada pela equação $-\log (P/P_0)$ versus a concentração do corante, na qual P é o valor médio do canal R, G ou B analisado por solução padrão ou amostra, enquanto P_0 é o valor médio obtido do branco analítico.

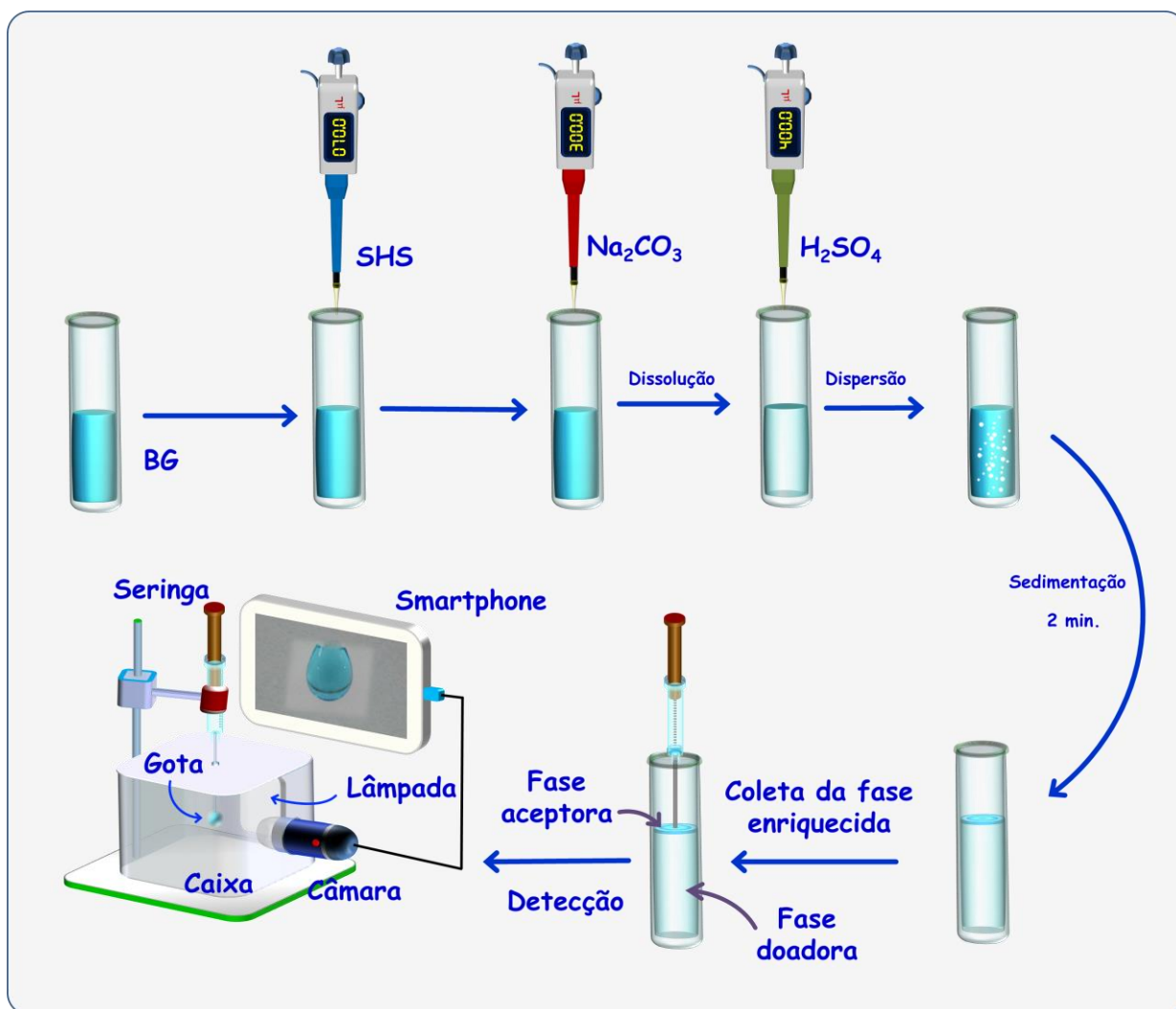


Figura 5. Representação do procedimento de microextração

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Otimização das variáveis

Com o objetivo de obter as melhores condições nos ensaios experimentais e, tornar o procedimento de pré-concentração de verde brilhante mais eficiente, alguns parâmetros foram analisados, dentre eles: tipo de solvente extrator, pH, volume de amostra, volume de solvente, proporção carbonato x ácido e interferentes, foram otimizados. Portanto, em cada experimento, foi utilizada a colorimetria de imagem digital para decodificar os resultados, empregando-se soluções de BG a $200,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Um estudo preliminar foi realizado para identificar o canal com maior correlação com a concentração de BG. O canal mais adequado à determinação foi aquele referente à cor vermelho, sendo empregado nos estudos posteriores.

4.2 - Tipo de solvente extrator

Nesta etapa usou-se alguns tipos de solventes de extração. Os DESs Cloreto de colina com fenol; timol com mentol; timol com ácido octanóico; mentol com octanóico, foram preparados em diferentes proporções para encontrar a possível combinação ideal para a extração do complexo de verde brilhante das soluções. Também foi analisado os solventes, ácido octanóico e o líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$. Na Figura 7, destaca-se dois solventes, o ácido octanóico e o DES (mentol com octanóico 1:1), este último, apesar de apresentar boa extração do BG $200 \mu\text{g L}^{-1}$, não foi utilizado neste trabalho, pois, sozinho, o ácido octanóico apresenta excelente extração da espécie de interesse. Mas, o DES em questão, não foi descartado para estudo de outros corantes trifenilmetano.

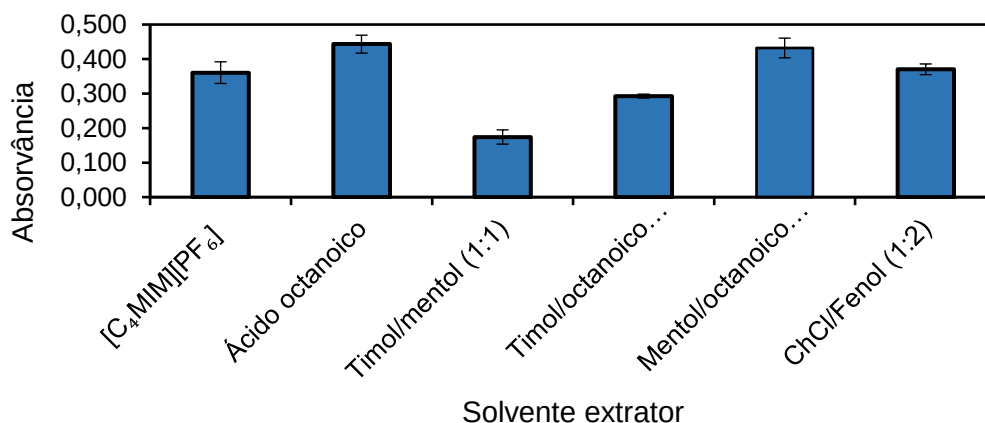


Figura 6. Influência do solvente extrator na pré-concentração de BG

4.3 - Efeito do pH na extração de BG

O potencial hidrogeniônico (pH) foi estudado para saber como é o comportamento da fase doadora de verde brilhante em pH alcalino e ácido, ou seja, para identificar em qual meio a extração é mais eficiente, promovendo um elevado sinal de absorvância. O efeito de pH foi analisado na faixa de 2,0 a 9,0, utilizando soluções tampão. Os corantes trifenilmetanos podem existir de duas formas: uma catiônica colorida e outra alcalina, o carbinol, que não dissocia. Em meio ácido, a espécie de BG tem maior interação com o ácido caprílico (solvente extrator), como pode ser observado na Figura 6. A solução tamponante de acetato de sódio pH 4,0, foi a escolhida para o estudo, devido apresentar esse fator e apresentar o melhor sinal analítico. Todavia, em meio alcalino, ocorre diminuição na pré-concentração, pois em pH alto (acima de 7,0), ocorre mudanças estruturais na espécie de verde brilhante, desse modo favorece a formação de moléculas carbinol que tem relativa insolubilidade em água e não apresenta coloração[45]. Nos ensaios experimentais posteriores, foi utilizado pH 4,0.

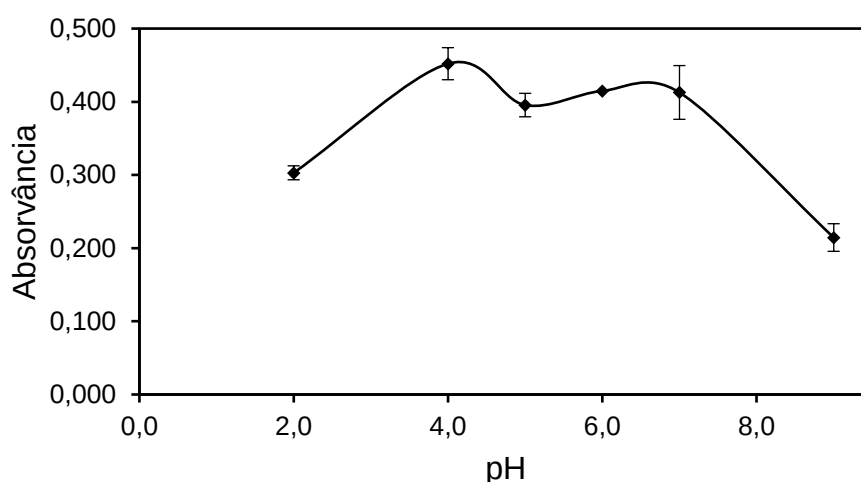


Figura 7. Influência do pH na na pré-concentração de BG

4.4 - Quantidade de amostra

Esse parâmetro foi avaliado para verificar o volume de fase doadora, suficiente para promover a extração eficiente e consequentemente obter o melhor sinal analítico. Diante disso, vale ressaltar que, extrações com grande volume de

amostra, contribui para elevar a quantidade de resíduo gerado e possivelmente a extrações ineficazes. Os resultados dessas análises são observados na Figura 8.

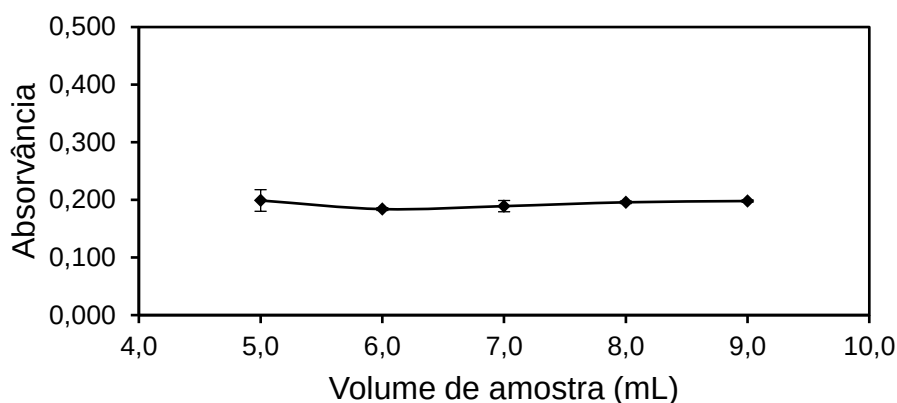


Figura 6. Influência do volume de amostras na pré-concentração de BG.

No gráfico pode-se observar que houve pouca variação do sinal analítico quando se utilizou volumes de (6,0 a 9,0) mL, isso ocorre devido ao grau de saturação do solvente extrator, como são utilizados apenas 70 μ L, volume pequeno para extração de BG e por tanto, extração semelhantes nesses volumes citados.

No estudo em destaque, foi utilizado o volume de 5,0 mL de amostra para os susceptíveis ensaios experimentais, pois apresentou boa extração e ótimo sinal analítico, além disso, este volume, proporciona uma pequena quantidade de resíduo, em comparação com os demais volumes.

4.5 - Volume de ácido octanóico

Nos procedimentos de pré-concentração, a quantidade ou volume de solvente utilizado, pode interferir na eficiência da extração, bem como, no volume da fase rica extraída. Foi investigado o efeito da alíquota do solvente extrator, na faixa de 50,0 a 150,0 μ L como é observado na Figura 9. Quando se utilizou volume de 50 μ L, foi observado baixo volume da fase enriquecida que foi extraída, sendo uma extração ineficiente, resultado da quantidade do solvente usado e, portanto, esse volume diminuto dificulta o recolhimento da fase enriquecida para a microseringa e uma perda na precisão.

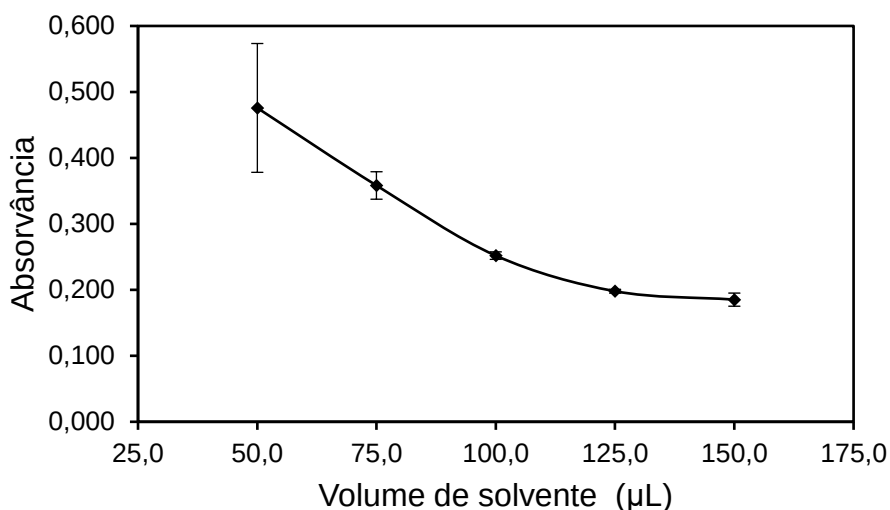


Figura 7. Influência do volume de ácido octanóico na pré-concentração de BG.

É observado, também, que o sinal analítico diminuiu com o aumento do volume do ácido octanóico, devido aos efeitos de diluição. Com base nesses resultados. Nos experimentos seguintes, foi utilizado 70,0 µL de solvente de extração, esse volume é ideal para pré-concentração eficiente do complexo formado com o analito verde brilhante, tendo uma boa precisão nas extrações.

4.6 - Proporção ácido versus carbonato

O ácido octanóico é insolúvel em água, porém, ao utilizar uma espécie alcalina, como o carbonato de sódio, irá promover a formação da fase iônica do solvente, sendo ela hidrofílica e consequentemente uma solução homogênea é gerada. Outras características que podem ser alteradas são: polaridade; força iônica; hidrofobicidade e superfície de contato do solvente extrator com a amostra.

A extração do BG é promovida pela alteração do pH da solução, essa diminuição, é capaz de converter o octanoato de sódio em ácido octanóico. Por conseguinte, a reação do ácido sulfúrico com o excesso de carbonato de sódio, produz efervescência (bolhas) na solução, devido a formação de dióxido de carbono, assim permitindo a separação das fases de forma rápida e eficiente na pré-concentração. Esses dois processos acontecem de forma simultânea na solução.

A conversão do solvente, imiscível em água, à sua forma iônica (hidrofílica) foi realizada através da adição de um agente alcalino, solução de carbonato de sódio a 2,0 mol L⁻¹. Após a adição desses agentes, forma-se uma mistura homogênea, pois ocorre a passagem do ácido octanóico à sua forma ionizada. Em seguida, uma solução de ácido sulfúrico 2,5 mol L⁻¹. Foi empregado como doadores de hidrogênio.

O volume de carbonato de sódio (agente alcalino) e ácido sulfúrico (doador de hidrogênio), foi estudado em diversas proporções (200 a 600 μL), a fim de conhecer, qual o volume que ambos potencializam a extração de BG da amostra. Dessa maneira, na Figura 10, estão descritas essas variações.

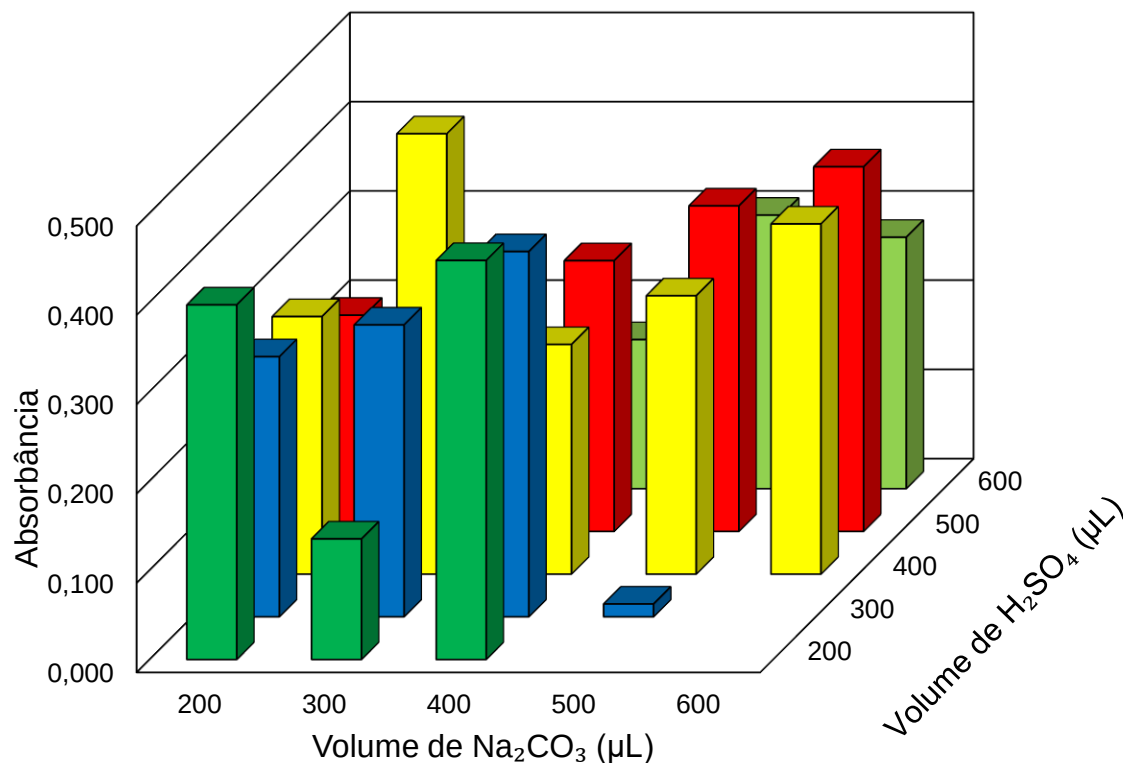


Figura 8. Influência da proporção ácido sulfúrico X carbonato de sódio na pré-concentração de BG.

Através do gráfico, é possível observar que o aumento da substância alcalina (Na_2CO_3), promove um maior consumo do agente doador de próton (H_2SO_4), ideal para formar a efervescência, esta, garante a dispersão do solvente orgânico (extrator) na fase aquosa, facilitando a extração do analito para a fase hidrofóbica (orgânica). Assim, o volume de carbonato e ácido utilizado nos ensaios experimentais foram de 300 e 400 μL , respectivamente.

4.7 – Características analíticas e validação

O desempenho analítico do método foi avaliado sob condições otimizadas. Faixas lineares de calibração, equação da curva de calibração, limite de detecção (LoD), e limite de quantificação (LoQ) foram calculados. As curvas de calibração foram construídas para a determinação de BG a uma faixa de concentração de 20,0 a 400,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ como é observado na Figura 11.

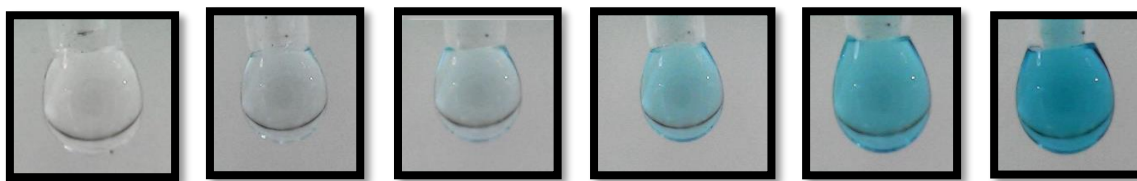


Figura 9. Curva de analítica de verde brilhante (0; 20; 50; 100; 200 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$).

A Figura 12 apresenta as curvas analíticas correspondentes aos canais RGB. Observa-se que a curva analítica referente ao canal Vermelho apresentou maior inclinação, proporcionando maior sensibilidade. Os resultados deste canal foram, portanto, processados para obtenção de sinais analíticos.

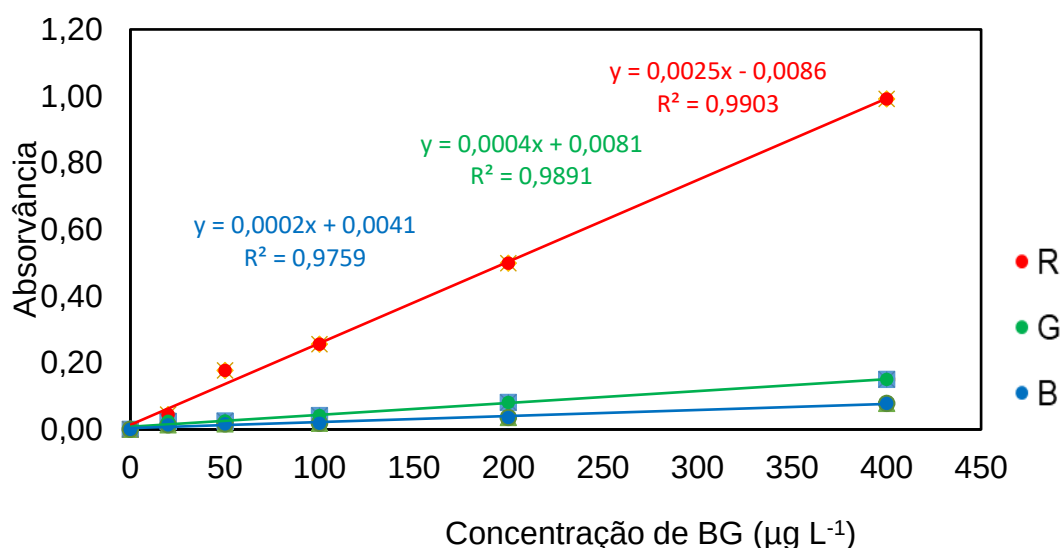


Figura 10. Curvas analíticas correspondentes aos canais RGB.

Os dados do canal vermelho apresentaram maior sensibilidade, conforme observado na Figura 12. Por isso, o canal vermelho foi utilizado para obter os sinais analíticos. A equação da curva de calibração do canal vermelho foi obtida pelo método de regressão linear e é $A = 2,5 \times 10^{-3} C - 8,6 \times 10^{-3}$, onde A é o sinal de absorção, e C é a concentração de BG, em $\mu\text{g L}^{-1}$. LoD e LoQ foram calculados utilizando-se as expressões $\text{LoD} = 3,3\delta / s$ e $\text{LoQ} = 10\delta / s$, respectivamente, onde δ é o desvio padrão de dez medidas do branco analítico e s é a inclinação da curva analítica. LoD e LoQ foram 1,4 e 4,3 $\mu\text{g L}^{-1}$. A precisão do método foi de 1,9 %, calculada em termos de desvio padrão relativo (RSD) de nove medidas de uma solução BG a 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. O fator de enriquecimento foi calculado considerando o

quociente entre os coeficientes angulares da curva analítica e o relacionado à medição direta ($A = 1,0 \times 10^{-5} C - 4,79 \times 10^{-2}$) [57]. O fator de enriquecimento em relação ao DIC foi de 250. O método também foi comparado com espectrofotometria em termos de fator de enriquecimento. Se a curva analítica em relação à medição direta do sistema em um espectrofotômetro ($A = 1,4 \times 10^{-5} C - 1,5 \times 10^{-3}$) for um valor aproximado, considera-se, o fator de enriquecimento obtido é de 179 como bom. O índice de consumo (IC) é definido como o volume da amostra consumida para alcançar uma unidade fator de enriquecimento. O IC pode ser calculado pela razão entre o volume da fase aquosa (v) e o fator de enriquecimento (EF): $IC = v / EF$. Neste método, obteve-se um IC de 0,02 mL. Um resumo dos parâmetros analíticos é apresentado na Tabela 2.

Tabela 1. Resumo dos parâmetros analíticos após o processo de pré-concentração de BG.

	Com pré-concentração DIC	$A = 2,5 \times 10^{-3} C - 8,6 \times 10^{-3}$
Equação de calibração	Medida direta DIC	$A = 1,0 \times 10^{-5} C - 4,79 \times 10^{-2}$
	Medida direta espectrofotômetro	$A = 1,4 \times 10^{-5} C - 1,5 \times 10^{-3}$
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	20 a 400	
Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,4	
Limite de quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4,3	
Precisão (RSD %)	1,9	
Fator de enriquecimento	250	
Índice de consumo (mL)	0,02	

A seletividade do método foi feita através da averiguação de íons interferentes que poderiam causar variação no sinal de absorvância, foi feita usando a concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de verde brilhante. Assim, cada íon foi adicionado a soluções de BG $200 \mu\text{g L}^{-1}$, logo, o sinal analítico resultante foi analisado em comparação ao sinal da solução que continha apenas verde brilhante. A interferência foi considerada quando o sinal analítico varia em $\pm 10\%$ em relação ao sinal do elemento. A seguir, na Tabela 1, estão expressos os resultados desse estudo.

Tabela 2. Estudo de interferência causada por íons no processo de extração de BG.

Espécies	BG:Razão de espécie
Ca(II), Co(II), Cl(-I), Fe(II), K(I), Mg(II), Na(I), SO ₄ (-II)	1:15
Ni(II), Zn(II)	1:10
Cr(III), Cd(II), Hg, Mn(II), Pb(II)	1:5
Ponceau, rodamina B, verde malaquita, violeta cristal	1:5

Esses ions foram escolhidos pois são encontrados nas matrizes estudadas, e por isso foi verificado qual o grau de interferência que poderiam causar nas análises de BG.

4.8 –Aplicação do método proposto

O método proposto foi aplicado à determinação de BG em amostras de águas, mariscos e peixes. As amostras foram fortificadas com quantidades conhecidas do padrão Backer BG 1000 mg L⁻¹, adicionando-se 100 µg L⁻¹ de BG em cada amostra e depois feito o cálculo da recuperação. Os resultados são mostrados nas Tabela 3 e 4. O teste t com base nas análises, mostrou-se que os resultados obtidos com a metodologia proposta não apresentaram diferença significativa no nível de 95%. Os resultados obtidos comprovam a exatidão do método e sua aplicabilidade às amostras analisadas.

Tabela 1. Resultados da aplicação do método nas amostras de água.

Amostra	Concentração BG ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperação
	Adicionada	Encontrada	
Água de poço	0	< LQ	95,2
	100	$95,2 \pm 2,1$	
Água de rio	0	< LQ	93,2
	100	$93,2 \pm 3,8$	
Água potável	0	< LQ	110,9
	100	$110,9 \pm 3,6$	
Piscicultura 1	0	< LQ	108,0
	100	$108,0 \pm 0,5$	
Piscicultura 2	0	< LQ	98,3
	100	$98,3 \pm 2,0$	
Piscicultura 3	0	< LQ	108,6
	100	$108,6 \pm 2,3$	
Piscicultura 4	0	< LQ	116,4
	100	$116,4 \pm 3,0$	
Piscicultura 5	0	< LQ	96,6
	100	$96,6 \pm 2,4$	

Tabela 2. Resultados da aplicação do método nas amostras de peixes e mariscos.

Amostra	Concentração BG ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperação (%)
	Adicionada	Encontrada	
Robalo	0	< LQ	111,8
	100	$111,8 \pm 2,1$	
Sururu	0	< LQ	114,7
	100	$114,7 \pm 0,2$	
Ostra	0	< LQ	103,3
	100	$103,3 \pm 4,5$	
Tainha	0	< LQ	98,2
	100	$98,2 \pm 0,3$	
Siri	0	< LQ	101,2
	100	$101,2 \pm 2,1$	
Camarão	0	< LQ	94,2
	100	$94,2 \pm 0,2$	

Os resultados observados nas tabelas 3 e 4, retratam que não foi possível quantificar o componente verde brilhante nas amostras de águas, mariscos e peixes, sendo assim, precisaria de uma técnica ainda mais sensível para o diagnóstico de VB nessas matrizes.

As recuperações mostraram-se que o método proposto pode ser aplicado com exatidão e segurança para mapear os níveis de VB nessas amostras estudadas e que a metodologia empregada para o controle de qualidade dos produtos comercializados (água potável, mariscos e peixes).

5- CONCLUSÃO e PERSPECTIVAS

O desenvolvimento do método de microextração utilizando SHS como solvente ofereceu novas possibilidades para processos ecologicamente corretos e é essencial para aplicações químicas acessíveis e seguras a partir do aspecto toxicológico. O sistema desenvolvido neste método foi aplicado com sucesso para determinar BG em amostras de águas, peixes e mariscos.

A separação das fases ocorre sem equipamentos adicionais. Além disso, a extração do BG ocorre sem a necessidade do uso de um solvente dispersor ou energia externa. O método apresenta como novidade a associação entre um sistema LPME para determinação de BG utilizando a detecção por DIC.

As vantagens obtidas, como baixo custo e eficiência, se somam à grande adequação do método proposto aos princípios da Química Verde. As características analíticas deste método o tornam bastante atrativo para uso como uma alternativa aos procedimentos convencionais que requerem equipamentos mais complexos.

A abordagem deste trabalho pode ser explorada para outros tipos de sistemas e componentes, como outros corantes, metais, ametais e farmacêuticos. Criar e automatizar um sistema de extração em linha do referido analito, acoplado ao equipamento de detecção por imagem digital.

Outra perspectiva futura é a automatização do sistema, utilizando válvulas solenóides, objetivando a diminuição da possibilidade de contaminação, de erros aleatórios.

Possibilidade de aplicar uma análise multivariada para otimizar as variáveis, já que o comportamento do sistema agora é conhecido.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramos, L., J.J. Ramos, and U.A.T. Brinkman, *Miniaturization in sample treatment for environmental analysis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005. **381**(1): p. 119-140.
2. Lopez-Lorente, A.I., et al., *The ten principles of green sample preparation*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2022. **148**.
3. Armenta, S., S. Garrigues, and M. De la Guardia, *Green analytical chemistry*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2008. **27**(6): p. 497-511.
4. Lenardão, E.J., et al., " *Green chemistry*": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. Química Nova, 2003. **26**(1): p. 123-129.
5. Anastas, P.T., *Green chemistry and the role of analytical methodology development*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 1999. **29**(3): p. 167-175.
6. Galuszka, A., Z. Migaszewski, and J. Namiesnik, *The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2013. **50**: p. 78-84.
7. Nilsson, S. and T. Laurell, *Miniaturization in analytical and bioanalytical chemistry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004. **378**(7): p. 1676-1677.
8. Kutter, J.P., *Special issue - Miniaturization in analytical chemistry - Preface*. Talanta, 2002. **56**(2): p. 221-221.
9. Santos, L.B., et al., *Deep eutectic solvents in liquid-phase microextraction: contribution to green chemistry*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2021: p. 116478.
10. Spietelun, A., et al., *Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques*. Talanta, 2014. **119**: p. 34-45.

11. Kaur, V., A.K. Malik, and N. Verma, *Applications of solid phase microextraction for the determination of metallic and organometallic species*. Journal of Separation Science, 2006. **29**(3): p. 333-345.
12. Arthur, C.L. and J. Pawliszyn, *SOLID-PHASE MICROEXTRACTION WITH THERMAL-DESORPTION USING FUSED-SILICA OPTICAL FIBERS*. Analytical Chemistry, 1990. **62**(19): p. 2145-2148.
13. Lemos, V.A., et al., *Liquid phase microextraction associated with flow injection systems for the spectrometric determination of trace elements*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019. **110**: p. 357-366.
14. Santos, A.P. and V.A. Lemos, *Determination of Vanadium Levels in Seafood Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Optical Sensors*. Water Air and Soil Pollution, 2015. **226**(3).
15. Prosen, H., *Applications of Liquid-Phase Microextraction in the Sample Preparation of Environmental Solid Samples*. Molecules, 2014. **19**(5): p. 6776-6808.
16. Santos, L.B., et al., *Switchable-hydrophilicity solvent-based liquid-phase microextraction in an on-line system: Cobalt determination in food and water samples*. Talanta, 2022. **238**.
17. Yilmaz, E. and M. Soylak, *Switchable polarity solvent for liquid phase microextraction of Cd(II) as pyrrolidinedithiocarbamate chelates from environmental samples*. Analytica Chimica Acta, 2015. **886**: p. 75-82.
18. Moghadam, A.G., et al., *Development of effervescence-assisted liquid phase microextraction based on fatty acid for determination of silver and cobalt ions using micro-sampling flame atomic absorption spectrometry*. Journal of Molecular Liquids, 2017. **242**: p. 1176-1183.
19. Jessop, P.G., et al., *Reversible nonpolar-to-polar solvent*. Nature, 2005. **436**(7054): p. 1102-1102.

20. Lasarte-Aragonés, G., et al., *Use of switchable solvents in the microextraction context*. Talanta, 2015. **131**: p. 645-649.
21. Vakh, C., et al., *A fully automated effervescence-assisted switchable solvent-based liquid phase microextraction procedure: liquid chromatographic determination of ofloxacin in human urine samples*. Analytica chimica acta, 2016. **907**: p. 54-59.
22. Shishov, A., et al., *An effervescence tablet-assisted switchable solvent-based microextraction: On-site preconcentration of steroid hormones in water samples followed by HPLC-UV determination*. Journal of Molecular Liquids, 2017. **247**: p. 246-253.
23. Hu, L., et al., *Centrifuge-less dispersive liquid-liquid microextraction base on the solidification of switchable solvent for rapid on-site extraction of four pyrethroid insecticides in water samples*. Journal of Chromatography A, 2016. **1472**: p. 1-9.
24. Yilmaz, E. and M. Soylak, *Switchable polarity solvent for liquid phase microextraction of Cd (II) as pyrrolidinedithiocarbamate chelates from environmental samples*. Analytica chimica acta, 2015. **886**: p. 75-82.
25. Ezoddin, M., K. Abdi, and N. Lamei, *Development of air assisted liquid phase microextraction based on switchable-hydrophilicity solvent for the determination of palladium in environmental samples*. Talanta, 2016. **153**: p. 247-252.
26. Pochivalov, A., et al., *An automated in-syringe switchable hydrophilicity solvent-based microextraction*. Talanta, 2020. **209**: p. 120587.
27. Zhang, A.L. and Y. Zha, *Single-drop liquid phase microextraction accelerated by surface acoustic wave*. Journal of Separation Science, 2013. **36**(6): p. 1085-1089.

28. Kokosa, J.M., *Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2015. **71**: p. 194-204.
29. Jeannot, M.A. and F.F. Cantwell, *Solvent microextraction into a single drop*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(13): p. 2236-2240.
30. de la Calle, I., et al., *Liquid-phase microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry: A review*. Analytica Chimica Acta, 2016. **936**: p. 12-39.
31. Liang, P., R. Liu, and J. Cao, *Single drop microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry for determination of lead in biological samples*. Microchimica Acta, 2008. **160**(1-2): p. 135-139.
32. Nunes, L.S., M.G.A. Korn, and V.A. Lemos, *A novel direct-immersion single-drop microextraction combined with digital colorimetry applied to the determination of vanadium in water*. Talanta, 2021. **224**: p. 121893.
33. Xu, L., C. Basheer, and H.K. Lee, *Developments in single-drop microextraction*. Journal of Chromatography A, 2007. **1152**(1-2): p. 184-192.
34. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(14): p. 2650-2656.
35. Hyotylainen, T. and M.L. Riekkola, *Sorbent- and liquid-phase microextraction techniques and membrane-assisted extraction in combination with gas chromatographic analysis: A review*. Analytica Chimica Acta, 2008. **614**(1): p. 27-37.
36. Bedendo, G.C. and E. Carasek, *Simultaneous liquid-liquid microextraction and polypropylene microporous membrane solid-phase extraction of organochlorine pesticides in water, tomato and strawberry samples*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(1): p. 7-13.

37. Rezaee, M., et al., *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction*. Journal of Chromatography A, 2006. **1116**(1-2): p. 1-9.
38. Soylak, M. and M. Karaca, *Vortex-assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Pb (II) as 2-hydroxypyridine-3-carboxylic Acid Chelates From Food and Water Samples Prior to Flame Atomic Absorption Spectrometric Determination*. Atomic Spectroscopy, 2016. **37**(3): p. 108-113.
39. Barreto, J.A., et al., *A novel strategy based on in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of nickel in chocolate samples*. Talanta, 2019. **193**: p. 23-28.
40. Lemos, V.A., et al., *A New Simple and Fast Method for Determination of Cobalt in Vitamin B12 and Water Samples Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Digital Image Analysis*. Water Air and Soil Pollution, 2020. **231**(7): p. 8.
41. Menezes, R.M., et al., *A Miniaturized Gas-Liquid Separator for Use in Liquid-Phase Microextraction Procedures: Determination of Mercury in Food*. Water Air and Soil Pollution, 2020. **231**(9).
42. Hosseini, S.S.S., S. Khezri, and A. Khosravi, *Experimental design for the optimization of coacervative extraction of brilliant green in water samples using anionic surfactant*. Applied Water Science, 2018. **8**(4).
43. Mane, V.S., I.D. Mall, and V.C. Srivastava, *Use of bagasse fly ash as an adsorbent for the removal of brilliant green dye from aqueous solution*. Dyes and Pigments, 2007. **73**(3): p. 269-278.
44. Mariah, G.K. and K.S. Pak, *Removal of brilliant green dye from aqueous solution by electrocoagulation using response surface methodology*. Materials Today-Proceedings, 2020. **20**: p. 488-492.
45. Sadeghi, S. and Z. Nasehi, *Simultaneous determination of Brilliant Green and Crystal Violet dyes in fish and water samples with dispersive liquid-liquid*

- micro-extraction using ionic liquid followed by zero crossing first derivative spectrophotometric analysis method*. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018. **201**: p. 134-142.
46. Reilley, C.N., et al., *CHARACTERIZATION OF THE COLOR QUALITY OF INDICATOR TRANSITION - COMPLEMENTARY TRISTIMULUS COLORIMETRY*. *Analytical Chemistry*, 1960. **32**(10): p. 1218-1232.
47. Capitan-Vallvey, L.F., et al., *Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review*. *Analytica Chimica Acta*, 2015. **899**: p. 23-56.
48. Soares, S., M.J.A. Lima, and F.R.P. Rocha, *A spot test for iodine value determination in biodiesel based on digital images exploiting a smartphone*. *Microchemical Journal*, 2017. **133**: p. 195-199.
49. Salcedo, A.R.M. and F.B. Sevilla, *Colorimetric determination of mercury vapor using smartphone camera-based imaging*. *Instrumentation Science & Technology*, 2018. **46**(4): p. 450-462.
50. Firdaus, M.L., et al., *Determination of Chromium and Iron Using Digital Image-based Colorimetry*. 4th International Conference on Sustainable Future for Human Security Sustain 2013, 2014. **20**: p. 298-304.
51. Leon, K., et al., *Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images*. *Food Research International*, 2006. **39**(10): p. 1084-1091.
52. Santos, L.B. and V.A. Lemos, *Vortex-Assisted Ionic Liquid-Based Liquid-Phase Microextraction: A Simple, Low-Cost, and Environmentally Friendly Method for Speciation of Antimony in Water*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2022. **33**(8): p. 1008-1015.
53. Monisha, et al., *Inkjet-printed paper-based colorimetric sensor coupled with smartphone for determination of mercury (Hg²⁺)*. *Journal of Hazardous Materials*, 2021. **414**.

54. Khezeli, T., A. Daneshfar, and R. Sahraei, *Emulsification liquid–liquid microextraction based on deep eutectic solvent: an extraction method for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and seven polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples*. Journal of Chromatography A, 2015. **1425**: p. 25-33.
55. 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, 2020. **310**: p. 125825.
56. Farajzadeh, M.A., M.R.A. Mogaddam, and M. Aghanassab, *Deep eutectic solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction*. Analytical methods, 2016. **8**(12): p. 2576-2583.
57. Fang, Z., L. Dong, and S. Xu, *Critical evaluation of the efficiency and synergistic effects of flow injection techniques for sensitivity enhancement in flame atomic absorption spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1992. **7**(2): p. 293-299.