

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

VALÉRIA OLIVEIRA GONÇALVES

**Um novo método para a determinação de rodamina B em
batom e água usando solvente eutético em microextração em
fase líquida assistida por ultrassom**

JEQUIÉ – BA

DEZEMBRO / 2022

VALÉRIA OLIVEIRA GONÇALVES

**Um novo método para a determinação de rodamina B em
batom e água usando solvente eutético em microextração em
fase líquida assistida por ultrassom**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre(a) em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos
Coorientador: Dr. Jeferson Alves Barreto

**JEQUIÉ – BA
DEZEMBRO / 2022**

G635n Gonçalves, Valéria Oliveira.

Um novo método para a determinação de rodamina B em batom e água usando solvente eutético em microextração em fase líquida assistida por ultrassom / Valéria Oliveira Gonçalves.- Jequié, 2022.

39f.

(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 e coorientação do Prof. Dr. Jeferson Alves Barreto)

1.Rodamina B 2.Solvente eutético 3.Microextração 4.Batom 5.Água
6.Colorimetria por imagem digital I.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

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

Dissertação de Mestrado - Valéria Oliveira Gonçalves

TERMO DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Jeferson Alves Barreto
Coorientador (UESB - Jequié - BA)



Prof^ª. Dr^ª. Leane Santos
Nunes

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor incondicional a minha vida, sendo meu sustento em todos os momentos de dificuldades e por mais essa vitória.

Ao Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos, que dedicou seu tempo e amizade compartilhando suas orientações e experiências.

A todos os mestres que muito contribuíram para a minha formação.

A Jeferson por todos os ensinamentos, apoio, orientação e cuidado comigo nesta jornada. Muito obrigada.

À minha família, em especial a minha mãe Glória, meu pai João, pelos ensinamentos, apoio e incentivo.

Aos meus amigos, que são pessoas maravilhosas e que trouxeram leveza para a minha caminhada nesta etapa.

À equipe do Laboratório de Química Analítica da UESB, em especial a Luana, Joselânio, Rosivan, Anderson, Uneliton, Victor e Márcio, pelo acolhimento.

À minha supervisora Lorena e aos colegas de trabalho da CLAB UNIFTC, pelo apoio e por toda compreensão durante todo este período.

Aos colegas do mestrado, pelo companheirismo que foram fundamentais para tornar os desafios mais leves.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UESB, pela oportunidade e aperfeiçoamento.

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

Sejamos sempre movidos por AMOR.
Bíblia Sagrada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da Rodamina B.....	13
Figura 2. Etapas do procedimento determinação de RB por UA-LPME e imagem digital.	19
Figura 3. Estudo do tipo de solvente extrator na determinação de RB por UA-LPME e imagem digital.	22
Figura 4. Estudo da proporção do DES ChCl:fenol na determinação de RB por UA-LPME e imagem digital.	23
Figura 5. Estudo do volume do DES ChCl:fenol na determinação de RB por UA-LPME e imagem digital.	24
Figura 6. Estudo do volume do agente emulsificante THF na determinação de RB por UA-LPME e imagem digital.	25
Figura 7. Estudo do volume de amostra na determinação de RB por UA-LPME e imagem digital.	26
Figura 8. Estudo do pH do meio de extração na determinação de RB por UA-LPME e imagem digital.	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores obtidos após otimização das variáveis estudadas no método proposto	27
Tabela 2. Avaliação dos possíveis interferentes tolerados na determinação de RB empregando o método proposto.	28
Tabela 3. Parâmetros de mérito do método proposto.....	29
Tabela 4. Resultados da determinação de RB em amostras de batons	30
Tabela 5. Resultados da determinação de RB em amostras de águas	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ChCl - Cloreto de colina

DES - Solvente eutético

DIC- Colorimetria por imagem digital (do inglês: *Digital image colorimetry*)

DI-SDME - Microextração em gota suspensa por imersão direta (do inglês: *Direct immersion suspended drop microextraction*)

DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês: *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*).

DLPME - Microextração em fase líquida dispersiva (do inglês: *Microextraction in dispersive liquid phase*)

HBA - Receptor de ligação de hidrogênio

HBD - Doador de ligação de hidrogênio

HF-LPME - Microextração em fase líquida suportada em fibra oca (do inglês: *Microextraction in dispersive liquid phase supported on hollow fiber*)

HS-SDME - Microextração em gota suspensa por headspace (do inglês: *Headspace suspended drop microextraction*)

LD - Limite de detecção

LLE - Extração líquido-líquido (do inglês: *Liquid-liquid extraction*)

LPME - Microextração em fase líquida (do inglês: *Liquid phase microextraction*)

LQ - Limite de quantificação

RB - Rodamina B

RGB- Vermelho, verde, azul

SDME - Microextração com gota suspensa (do inglês: *Microextraction whit suspended drop*)

SFODME- Microextração com gota orgânica solidificada (do inglês: *Microextraction Whit solidified organic drop*)

SPE - Extração em fase sólida (do inglês: *Solid phase extraction*)

SPME - Microextração em fase sólida (do inglês: *Solid phase microextraction*)

THF - Tetrahidrofurano

UA-LPME - Microextração em fase líquida assistida por ultrassom (do inglês: *Ultrasound-assisted liquid-phase microextraction*)

USAEME- Microextração com emulsificação assistida por ultrassom (do inglês: *Microextraction ultrasound-assisted emulsification*)

Um novo método para a determinação de rodamina B em batom e água usando solvente eutético em microextração em fase líquida assistida por ultrassom

Autor: Valéria Oliveira Gonçalves

Orientador: Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos

RESUMO: Neste trabalho, um método envolvendo uma nova abordagem de microextração em fase líquida assistida por ultrassom (UA-LPME) com solvente eutético (DES) foi desenvolvido. O procedimento foi aplicado na determinação de rodamina B (RB) em amostras de batom e águas naturais por colorimetria por imagem digital. As variáveis que influenciam na extração de RB nas amostras foram estudadas, tais como: tipo e composição do DES (fenol: cloreto de colina, 1:2), pH (5,75), volume do solvente dispersor (600 μL) e volume da amostra (7,5 mL). Sob condições otimizadas, o método apresentou limites de detecção e quantificação de 3,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 11,3 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, e fator de enriquecimento foi de 75. O procedimento foi aplicado à análise de amostras reais de diferentes marcas de batons e águas coletadas em diferentes regiões da cidade de Jequié-BA. O método de UA-LPME com DES e colorimetria por imagem digital apresenta-se como uma alternativa eficiente, simples, rápida e de baixo custo, para a determinação de RB a quantidades-traço.

Palavras-chave: rodamina B, solvente eutético, microextração, batom, água, colorimetria por imagem digital.

**A novel method for the determination of rhodamine B in lipstick and water
using deep eutectic solvent in ultrasound-assisted liquid-phase
microextraction**

Author: Valéria Oliveira Gonçalves

Advisor: Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos

Co-Advisor: Prof. Dr. Jeferson Alves Barreto

ABSTRACT: A new approach to deep eutectic solvent (DES) ultrasound-assisted liquid-phase microextraction (UA-LPME) was developed in this work. The procedure was applied to determine rhodamine B (RB) in lipstick and natural water samples by digital imaging colorimetry. The variables that influence the extraction of RB in the samples were studied, such as the composition of the DES (phenol: choline chloride, 1:2), pH (5.75), dispersive solvent volume (600 μL) and sample volume (7.5 mL). Under optimized conditions, the method presented limits of detection and quantification of 3.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 11.3 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively, and an enrichment factor of 75. The procedure was applied to analyze samples of different brands of lipsticks and water collected in the city of Jequié-BA. UA-LPME with DES and digital image colorimetry are efficient, simple, fast, and low-cost alternatives for determining RB at trace levels.

Keywords: rhodamine B, deep eutectic solvent, microextraction, lipstick, water, digital imaging colorimetry.

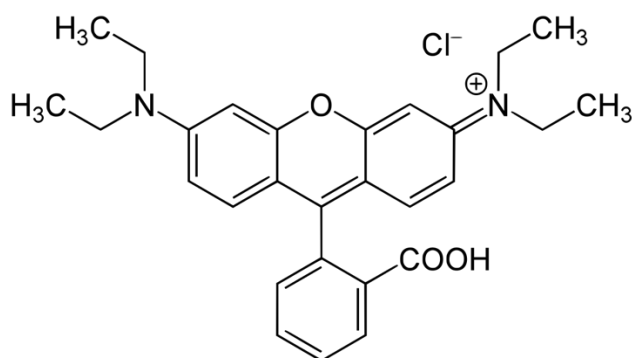
SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	13
2.0 Objetivo Geral	17
2.1 Objetivos Específicos	17
3.0 PARTE EXPERIMENTAL.....	17
3.1 Equipamentos	17
2.2 Reagentes e soluções.....	18
2.3 Síntese e solventes eutéticos	18
2.4 Procedimento de microextração e detecção	19
2.5 Preparo de amostras.....	20
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
3.1 Canais RGB	20
3.2 Tipo de solvente extrator.....	21
3.3 Proporção molar do DES	22
3.4 Quantidade da fase receptora.....	23
3.5 Quantidade do agente emulsificante	24
3.6 Quantidade da fase doadora.....	25
3.7 pH do meio de extração	26
3.9. Seletividade.....	27
4.0 CONCLUSÃO.....	31
5.0 REFERÊNCIAS.....	31

1.0 INTRODUÇÃO

Rodamina B (RB), nome comercial do cloreto de N-[9-(2-carboxifenil)-6-(dietilamino)-3H-xanten-3-ilideno]-N-ethylethanaminium é uma substância pertencente à família dos compostos orgânicos xantenos, que estão entre os mais comumente usados entre todos os corantes sintéticos [1-3]. Trata-se de um composto fluorescente e solúvel em água. Inicialmente, a RB foi utilizada nas indústrias têxtil e alimentícia, mas o seu uso foi ampliado para outras aplicações, tais como: rastreamento de água, tingimento de produtos petrolíferos, impressão de papel, tecnologia forense e fabricação de produtos cosméticos [1]. Os corantes da classe rodaminas são prejudiciais se ingeridos por humanos ou animais e podem causar danos se inalados ou em contato com a pele e os olhos. Como os produtos cosméticos são aplicados na pele, o contato direto com RB pode causar irritação das mucosas e da pele [4, 5]. Além disso, RB tem efeitos carcinogênico e crônico, ainda apresenta neurotoxicidades para células vivas [4-7]. RB foi anunciado como cancerígeno pela agência FDA (*Food and Drug Administration*), que encerrou o uso do corante para fins farmacêuticos e cosméticos [8]. Assim, seu uso como corante em alimentos, medicamentos e produtos cosméticos é proibido [8, 9]. No entanto, devido ao seu baixo preço, boa solubilidade em água e cores brilhantes, continua a ser usado como corante. Dessa forma, a determinação precisa e sensível de RB em amostras ambientais é uma tarefa importante e desafiadora para os cientistas [9, 10]. A fórmula estrutural da Rodamina B é apresentada na Figura 1.

Figura 1: Fórmula estrutural da Rodamina B



Diversas técnicas analíticas, como cromatografia líquida de alto desempenho [1, 11-14], espectrofotometria [9, 15, 16], fluorescência molecular

[10], e cromatografia de camada delgada [17, 18] têm sido usadas para a determinação de RB. Existem diversas técnicas que oferecem vantagens importantes, com operação simples, baixo custo de análise e alta precisão. Entretanto, devido aos baixíssimos níveis de RB no meio ambiente e à complexidade de diferentes matrizes, o uso direto de alguns destes métodos é limitado por sua sensibilidade e seletividade [1]. Assim, o pré-tratamento da amostra é uma etapa valiosa nos métodos analíticos precedendo as análises.

O preparo de amostra é uma das fases críticas encontrada no processo analítico e tem sido uma das principais dificuldades para a obtenção de resultados congruentes em termos de precisão e exatidão. Nos últimos tempos, o uso das técnicas clássicas de preparo de amostras como, por exemplo, a extração em fase sólida (SPE) e a extração líquido-líquido (LLE) tem decaído, devido às diversas desvantagens apresentadas, como alto custo, alto consumo de reagentes e solventes orgânicos, riscos ao operador e geração de resíduos. Estas desvantagens têm sido suprimidas devido ao apreciável esforço feito pelos cientistas, para encontrar métodos alternativos, econômicos, miniaturizados e eco-sustentáveis, ou seja, sistemas e métodos que requerem o uso de microquantidades, atendendo assim, aos requisitos da química verde [19-22]. Nesse caso, as técnicas de microextração podem ser bastante eficazes. A microextração em fase sólida (SPME) e a microextração em fase líquida (LPME) foram, então, originadas, com base nas vantagens da redução do volume de solventes e amostras. A miniaturização da extração em fase líquida convencional deu origem a diferentes abordagens de microextração, que podem ser divididas em três categorias principais: microextração com gota suspensa (SDME) [23, 24], microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) [25-33] e microextração líquido-líquido com fibra oca (HF-LPME) [34-36].

Recentemente, surgiram novas modalidades baseadas nos princípios dessas três categorias, tais como microextração com gota orgânica solidificada (SFODME) [37], microextração com gota única e headspace (HS-SDME) [38, 39], microextração com emulsificação assistida por ultrassom (USAEME) [40] e microextração em fase líquida com líquido iônico e controle de temperatura (TC-IL-LPME) [41]. A microextração em gota suspensa (SDME) é uma técnica baseada na extração do analito através da formação de uma microgota imiscível

em água. Nesta técnica, os analitos de elevado coeficiente de partição podem atingir altas concentrações, uma vez que são transferidos por difusão de um expressivo volume de amostra para um pequeno microextrato [23, 24]. Microextração com gota suspensa é um processo de baixo custo, simples e de baixo impacto ambiental. Existem várias abordagens de SDME, entre as quais imersão direta (DI-SDME), headspace (HS-SDME) e gota solidificada (SFODME) [23, 24, 42].

A microextração em fase líquida assistida por ultrassom (UA-LPME) é uma abordagem baseada na DLLME, que utiliza ondas ultrassônicas para facilitar a emulsificação entre duas fases imiscíveis [40, 43, 44]. O ultrassom acelera a transferência de massa a partir da solução aquosa para a fase aceptora, melhorando a eficiência da extração. Uma das vantagens da UA-LPME é a eliminação do uso de solvente dispersor como na DLLME convencional, o que evita perdas do analito por dissolução suprido pelo ultrassom cujo o principal efeito é a fragmentação de uma das fases para formar uma emulsão, o que aumenta a superfície de contato entre os dois líquidos. Combinando o benefício da microextração e do ultrassom, tornou-se possível estabelecer uma técnica de pré-concentração eficiente para determinar analitos a quantidades-traço [45-47].

Uma nova classe de solventes verdes, denominados solventes eutéticos (DES) têm sido bastante usados em diversas aplicações, nos últimos anos [48]. DES consistem em misturas que apresentam ponto de fusão muito baixo a mistura é obtida utilizando-se dois ou mais componentes para interagir através de ligações de hidrogênio [49, 50]. Um DES é geralmente composto de uma mistura de um receptor de ligação de hidrogênio (HBA), como um sal quaternário, como um doador de ligação de hidrogênio (HBD), a diferentes proporções. DES apresentam preparo simples, baixo custo, e a sua produção geralmente requer matérias-primas facilmente acessíveis e obtidas a partir de fontes renováveis. Além destas vantagens, apresentam baixa volatilidade, viscosidade ajustável, e alto poder de solubilização de compostos polares e apolares [51]. Muitos estudos envolvendo LPME usam DES como fase receptora. Na maioria desses estudos, várias combinações de HBA com HBD são testadas, pois muitas interações podem ocorrer entre o DES e o componente extraído [52-54].

Atualmente, existe um esforço para inserir novos tipos de procedimentos analíticos e ensaios portáteis para fornecer equipamentos simples e confiáveis para as análises de campo e laboratorial [55-59]. O desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico é outro desafio da química analítica. As câmeras digitais são amplamente disponíveis e de baixo custo, podendo, portanto, serem usadas como sensores para a construção de métodos analíticos e de diagnóstico. Em geral, câmeras integradas em smartphones podem ser facilmente convertidas em ferramentas analíticas [60-62].

O advento de melhores tecnologias, como computadores pessoais de bolso, tablets e celulares inteligentes tornou possível o uso destes dispositivos como ferramentas analíticas, substituindo os espectrofotômetros, fotômetros de chama e outros equipamentos de detecção, em diversas áreas [61, 63]. Evidentemente, este uso apresenta desvantagens óbvias, pois os dispositivos não são projetados para fins analíticos. Assim, o seu uso inclui algumas dificuldades técnicas, como luz policromática, radiação não colimada, presença de reflexos e menor precisão. No entanto, a colorimetria de imagem digital vem ganhando destaque em diversas aplicações, como análises clínicas, alimentícias e farmacêuticas, pois torna alguns processos extremamente viáveis para execução em laboratório e campo, devido ao seu baixo custo, rapidez e facilidade de automatização [62, 64-66].

O modelo RGB é o mais utilizado em imagem digital, dentre os modelos CMY (C: ciano, M: magenta, Y: amarelo), CMYK e HSV [56, 62, 66]. O padrão RGB é formada por três planos de cor; sendo R para vermelho (red), G para verde (green) e B para azul (blue). O cubo RGB com três coordenadas permite gerar uma matriz ($m \times n \times 3$) de 24 bits, sendo 8 bits para cada elemento. A mistura das cores aditivas RGB geram as subtrativas CMY, podendo assumir CMYK, pois a junção de todas as cores subtrativas gera a cor preta, onde k representa o tom preto. O modelo de cor HSV representa a matiz (H), que está relacionada ao comprimento de onda dominante da radiação espectral de uma cor; saturação (S), que representa a pureza da cor; e valor (V), relacionado à luz presente na cor. Cada cor é composta de uma célula chamada pixel que vai de 0 a 255, ou 0 a 1 normalizado variando em 256 níveis de tonalidades, gerando 16,7 milhões de cores [56].

Neste trabalho, um método empregando microextração em fase líquida com solvente eutético foi empregado para a determinação de RB com detecção por colorimetria digital. As variáveis que afetam a microextração foram otimizadas. O método foi aplicado à determinação de RB em amostras de amostras de águas e batom.

2.0 Objetivo Geral

Desenvolver um método utilizando UA-LPME com o uso de solvente eutético para pré-concentração de rodamina B em amostras de batons e águas com determinação por Colorimetria por Imagem Digital

2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Otimizar e validar o sistema de microextração em fase líquida assistida por ultrassom com o uso de solvente eutético ;
- ✓ Comparar a eficiência de extração e pré-concentração dos métodos de pré-concentração desenvolvidos;
- ✓ Aplicar o método proposto em amostras de águas e batons para determinar o teor de rodamina B.

3.0 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos

A dispersão do solvente em fase aquosa foi realizada em um banho ultrassônico Unique (Idaiatuba, Brasil) banho, modelo USC 1450, com frequência de 25 kHz e 135w de potência. Uma centrífuga SP 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 agitador vortex Lab Dancer (IKA, Campinas, Brasil) foi utilizado para auxiliar a mistura das fases.

As imagens digitais foram obtidas empregando-se um microscópio portátil multifuncional (Supereyes modelo B007, Shenzhen, China). Um sistema para captura de imagens digitais foi desenvolvido, construindo-se uma caixa com

dimensões (17×9×14 cm) de medium-density fiberboard (MDF) de cor branca para inibir os efeitos de interferência da luz e reflexão. A iluminação do sistema (caixa), é composta por seis LEDs (light-emitting diode) (5W) na cor branca, que foram fixadas na parte superior da caixa, para uniformizar a iluminação no interior do sistema e assegurar a reprodutibilidade da imagem durante os experimentos.

2.2 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados são de grau analítico, e as soluções preparadas com água ultrapura processada por um sistema Elga modelo Purelab Classic (High Wycombe, Reino Unido). Soluções de trabalho de RB foram preparadas por dissolução do reagente analítico (Sigma, Aldrich, São Paulo, Brasil). Fenol (Sigma, Aldrich), xilitol (Sigma, Aldrich) e cloreto de colina (ChCl, Sigma, Aldrich) foram empregados no preparo do solvente eutético. Tetrahidrofurano (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foi utilizado como solvente dispersor. Uma solução de KCl/HCl (pH 2,0) 0,1 molL⁻¹ e soluções-tampão de acetato (pH 4,0 a 5,0) 1,0 molL⁻¹; fosfato (pH 5,75 a 6,0) 0,1 molL⁻¹; borato pH (7,0) e (pH 8,0) 0,1 molL⁻¹ e amoniacal (pH 9,25) e (10,0) 0,1 mol L⁻¹ foram preparados para ajustar o pH do meio de extração. A vidraria usada nos ensaios experimentais, foi antecipadamente descontaminada com solução de ácido nítrico (Vetec) a 10% mv⁻¹ por 24 h e enxaguada com água desionizada.

2.3 Síntese e solventes eutéticos

Os solventes eutéticos profundos (DES) foram preparados utilizando algumas combinações de reagentes, timol - mentol e cloreto de colina (ChCl) - fenol. A seguir segue a descrição dos preparos. O solvente eutético xilitol – cloreto de colina foi testado em várias proporções, no entanto, não foi possível a sua utilização no processo de extração, pois a combinação solubilizava na fase aquosa, em pequenas quantidades de xilitol e, cristalizava em grandes quantidades.

- Cloreto de Colina-Fenol

Foram preparados 04 combinações do cloreto de colina (ChCl) - fenol nas seguintes proporções: 1:1, (1,3963 g) e (0,9411 g) em razões molares; 1:2, (1,3963 g) e (1,8822 g); 1:3, (1,3963 g) e (2,8233 g); 1:4, (1,3963 g) e (3,7644 g).

g). A mistura foi agitada no vortéx (por aproximadamente 1 min), seguida de sonicação (por aproximadamente 20 s) a temperatura ambiente.

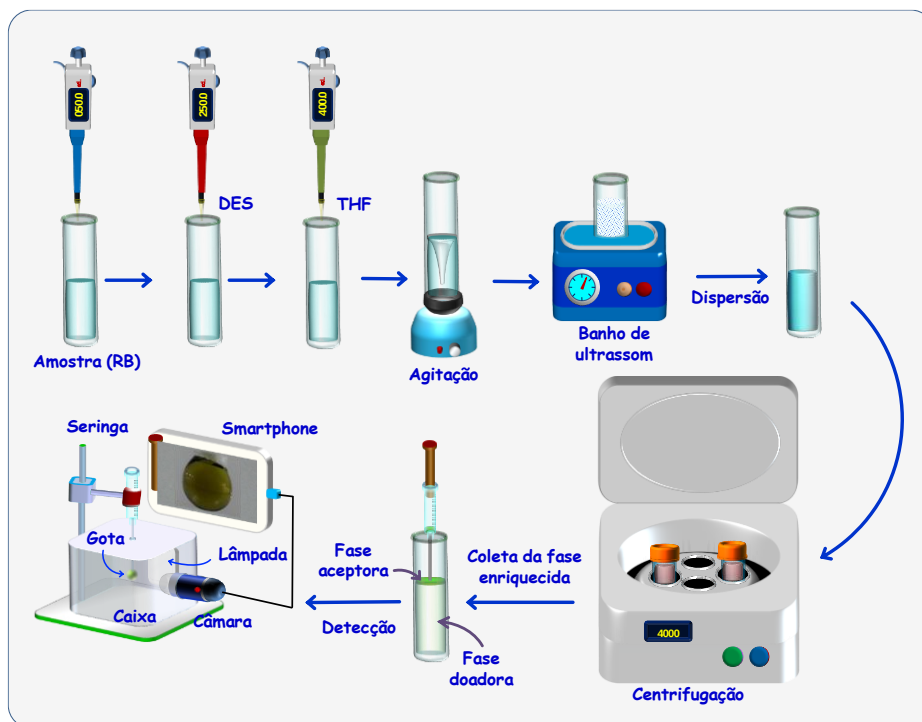
- Timol – mentol

O solvente eutético timol – mentol foi preparado em uma proporção de 1:1. Misturou-se (0,1502 g) de timol e (0,1562 g) de mentol sob temperatura de 50 °C até a dissolução durante 10 minutos.

2.4 Procedimento de microextração e detecção

Em um tubo de ensaio, foram adicionados 7,50 mL da solução-amostra contendo RB ($200 \mu\text{g L}^{-1}$), cujo pH da solução foi previamente ajustado utilizando 3mL da solução-tampão fosfato pH 5,75. Em seguida, acrescentou-se nesta ordem o solvente eutético (200 μL) e o solvente dispersor THF(600 μL). O sistema foi submetido a um banho de ultrassom por 3,0 min, a fim de fragmentar a fase receptora em gotículas, aumentando a superfície de contato entre os dois líquidos. Nesta etapa, a mistura ficou turva, e gotas de DES foram formadas, devido à cavitação transiente próximo à sua interface. Em seguida, foi promovida a centrifugação do sistema durante 6,0 min a 3500 rpm, quando ocorreu a sedimentação da fase enriquecida. Então, com o suporte de uma seringa cromatográfica de 50 μL , à qual foi adaptado um tubo capilar de PTFE na ponta, foi coletada uma alíquota da fase enriquecida. A detecção de RB na fase enriquecida foi realizada através da inserção da ponta da seringa no sistema para captura de imagens descrito na seção 2.1. Após a inserção, uma gota da alíquota foi formada na ponta da seringa, e a imagem correspondente foi capturada. Os dados foram registrados como sinais de pixel do modelo RGB e processado usando o software Chemostat. Uma representação esquemática das etapas do procedimento pode ser observada na Figura 2.

Figura 2: Etapas do procedimento determinação de RB por UA-LPME e imagem digital.



2.5 Preparo de amostras

As amostras de água foram coletadas no Rio de Contas, em diferentes pontos, na cidade de Jequié, Bahia, Brasil. Quatro amostras de diferentes marcas de batons foram adquiridas em lojas de cosméticos. As amostras de água coletadas foram usadas após filtração através de filtro de membrana de celulose de 0,45 µm. Com base na literatura As amostras de batom (0,050 g) foram pesadas e 50 mL de água ultrapura foram adicionadas, em um tubo de ensaio. A mistura resultante foi sonicada durante 15 min e, então, agitada por vórtex durante 15,0 min. Posteriormente, a solução foi filtrada, o procedimento descrito na seção anterior foi aplicado.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Canais RGB

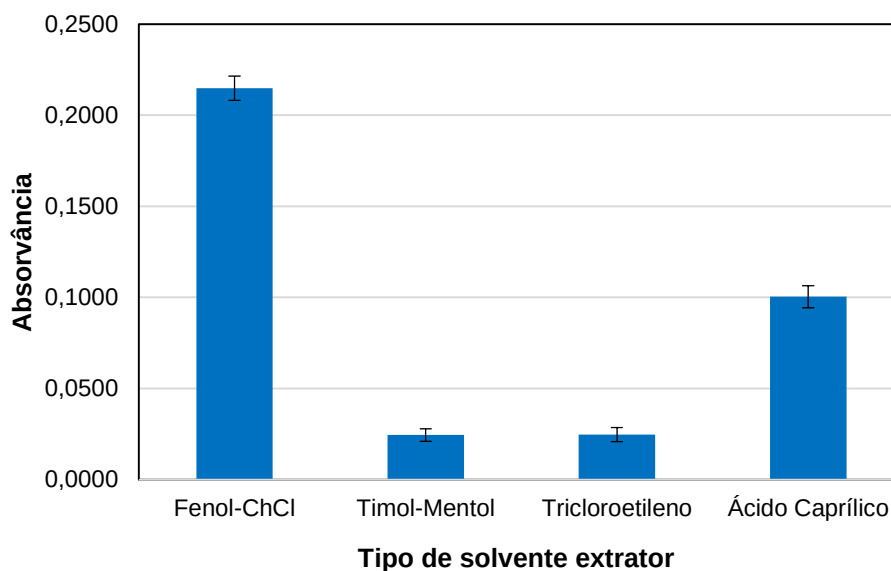
O sinal analítico, em absorvância (A), para cada canal do modelo RGB foi calculado usando a equação $A = -\log(P/P_0)$, onde P representa o sinal, em pixels, da solução contendo RB, e P_0 representa o sinal, em pixels, do branco. Um estudo foi realizado para identificar os mais adequados canais para as medições.

O procedimento de microextração foi aplicado a soluções de RB de $200,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Os sinais correspondentes a cada canal foram medidos em quadruplicata. O canal verde resultou em maiores sinais analíticos. Deste modo, o canal verde foi usado em todos os experimentos subsequentes. Soluções de RB de $200,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foram utilizadas nos experimentos de otimização.

3.2 Tipo de solvente extrator

Existe um grande interesse nos estudos para o desenvolvimento de novos solventes verdes, objetivando, principalmente, a substituição de solventes apontados como voláteis e de elevada toxicidade e inflamabilidade. Neste contexto, o preparo e aplicação de DES é bastante pertinente, pois muitos destes solventes enquadram-se fortemente aos princípios da Química Verde [19, 27]. Considerando estes aspectos, dois DES foram preparados, e a sua aplicação em um sistema de pré-concentração com UA-LPME foi comparada com os solventes tricloroetileno e ácido caprílico. O tricloroetileno foi escolhido para comparação devido à sua importância como solvente tradicional muito usado em procedimentos de microextração em fase líquida (LPME) e à sua toxicidade. Por sua vez, o ácido caprílico merece destaque devido ao seu recente uso como substituto de solventes tradicionais em LPME, e por ser considerado um solvente verde. Os solventes eutéticos testados foram fenol-ChCl (1:4) e timol-mentol (1:1). A **Figura 3** mostra os resultados obtidos a partir deste estudo.

Figura 3: Estudo do tipo de solvente extrator na determinação de RB por UA-LPME e imagem digital.



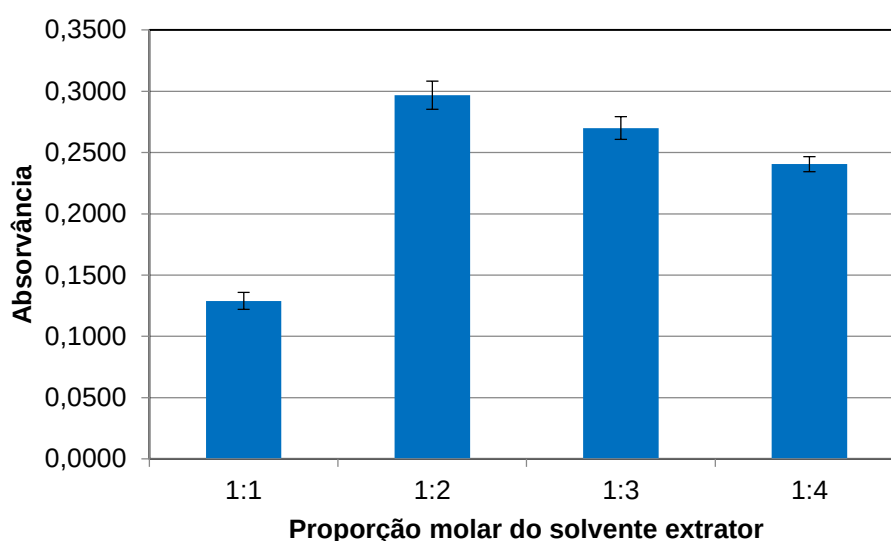
Após a realização do estudo dos solventes pode-se verificar que o ChCl com fenol apresentou uma melhor eficiência de extração, ou seja, a separação de fases mais adequada. De forma complementar, o extrato obtido a partir deste solvente foi mais homogêneo e com um volume mais expressivo. Quando comparado às outras fases receptoras testadas, o ChCl-fenol apresentou uma combinação ideal para a extração do complexo de RB das soluções. Além disso, a fase enriquecida foi sedimentada na parte superior do meio de extração, o que facilitou a retirada do extrato para a detecção. Assim, a fase receptora constituída de ChCl e fenol foi escolhida para os próximos experimentos.

3.3 Proporção molar do DES

As misturas de DES foram preparadas a partir de um sal quaternário de amônio ChCl como receptor de hidrogênio e fenol como molécula doadora de hidrogênio. Quatro DES contendo ChCl e fenol com proporções distintas foram preparados e aplicados ao procedimento de UA-LPME. Os resultados referentes a este estudo estão apresentados na Figura 4. O DES com proporção 1:1 proporcionou um sinal baixo, devido à insuficiente quantidade de fenol. Melhores resultados foram obtidos com maiores quantidades de fenol, pois o caráter

hidrofóbico do DES foi aumentado, devido ao acréscimo na quantidade de moléculas com anéis benzênicos. Quando comparado ao DES (1:2), o sinal analítico de DES a maiores proporções (1:3 e 1:4) decresce, pois o aumento a concentração excessiva de fenol na fase enriquecida pode promover interferência espectral na detecção. Então, o Des com proporção ChCl:fenol 1:2 foi escolhido para os experimentos posteriores.

Figura 4: Estudo da proporção do DES ChCl:fenol na determinação de RB por UA-LPME e imagem digital.

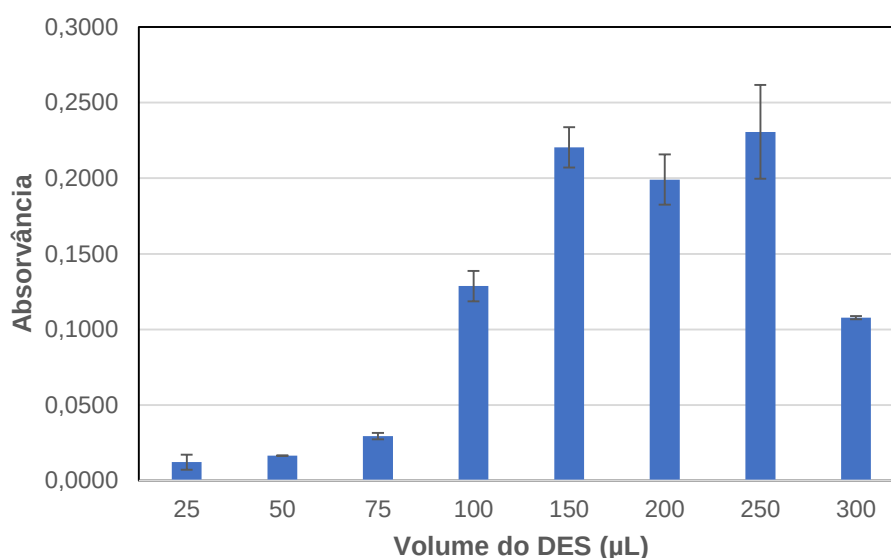


3.4 Quantidade da fase receptora

A quantidade de DES representa o volume da fase receptora empregada no sistema de microextração. Esta quantidade não representa exatamente o volume da fase enriquecida após a sedimentação, pois podem ocorrer perdas por dissolução na fase doadora. Perdas por volatilização do DES são ínfimas, ao contrário do que ocorre no uso de muitos solventes tradicionais. O volume do DES ChCl-fenol de proporção molar 1:2 utilizado neste experimento foi examinado na faixa de 25 a 300 μL . Na Figura 5, os resultados correspondentes a este estudo são mostrados. Quando volumes de DES menores ou iguais a 100 μL foram usados, pode ser observado que o sinal analítico cresce à medida que aumenta a quantidade da fase receptora. Isso indica que os volumes nessa faixa são insuficientes para promover a extração de uma quantidade máxima de RB

da fase doadora. Volumes de DES no intervalo entre 150 e 250 μL promoveram os maiores sinais analíticos. O uso de um volume de 300 μL de DES causou um decréscimo de sinal, provavelmente devido à consequente diluição do RB na fase enriquecida. Portanto, 200 μL do DES ChCl-fenol foi selecionado como volume ideal para o procedimento de UA-LPME.

Figura 5: Estudo do volume do DES ChCl:fenol na determinação de RB por UA-LPME e imagem digital.

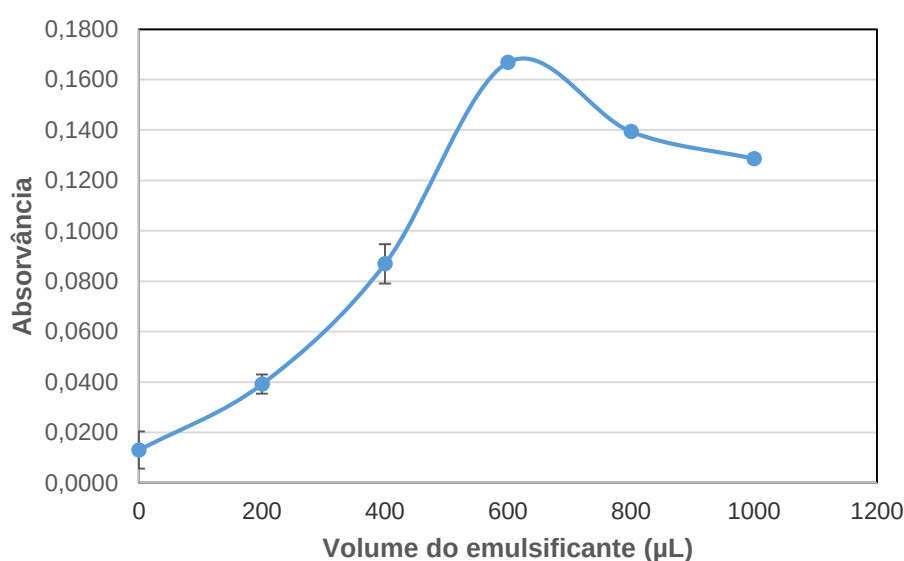


3.5 Quantidade do agente emulsificante

A maior parte dos DES resulta da associação de um HBA e um HBD, dando origem a misturas hidrofílicas. O caráter hidrofílico dessas misturas impõe a adição de um solvente emulsificante ao meio de extração, para reduzir a interação entre o DES e a água. Então, as moléculas de água se associarão melhor com o agente emulsificante, e as moléculas do DES agregar-se-ão, separando-se da fase aquosa [67]. Neste trabalho, utilizou-se como emulsificante o solvente aprótico THF. A influência do volume do agente emulsificante foi examinado. Os resultados estão apresentados na Figura 6. As recuperações de RB foram avaliadas a partir de volumes quantitativos de THF na faixa de 0-1000 μL . Foi observado que na ausência do agente emulsificante THF não ocorreu a separação das fases. A adição de volumes na faixa entre 200

μL a 500 μL de THF não é suficiente para promover uma eficiente separação de fases. O volume de 600 μL proporcionou as maiores respostas analíticas. Em contrapartida, quando os volumes acima de 600 μL foram usados, observou-se uma queda no sinal, devido à excessiva quantidade de THF na fase doadora, o que prejudicou a extração de RB. Desta forma, 600 μL de THF foram empregados para a emulsificação nos experimentos posteriores.

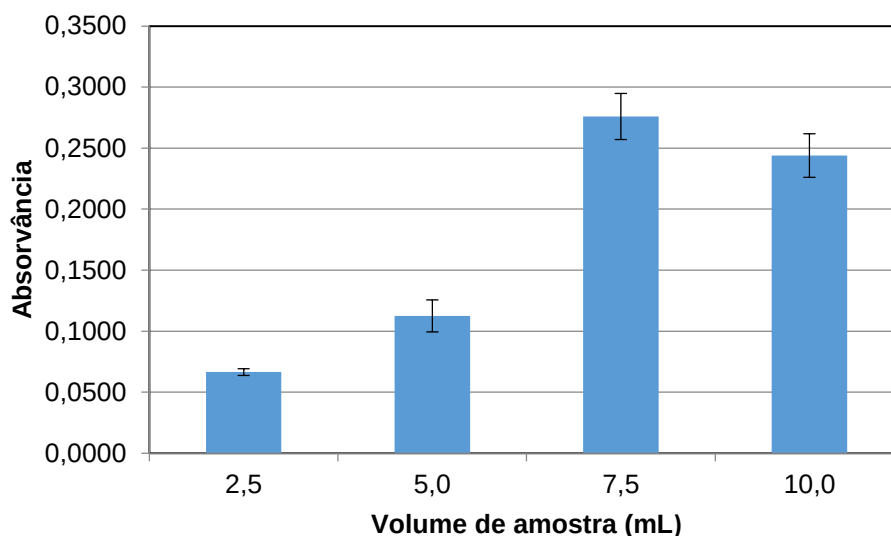
Figura 6: Estudo do volume do agente emulsificante THF na determinação de RB por UA-LPME e imagem digital.



3.6 Quantidade da fase doadora

O volume da fase doadora no sistema de UA-LPME com DES foi estudado, utilizando-se valores entre 2,50 e 10,00 mL (Figura 7). Os maiores sinais analíticos foram obtidos quando um volume de solução de RB de 7,50 mL foi empregado. Valores menores que 7,50 mL proporcionaram baixos sinais analíticos, devido à menor quantidade de RB nestes volumes. Quando um volume de fase doadora 10,00 mL foi utilizado, também houve prejuízo na extração, pois ocorre uma dissolução do analito e do DES na fase aquosa, proporcional ao seu volume. Assim um volume de 7,50 mL de fase doadora foi empregado em todos os experimentos posteriores.

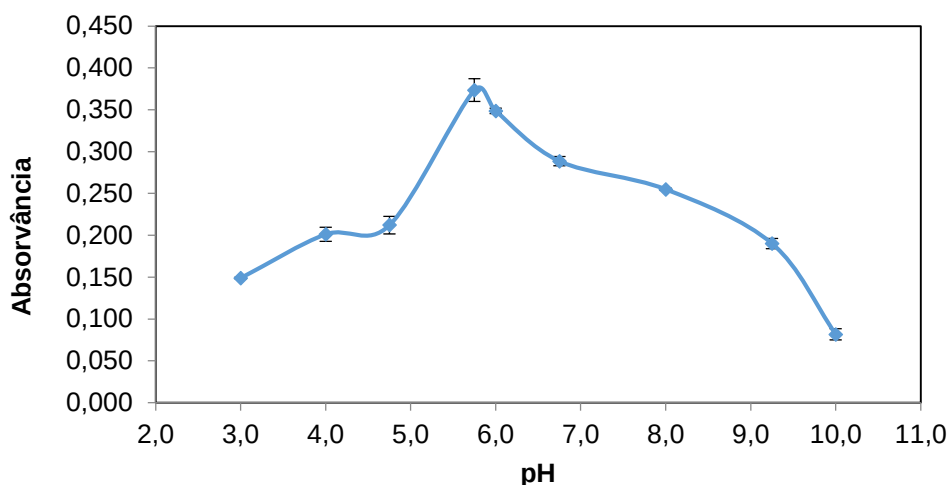
Figura 7: Estudo do volume de amostra na determinação de RB por UA-LPME e imagem digital.



3.7 pH do meio de extração

A influência do pH na extração de RB da solução doadora foi estudado, na faixa entre 2,0-10,0. Os resultados são apresentados na Figura 8. O pH pode influenciar fortemente a extração de analitos, pois este parâmetro é determinante na predominância de espécies químicas, que podem apresentar afinidades variadas com a fase receptora. Pode ser observado que a quantidade máxima de RB extraída é promovida por um meio de pH 5,75. Meios de extração com pH acima deste valor prejudicam a extração, pois favorecem a dissociação do próton carboxílico, formando uma espécie aniônica, que tem pouca afinidade ao DES hidrofílico [68]. A baixos valores de pH, o DES diminui o seu caráter hidrofílico, diminuindo a quantidade de RB extraída. Então, o pH 5,75 foi escolhido para todos os experimentos posteriores.

Figura 8: Estudo do pH do meio de extração na determinação de RB por UA-LPME e imagem digital.



Após otimização, os valores estabelecidos para as variáveis são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores obtidos após otimização das variáveis estudadas no método proposto

Variável	Valor
Tipo de solvente extrator	Fenol-ChCl
pH	5,75
Razão do DES	1:2
Volume do solvente extrator (µL)	200
Volume do agente emulsificante (µL)	600
Volume da amostra (mL)	7,50
Tempo de sonicação (min)	3
Tempo de centrifugação (min)	6

3.9. Seletividade

A seletividade do método foi estudada a fim de aferir a sua tolerância à presença de outros íons. Neste estudo, uma solução de RB 200,0 µg L⁻¹ foi empregada e a concentração do possível interferente foi variada nesta solução. O método foi aplicado em condições otimizadas e o sinal analítico da solução de

RB foi comparado com o da solução contendo RB e o possível interferente. O efeito de cada íon foi considerado como interferência se as espécies fornecessem uma variação de $\pm 5\%$ no sinal analítico de rodamina B.

Conforme os resultados obtidos, o método é tolerante à presença dos íons testados em concentrações, pelo menos, cinco vezes superiores à concentração de rodamina B. Os resultados estão representados na Tabela 2. O limite de tolerância de íons estranhos e corantes foi tomado como o valor que causou um erro não superior a $\pm 5\%$ na absorvância. Esses resultados revelam que, o método de microextração proposto pode ser aplicado a matrizes complexas.

Tabela 2: Avaliação dos possíveis interferentes tolerados na determinação de RB empregando o método proposto.

Corantes e íons	Concentração máxima tolerada ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Brilhante Green	200
Verde de Malaquita	200
Ponceau	200
Cu^{2+}	200
Mg	200
SO_4^{2-}	200
Zn^{2+}	300
Na^+	300
Ca^{2+}	300
K^+	300
Cl^-	300

3.10 Características analíticas

Os parâmetros analíticos sob condições otimizadas do método foram obtidos. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados como $3,3s_b/S$ e $10s_b/S$, respectivamente, onde s_b é o desvio padrão de 10 medidas da solução do branco e S é a inclinação da curva analítica utilizada na calibração do método proposto. O fator de enriquecimento (EF) foi obtido utilizando-se as razões entre o volume da amostra (V_a) e da fase extratora (V_o), V_a/V_o . A precisão do método foi tomada como o desvio-padrão relativo de sete medições de uma solução aquosa de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de RB submetida à análise pelo método proposto, nas condições otimizadas. A Tabela 3 apresenta as características analíticas do método.

Tabela 3: Resumo dos parâmetros de mérito do método proposto.

Parâmetro	Valor
Limite de detecção	$3,7 \mu\text{g L}^{-1}$
Limite de quantificação	$11,3 \mu\text{g L}^{-1}$
Precisão (%)	3,3 ($200 \mu\text{g L}^{-1}$)
Fator de enriquecimento	75
Equação de calibração	$y = 2,6 \times 10^{-3}x + 2,5 \times 10^{-2}$

3.11 Aplicação

A validação do método desenvolvido foi realizada por experimentos de recuperação de adição para as amostras reais enriquecidas. Para essa finalidade, foram acrescentadas concentrações conhecidas de RB em vários tipos de amostras (água de poço, água de rio e diferentes tipos de batons) e experimentos de recuperação com o método. Os resultados de recuperação obtidos estão representados nas tabelas 4 e 5. Os valores encontrados para amostras reais mostraram que as recuperações do método foram de 92 a 107% com desvios padrão baixos. Os dados obtidos para validação comprovaram que o método não foi afetado pela matriz de amostras e aplicável para pré-concentração e determinação precisa de RB em diferentes amostras.

Tabela 4: Resultados da determinação de RB em amostras de batons

Amostra	Conc. de RB ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Rec. (%)
	Adicionada	Encontrada	
Amostra 1	0,0	29,1 $\pm$ 0,2	103,0
	30,0	60,0	
Amostra 2	0	29,6 $\pm$ 0,1	92,7
	30,0	57,4	
Amostra 3	0	28,7 $\pm$ 0,3	107,0
	30,0	60,8	
Amostra 4	0	30,5 $\pm$ 0,3	96,3
	30,0	59,4	

Tabela 5: Resultados da determinação de RB em amostras de águas

Amostra	Conc. de RB ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Rec. (%)
	Adicionada	Encontrada	
Água de Poço 1	0,0	---	98,0
	20,0	19,8 $\pm$ 0,1	
Água de Poço 2	0	---	103,0
	40,0	40,1 $\pm$ 0,2	
Água de rio 1	0	---	100,0
	20,0	20,8 $\pm$ 0,3	
Água de rio 2	0	---	103,0
	40,0	40,3 $\pm$ 0,1	
Água de rio 3	0	---	102,0
	20	20,1 $\pm$ 0,2	

4.0 CONCLUSÃO

Um método envolvendo DES com UA-LPME foi desenvolvido para pré-concentração e determinação de RB combinado com DIC. O desenvolvimento do método utilizando DES como uma alternativa aos solventes convencionais proposto apresentou inúmeras vantagens como simplicidade, baixo custo e eliminação de solventes de extração nocivos. Além disso, quando comparado com outros solventes verdes, os DESs podem ser sintetizados à temperatura ambiente com alta pureza e em pouco tempo. A técnica proporcionou a determinação confiável e precisa de RB em amostras ambientais de água e cosméticos (batons), mostrando a possibilidade de uso das técnicas de microextração.

5.0 REFERÊNCIAS

1. Ranjbari, E. and M.R. Hadjmohammadi, *Optimization of magnetic stirring assisted dispersive liquid-liquid microextraction of rhodamine B and rhodamine 6G by response surface methodology: application in water samples, soft drink, and cosmetic products*. Talanta, 2015. **139**: p. 216-225.
2. Neckers, D.C. and V.-A.O. M., *Chemistry of Xanthene Dyes*, in *Advances in Photochemistry*, D.H. Volman, G. S. Neckers, D. C., Editor. 1993, Wiley: New York. p. 315-370.
3. *National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 6694, Rhodamine B. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rhodamine-B>.*
4. Kaji, T., et al., *Rhodamine B inhibits collagen synthesis by human lip fibroblasts in culture*. Toxicology letters, 1992. **61**(1): p. 81-87.

5. Dire, D.J. and J.A. Wilkinson, *Acute exposure to rhodamine B*. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 1987. **25**(7): p. 603-607.
6. Roberts, A.L., et al., *Trans-generational exposure to low levels of rhodamine B does not adversely affect litter size or liver function in murine mucopolysaccharidosis type IIIA*. Molecular genetics and metabolism, 2010. **101**(2-3): p. 208-213.
7. Thaler, S., et al., *In vivo toxicity study of rhodamine 6G in the rat retina*. Investigative ophthalmology & visual science, 2008. **49**(5): p. 2120-2126.
8. Mull, D.S., et al., *US Environmental Protection Agency, EPA 9046-88-001*. 1988: Atlanta, Georgia. p. 90103.
9. Yilmaz, E. and M. Soylak, *A novel and simple deep eutectic solvent based liquid phase microextraction method for rhodamine B in cosmetic products and water samples prior to its spectrophotometric determination*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018. **202**: p. 81-86.
10. Skjolding, L.M., et al., *Assessing the aquatic toxicity and environmental safety of tracer compounds Rhodamine B and Rhodamine WT*. Water Research, 2021. **197**: p. 117109.
11. Chiang, T.L., Y.C. Wang, and W.H. Ding, *Trace determination of rhodamine B and rhodamine 6G dyes in aqueous samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection*. Journal of the chinese chemical society, 2012. **59**(4): p. 515-519.
12. Tatebe, C., et al., *A simple and rapid chromatographic method to determine unauthorized basic colorants (rhodamine B, auramine O, and pararosaniline) in processed foods*. Food science & nutrition, 2014. **2**(5): p. 547-556.

13. Shi, J. and L. Chen, *Determination of rhodamine B in lipsticks by high performance liquid chromatography after extraction with AOT reversed micelles*. Analytical Methods, 2014. **6**(21): p. 8627-8632.
14. Chen, J. and X. Zhu, *Magnetic solid phase extraction using ionic liquid-coated core-shell magnetic nanoparticles followed by high-performance liquid chromatography for determination of Rhodamine B in food samples*. Food chemistry, 2016. **200**: p. 10-15.
15. Unsal, Y.E., M. Soylak, and M. Tuzen, *Spectrophotometric detection of rhodamine B after separation-enrichment by using multi-walled carbon nanotubes*. Journal of AOAC International, 2014. **97**(5): p. 1459-1462.
16. Unsal, Y.E., M. Soylak, and M. Tuzen, *Dispersive liquid-liquid microextraction-spectrophotometry combination for determination of rhodamine B in food, water, and environmental samples*. Desalination and Water Treatment, 2015. **55**(8): p. 2103-2108.
17. Wang, C., et al., *Single point calibration for semi-quantitative screening based on an internal reference in thin layer chromatography-SERS: the case of Rhodamine B in chili oil*. Analytical Methods, 2014. **6**(18): p. 7218-7223.
18. Tonica, W.W., et al. *Determination of Rhodamine-B and Amaranth in snacks at primary school Sukolilo district of Surabaya-Indonesia by thin layer chromatography*. in *AIP Conference Proceedings*. 2018. AIP Publishing LLC.
19. Lopez-Lorente, A.I., et al., *The ten principles of green sample preparation*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2022. **148**.
20. Santos, L.B., et al., *Deep eutectic solvents in liquid-phase microextraction: Contribution to green chemistry*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2022. **146**.

21. Kokosa, J.M., *Selecting an extraction solvent for a greener liquid phase microextraction (LPME) mode-based analytical method*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2019. **118**: p. 238-247.
22. Pacheco-Fernández, I. and V. Pino, *Green solvents in analytical chemistry*. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, 2019. **18**: p. 42-50.
23. Jain, A. and K.K. Verma, *Recent advances in applications of single-drop microextraction: A review*. Analytica chimica acta, 2011. **706**(1): p. 37-65.
24. Jeannot, M.A., A. Przyjazny, and J.M. Kokosa, *Single drop microextraction—development, applications and future trends*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(16): p. 2326-2336.
25. Dmitrienko, S.G., et al., *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Organic Compounds: An Overview of Reviews*. Journal of Analytical Chemistry, 2020. **75**(10): p. 1237-1251.
26. Sajid, M., *Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with derivatization: A review of different modes, applications, and green aspects*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2018. **106**: p. 169-182.
27. Grau, J., et al., *Use of green alternative solvents in dispersive liquid-liquid microextraction: A review*. Journal of Separation Science, 2022. **45**(1): p. 210-222.
28. Pacheco-Fernandez, I., et al., *Insights into coacervative and dispersive liquid-phase microextraction strategies with hydrophilic media - A review*. Analytica Chimica Acta, 2021. **1143**: p. 225-249.
29. Mousavi, L., Z. Tamiji, and M.R. Khoshayand, *Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid-liquid microextraction method - A review*. Talanta, 2018. **190**: p. 335-356.

30. Sajid, M. and K. Alhooshani, *Dispersive liquid-liquid microextraction based binary extraction techniques prior to chromatographic analysis: A review*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2018. **108**: p. 167-182.
31. Rykowska, I., J. Ziemblińska, and I. Nowak, *Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review*. Journal of Molecular Liquids, 2018. **259**: p. 319-339.
32. Vinas, P., et al., *Dispersive liquid-liquid microextraction in food analysis. A critical review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(8): p. 2067-2099.
33. Kocurova, L., et al., *Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review*. Microchemical Journal, 2012. **102**: p. 11-17.
34. Alsharif, A.M.A., et al., *Efficiency of hollow fiber liquid-phase microextraction chromatography methods in the separation of organic compounds: a review*. Journal of Chromatographic Science, 2017. **55**(3): p. 378-391.
35. Bello-López, M.Á., et al., *Analytical applications of hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME): a review*. Analytical Letters, 2012. **45**(8): p. 804-830.
36. Pedersen-Bjergaard, S., K.E. Rasmussen, and J.Å. Jönsson, *Liquid-Phase Microextraction (LPME) Utilizing Porous Hollow Fibers*. Handbook of sample preparation, 2010: p. 125-148.
37. Dias, F.d.S., et al., *Emulsification solidified floating organic drop microextraction assisted by ultrasound for the determination of nickel, cobalt and copper in oyster and fish samples*. Analytical Methods, 2020. **12**(6): p. 865-871.

38. Yousefi, S.M., F. Shemirani, and S.A. Ghorbanian, *Enhanced headspace single drop microextraction method using deep eutectic solvent based magnetic bucky gels: application to the determination of volatile aromatic hydrocarbons in water and urine samples*. Journal of separation science, 2018. **41**(4): p. 966-974.
39. Mogaddam, M.R.A., et al., *Headspace mode of liquid phase microextraction: A review*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2019. **110**: p. 8-14.
40. Torabi, A., et al., *Deep eutectic solvent-based ligandless ultrasound-assisted liquid-phase microextraction for extraction of cobalt ions from food samples prior to spectrophotometric determination*. Journal of the Iranian Chemical Society, 2021. **18**(4): p. 893-902.
41. Berton, P., E.M. Martinis, and R.G. Wuilloud, *Development of an on-line temperature-assisted ionic liquid dispersive microextraction system for sensitive determination of vanadium in environmental and biological samples*. Journal of Hazardous Materials, 2010. **176**(1-3): p. 721-728.
42. Tegladza, I.D., et al., *Direct immersion single-drop microextraction of semi-volatile organic compounds in environmental samples: A review*. Journal of hazardous materials, 2020. **393**: p. 122403.
43. Qiao, L., et al., *Novel hydrophobic deep eutectic solvents for ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of trace non-steroidal anti-inflammatory drugs in water and milk samples*. Microchemical Journal, 2021. **170**: p. 106686.
44. Sandrejova, J., et al., *Classification and terminology in dispersive liquid-liquid microextraction*. Microchemical Journal, 2016. **127**: p. 184-186.
45. Alvarez, S.M., et al., *Ionic liquid mediated extraction, assisted by ultrasound energy, of available/mobilizable metals from sediment samples*. Ultrasonics Sonochemistry, 2017. **34**: p. 239-245.

46. Yilmaz, E. and M. Soylak, *Ultrasound assisted-deep eutectic solvent based on emulsification liquid phase microextraction combined with microsample injection flame atomic absorption spectrometry for valence speciation of chromium (III/VI) in environmental samples*. Talanta, 2016. **160**: p. 680-685.
47. Lemos, V.A., et al., *Development of a method using ultrasound-assisted emulsification microextraction for the determination of nickel in water samples*. Water, Air, & Soil Pollution, 2015. **226**(5): p. 141.
48. Abo-Hamad, A., et al., *Potential applications of deep eutectic solvents in nanotechnology*. Chemical Engineering Journal, 2015. **273**: p. 551-567.
49. Abbott, A.P., et al., *Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures*. Chemical Communications, 2003(1): p. 70-71.
50. Abbott, A.P., et al., *Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains*. Chemical Communications, 2001(19): p. 2010-2011.
51. Espino, M., et al., *Natural designer solvents for greening analytical chemistry*. TrAC trends in analytical chemistry, 2016. **76**: p. 126-136.
52. Faraji, M., M. Mahmoodi-Maymand, and F. Dastmalchi, *Green, fast and simple dispersive liquid-liquid microextraction method by using hydrophobic deep eutectic solvent for analysis of folic acid in fortified flour samples before liquid chromatography determination*. Food Chemistry, 2020: p. 126486.
53. Faraji, M., *Determination of some red dyes in food samples using a hydrophobic deep eutectic solvent-based vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2019. **1591**: p. 15-23.

54. Lemos, V.A., L.B. Santos, and R.S. Assis, *Deep eutectic solvent in ultrasound-assisted liquid-phase microextraction for determination of vanadium in food and environmental waters*. Microchemical Journal, 2022. **180**.
55. Porto, I.S.A., et al., *Determination of ascorbic acid in natural fruit juices using digital image colorimetry*. Microchemical Journal, 2019. **149**: p. 104031.
56. Pascale, D., *A review of rgb color spaces... from xyy to r'g'b'*. Babel Color, 2003. **18**: p. 136-152.
57. Fan, Y., et al., *Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review*. Measurement, 2021. **171**: p. 108829.
58. Helfer, G.A., et al., *PhotoMetrix: an application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2017. **28**: p. 328-335.
59. Christodouleas, D.C., et al., *Broadly available imaging devices enable high-quality low-cost photometry*. Analytical chemistry, 2015. **87**(18): p. 9170-9178.
60. Choodum, A., et al., *Using the iPhone as a device for a rapid quantitative analysis of trinitrotoluene in soil*. Talanta, 2013. **115**: p. 143-149.
61. Firdaus, M.L., et al., *Determination of chromium and iron using digital image-based colorimetry*. Procedia Environmental Sciences, 2014. **20**: p. 298-304.
62. 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.

63. Vidal, M., et al., *Simultaneous determination of color additives tartrazine and allura red in food products by digital image analysis*. Talanta, 2018. **184**: p. 58-64.
64. Soares, S., M.J. Lima, and F.R. Rocha, *A spot test for iodine value determination in biodiesel based on digital images exploiting a smartphone*. Microchemical Journal, 2017. **133**: p. 195-199.
65. Sorouraddin, M.-H., M. Saadati, and F. Mirabi, *Simultaneous determination of some common food dyes in commercial products by digital image analysis*. journal of food and drug analysis, 2015. **23**(3): p. 447-452.
66. Capitan-Vallvey, L.F. and A.J. Palma, *Recent developments in handheld and portable optosensing—A review*. Analytica chimica acta, 2011. **696**(1-2): p. 27-46.
67. 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.
68. McHedlovpetrossyan, N.O., V.I. Kukhtik, and V.I. Alekseeva, *Ionization and tautomerism of fluorescein, rhodamine B, N,N-diethylrhodol and related dyes in mixed and nonaqueous solvents*. Dyes and Pigments, 1994. **24**(1): p. 11-35.