

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Tarlene Pinheiro Miranda

**EMPREGO DA ELETROEXTRAÇÃO MULTIFÁSICA E TÉCNICAS  
ESPECTROSCÓPICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTE  
AZUL DE METILENO EM ÁGUA TRATADA**

Belo Horizonte

2020

UFMG/ICEX/DQ. 1382

D. 750

Tarlene Pinheiro Miranda

**EMPREGO DA ELETROEXTRAÇÃO MULTIFÁSICA E TÉCNICAS  
ESPECTROSCÓPICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTE  
AZUL DE METILENO EM ÁGUA TRATADA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Analítica.

Belo Horizonte

2020

Ficha Catalográfica

M672e    Miranda, Tarlene Pinheiro  
2020        Emprego da eletroextração multifásica e técnicas  
D            espectroscópicas para a determinação de corante azul  
              de metileno em água tratada [manuscrito] / Tarlene  
              Pinheiro Miranda. 2020.

90 f. : il.

Orientadora: Mariana Ramos de Almeida.

Coorientador: Ricardo Mathias Orlando.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses. 2. Água potável -  
Contaminação - Teses. 3. Corantes - Teses. 4. Raman,  
Espectroscopia de - Teses. 5. Preparação de amostra  
(Química) - Teses. 6. Espectrofotometria - Teses. I.  
Almeida, Mariana Ramos de, Orientadora. II. Orlando,  
Ricardo Mathias, Coorientador. III. Título.

CDU 043

**"Emprego da Eletroextração Multifásica e Técnicas Espectroscópicas para a  
Determinação de Corante Azul de Metileno em Água Tratada"**

**Tarlene Pinheiro Miranda**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

*Mariana Ramos de Almeida*

Prof. Mariana Ramos de Almeida - Orientadora  
UFMG

*Ricardo Mathias Orlando*

Prof. Ricardo Mathias Orlando - Coorientador  
UFMG

*Leticia Malta Costa*

Prof. Leticia Malta Costa  
UFMG

*Guilherme Dias Rodrigues*

Prof. Guilherme Dias Rodrigues  
UFMG

Belo Horizonte, 17 de fevereiro de 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Autor da vida, seja dada toda glória por essa conquista! Ele é quem me sustentou e me guiou em todo esse percurso.

Ao meu amado esposo Leandro expresso minha mais profunda gratidão pelo apoio, incentivo e parceria.

Aos meus pais, a minha sogra e demais familiares e amigos agradeço pelas orações e compreensão em meus tempos de ausência.

A minha irmã Millena, expresso minha eterna gratidão pela forte parceria estabelecida nesses oito anos de UFMG. Sua companhia fez os dias difíceis um pouco mais leves!

As minhas amigas Cristiane Alves e Ive Lorena agradeço pelas orações e abraços.

À família LaMS eu agradeço por todo o carinho que sempre tiveram comigo!

À professora Mariana, agradeço pela orientação, pela confiança, empatia, amizade, compreensão e carinho que teve comigo durante todos esses meses! Inclusive agradeço pelo chá calmante que me receitou em dias de ansiedade e insônia.

Ao professor Ricardo, agradeço pela confiança e contribuição não só nesse trabalho, mas por ter me acolhido no LaMS nos últimos sete anos, me proporcionando a oportunidade de crescer tanto pessoalmente como profissionalmente. Agradeço imensamente por sempre se dispor a ajudar e sobretudo obrigada por sua amizade!

Aos colegas do laboratório de espectrometria atômica e química analítica ambiental (LEAQUAA) agradeço por disponibilizarem o uso do equipamento espectrofotômetro UV/Vis.

Aos professores Guilherme Dias e Leticia Malta por aceitarem o convite para compor a banca de avaliação e por suas contribuições no aprimoramento desse trabalho.

Aos colegas do laboratório de encapsulamento molecuclar e biomateriais (LEMB) por me permitir utilizar o espectrofotômetro UV/Vis e deionizador para execução desse trabalho.

À professora Ariete Righi por me permitir usar o Espectrômetro Raman.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao CNPQ, INCTAA e FAPEMIG pelo apoio financeiro a pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho.

“Toda a carne é como a erva e toda a glória do homem como a flor da erva. Secou-se a erva e caiu a sua flor...”

1 Pedro 1:24

## RESUMO

O corante azul de metileno bem como outros compostos são lançados nos corpos hídricos diariamente, sendo provenientes de distintas fontes como a indústria têxtil e a aquicultura. Após passar por vários processos de purificação nas estações de tratamento, a água destinada ao consumo humano pode ainda conter resíduos de espécies indesejáveis, chamados de contaminantes emergentes e que causam prejuízos à saúde. Diante disso, um sistema de eletroextração multifásico para grandes volumes de amostra, com suporte sólido para a fase aceptora, foi desenvolvido e otimizado para extrair e pré-concentrar o corante azul de metileno presente em amostras de água tratada. O sistema de eletroextração fez o uso de uma base multipoços, a qual permitiu múltiplas extrações simultâneas, com posterior análise por espectrofotometria de absorção molecular na região do visível e espectroscopia Raman. O sistema usou algodão como suporte da fase aceptora, uma vez que esse material apresentou melhores resultados nos testes de sorção/dessorção. A melhor configuração do sistema foi obtida com o filtro orgânico livre e sem a presença da agitação. Um planejamento do tipo Box-Behnken foi empregado para a otimização das variáveis: tempo de extração, pH e porcentagem de acetonitrila na fase doadora. Os parâmetros escolhidos para o sistema de eletroextração foram: fase aceptora constituída de 0,0300 g de algodão embebido em ácido acético 0,50 mol L<sup>-1</sup>, fase doadora composta de tampão McIlvaine, pH = 5,00 com 35% (v/v) de acetonitrila, 3,00 mL de 1-octanol usado como filtro orgânico livre, com aplicação de uma diferença de potencial elétrico de 300 volts por 25 minutos. Empregando a espectrofotometria de absorção molecular na região do visível, construiu-se uma curva matrizada e essa apresentou-se linear na faixa de 0,030 a 0,375 mg L<sup>-1</sup> em termos da concentração da amostra. O método proposto foi validado, apresentando-se preciso com desvio padrão relativo entre 3,0 e 9,9% e teve sua faixa de recuperação entre 99-105%, com limite de detecção e de quantificação de 0,001 e 0,004 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Não foi observado efeito de matriz e a eficiência de extração calculada foi de 31% com uma pré-concentração de 10 vezes. A análise qualitativa dos espectros Raman permitiu a detecção do corante azul de metileno na ordem de 5 x 10<sup>-5</sup> mg L<sup>-1</sup>. O método apresentou agilidade nas análises uma vez que pôde-se fazer múltiplas extrações de forma simultânea, além de permitir a análise de amostras com baixas concentrações de azul de metileno, devido a seu elevado poder de pré-concentração e seletividade.

**Palavras-chave:** água potável, EAM-UV/Vis, SERS, preparo de amostra, contaminante emergente.

## ABSTRACT

Methylene blue dye and other compounds are released into water bodies daily and primarily originate from the textile industry and aquaculture. After going through several purification processes at the treatment plants, water intended to be released to the environment or for human consumption may still contain residues of undesirable species, referred to as emerging contaminants, which can cause serious health effects. Therefore, a multiphase electroextraction system for large sample volumes, with a solid support for the acceptor phase, was developed and optimized to extract and pre-concentrate methylene blue dye present in treated water samples. The electroextraction system utilizes a multi-well base, allowing for multiple simultaneous extractions with subsequent analysis by molecular absorption spectrophotometry in the visible region and Raman spectroscopy. The system uses cotton as a support for the acceptor phase, because it showed excellent results in sorption/desorption tests. The best system configuration was achieved with a free organic filter without stirring. A Box-Behnken-type plan was used to optimize the following variables: extraction time, pH, and acetonitrile percentage in the donor phase. The parameters for the electroextraction system were as follows: acceptor phase, 0.0300 g of cotton soaked in 0.50 mol L<sup>-1</sup> acetic acid; donor phase, McIlvaine buffer, pH 5,00, 35% (v/v) acetonitrile, 3,00 mL of 1-octanol used as a free organic filter; application of 300 V for 25 min. Using molecular absorption spectroscopy in the visible region, a matrix-matched curve was obtained and linearity was demonstrated in the range of 0.030 to 0.375 mg L<sup>-1</sup>. The proposed method was validated, achieving precision with a relative standard deviation between 3,0 and 9.9% and a recovery range between 99 and 105%, with detection and quantification limits of 0.001 and 0.004 mg L<sup>-1</sup>, respectively. No matrix effects were observed and the calculated extraction efficiency was 31% with a 10-times pre-concentration. Qualitative analysis of the Raman spectra allowed the detection of methylene blue dye at concentrations as low as 5 x 10<sup>-5</sup> mg L<sup>-1</sup>. The newly developed method showed agility because multiple extractions could be performed simultaneously, which allowed the analysis of samples with low concentrations of methylene blue due to the high pre-concentration power and selectivity.

**Keywords:** potable water, UV/Vis absorption spectrophotometry, SERS, sample preparation, emerging contaminant.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura molecular do corante azul de metileno.<sup>29</sup> ..... 21
- Figura 2.** Esquema ilustrativo da EME para a) cátions e b) ânions. SLM: membrana líquida suportada. Fonte: Adaptado de Huang et al (2017)<sup>59</sup>..... 26
- Figura 3.** Ilustração esquemática do sistema de eletroextração trifásica para extração de analito catiônico. Fase acceptora: solução aquosa constituída de 33% de metanol e 5% de ácido fórmico; Filtro orgânico: mistura de acetato de etila e acetato de metila (3:2); Fase doadora: plasma humano fortificado com acilcarnitinas, diluído dez vezes em 33% de metanol e 5% de ácido fórmico Fonte: Adaptado de RATERINK *et al.* (2013). ..... 29
- Figura 4.** Ilustração esquemática do sistema multifásico utilizando suporte sólido na fase acceptora. Fase acceptora: cone odontológico embebido em ácido acético; Filtro orgânico: 1-octanol; Fase doadora: saliva:ACN (50:50, v/v); Fonte: Adaptado de Sousa *et al.* (2020). ..... 31
- Figura 5.** Desenho esquemático para o sistema de eletroextração multifásico para amostras em grandes volumes (35 mL). (A) configuração com restritor de volume para filtro orgânico; (B) configuração com filtro orgânico livre. (a) eletrodo superior; (b) contato elétrico; (c) suporte sólido com eletrólito (fase acceptora); (d) filtro orgânico; (e) fase doadora; (f) mangueira de teflon isolante do eletrodo; (g) eletrodo inferior; (h) barra magnética; (i) fonte de diferença de potencial. Adaptado de BR10 2019 017861 2 <sup>66</sup>..... 39
- Figura 6.** Desenho esquemático do processo de montagem das ponteiros de micropipeta contendo a fase acceptora. Adaptado de Resende, 2019. <sup>68</sup> ..... 40
- Figura 7.** Esquema ilustrativo do dispositivo multipoços para eletroextração onde são apresentados (a) o dispositivo de agitação magnética, (b) a fonte de alimentação de energia, (c) o poço para posicionamento do tubo de eletroextração e (d) os terminais elétricos ligados a fonte de diferença de potencial. Adaptado de BR10 2019 017861 2 <sup>66</sup>..... 41
- Figura 8.** Desenho esquemático da visão frontal da mangueira de silicone usada como restritor de volume para o filtro orgânico..... 44

<b>Figura 9.</b> Porcentagem de sorção do azul de metileno aquoso pelos diferentes sorventes testados. Condições: 10,0 mL de solução aquosa de AM 10,0 mg L <sup>-1</sup> ; 150 mg de sorvente; tempo de 30 minutos a 25 rpm; (n=1).....	56
<b>Figura 10.</b> Porcentagem de dessorção do azul de metileno dos diferentes sorventes testados, utilizando metanol e ácido acético 0,1 e 1 % (v/v), como agentes dessorventes. Condições: 10,0 mL de solvente de dessorção; tempo de 30 minutos a 25 rpm; (n=1).....	57
<b>Figura 11.</b> Comparação entre a porcentagem de sorção do AM 10,0 mg L <sup>-1</sup> aquoso e a porcentagem de dessorção utilizando uma mistura de MeOH / ACN / HAc na proporção 40:40:20 (v/v/v), como agente dessorvente; (n=1). .....	59
<b>Figura 12.</b> Gráfico comparativo dos sinais de absorbância média da solução de dessorção para o azul de metileno em 654 nm para quatro diferentes configurações do sistema de eletroextração multifásico. (FL= filtro livre).....	60
<b>Figura 13.</b> Gráfico dos efeitos versus probabilidade normal para o planejamento fatorial fracionário 2 <sub>III</sub> 6 <sup>-3</sup> . Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V; concentração do azul de metileno na fase doadora 4,0 mg L <sup>-1</sup> . .....	63
<b>Figura 14.</b> Superfícies de resposta para o planejamento Box-Behnken avaliando interação entre: (A) tempo e porcentagem de orgânico na fase doadora; (B) pH da fase doadora e tempo de extração; (C) pH e porcentagem de orgânico ambos da fase doadora. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V; concentração do corante na fase doadora de 0,5 mg L <sup>-1</sup> ; fase acceptora constituída de 0,0300 g de algodão embebido em solução 0,50 mol L <sup>-1</sup> de ácido acético. ....	66
<b>Figura 15.</b> Estruturas do azul de metileno em diferentes valores de pH. Fonte: Adaptado de Anastapoulos (2017) <sup>27</sup> . .....	68
<b>Figura 16.</b> Perfil da corrente elétrica para o sistema otimizado. Condições: fase doadora composta por 32,0 mL de AM 0,5 mg L <sup>-1</sup> em tampão McIlvaine pH = 5,00 com 35% (v/v) de ACN; filtro orgânico formado por 3,00 mL de 1-octanol; fase acceptora constituída por ácido acético 0,50 mol L <sup>-1</sup> imobilizado em 0,0300 g de algodão e diferença de potencial elétrico de 300 V aplicado durante 25 minutos. ....	69
<b>Figura 17.</b> Curva analítica extraída (curva 1) para soluções de azul de metileno em tampão McIlvaine pH = 5,00. Absorbância em 654 nm.....	70
<b>Figura 18.</b> Curva analítica extraída (curva 2) para soluções de azul de metileno em tampão McIlvaine pH = 5,00. Absorbância em 654 nm.....	71

<b>Figura 19.</b> Análise do efeito de matriz para as curvas analíticas extraídas em água deionizada e em água de torneira (matriz).....	72
<b>Figura 20.</b> Curva analítica do azul de metileno preparada em uma mistura de MeOH / ACN / HAc na proporção 40:40:20 (v/v/v). .....	75
<b>Figura 21.</b> Espectros SERS das desorções do azul de metileno com os respectivos valores de concentrações em mg L <sup>-1</sup> , referentes às amostras antes da eletroextração. Laser de excitação em 785 nm.....	77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Trabalhos descritos na literatura que determinam o corante azul de metileno em matrizes aquosas. ....	24
<b>Tabela 2:</b> Volumes de fosfato de sódio bibásico e de ácido cítrico usados para o preparo de 20 mL das soluções tampão nos diferentes valores de pH <sup>79</sup> .....	38
<b>Tabela 3:</b> Condições para eletroextração multifásica usando o restritor de volume para filtro orgânico.....	45
<b>Tabela 4:</b> Condições para eletroextração multifásica usando o sistema de filtro livre.....	46
<b>Tabela 5:</b> Variáveis investigadas no planejamento fatorial fracionário $2_{III}^{6-3}$ .....	47
<b>Tabela 6:</b> Matriz do planejamento fatorial fracionário $2_{III}^{6-3}$ .....	48
<b>Tabela 7:</b> Variáveis otimizadas no planejamento Box-Behnken .....	49
<b>Tabela 8:</b> Matriz do planejamento experimental Box-Behnken .....	50
<b>Tabela 9.</b> Condições da eletroextração multifásica para avaliação do perfil de corrente .....	51
<b>Tabela 10:</b> Valores de absorbância média e coeficiente de variação para as triplicatas de extração das diferentes configurações do sistema multifásico.....	61
<b>Tabela 11:</b> Valores de p, coeficientes estimados e coeficiente de determinação para o modelo ajustado.....	65
<b>Tabela 12.</b> Valores de desvio padrão relativo para avaliação da precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária.....	73
<b>Tabela 13.</b> Valores de recuperação para o método. ....	73
<b>Tabela 14.</b> Limites de detecção e quantificação para o método. ....	74
<b>Tabela 15.</b> Valor médio da eficiência de extração e seus desvios .....	74
<b>Tabela 16.</b> Valor médio do fator de pré-concentração e seus desvios.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABIT	Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confeções
Abs	Absorbância
ACN	Acetonitrila
AM	Azul de metileno
ANOVA	Análise de variância
CMD	Concentração média determinada
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPE	Extração de ponto-nuvem ( <i>Cloud point extraction</i> )
DLLME	Extração líquido-líquido dispersiva ( <i>Dispersive liquid-liquid extraction</i> )
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DSPE	Extração em fase sólida dispersiva ( <i>Dispersive solid phase extraction</i> )
EAM	Espectrofotometria de absorção molecular
EE	Eficiência de extração
EME	Eletroextração em membrana ( <i>Electromembrane extraction</i> )
E-SPE	Extração em fase sólida assistida por campo elétrico ( <i>Electric field- assisted solid phase extraction</i> )
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
ETOH	Etanol

FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FL	Filtro livre
FPC	Fator de pré-concentração
GPC	Cromatografia de permeação em gel ( <i>Gel permeation chromatography</i> )
HAc	Ácido acético
HF-LPME	Microextração em fase líquida de fibra oca ( <i>Hollow-fiber liquid-phase microextraction</i> )
HPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LaMS	Laboratório de Microfluidica e Separações
LD	Limite de detecção
LLE	Extração líquido-líquido ( <i>liquid-liquid extraction</i> )
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
MS	Espectrometria de massas ( <i>Mass Spectrometry</i> )
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial ( <i>Tandem Mass Spectrometry</i> )
MSPE	Extração em fase sólida magnética ( <i>Magnetic solid phase extraction</i> )
nanoESI	Ionização por nanoeletronebulização ( <i>nano-electrospray ionization</i> )
PLE	Extração acelerada por solventes ( <i>Pressurised liquid extraction</i> )
SALLE	Extração líquido-líquido assistida pelo efeito <i>salting-out</i> ( <i>Salting out liquid-liquid extraction</i> )

SERRS	Espalhamento Raman ressonante intensificado pela superfície ( <i>Surface-enhanced resonance Raman scattering</i> )
SERS	Espalhamento Raman intensificado pela superfície ( <i>Surface-enhanced Raman scattering</i> )
SLM	Membrana líquida suportada ( <i>Supported liquid membrane</i> )
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre o Saneamento
SPE	Extração em fase sólida ( <i>solid phase extraction</i> )
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência ( <i>Ultra high performance liquid chromatography</i> )
UV/Vis	Ultravioleta e visível
VB	Verde brilhante
VM	Verde malaquita

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1	Contaminação de águas por corantes .....	19
2.1.1	Indústria têxtil .....	19
2.1.2	Aquicultura .....	20
2.1.3	O azul de metileno como um contaminante .....	21
2.1.4	Preparo de amostra e técnicas analíticas para análise de azul de metileno em matrizes aquosas.....	23
2.2	Eletroextração .....	25
2.2.1	Eletroextração em membrana .....	25
2.2.2	A evolução da eletroextração.....	28
2.3	Espalhamento Raman Intensificado por Superfície .....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>35</b>
3.1	Objetivo geral .....	35
3.2	Objetivos específicos .....	35
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1	Materiais e reagentes.....	36
4.2	Equipamentos .....	36
4.3	Materiais para construção do sistema de eletroextração multifásico .....	37
4.4	Parte Experimental.....	38
4.4.1	Preparo da solução estoque e intermediária de azul de metileno.....	38
4.4.2	Preparo das soluções tampão McIlvaine .....	38
4.4.3	Montagem e funcionamento do sistema multifásico de eletroextração .....	38
4.4.4	Processo de dessorção do corante azul de metileno eletroextraído do material sorvente.....	41
4.4.5	Triagem para escolha do material sorvente e de seu respectivo solvente de dessorção .....	42
4.4.5.1	Dessorção com mistura de solventes .....	43
4.4.6	Avaliação de diferentes configurações do sistema .....	43
4.4.6.1	Eletroextração com uso de restritor de volume para o filtro orgânico - sob agitação magnética.....	43



4.4.6.2	Eletroextração com o filtro orgânico livre .....	45
4.4.7	Estudo multivariado para avaliação das condições de eletroextração multifásica do corante azul de metileno.....	46
4.4.7.1	Planejamento Fatorial Fracionário 2 <sup>III</sup> 6-3 .....	47
4.4.7.2	Planejamento de otimização do tipo Box-Behnken .....	48
4.4.8	Avaliação do perfil da corrente elétrica para a eletroextração multifásica do azul de metileno .....	51
4.4.9	Figuras de mérito avaliadas para o método .....	51
4.4.9.1	Linearidade .....	52
4.4.9.2	Efeito de matriz.....	52
4.4.9.3	Precisão.....	53
4.4.9.4	Veracidade .....	53
4.4.9.5	Limite de quantificação e detecção.....	54
4.4.10	Eficiência de extração .....	54
4.4.11	Fator de pré-concentração .....	55
4.4.12	Análise qualitativa da eletroextração multifásica do azul de metileno utilizando o espalhamento Raman intensificado por superfície.....	55
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
5.1	Comparação da sorção e dessorção do corante AM em diferentes materiais.....	56
5.2	Dessorção com mistura de solventes .....	58
5.3	Avaliação de diferentes configurações do sistema .....	60
5.4	Estudo multivariado para avaliação das condições de eletroextração multifásica do corante azul de metileno.....	62
5.4.1	Planejamento Fatorial Fracionário 2 <sup>III</sup> 6-3 .....	63
5.4.2	Planejamento de otimização do tipo Box-Behnken .....	64
5.5	Avaliação do perfil da corrente elétrica para a eletroextração multifásica do azul de metileno. ....	68
5.6	Figuras de mérito avaliadas para o método .....	70
5.6.1	Linearidade .....	70
5.6.2	Efeito de matriz .....	71
5.6.3	Precisão .....	72
5.6.4	Veracidade .....	73

5.6.5	Limite de detecção e quantificação .....	74
5.7	Eficiência de extração .....	74
5.8	Fator de pré-concentração .....	75
5.8.1	Análise qualitativa da eletroextração multifásica do azul de metileno utilizando o espalhamento Raman intensificado por superfície.....	76
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A intensa atividade industrial e o descarte inadequado de lixo e esgoto em cursos d'água contribui diretamente para a poluição de ambientes aquáticos, com a eliminação de efluentes contendo vários poluentes, dentre os quais pode-se citar os corantes sintéticos. Esses podem estar presentes em distintos processos como: indústria têxtil, fabricação de plásticos, produção de alimentos, dentre outros <sup>1</sup>.

Outro emprego dos corantes é como agente antimicrobiano, com aplicação na aquicultura, a qual é susceptível a diversos impactos, como desastres naturais, condições econômicas e doenças. A doença infecciosa é um risco sempre presente nesse setor, com o potencial de causar grandes perdas de estoque e problemas de bem-estar animal. Devido a isso, se faz necessário o uso de medicamentos veterinários, porém poucos fármacos são regulamentados para uso na aquicultura, o que abre caminho para o uso irregular de substâncias antimicrobianas baratas e de fácil acesso, como por exemplo os corantes, os mesmos usados no setor têxtil, como azul de metileno (AM), verde malaquita (VM) e verde brilhante (VB) <sup>2-4</sup>.

A presença de corantes nos corpos d'água pode ocasionar problemas de natureza estética. Além disso, em sua maioria esses compostos não são biodegradáveis, e causam redução da penetração da luz na água, afetando a atividade fotossintética. Muitos deles podem ser prejudiciais, uma vez que alguns são carcinogênicos e mutagênicos, tanto para organismos aquáticos quanto terrestres <sup>5,6</sup>.

As estações de tratamento de água possuem limitações no processo de remoção de algumas espécies poluidoras e conseqüentemente, a água destinada para consumo humano pode conter substâncias indesejadas, mesmo após passar por todo o processo de purificação. Sendo assim, corantes sintéticos, provenientes das mais diversas fontes podem causar danos à saúde, podendo ainda estar presentes na água potável, mesmo em baixas concentrações <sup>7,8</sup>. Diante disso, faz-se necessário o desenvolvimento de um método capaz de pré-concentrar essa espécie de forma a permitir sua detecção e quantificação, tendo em vista a promoção da saúde humana e animal.

No presente trabalho foi proposto o desenvolvimento de um dispositivo de eletroextração multifásico, para extrair e pré-concentrar o corante azul de metileno em amostras de água tratada destinadas ao consumo humano. As técnicas analíticas

empregadas para detecção e quantificação foram a espectrofotometria de absorção molecular no visível e a espectroscopia Raman.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Contaminação de águas por corantes

Os diversos resíduos provenientes das atividades industriais podem causar sérios impactos ao meio ambiente, em especial aos corpos hídricos. Dentre esses rejeitos, destacam-se os corantes presentes em várias vertentes da cadeia produtiva. Cabe ainda ressaltar que dentre as diversas fontes de contaminação de águas por esses compostos estão a indústria têxtil e a aquicultura.

#### 2.1.1 Indústria têxtil

A indústria têxtil está presente em todo o mundo e tem um significado importante nos âmbitos social, cultural, econômico e político devido a necessidade humana de vestuário e outros artigos úteis, como itens para casa, hospitais, decoração, dentre outros. Sendo assim, ao longo dos anos, a sociedade desenvolveu uma infraestrutura produtiva para fazer frente a uma demanda de larga escala no mercado interno e externo. Esta infraestrutura constitui uma grande rede de segmentos independentes, tais como o beneficiamento das fibras naturais, sua fiação e seu tingimento<sup>9</sup>.

No Brasil a indústria têxtil teve seu início no período colonial e apresenta grande importância para o país. Atualmente, o Brasil é uma referência mundial em design de moda praia, jeans e roupas para casa, apresentando grande crescimento nos segmentos *fitness* e *lingerie*, o que permite ao país ocupar a quarta posição na produção de malhas no mundo. Dados de 2017 da Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecções (ABIT) mostram que o faturamento anual da cadeia têxtil e de confecção foi de 51,58 bilhões de dólares<sup>9-11</sup>. Para suprir toda a demanda dessa cadeia produtiva, cerca de 10000 toneladas de corantes são consumidas pelo setor têxtil anualmente, em âmbito mundial, e são descarregados em água corrente aproximadamente 100 toneladas por ano<sup>12,13</sup>.

Muitos pesquisadores têm se empenhado na busca de métodos de remoção/degradação de corantes para tratamento dos efluentes têxteis. Dentre os vários trabalhos encontrados na literatura, pode-se citar o uso da fotocatalise para degradação do azul de metileno feita por Ferrari *et al.* (2019) e também por Satdeve e Bhanvase (2019); o uso do processo de adsorção, do mesmo corante, usando resíduos de fibra de algodão, descrito por Tenev *et al.* (2019); a aplicação da ultrafiltração realizada por Parakala *et al.* (2019) com o intuito de remoção do azul de metileno, dentre outros.<sup>14-17</sup>

A água residual é também constituída de outros componentes, tais como sais, agentes de limpeza, compostos clorados, surfactantes, dentre outros. No entanto, os corantes são os principais constituintes desses efluentes e os problemas a eles relacionados, são vários, dentre os quais pode-se citar a dificuldade de transferência de oxigênio, dificuldade de penetração da luz nos corpos d'água, com conseqüente interferência no processo fotossintético, afetando o equilíbrio do ecossistema aquático. Além disso, geram problemas de natureza estética bem como interferem na saúde animal e humana, uma vez que muitos corantes têxteis e seus metabólitos são tóxicos e carcinogênicos<sup>5,6,18</sup>. Tendo em vista os problemas supracitados, é imprescindível remover os corantes de águas residuárias, antes que essas se misturem aos corpos d'água receptores.

### **2.1.2 Aquicultura**

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, na sigla em inglês) introduziu em 1988 a definição para o termo aquicultura como o cultivo de organismos aquáticos incluindo peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas. Esse cultivo leva em consideração intervenções feitas no processo de criação das espécies aquáticas, com o objetivo de melhorar a produção, como alimentação, proteção contra predadores, incluindo também a aplicação de remédios no combate a doenças<sup>2,19</sup>.

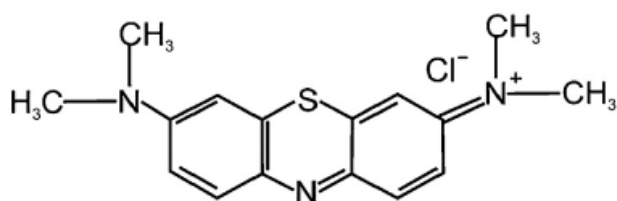
Dados da FAO de 2018 mostram que a aquicultura mundial é gerida principalmente pelos países da Ásia, sendo a China o maior produtor, seguida pela América com 4,2% e da Europa com 3,7%. No Brasil, a aquicultura tem-se desenvolvido fortemente nos últimos anos e estima-se que o país deve registrar um crescimento de 104% na produção da pesca e aquicultura em 2025. Mesmo estando longe da produção da Ásia, a América Latina e o Caribe vem mantendo uma das taxas de expansão aquícola mais elevadas do mundo<sup>20,21</sup>.

O aumento no consumo de pescados tem sido motivado pelos benefícios que geram à saúde, uma vez que fornece vários nutrientes importantes, como vitaminas D, A e B, minerais como cálcio, zinco, ferro, além de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, EPA (ácido eicosapentaenoico) e o DHA (ácido docosaenoico), os quais não são gerados pelo nosso organismo e precisam ser obtidos a partir de uma dieta saudável<sup>2,22</sup>. Por conseguinte, percebe-se a grande importância da manutenção da qualidade dos alimentos pelos produtores, mantendo-os adequados para o consumo humano. Logo a aplicação de antimicrobianos nas águas se faz necessário para garantir a saúde dos animais aquáticos. Porém, isso abre margem para o uso indiscriminado de produtos veterinários não permitidos, como os corantes, os quais podem causar conseqüências à saúde humana<sup>2,22</sup>.

Devido à grande preocupação com os riscos inerentes a contaminação por corantes em águas de aquicultura, muitos trabalhos têm sido publicados propondo novas formas de detecção desses compostos, tanto nas águas quanto nas espécies cultivadas nelas e que são destinadas ao consumo humano. Como exemplo desses trabalhos, tem-se a publicação de Xu *et al.* (2018) que detectaram o corante verde malaquita em água de aquicultura utilizando a pré-concentração eletroquímica associada ao espalhamento Raman intensificado pela superfície (SERS). Amelin *et al.* (2017) quantificaram o azul de metileno em diversos produtos aquáticos para fins alimentícios como truta, carpa, lagosta, dentre outros, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas.<sup>2-4,23-26</sup>

### 2.1.3 O azul de metileno como um contaminante

O azul de metileno ( $C_{16}H_{18}ClN_3S$ ), representado na **Figura 1**, é um corante catiônico da classe das fenotiazinas, se apresentando como um pó escuro e cristalino de massa molar igual a  $319,8 \text{ g mol}^{-1}$  com  $pK_a 1 = 5,5$  e  $pK_a 2 = 6,0$ <sup>27</sup>. Possui alta solubilidade em água,  $43,6 \text{ g L}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e tem absorção máxima na região do visível em  $664 \text{ nm}$ <sup>28</sup>. O azul de metileno (AM) embora não tenha toxicidade elevada, pode causar vários efeitos prejudiciais à saúde humana, como períodos rápidos de dificuldade de respiração por inalação; enquanto a ingestão produz uma sensação de queima e provoca náuseas, vômito, diarreia e gastrite. A ingestão de altas doses provoca dores no abdômen e tórax, dor de cabeça severa, transpiração abundante, confusão mental dentre outros sintomas<sup>1,6,29</sup>.



**Figura 1.** Estrutura molecular do corante azul de metileno.<sup>29</sup>

O AM é um dos corantes mais usados na indústria para tingir algodão, papel, seda, lã, dentre outros, além de ser usado para coloração temporária em cabelos<sup>28,29</sup>. Na aquicultura tem sido aplicado como antifúngico, devido a seu baixo custo frente a outros medicamentos veterinários<sup>30</sup>. Como consequência do vasto uso desse corante, há geração

de efluentes aquosos com quantidades consideráveis de azul de metileno, o que pode ocasionar problemas aos animais e aos seres humanos.

Os efluentes de origem doméstica e/ou industrial, são destinados às estações de tratamento de esgoto (ETEs) as quais tratam as águas residuais, para depois serem escoadas para o mar ou rio. Porém, segundo Starling *et al.* (2019), no Brasil essas estações de tratamento tratam até o estágio secundário e levam a uma remoção limitada de contaminantes, conseqüentemente as ETEs tem sido as principais fontes de contaminantes emergentes para o meio ambiente, uma vez que as águas saem dessas estações e são lançadas nas águas superficiais ou corpos receptores. Além disso, segundo dados do Sistema Nacional de Informações sobre o Saneamento (SNIS, 2018), apenas 46% do esgoto gerado no Brasil passa por tratamento. Isso quer dizer que os outros 54% são despejados diretamente nos corpos d'água, onde estações de tratamento de água (ETAs) fazem captação para tratamento e distribuição. Portanto, o descarte direto é outra fonte de contaminação dos corpos hídricos e como consequência a água destinada ao consumo humano pode conter resíduos de poluentes, mesmo após passarem por tratamento <sup>7,8,31</sup>. Não existem regulamentos oficiais ou leis sobre contaminantes emergentes em matrizes ambientais no Brasil. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece condições e padrões de lançamentos de efluentes em geral, porém muitos compostos como corantes, plastificantes, hormônios e outros geralmente não são regulamentados <sup>8,32,33</sup>.

A qualidade da água destinada ao consumo humano tem sido uma das preocupações apresentadas por diversos pesquisadores. Sanchez (2018) investigou e detectou parabenos em água tratada e mineral e Becerra-Herrera *et al.* (2018) analisou os mesmos compostos em água de torneira. Campestrini e Jardim (2017) encontraram cocaína e seu metabolito em 100% das amostras de água potável e Rozas *et al.* (2016) encontraram resíduos de cafeína, atrazina e triclosan em água de torneira <sup>32,34-37</sup>.

Uma vez que a purificação da água nas estações de tratamento, não é totalmente eficaz na eliminação de contaminantes, o azul de metileno pode estar presente na água para consumo humano. Esse corante pode servir como um marcador para outros compostos contaminantes persistentes na água tratada, ou seja, se houver resíduos desse composto, pode haver outros até mais prejudiciais à saúde e que não foram removidos após o processamento da água, como fármacos e hormônios por exemplo<sup>32</sup>.



#### 2.1.4 Preparo de amostra e técnicas analíticas para análise de azul de metileno em matrizes aquosas

Amostras de composição complexa como matrizes ambientais bem como aquelas com analitos em nível traço requerem um preparo prévio minucioso, de forma a possibilitar a eliminação dos interferentes e a pré-concentração da espécie de interesse. Sendo assim, o preparo da amostra contribui consideravelmente para o aumento da sensibilidade e da seletividade de uma análise <sup>38</sup>. Métodos de pré-tratamento de amostras como extração em fase sólida (SPE), extração líquido-líquido (LLE), cromatografia de permeação em gel (GPC), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), extração por ponto nuvem (CPE), e extração acelerada por solventes (PLE), tem sido empregadas para a análise de corantes sintéticos em diversas matrizes, inclusive em amostras de interesse ambiental como corpos d'água <sup>39-44</sup>. Aliadas a esses diferentes métodos de preparo de amostra, diversas técnicas analíticas podem ser utilizadas para a determinação de corantes em águas. No entanto, a técnica de maior destaque é a espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (EAM-UV/Vis), relatada em vários trabalhos <sup>29,45-47</sup>.

Na literatura, predomina as publicações com diversas propostas de novas tecnologias e materiais adsorventes para a retirada/degradação do azul de metileno de matrizes aquosas, em detrimento daquelas que são relativas ao preparo da amostra, que tem o objetivo de pré-concentrar, determinar e/ou quantificar esse corante <sup>6,14-17,45,46,48,49</sup>. Apesar do vasto número de trabalhos publicados com o intuito de remediar o problema da contaminação da água pelo azul de metileno, o preparo da amostra seguido da detecção e quantificação desse corante não é muito explorada na literatura, como pode ser visto na **Tabela 1**, a qual apresenta trabalhos dos últimos nove anos, em que os autores fazem a quantificação desse corante em diversas matrizes aquosas.

**Tabela 1.** Trabalhos descritos na literatura que determinam o corante azul de metileno em matrizes aquosas.

Amostra de água	Preparo de amostra	Técnica analítica	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )	Faixa linear (mg L <sup>-1</sup> )	Ref
Residual	SALLE	EAM-UV/Vis	0,20	0,06	0,20 – 7,00	50
Efluente industrial	SPE	UPLC-MS/MS	1,00 x 10 <sup>-4</sup>	4,00 x 10 <sup>-4</sup>	1,00 x 10 <sup>-5</sup> – 5,00 x 10 <sup>-3</sup>	51
Residual, rio, chuva, torneira, lago	DLLME	EAM-UV/Vis	7,90 x 10 <sup>-4</sup>	2,60 x 10 <sup>-3</sup>	5,00 x 10 <sup>-3</sup> – 3,00	42
Rio, efluente e água engarrafada	MSPE-DLLME	HPLC-UV	5,00x 10 <sup>-5</sup>	1,60 x 10 <sup>-4</sup>	2,00 x 10 <sup>-4</sup> – 1,00 x 10 <sup>-2</sup>	52
Residual doméstica, rios.	DSPE-CPE	EAM-UV/Vis	6,50 x 10 <sup>-4</sup>	2,05 x 10 <sup>-3</sup>	2,00 x 10 <sup>-3</sup> – 3,00 x 10 <sup>-1</sup>	53
Água tridestilada fortificada	-	SERRS	7,47 x 10 <sup>-5</sup>	2,27 x 10 <sup>-4</sup>	1,60 x 10 <sup>-5</sup> - 4,50 x 10 <sup>-2</sup>	27
Água tridestilada fortificada	-	EAM-UV/Vis	0,19	0,58	0,20 - 6,80	27

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; Ref: referência; SALLE: extração líquido-líquido assistida pelo efeito *salting out* ; EAM-UV/Vis: espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta e visível; SPE: extração em fase sólida; UPLC-MS/MS: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial; DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva; MSPE: extração em fase sólida magnética; HPLC-UV: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta e visível ; DSPE: extração em fase sólida dispersiva, CPE: extração em ponto nuvem; SERRS: Espalhamento Raman ressonante intensificado pela superfície.

## 2.2 Eletroextração

Nos últimos anos, o emprego de campo elétrico combinado com as técnicas de pré-concentração convencionais tem sido proposto para auxiliar os processos de extração, gerando redução do tempo de preparo de amostras e um aumento da eficiência. São exemplos de técnicas que utilizam essa abordagem: a eletroextração em fase sólida (E-SPE), a eletrodialise, a qual é uma das técnicas pioneiras de eletroextração utilizada em preparo de amostras, a eletroextração em membrana (EME) e as eletroextrações multifásicas que não utilizam nenhum suporte físico para a camada orgânica como as apresentadas nos trabalhos de Raterink *et al.* (2013), Orlando *et al.* (2019) e Sousa *et al.* (2020), as quais baseiam-se na migração eletroforética seletiva, de espécies eletricamente carregadas, de uma solução doadora (amostra) para uma solução acceptora<sup>38,54–56</sup>.

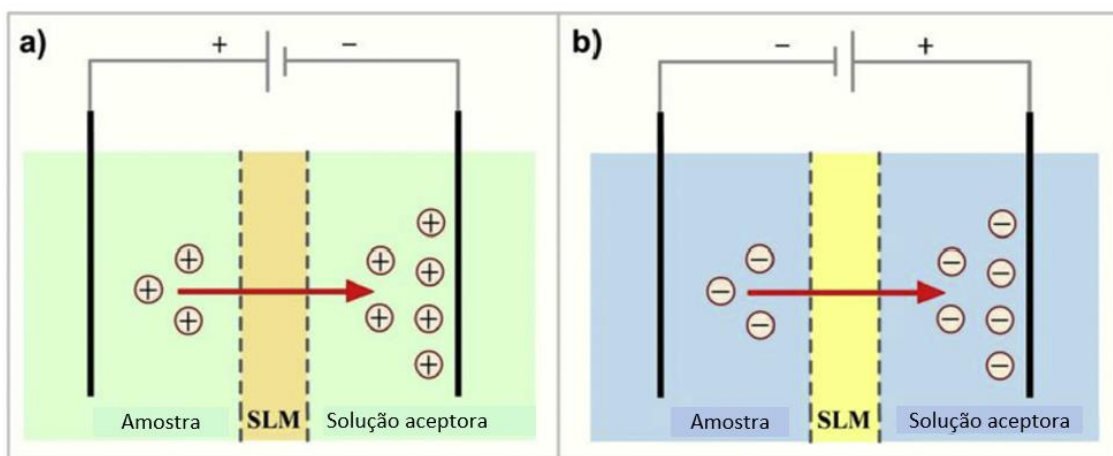
A extração líquido-líquido impulsionada por campo elétrico foi introduzida no início da década de 1990 por Stichlmair *et al.* (1992). Porém, a maior exploração da aplicação de uma diferença de potencial em preparo de amostras se deu a partir do trabalho de Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (2006), os quais descreveram a extração de espécies ionizadas de uma amostra aquosa passando através de uma fase orgânica imiscível, para uma outra fase aquosa acceptora pela ação do potencial elétrico com uma corrente contínua. Essa técnica foi denominada eletroextração em membrana (EME)<sup>57,58</sup>.

### 2.2.1 Eletroextração em membrana

A EME foi desenvolvida a partir da microextração em fase líquida de fibra oca (HF-LPME) na qual os analitos são transferidos da amostra para a fase acceptora devido à ação de forças difusivas e convectivas. A EME por sua vez, é uma técnica híbrida que envolve eletroforese e partição, já que com a aplicação do campo elétrico, as espécies carregadas migram em direção ao polo de carga contrária, devido à suas respectivas mobilidades eletrocinéticas<sup>38,59</sup>

Na EME os analitos presentes na amostra aquosa devem estar na forma ionizada, o que geralmente é obtido pela acidificação do meio quando o analito é básico ou pela alcalinização quando as espécies a serem extraídas são ácidas. As espécies, uma vez carregadas, migram da amostra para a fase acceptora aquosa, através de uma fase orgânica imiscível, a qual é impregnada em uma membrana porosa de polipropileno, que recebe o nome de membrana líquida suportada ou SLM (*supported liquid membrane*). Quando as espécies ionizadas atingem a interface entre a fase doadora e a SLM, elas migram para essa

segunda fase por partição e por ação do campo elétrico aplicado. Os analitos extraídos deixam então a SLM e são liberados na fase aceptora aquosa a qual deve também estar acidificada, no caso de analitos básicos, para que as espécies de interesse se mantenham em sua forma protonada e sejam então pré-concentrados nessa fase, evitando a ocorrência de uma retromigração. Componentes da matriz como íons e proteínas, bem como outras espécies interferentes de baixa e alta massa molecular, são eficientemente retidos na SLM, proporcionando um processo de *clean-up*<sup>60</sup>. Na **Figura 2** está representado o esquema da EME para espécies básicas (a), as quais estão positivamente carregadas, e as espécies ácidas (b), negativamente carregadas<sup>59</sup>.



**Figura 2.** Esquema ilustrativo da EME para a) cátions e b) ânions. SLM: membrana líquida suportada. Fonte: Adaptado de Huang et al (2017)<sup>59</sup>.

A EME é um processo misto de eletroforese e partição, porém a transferência de massa é devida principalmente a migração eletrocínética<sup>61</sup>, nesse sentido dois modelos matemáticos foram introduzidos para descrever a transferência de analitos carregados na EME. O primeiro proposto por Gjelstad *et al.* (2007) é um modelo de transferência de massa em estado estacionário o qual descreve o fluxo dos analitos através da SLM na EME. No entanto, este não revela o impacto do tempo de extração na eficiência da eletroextração em membrana<sup>62</sup>. Posteriormente, foi proposto um modelo dependente do tempo para simular a transferência de massa através da SLM, e esse baseia-se em três suposições: 1) existe um tempo de atraso na extração, que é determinado pelo tempo de permanência do analito na SLM; 2) a convecção da amostra para a solução aceptora é eficiente sendo que o gargalo da transferência de massa é a travessia na SLM; e 3) a migração de analitos na SLM é unidirecional. Esse último modelo, está de acordo com a maioria das observações

experimentais e indica que a afinidade da SLM com os analitos e a área de contato entre as fases afeta fortemente a eficiência da EME<sup>59,61,63</sup>.

Diante disso, o processo de eletroextração, como uma função do tempo ( $t$ ) pode ser descrito pela Equação 1 e Equação 2, em que  $C_{A_i}(t)$  é a concentração, dependente do tempo, do analito  $i$  na fase aceptora e o tempo de residência desse na SLM é  $t_{lag}$ . Para  $t < t_{lag}$  a concentração do analito na fase aceptora é zero, e para  $t \geq t_{lag}$  a concentração na fase aceptora é regida pela Equação 2, em que  $V_D$  é o volume de amostra na fase doadora;  $C_{D_i}^0$  é a concentração original do analito na amostra;  $C_{D_i}(t)$  é a concentração do analito na amostra em função do tempo;  $k_d^*$  é o coeficiente de distribuição do analito dependente da voltagem;  $V_m$  é o volume da SLM;  $V_A$  é o volume da fase aceptora<sup>60</sup>.

$$C_{A_i}(t) = 0 \quad \text{para } t < t_{lag} \quad \text{Equação 1}$$

$$C_{A_i}(t) = \frac{V_D C_{D_i}^0 - C_{D_i}(t) (V_D + k_d^* V_m)}{V_A} \quad \text{para } t \geq t_{lag} \quad \text{Equação 2}$$

Na Equação 3 é mostrado o cálculo para o coeficiente de distribuição, o qual está diretamente relacionado a  $\Delta_0^w \varphi$  que é a diferença de potencial de Galvani entre a solução da amostra e a SLM e  $\Delta_0^w \varphi$  por sua vez, é proporcional à diferença de potencial (E) aplicada entre a fase doadora e aceptora;  $Z_i$  é a carga do analito  $i$ ;  $F$  é a constante de Faraday;  $R$  é a constante dos gases ideais;  $T$  é a temperatura absoluta;  $\Delta_0^w \varphi_i^0$  é uma propriedade da hidrofobicidade relacionada ao analito  $i$ <sup>60</sup>.

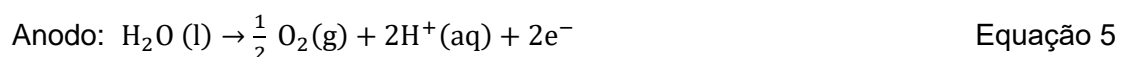
$$k_d^* = \exp\left(\frac{Z_i F}{RT} (\Delta_0^w \varphi - \Delta_0^w \varphi_i^0)\right) \quad \text{Equação 3}$$

Por fim,  $C_{D_i}(t)$  que também aparece na Equação 2 é a concentração do analito na amostra em função do tempo, a qual é calculada de acordo com a Equação 4. Onde  $A_f$  e  $P_i^{D \rightarrow A}$  são a área superficial ativa da SLM e a constante de permeabilidade do analito nessa, respectivamente<sup>60</sup>.

$$C_{D_i}(t) = C_{D_i}^0 \exp\left(\frac{-A_f P_i^{D \rightarrow A}}{V_D} t\right) \quad \text{Equação 4}$$

Diante das equações aqui expostas, verifica-se que a eficiência de extração na EME aumenta com: 1) o tempo de extração até certo tempo de equilíbrio; 2) aumento da diferença de potencial elétrico, até um certo nível; 3) diminuição do volume da amostra; 4) aumento da área superficial da SLM <sup>60</sup>.

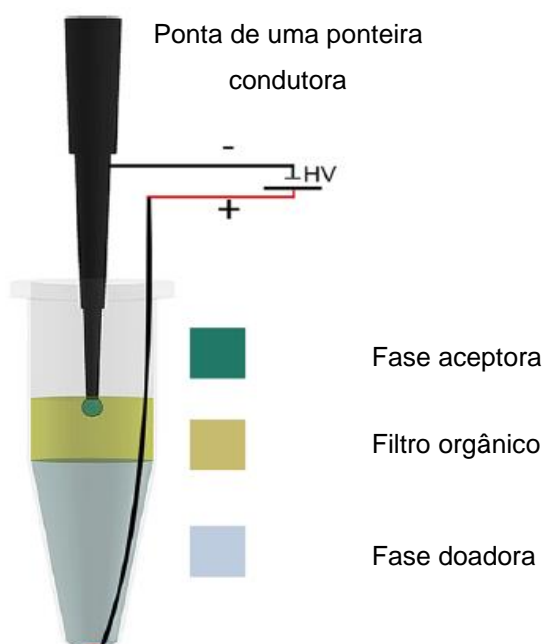
É importante ressaltar que a composição da SLM é um dos parâmetros determinantes para uma extração eficiente e para a seletividade do processo extrativo. Um solvente ideal deve ter baixa solubilidade em soluções aquosas, para que haja estabilidade operacional e evite vazamentos da SLM durante a extração. Além disso, o solvente não pode ser volátil, para evitar perdas durante o processo da EME, deve possuir baixa viscosidade para permitir o transporte dos íons, possuir afinidade adequada pelos analitos de maneira a propiciar uma boa extração e deve possuir ainda baixa condutividade de forma a evitar uma alta corrente no sistema. Uma corrente elétrica excessiva deve ser evitada, uma vez que altos valores podem ocasionar instabilidade no sistema, como a formação de bolhas na superfície dos eletrodos proveniente do processo de eletrólise, como mostrado nas equações químicas representadas na Equação 5 e Equação 6. A eletrólise sempre ocorre na EME e depende da corrente elétrica gerada, porém seu aumento indiscriminado, afeta significativamente o desempenho da eletroextração, devido à alteração notável do pH das fases. No entanto, para evitar essas alterações de pH, soluções tampão podem ser usadas tanto na fase doadora quanto na aceptora. Valores controlados de corrente elétrica e consequente redução da eletrólise podem ser obtidos com a seleção adequada do solvente da SLM, o qual é a parte mais resistiva do sistema e também pelo controle do potencial elétrico aplicado <sup>59,60</sup>



### 2.2.2 A evolução da eletroextração

Com o intuito de melhorar a recuperação e / ou a taxa de transferência dos analitos, várias configurações de EME já foram desenvolvidas ao longo dos anos e um dos arranjos proposto é aquele que não inclui nenhum suporte físico para a camada orgânica <sup>60</sup>. O primeiro aparato desenvolvido desse tipo, foi publicado no ano de 2013 por Raterink e colaboradores e ficou conhecido como eletroextração trifásica o qual usa uma arquitetura vertical e uma diferença de densidade entre solventes para formar uma camada orgânica <sup>64</sup>

Raterink *et al.* (2013) desenvolveram um novo método de purificação e enriquecimento de acilcarnitinas em amostras biológicas em uma eletroextração líquido-líquido de três fases, sem a utilização de membrana para suportar o filtro orgânico, conforme mostrado na **Figura 3**. Neste trabalho, os autores desenvolveram um sistema que consiste em aplicar uma diferença de potencial entre dois eletrodos, um posicionado na solução aquosa doadora (amostra) e o outro na solução aceptora (gota suspensa por uma ponteira condutora). Entre a fase doadora e aceptora foi colocado um solvente orgânico que funcionou como filtro, impedindo, por exemplo, a migração de interferentes entre as fases. O campo elétrico aplicado, promoveu a eletromigração do analito para a gota e essa foi diretamente analisada por espectrometria de massas com ionização por nano eletronebulização (nanoESI-MS) em um sistema automatizado. O aparato desenvolvido por Raterink *et al.* (2013) foi eficiente para preparação de amostras em bioanálises, uma vez que a fase orgânica impediu que as proteínas fossem transportadas para a fase aceptora, conferindo seletividade ao sistema <sup>64</sup>.

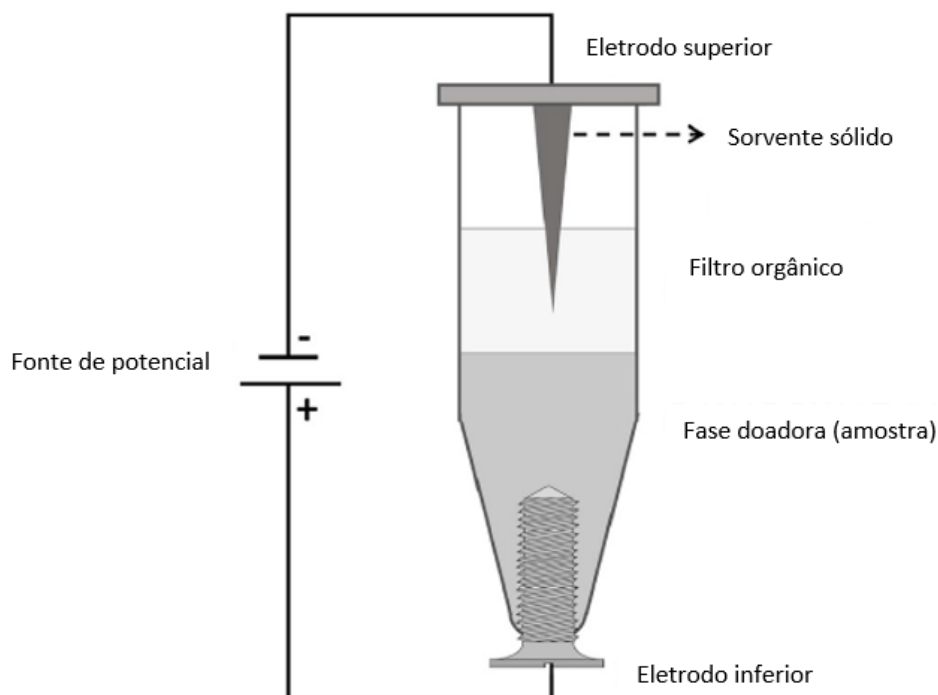


**Figura 3.** Ilustração esquemática do sistema de eletroextração trifásica para extração de analito catiônico. Fase aceptora: solução aquosa constituída de 33% de metanol e 5% de ácido fórmico; Filtro orgânico: mistura de acetato de etila e acetato de metila (3:2); Fase doadora: plasma humano fortificado com acilcarnitinas, diluído dez vezes em 33% de metanol e 5% de ácido fórmico Fonte: Adaptado de RATERINK *et al.* (2013).

Apesar das vantagens que o sistema proposto por Raterink *et al.* (2013) apresenta, esse dispositivo também possui uma série de limitações, como por exemplo, baixa capacidade extrativa, baixa estabilidade química e física da gota constituinte da fase acceptora, pequeno volume capaz de ser sustentado pela ponteira e impossibilidade de aplicação de altos valores de potencial, o que reduz o poder de recuperação dos analitos. Diante disso, no ano de 2017, Orlando e colaboradores do LaMS (Laboratório de microfluidica e separações) do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) desenvolveram e patentearam um novo sistema com a finalidade de contornar essas limitações. Nessa nova configuração os pesquisadores utilizaram um cone odontológico feito de papel como suporte para a fase acceptora, o que visou substituir a gota suspensa proposta no sistema de Raterink *et al.* (2013), conferindo maior capacidade sortiva devido a maior área superficial e maior estabilidade à fase acceptora, o que permite a aplicação de potenciais maiores. Além dessas vantagens, o formato em cone com uma extremidade pontiaguda do sorvente, auxilia na concentração de cargas, o que faz com que o campo elétrico fique mais efetivo nessa região e conseqüentemente proporcione melhor extração<sup>65</sup>.

O uso de um suporte sólido para receber o analito em um sistema de extração aplicando campo elétrico ainda não é bem difundido na literatura, porém posteriormente a patente de Orlando *et al.* (2017), outros dois trabalhos foram publicados recentemente, usando o mesmo sistema. Orlando *et al.* (2019) procedeu a eletroextração do corante catiônico violeta de genciana em extrato de tecidos de peixe, e esse analito foi posteriormente quantificado por análise de imagens digitais. Pouco tempo depois, Sousa *et al.* (2020) realizou a eletroextração de cocaína em saliva e fez a quantificação, por UHPLC-MS/MS<sup>55,56</sup>. Portanto, o uso do material sorvente na fase acceptora, para as extrações assistidas por campo elétrico possibilita que após a extração dos analitos, o suporte sólido seja usado para leituras diretas, como no caso das imagens digitais, feitas por Orlando *et al.* (2019) ou ainda que seja transportado, armazenado e dessorvido quando necessário, para posterior análise por técnicas analíticas apropriadas, como cromatografia, por exemplo. A **Figura 4**, ilustra o sistema desenvolvido por Orlando e colaboradores no ano de 2017 e utilizado nos dois últimos trabalhos supracitados<sup>55,56</sup>





**Figura 4.** Ilustração esquemática do sistema multifásico utilizando suporte sólido na fase aceitadora. Fase aceitadora: cone odontológico embebido em ácido acético; Filtro orgânico: 1-octanol; Fase doadora: saliva:ACN (50:50, v/v); Fonte: Adaptado de Sousa *et al.* (2020).

A evolução da técnica de extração aplicando campo elétrico com a introdução de um suporte sólido na fase aceitadora abriu novas possibilidades para o preparo de amostras, uma vez que esse material sólido, após receber o analito, pode ser armazenado, transportado, dessorvido para posterior análise ou ainda usado para leitura direta, fazendo uso de análise de imagens digitais, por exemplo. As extrações feitas nessa nova configuração, destacam-se pela capacidade de *clean-up*, maior cinética de extração, poder de pré-concentração e seletividade, além de permitir múltiplas extrações<sup>55,56</sup>. No entanto, o sistema apresentado por Sousa *et al.* (2020) e Orlando *et al.* (2019) possui algumas desvantagens, como: suporte sólido limitado ao cone odontológico, impossibilidade de agitação, além de estar restrito a pequenos volumes de amostra (2 mL)<sup>55,56</sup>.

Diante do crescente aprimoramento das pesquisas nessa área, o presente trabalho apresenta uma nova configuração do sistema de eletroextração multifásica, a qual é parte da patente de número BR 10 2019 017861 2 desenvolvida e depositada durante a pesquisa de mestrado referente a essa dissertação<sup>66</sup>. Diferentes aplicações da tecnologia patenteada podem ser consultadas também nos trabalhos de Resende (2019) e Viana (2019)<sup>67,68</sup>. O trabalho aqui proposto refere-se ao desenvolvimento de um novo sistema,

que permite a análise de grandes volumes (35 mL) de amostra, com a possibilidade do emprego da agitação magnética, utilizando um suporte sólido para a fase aceptora, além de permitir múltiplas extrações simultâneas.

### 2.3 Espalhamento Raman Intensificado por Superfície

A espectroscopia Raman baseia-se no uso de uma fonte monocromática de luz visível ou no infravermelho próximo (NIR), a qual ao ser irradiada sobre um material é espalhada em todas as direções, de forma elástica e em menor proporção de forma inelástica, ou seja, com energia igual ou diferente da energia da luz incidente. Com o espalhamento inelástico é possível obter informações importantes sobre a composição química da amostra sobre a qual se aplica o laser. A diferença entre a energia da radiação incidente e a espalhada corresponde à energia com que átomos presentes na amostra em estudo estão vibrando e essa frequência de vibração diz como os átomos estão ligados, fornecendo informações sobre a geometria molecular e as interações das espécies, permitindo assim sua identificação inequívoca. O espectro Raman, o qual é como a impressão digital da amostra, é representado como a intensidade da radiação espalhada em função de sua energia (dada em uma unidade chamada de número de onda e expressa em  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>69,70</sup>.

A intensidade ( $I$ ) de um sinal Raman é determinada por alguns parâmetros como a intensidade da radiação do laser incidente ( $I_0$ ), número de espalhadores ( $N$ ), energia da radiação incidente ( $\nu$ ) e taxa de variação da polarizabilidade com a vibração molecular ( $(\partial\alpha/\partial Q)_0$ ), como explicitado na Equação 7<sup>71</sup>.

$$I \propto I_0 \cdot N \cdot \nu^4 \cdot \left(\frac{\partial\alpha}{\partial Q}\right)_0^2 \quad \text{Equação 7}$$

Um dos entraves da espectroscopia Raman ordinária como técnica analítica é a baixa probabilidade de que um fóton seja espalhado inelasticamente. Em geral apresenta seções de choque de espalhamento inelástico baixa (cerca de  $10^{-30} \text{ cm}^2 \text{ Sr}^{-1} \text{ molécula}^{-1}$ ) o que a torna pouco sensível. Além disso, esta técnica é sujeita a interferência causada pela fluorescência da amostra, a qual compete com o sinal Raman<sup>72,73</sup>.

Observando-se a Equação 7, vê-se que a intensidade do sinal pode ser ampliada aumentando-se energia da radiação incidente ( $I_0$ ), ou o número de espalhadores ( $N$ ) já que ( $\nu$ ) e  $(\partial\alpha/\partial Q)_0$  são invariantes para uma dada linha de laser. Preparando-se soluções mais concentradas por exemplo, pode-se aumentar ( $N$ ), porém nem sempre é possível e/ou desejável e o aumento de ( $I_0$ ) pode gerar degradação da amostra. Diante dessa limitação

inerente à técnica é clara a necessidade de se buscar formas de intensificação do sinal Raman. Neste sentido, uma das maneiras de se promover essa melhoria é através do efeito de intensificação do espalhamento Raman por superfície (SERS – *Surface Enhanced Raman Scattering*). O efeito SERS é observado quando uma espécie química está próxima ou adsorvida sobre uma superfície metálica rugosa com a qual a amostra pode interagir química e fisicamente, permitindo um aumento significativo da intensidade Raman<sup>71,72</sup>.

Os mecanismos de intensificação SERS são bem complexos, mas podem ser simplificados em termos de duas contribuições, uma do modelo químico e outra decorrente do modelo eletromagnético. O primeiro é devido às mudanças na polarizabilidade molecular, associada a transferência de carga entre as moléculas espalhadoras e a superfície metálica. O segundo é decorrente da grande intensificação do campo elétrico próximo a superfície do metal devido a ressonância com o plasmon de superfície desse<sup>74</sup>. Apesar de ambos os mecanismos contribuírem para a intensificação, é consenso na literatura que a contribuição do mecanismo eletromagnético é substancialmente maior<sup>71</sup>.

Os metais são caracterizados pela presença de elétrons livres, os quais oscilam com uma certa frequência de forma que na interface desse metal com um dielétrico (ar ou água por exemplo) essas oscilações adquirem uma frequência tal, denominada frequência de plasmon de superfície. Para que o efeito SERS seja observado, esses plasmons de superfície devem ser excitados pela radiação eletromagnética incidente e devem estar localizados em superfícies nanoestruturadas. Sendo que as nanoestruturas ou a rugosidade superficial no caso de substratos contínuos, tem a função de permitir a interação entre o fóton incidente e o plasmon de superfície. Diante disso, com a ressonância, o campo elétrico local nas vizinhanças das nanopartículas ou da superfície metálica rugosa, é intensificado em grande proporção. Assim, a presença de superfícies metálicas nanoestruturadas proporciona a intensificação do sinal por fatores da ordem de  $10^6$  vezes, permitindo o uso da espectroscopia Raman de forma muito mais abrangente, possibilitando a análise de espécies em concentrações nas escalas de nano-, pico- e fentograma<sup>71,73</sup>. Os metais nobres, como prata e ouro, são dominantes como substrato material para SERS devido aos enormes fatores de intensificação induzidos pelo efeito eletromagnético. O uso do efeito SERS para a investigação de corantes em matrizes alimentícias, moléculas de interesse biológico, poluentes ambientais como corantes e pesticidas em água, dentre outros, já foram relatados na literatura, mostrando a potencialidade dessa técnica com base em sua sensibilidade e capacidade de diminuição da fluorescência<sup>23,30,75–78</sup>.

A espectroscopia Raman permite que se explorem efeitos especiais de intensificação do sinal pelo uso do efeito SERS, além de não requerer tratamentos laboriosos

da amostra e nem grandes quantidades dessa. Permite curtos tempos de análise e não exige gasto com solventes orgânicos com conseqüente geração de resíduos, como em outras técnicas utilizadas para estudo de corantes, como a cromatografia.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo geral**

Este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de um método para detecção e quantificação do azul de metileno em água tratada, utilizando um novo dispositivo de eletroextração multifásica para grandes volumes de amostra, como técnica de extração e pré-concentração do analito e EAM-UV/Vis e SERS como técnicas de análise.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Construir e avaliar o sistema de eletroextração multifásica;
- Avaliar a capacidade de sorção/dessorção do azul de metileno em diferentes materiais sorventes para a fase aceptora;
- Avaliar o desempenho e a reprodutibilidade da extração do azul de metileno em diferentes configurações do sistema de eletroextração multifásica;
- Aplicar um planejamento fracionário para triagem das variáveis significativas na extração do azul de metileno;
- Otimizar as variáveis significativas da eletroextração através de um planejamento do tipo Box - Behnken;
- Validar o método utilizando a EAM-UV/Vis como técnica de análise;
- Fazer uma avaliação qualitativa do efeito SERS em diferentes concentrações de corante azul de metileno provenientes das soluções de dessorção.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais e reagentes

Os materiais sorventes testados foram:

- Sílica gel 60-200 mesh (JT Baker)
- Algodão marca Apollo®
- Florisil® 60-100 mesh (Sigma Aldrich)
- Cone odontológico de papel n° 60 (Tanari)

Os reagentes usados foram todos com pureza grau analítico ou superior:

- Azul de metileno (Synth)
- Ácido acético glacial (Synth)
- Ácido clorídrico (Merck)
- Ácido cítrico (Synth)
- Fosfato de sódio bibásico (Synth)
- 1-octanol (Neon)
- 2-etilhexanol (Sigma Aldrich)
- Acetonitrila grau HPLC (Merck)
- Metanol grau HPLC (Merck)
- Etanol (Synth)
- Água deionizada (18,2 MΩ cm) por deionizador Simpак® (Merck)

### 4.2 Equipamentos

- Homogeneizador de soluções da marca Kacil modelo HM01-A
- Bomba a vácuo Dia-Pump®
- Fonte de eletroforese da marca KASVI modelo K33- 300 V
- Agitador do tipo vortex marca Velp Scientifica modelo ZX classic
- Balança analítica marca Shimadzu modelo ATX224
- Espectrofotômetro UV-Vis marca Agilent modelo Cary 60

- Microcomputador Pentium (Intel) contendo: sistema operacional Microsoft Windows XP, programa de aquisição de dados Multi Meter Interface (versão Build 07.12.051339) com uma entrada RS-232.
- Multímetro (Tekpower) modelo TP4000ZC com um comunicador RS-232 (EUA) conectado ao microcomputador;
- Ultrassom da marca Ney ULTRASONIK, modelo 28H
- Furadeira de bancada Motomil 245W Mandril 1/2" FBH 130i
- Centrifuga marca Centribio
- pHmetro JK-PHM-005, marca JKI
- Sistema de eletroextração multifásico para grandes volumes de amostras BR1020190178612
- Espectrômetro Raman marca Horiba modelo T64000

#### **4.3 Materiais para construção do sistema de eletroextração multifásico**

Para a montagem do sistema multifásico de eletroextração desenvolvido nesse trabalho, utilizou-se materiais de baixo custo, facilmente encontrados em laboratório ou acessíveis no comércio, como a palha de aço inoxidável, por exemplo, encontrada em supermercado e os eletrodos construídos a partir de linha de aço inoxidável encontrados em lojas de artigos para pesca. Esses materiais estão relacionados abaixo e foram usados para montagem do sistema de eletroextração.

- Tubos cônicos de polipropileno de 50 mL (Tipo Falcon Cralplast®)
- Ponteiros de micropipetas 100-1000 µL (Tipo Gilson, Olen®);
- Eletrodo de aço inoxidável do tipo haste
- Eletrodo de aço inoxidável do tipo espiral
- Mangueira de silicone de diâmetro interno 3,2 mm
- Barras magnéticas (0,7 x 1 mm)
- Palha de aço inoxidável (Scotch Brite®)
- Batoques de vedação

## 4.4 Parte Experimental

### 4.4.1 Preparo da solução estoque e intermediária de azul de metileno

A solução estoque de azul de metileno (AM)  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  foi preparada usando o corante em pó e diluindo esse em água ultrapura, sendo armazenada em frasco âmbar e geladeira a  $4^\circ\text{C}$ . Todas as soluções intermediárias de concentrações menores que a estoque, necessárias ao trabalho, foram preparadas no momento do uso. Para acompanhamento da estabilidade do corante, uma solução de AM de concentração  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  foi monitorada pelo seu espectro de absorção no UV-Vis durante o período de execução do presente trabalho.

### 4.4.2 Preparo das soluções tampão McIlvaine

A soluções tampão McIlvaine nos diferentes valores de pH testados, foram preparadas pela mistura de soluções de ácido cítrico  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  e fosfato de sódio bibásico  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  nas proporções apresentadas na **Tabela 2**.

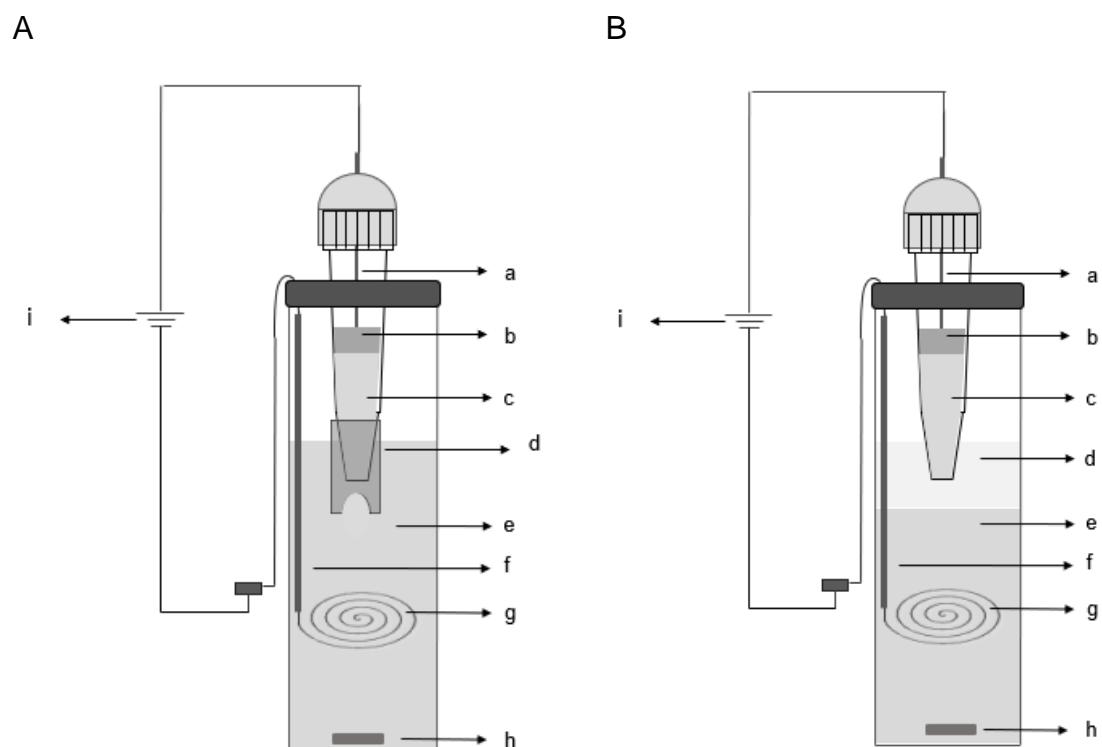
**Tabela 2:** Volumes de fosfato de sódio bibásico e de ácido cítrico usados para o preparo de 20 mL das soluções tampão nos diferentes valores de pH <sup>79</sup>.

pH	$0,20 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (mL)	$0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cítrico (mL)
2,00	0,40	19,60
3,00	4,11	15,89
5,00	10,30	9,70
6,00	12,63	7,37
7,00	16,47	3,53

### 4.4.3 Montagem e funcionamento do sistema multifásico de eletroextração

A **Figura 5** mostra duas configurações do sistema multifásico de eletroextração utilizado nesse trabalho. Em “A” tem-se o sistema com restritor de volume para o filtro orgânico e em “B” tem-se o filtro orgânico livre.

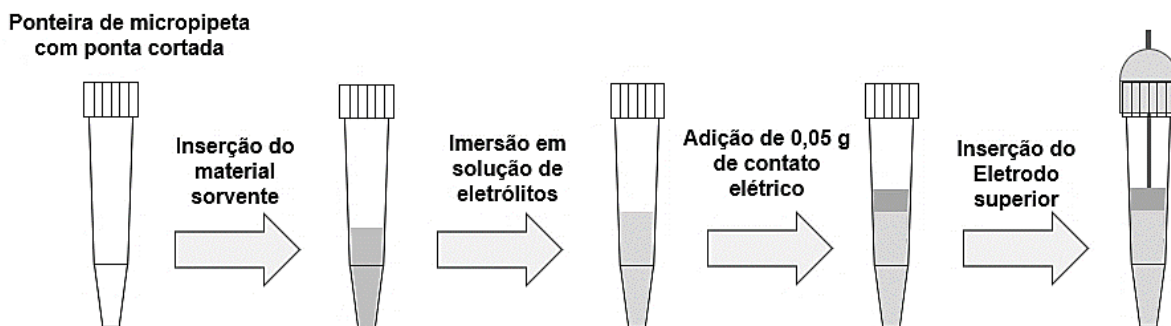




**Figura 5.** Desenho esquemático para o sistema de eletroextração multifásico para amostras em grandes volumes (35 mL). (A) configuração com restritor de volume para filtro orgânico; (B) configuração com filtro orgânico livre. (a) eletrodo superior; (b) contato elétrico; (c) suporte sólido com eletrólito (fase aceptora); (d) filtro orgânico; (e) fase doadora; (f) mangueira de teflon isolante do eletrodo; (g) eletrodo inferior; (h) barra magnética; (i) fonte de diferença de potencial. Adaptado de BR10 2019 017861 2 <sup>66</sup>.

Para a montagem do sistema visto na **Figura 5**, colocou-se em um frasco de polipropileno, uma barra magnética, a fase doadora e o filtro orgânico. No caso do sistema com restritor de volume para o filtro, foi usada uma mangueira de silicone de 10 mm de comprimento e 3,2 mm de diâmetro interno, para conter o filtro orgânico.

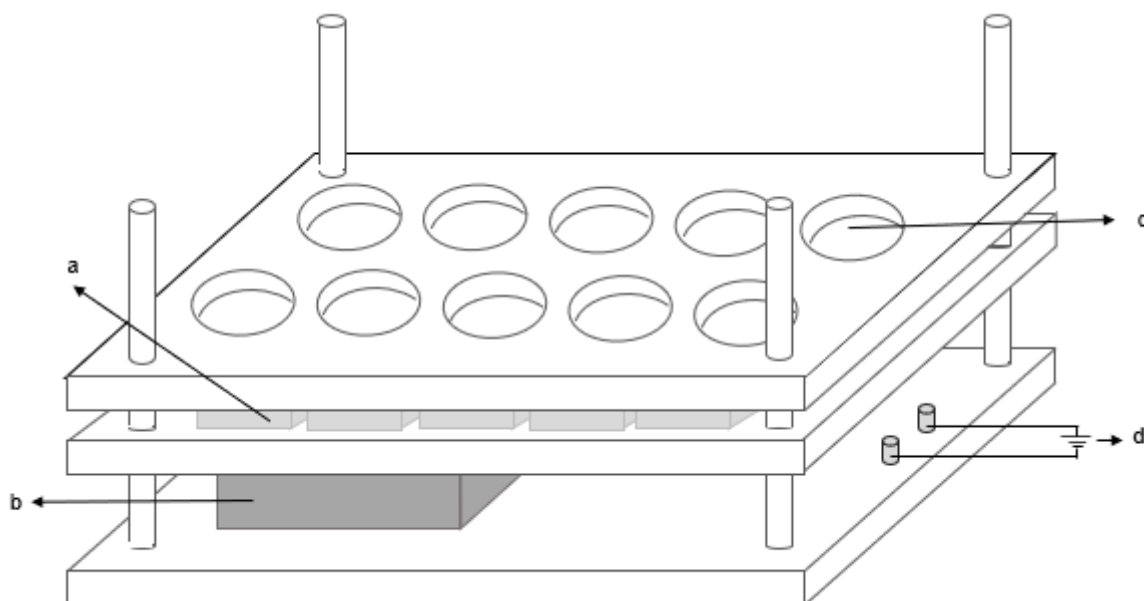
Para a montagem da parte superior desse sistema, ponteiros de micropipetas contendo a fase aceptora, foram montadas conforme mostrado na **Figura 6**.



**Figura 6.** Desenho esquemático do processo de montagem das ponteiras de micropipeta contendo a fase aceptora. Adaptado de Resende, 2019. <sup>68</sup>

As ponteiras foram cortadas em suas pontas de forma a aumentar a área superficial de contato do material sorvente com o filtro orgânico, sendo o diâmetro da ponta após o corte de 2 mm para a ponteira com restritor de volume e de 3 mm para a ponteira usada no sistema com filtro livre. Em seguida acomodou-se o material sorvente (suporte sólido para a fase aceptora), previamente pesado, no interior dessa ponteira. Na sequência, o material sorvente foi embebido em 15  $\mu\text{L}$  de solução de eletrólitos e então colocou-se um pedaço de palha de aço inoxidável (aproximadamente 0,0500 g) para se fazer o contato elétrico, adicionando-se por último o eletrodo superior. Após essa montagem, esse conjunto foi encaixado no frasco contendo a fase doadora.

Para a realização das eletroextrações, os frascos representados na **Figura 5** foram acoplados nos poços da base multipoços, representada na **Figura 7**.



**Figura 7.** Esquema ilustrativo do dispositivo multipoços para eletroextração onde são apresentados (a) o dispositivo de agitação magnética, (b) a fonte de alimentação de energia, (c) o poço para posicionamento do tubo de eletroextração e (d) os terminais elétricos ligados a fonte de diferença de potencial. Adaptado de BR10 2019 017861 2 <sup>66</sup>.

A base multipoços permite 10 análises simultâneas. Ela possui um sistema de agitação magnética, gerada por ventoinhas de computadores, que proporcionam uma rotação de aproximadamente 1400 rpm, que pode ser acionada ou não e permite a aplicação de uma diferença de potencial pela conexão dos eletrodos com uma fonte de eletroforese, utilizando cabos e conectores.

#### **4.4.4 Processo de dessorção do corante azul de metileno eletroextraído do material sorvente.**

Após o processo de eletroextração, a ponteira contendo a fase aceptora foi retirada do sistema e, após a remoção do eletrodo superior e do contato elétrico (palha de aço), empurrou-se o material sorvente com uma haste metálica para dentro de um microtubo de polipropileno. Ao sorvente foram adicionados 860  $\mu\text{L}$  de solvente de dessorção e, em seguida, levou-se o microtubo ao vortex por 30 segundos numa velocidade de 2000 rpm para proporcionar a dessorção. Após a dessorção, o líquido foi colocado em uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm e analisado em um espectrofotômetro UV/Vis na faixa de 400-800 nm com resolução espectral de 1 nm a fim de se obter os valores de absorbância.

#### 4.4.5 Triagem para escolha do material sorvente e de seu respectivo solvente de dessorção

Antes de se iniciar o processo de eletroextração, fez-se testes (n=1) de sorção e dessorção a fim de se escolher o suporte ideal para a fase acceptora. Os materiais sorventes analisados foram sílica, florisil, algodão e cone odontológico de papel e os solventes de dessorção testados foram metanol e soluções aquosas de ácido acético 0,1% e 1% (v/v).

Para o teste de sorção foram preparados 10,00 mL de solução aquosa 10,0 mg L<sup>-1</sup> de azul de metileno em água ultrapura e colocada em contato com 150 mg de sorvente contido em um tubo de polipropileno. A mistura ficou em contato por 30 minutos a 25 rpm em um homogeneizador de soluções.

Após o período de 30 minutos, filtrou-se a solução utilizando um sistema de filtração a vácuo, a fim de retirar o excesso de líquido do material sorvente. O líquido foi recolhido em um tubo de polipropileno, e o material sólido retirado do filtro e colocado em contato com 10,0 mL do solvente de dessorção em um tubo de polipropileno. O material sólido com a solução, ficou em contato em um homogeneizador de soluções a 25 rpm por 30 minutos e, após esse período, a mistura (sorvente + solvente de dessorção) foi centrifugada e o sobrenadante separado. As soluções filtradas na etapa de sorção e os sobrenadantes das dessorções foram analisadas em um espectrofotômetro UV/Vis nas condições descritas na seção 4.4.4.

A porcentagem de sorção foi calculada de acordo com a Equação 8:

$$\% \text{ de sorção} = \frac{\text{Abs do AM sorvido} \times 100}{\text{Abs da solução de AM inicial}} \quad \text{Equação 8}$$

Em que a absorbância (Abs) do AM sorvido é igual a Abs do AM presente no filtrado (ou seja, o que não foi sorvido) subtraída da Abs da solução de AM inicial de concentração 10,0 mg L<sup>-1</sup> preparada em água.

Para o cálculo da porcentagem de dessorção, primeiramente foram preparadas soluções de AM de concentração 10,0 mg L<sup>-1</sup> nos respectivos solventes de dessorção para poder se ter a comparação das absorbâncias no mesmo ambiente químico, então procedeu-se os cálculos mostrados na Equação 9 e na Equação 10:

$$\% \text{ dessorção} = \frac{AM_{\text{sob}} \times 100}{AM \text{ sorvido}} \quad \text{Equação 9}$$

Em que:

$$AM_{sob} = \frac{Abs_{sob} \times 10 \text{ mg L}^{-1}}{Abs \text{ da solucao de AM inicial em solvente}} \quad \text{Equação 10}$$

Onde  $AM_{sob}$  é o azul de metileno presente no sobrenadante e  $Abs_{sob}$  é a absorbância do sobrenadante.

#### 4.4.5.1 Dessorção com mistura de solventes

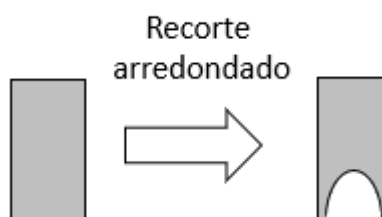
Com base nos resultados de sorção e dessorção supracitados, foram escolhidos os 3 melhores sorventes. Para a dessorção nessa etapa, foi usada uma mistura de 3 solventes, constituída de metanol (MeOH) / acetonitrila (ACN) / ácido acético (HAc) na proporção 40:40:20 (v/v/v) respectivamente. As porcentagens de sorção e dessorção também foram calculadas como supracitado.

#### 4.4.6 Avaliação de diferentes configurações do sistema

Os testes preliminares para o sistema de eletroextração são abordados nas seções a seguir.

##### 4.4.6.1 Eletroextração com uso de restritor de volume para o filtro orgânico - sob agitação magnética.

Os primeiros testes de eletroextração multifásica para o corante azul de metileno, foram feitos utilizando o sistema com restritor de volume de filtro orgânico, como representado na Figura 5 (A). Utilizou-se esse restritor com o intuito de reduzir o volume de solvente orgânico gasto para as extrações de grandes volumes de amostra. Esse restritor foi confeccionado manualmente, a partir de uma mangueira cilíndrica de silicone, e seu desenho esquemático está representado na **Figura 8**.



**Figura 8.** Desenho esquemático da visão frontal da mangueira de silicone usada como restritor de volume para o filtro orgânico.

Após acoplar a mangueira de silicone na ponta da ponteira contendo a fase aceptora, pipetou-se 45  $\mu\text{L}$  de 1-octanol para dentro desse restritor de volume e encaixou-o no frasco de polipropileno, onde previamente foi adicionado a barra magnética, o eletrodo inferior e a fase doadora. Estando o sistema montado como visto na **Figura 5 (A)**, fez-se as ligações na fonte de eletroforese, sendo o eletrodo superior (em contato com a fase aceptora) conectado no polo negativo e o eletrodo inferior (imerso na fase doadora) conectado ao polo positivo, de forma que o corante catiônico pudesse migrar em direção ao polo com carga contrária a sua. Após preparada a montagem, ligou-se a agitação e a fonte de eletroforese. As condições para essa eletroextração estão expostas na **Tabela 3**.

**Tabela 3:** Condições para eletroextração multifásica usando o restritor de volume para filtro orgânico.

<b>Fase doadora</b>	35,0 mL de solução 4,0 mg L <sup>-1</sup> de AM em 5:1 (v/v) de água e tampão McIlvaine pH = 3,00
<b>Eletrólito da fase aceptora</b>	Ácido acético 0,50 mol L <sup>-1</sup>
<b>Suporte sólido da fase aceptora</b>	0,0150 g de algodão
<b>Potencial elétrico</b>	300 V
<b>Tempo de aplicação do potencial</b>	20 minutos
<b>Filtro orgânico</b>	45 µL de 1-octanol
<b>Agitação</b>	~1400 rpm
<b>Número de replicatas</b>	3
<b>Diâmetro da ponta da ponteira</b>	2 mm

Após o processo de eletroextração, o algodão contendo o corante eletroextraído foi transferido para um microtubo de polipropileno e a esse foi adicionado 860 µL de uma mistura de MeOH / ACN / HAC na proporção 40:40:20 (v/v/v) e levado em seguida em um vortex a 2000 rpm por 30 segundos, de forma a dessorver o azul de metileno. As leituras de absorbância dos sobrenadantes foram feitas no espectrofotômetro UV/Vis na faixa de 400-800 nm com resolução espectral de 1 nm e cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm. Os valores de absorbância usados para os resultados foram os encontrados em 654 nm, onde o corante apresenta máxima absorção no solvente de dessorção.

#### 4.4.6.2 Eletroextração com o filtro orgânico livre

A configuração sem o uso de restritor de volume para o filtro orgânico denominada “eletroextração com filtro orgânico livre”, foi feita diminuindo o volume da amostra (fase doadora) de 35,0 para 32,0 mL e aumentando o volume de 1-octanol para 3,00 mL, sendo esse colocado lentamente, sobre a fase doadora, com o auxílio de uma pipeta. O diâmetro da ponta da ponteira onde colocou-se a fase aceptora, foi de 3 mm para essa configuração. As demais condições foram idênticas as apresentadas na **Tabela 3**.

A montagem necessária para a eletroextração com filtro livre está ilustrada na Figura 5 (B). Todos os outros procedimentos necessários, foram idênticos ao sistema (A). Para essa configuração foi feita triplicata da extração com aplicação da agitação com e sem uso do campo elétrico e triplicata sem agitação com aplicação de campo elétrico. A fase doadora para todas as três condições consistiu de 32,0 mL de solução 4,0 mg L<sup>-1</sup> de AM em 5:1 (v/v) de água e tampão McIlvaine pH = 3,00. As três condições avaliadas para a configuração com filtro orgânico livre estão dispostas na **Tabela 4**.

**Tabela 4:** Condições para eletroextração multifásica usando o sistema de filtro livre.

	Com agitação		Sem agitação
	Com campo elétrico	Sem campo elétrico	Com campo elétrico
<b>Potencial elétrico</b>	300 V	0 V	300 V
<b>Agitação</b>	~1400 rpm	~1400 rpm	0 rpm

Após o processo de eletroextração, o algodão contendo o corante foi transferido para um microtubo de polipropileno e a esse foi adicionado 860 µL de uma mistura de MeOH / ACN / HAc na proporção 40:40:20 (v/v/v) e levado em seguida a um vortex a 2000 rpm por 30 segundos de forma a dessorver o corante azul de metileno. As leituras de absorbância dos sobrenadantes foram feitas no espectrofotômetro UV/Vis na faixa de 350-800 nm com resolução espectral de 1 nm e cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm. Os valores de absorbância usados para os resultados foram os encontrados em 654 nm, onde o corante apresenta máxima absorção no solvente de dessorção.

#### **4.4.7 Estudo multivariado para avaliação das condições de eletroextração multifásica do corante azul de metileno**

Um planejamento exploratório fatorial fracionário foi feito para triagem das variáveis usadas na eletroextração multifásica do corante azul de metileno e em seguida foi feito um planejamento Box-Behnken para otimização das variáveis significativas.



#### 4.4.7.1 Planejamento Fatorial Fracionário 2<sup>III</sup> 6-3

O planejamento fatorial fracionário 2<sup>III</sup> 6-3 foi usado como uma ferramenta de triagem para verificar as variáveis significativas, ou seja, aquelas que teriam influência no processo de eletroextração do corante azul de metileno, para isso escolheu-se as variáveis listadas na **Tabela 5** com seus respectivos níveis. Os fatores avaliados nesse trabalho foram baseados em variáveis já reportadas na literatura como determinantes no processo de migração de diversos outros analitos em extrações com aplicação de campo elétrico<sup>64,80,81</sup>. A matriz para o planejamento encontra-se disposta na **Tabela 6** e os experimentos foram feitos de forma aleatória.

**Tabela 5:** Variáveis investigadas no planejamento fatorial fracionário 2<sup>III</sup> 6-3

Variáveis	Níveis	
	-1	+1
Eletrólito da fase aceptora	HAc pH = 2,50	HCl pH = 2,50
pH da fase doadora	2,00	7,00
Tipo de orgânico na fase doadora	20% de ETOH	20% de ACN
Tempo de extração	10 minutos	20 minutos
Quantidade de sorvente na fase aceptora	0,0150 g	0,0300 g
Tipo de filtro orgânico	2-etilhexanol	1-octanol

**Tabela 6:** Matriz do planejamento fatorial fracionário 2<sup>III</sup> 6-3

Exp	Eletrólito da fase acceptora	pH da fase doadora	Tipo de orgânico na fase doadora	Tempo de extração (min)	Quantidade de sorvente na fase acceptora (g)	Tipo de filtro orgânico
1	HAc	2,00	etanol	10	0,0300	1-octanol
2	HCl	2,00	etanol	20	0,0150	2-etilhexanol
3	HAc	7,00	etanol	20	0,0150	1-octanol
4	HCl	7,00	etanol	10	0,0300	2-etilhexanol
5	HAc	2,00	ACN	20	0,0300	2-etilhexanol
6	HCl	2,00	ACN	10	0,0150	1-octanol
7	HAc	7,00	ACN	10	0,0150	2-etilhexanol
8	HCl	7,00	ACN	20	0,0300	1-octanol

As eletroextrações para esse planejamento foram feitas utilizando o sistema de filtro orgânico livre, sem o uso da agitação e a fase doadora foi preparada diretamente em tampão McIlvaine no pH do respectivo experimento contendo 20% v/v de orgânico, tendo a concentração de 4,0 mg L<sup>-1</sup> do corante azul de metileno nessa solução. Como resposta analítica, utilizou-se os sinais de absorbância provenientes das dessorções e os resultados experimentais foram analisados no software Design Expert v.11. Nesse tipo de planejamento, de resolução III, há o confundimento dos efeitos de segunda ordem com os de terceira ordem. Os efeitos principais, por sua vez, são confundidos com os de quarta ordem, porém serão avaliados apenas os efeitos principais.

#### 4.4.7.2 Planejamento de otimização do tipo Box-Behnken

A metodologia de superfície de resposta Box-Behnken foi utilizada para otimizar as variáveis que foram significativas para o processo de eletromigração do corante azul de metileno, previamente detectadas a partir da triagem feita utilizando o planejamento fatorial fracionário. O planejamento Box-Behnken requer poucas combinações de fatores, sendo

estes estudados sempre em três níveis (-1, 0 e +1) e o número de experimentos (N) necessários para sua execução é dado por  $N = k^2 + k + pc$ , onde k é o número de variáveis e pc é o número de experimentos do ponto central <sup>82</sup>. Sendo assim, tendo 3 variáveis significativas, as quais são apresentadas na **Tabela 7**, foram feitos 15 experimentos no total, sendo 3 replicatas no ponto central. A matriz do planejamento de otimização está representada na **Tabela 8** e os experimentos foram realizados em ordem aleatória.

**Tabela 7:** Variáveis otimizadas no planejamento Box-Behnken

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Tempo	15	20	25
pH	5,00	6,00	7,00
% ACN na fase doadora	30	35	40

**Tabela 8:** Matriz do planejamento experimental Box-Behnken

<b>Experimento</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>pH da fase doadora</b>	<b>% ACN na fase doadora</b>
<b>1</b>	15	5,00	35
<b>2</b>	25	5,00	35
<b>3</b>	15	7,00	35
<b>4</b>	25	7,00	35
<b>5</b>	15	6,00	30
<b>6</b>	25	6,00	30
<b>7</b>	15	6,00	40
<b>8</b>	25	6,00	40
<b>9</b>	20	5,00	30
<b>10</b>	20	7,00	30
<b>11</b>	20	5,00	40
<b>12</b>	20	7,00	40
<b>PC</b>	20	6,00	35
<b>PC</b>	20	6,00	35
<b>PC</b>	20	6,00	35

As eletroextrações para esse planejamento foram feitas utilizando o sistema de filtro orgânico livre, sem o uso da agitação, como no planejamento de triagem, porém a fase doadora constitui-se de uma solução 0,5 mg L<sup>-1</sup> de azul de metileno, com porcentagem de orgânico própria de cada experimento, preparada no tampão McIlvaine no seu respectivo valor

de pH. O ácido acético 0,50 mol L<sup>-1</sup> foi usado como eletrólito da fase acceptora o qual foi embebido em 0,0300 g de sorvente e como filtro orgânico utilizou-se o 1-octanol.

Como resposta analítica, utilizou-se os sinais de absorbância provenientes das dessorções e os resultados experimentais foram analisados no software Design Expert v. 11.

#### 4.4.8 Avaliação do perfil da corrente elétrica para a eletroextração multifásica do azul de metileno

Os íons em solução possuem diferentes mobilidades eletroforéticas, o que caracteriza a corrente elétrica que atravessa o sistema. Sendo assim, fez-se um teste para medir a corrente elétrica durante a extração do corante em sistema com filtro livre nas condições otimizadas, utilizando para isso um multímetro, o qual trabalhou como um amperímetro e foi conectado a um computador, para aquisição dos dados, por uma entrada do tipo RS-232. As condições de eletroextração estão apresentadas na **Tabela 9**.

**Tabela 9.** Condições da eletroextração multifásica para avaliação do perfil de corrente

<b>Sistema</b>	<b>Filtro livre sem agitação</b>
<b>Fase doadora</b>	32,0 mL de solução 0,5 mg L <sup>-1</sup> de azul de metileno, preparada em tampão McIlvaine pH = 5,00 com 35% de ACN (v/v)
<b>Eletrólito da fase acceptora</b>	Solução 0,50 mol L <sup>-1</sup> de HAc
<b>Suporte sólido da fase acceptora</b>	0,0300 g de algodão
<b>Potencial elétrico</b>	300 V
<b>Tempo de aplicação do potencial</b>	25 minutos
<b>Filtro orgânico</b>	3 mL de 1-octanol
<b>Diâmetro da ponta da ponteira</b>	3 mm

#### 4.4.9 Figuras de mérito avaliadas para o método

Após definir as melhores condições para a eletroextração do azul de metileno, foram avaliadas algumas figuras de mérito baseando-se nos guias de validação do Instituto

Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) e do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Parâmetros como linearidade, efeito de matriz, repetibilidade, precisão intermediária, veracidade em termos de recuperação, eficiência de extração, limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD) foram determinados usando a EAM-UV/Vis como técnica de análise para as desorções provenientes das extrações. As condições para as eletroextrações foram as mesmas que as apresentadas na **Tabela 9** anteriormente, exceto para a concentração da fase doadora, porém a partir dessa seção as concentrações indicadas serão as da amostra, as quais serão indicadas em cada teste.

#### 4.4.9.1 Linearidade

Para avaliação da linearidade construiu-se uma curva analítica, denominada curva 1, com as concentrações da amostra e os sinais analíticos das respectivas desorções obtidas após o processo de eletroextração, o que se chamou de “curva extraída”. Os seis níveis de concentrações da amostra foram: 0,030; 0,075; 0,150; 0,225; 0,300; 0,375 mg L<sup>-1</sup> e fez-se triplicatas independentes em cada ponto, e o tampão McIlvaine pH = 5,00 necessário para a elaboração da solução foi preparado utilizando-se água deionizada. Construiu-se uma segunda curva nas mesmas condições em um dia distinto a qual foi designada como curva 2, essa foi usada para os cálculos da precisão intermediária.

Seguindo a metodologia de Souza e Junqueira (2005) a linearidade foi avaliada através do método dos mínimos quadrados ordinários em que os dados obtidos para a curva extraída foram inseridos em uma planilha de cálculo do programa Excel específica para teste de linearidade, a qual realizou testes estatísticos como : teste do resíduo padronizado Jackknife para a investigação e eliminação de *outliers*; teste Ryan-Joiner, Durbin-Watson e Brown-Forsythe para verificar a normalidade, independência e a homogeneidade da variância dos resíduos, respectivamente. Nessa mesma planilha foi feita a análise de variância (ANOVA) para averiguar a significância da regressão e se havia desvio de linearidade <sup>83</sup>.

#### 4.4.9.2 Efeito de matriz

Para analisar o efeito de matriz foi repetido o mesmo procedimento descrito na seção anterior (4.4.9.1), porém para o preparo do tampão McIlvaine pH = 5,00, a água deionizada foi substituída pela amostra real (água de torneira). Antes da verificação do efeito de matriz, a curva extraída matrizada teve sua linearidade analisada seguindo o mesmo procedimento para a curva preparada em água deionizada. A metodologia e a planilha de cálculo propostas por Souza (2007) foram usadas para a avaliação do efeito de matriz na qual

aplicou-se um teste F (Fisher-Snedecor) de homogeneidade das variâncias para verificar se as variâncias das amostras matrizadas e não matrizadas não diferiam estatisticamente em cada nível de concentração e também um teste t (Student) para comparação das inclinações e interseções das curvas <sup>84</sup>.

#### 4.4.9.3 Precisão

A precisão do método foi verificada em termos de repetibilidade e precisão intermediária, ambas foram avaliadas em três níveis de concentração da amostra, os quais foram 0,030; 0,225 e 0,375 mg L<sup>-1</sup>. A repetibilidade foi calculada e expressa em termos do desvio padrão relativo (% DPR) das concentrações obtidas, de acordo com a Equação 11 e cada nível foi feito em sextuplicata. Para encontrar os valores de concentração para essa figura de mérito, construiu-se uma curva extraída, designada curva 1. O DPR foi calculado para cada nível fazendo-se a razão entre o desvio padrão das medidas (DP) e a concentração média determinada para essas (CMD).

$$\%DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

Para o cálculo da precisão intermediária, o mesmo procedimento foi realizado nas mesmas condições que as extrações feitas para a repetibilidade, mudando apenas o dia dos experimentos e construiu-se uma nova curva para comparação dos dados obtidos, denominada curva 2, então calculou-se o DPR utilizando o desvio e a média das doze leituras para cada nível de concentração.

#### 4.4.9.4 Veracidade

Para os cálculos de veracidade em termos de recuperação, foram feitas sextuplicatas de eletroextrações nos seguintes níveis de concentração da amostra: 0,030; 0,225 e 0,375 mg L<sup>-1</sup>. O valor de recuperação foi calculado para cada nível através da Equação 1, a partir dos valores de concentrações encontrados utilizando a curva analítica denominada curva 1.

$$\text{Recuperação}(\%) = \frac{\text{concentração média experimental} \times 100}{\text{concentração teórica}} \quad \text{Equação 12}$$

#### 4.4.9.5 Limite de quantificação e detecção

O processo de eletroextração foi realizado em sextuplicata para o branco da amostra e a partir dos valores de desvio padrão da resposta do branco ( $s$ ) e do coeficiente angular ( $a$ ) da curva analítica, calculou-se os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), como mostrado nas Equação 13 e Equação 14 respectivamente.

$$LD = \frac{3,3 s}{a} \quad \text{Equação 13}$$

$$LQ = \frac{10 s}{a} \quad \text{Equação 14}$$

#### 4.4.10 Eficiência de extração

Para a eficiência de extração (EE) preparou-se amostras de  $0,225 \text{ mg L}^{-1}$  de azul de metileno em sextuplicata e realizou-se todo o procedimento de eletroextração. Em seguida, repetiu-se o mesmo procedimento para a amostra branco (água deionizada), a qual foi fortificada na mesma concentração, no final do processo de eletroextração. O cálculo está representado na Equação 15 e foi feito como demonstrado no trabalho de Sousa *et al.* (2020)<sup>55</sup>. O valor de absorbância para o analito que foi extraído, foi corrigido dividindo-se a absorbância encontrada pelo fator de correção (FC), uma vez que o volume inicial e final são diferentes, como mostrado na Equação 16. O valor de absorbância média do analito adicionado refere-se ao valor médio obtido para os brancos eletroextraídos que foram fortificados no final do processo.

$$(\%)EE = \frac{\left(\frac{\text{Abs analito extraído}}{FC}\right) \times 100}{\text{Abs média do analito adicionado}} \quad \text{Equação 15}$$

Em que:



$$FC = \frac{\text{volume da fase doadora (mL)}}{\text{volume da solução de dessorção (mL)}} \quad \text{Equação 16}$$

#### 4.4.11 Fator de pré-concentração

Para o cálculo do fator de pré-concentração (FPC), preparou-se amostras de 0,030 mg L<sup>-1</sup> de azul de metileno em sextuplicata e realizou-se todo o procedimento de eletroextração. Com o auxílio de uma curva analítica construída em solvente de dessorção, abrangendo a faixa de concentração de 0,25 a 2,00 mg L<sup>-1</sup>, encontrou-se as concentrações das soluções provenientes da dessorção e fez-se a razão dessas pela concentração da amostra como mostra a Equação 17.

$$FPC = \frac{\text{concentração da solução de dessorção}}{\text{concentração da amostra}} \quad \text{Equação 17}$$

#### 4.4.12 Análise qualitativa da eletroextração multifásica do azul de metileno utilizando o espalhamento Raman intensificado por superfície

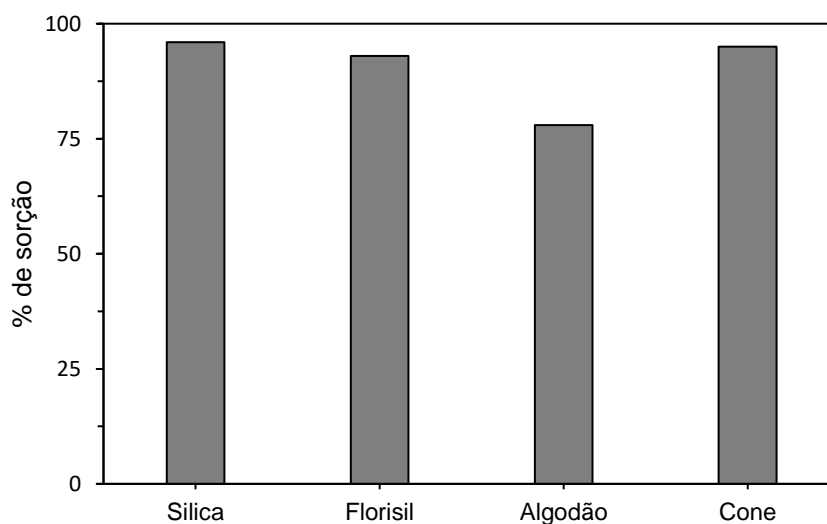
Para uma análise qualitativa utilizando a espectroscopia Raman intensificada por superfícies, preparou-se amostras de cinco concentrações abrangendo uma faixa de 5 x 10<sup>-1</sup> a 5 x 10<sup>-5</sup> mg L<sup>-1</sup> de azul de metileno e fez-se as eletroextrações nas condições otimizadas. Em uma tampa de frasco do tipo eppendorf de 2 mL, forrou-se papel alumínio e adicionou-se 150 µL da solução de dessorção proveniente da eletroextração, 200 µL de uma suspensão de nanopartículas de ouro (AuNPs) e 30 µL de solução de NaCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>. Após o preparo dessa mistura, fez-se a homogeneização e aguardou-se 10 minutos antes de se fazer as leituras no equipamento.

Para as leituras utilizou-se um espectrômetro Raman Horiba T64000, com modo monocromador simples, rede de 600 linhas/mm, excitação em 785 nm de um laser Ti:Safira. Os espectros foram obtidos com 30 mW de potência do laser na amostra, objetiva de 50x e 5 acumulações de 60s, tendo resolução espectral de 1 cm<sup>-1</sup>. A aquisição dos dados foi feita pelo software Labspec 6 e os espectros foram tratados utilizando o programa Origin 2018.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Comparação da sorção e dessorção do corante AM em diferentes materiais

Antes de se iniciar o processo de eletroextração, escolheu-se quatro diferentes materiais, sílica, florisil, algodão e cone odontológico, para se fazer testes de adsorção e dessorção de forma a selecionar um suporte para a fase aceptora. A **Figura 9** apresenta os resultados de sorção e mostra que a sílica e o cone foram os materiais que melhor sorveram o corante azul de metileno com 96 e 95% de sorção respectivamente, seguido pelo florisil com 93% e por último o algodão com 78%.



**Figura 9.** Porcentagem de sorção do azul de metileno aquoso pelos diferentes sorventes testados. Condições: 10,0 mL de solução aquosa de AM 10,0 mg L<sup>-1</sup>; 150 mg de sorvente; tempo de 30 minutos a 25 rpm; (n=1).

A sílica gel possui alta capacidade de sorção devido a sua grande área superficial, fazendo com que haja significativa adsorção física, além disso, há a adsorção química que pode ser explicada pela presença dos grupos silanóis, que corroboram para a existência de ligações de hidrogênio com o azul de metileno <sup>85</sup>.

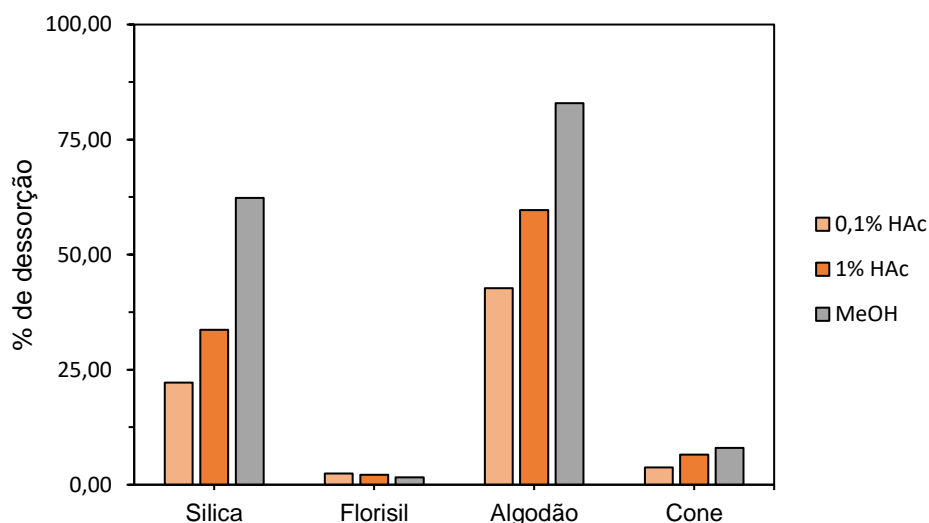
A boa sorção apresentada pelo florisil (silicato de magnésio), pode ser explicada pela alta capacidade de adsorção dos silicatos alcalinos terrosos frente a corantes catiônicos, que é devido a superfície carregada negativamente desse silicato, o que permitiu que o azul

de metileno (corante catiônico) fosse atraído pelos sítios aniônicos do sorvente; essa sorção se dá fisicamente e por troca iônica <sup>86</sup>.

O algodão é uma fibra natural celulósica e a boa sorção era esperada, uma vez que o AM é usado para tingimento desse material na indústria têxtil <sup>29,87</sup>. A celulose possui em sua estrutura diversos grupos hidroxila livres, o que permite uma forte interação com os elétrons não ligantes dos átomos de nitrogênio do corante através de ligações de hidrogênio.

O cone que também é constituído de celulose, segundo o fabricante, é formado de papel absorvente esterilizado e de alta absorção, silicato de sódio e goma adraganta. A maior sorção apresentada pelo cone comparado ao algodão, pode ser devida a presença do silicato, em que a superfície carregada negativamente, proveniente dos oxigênios ligados ao silício, possuem a capacidade de interagir eletrostaticamente com o corante catiônico, promovendo uma sorção adicional, que ocorre com a molécula de azul de metileno e a celulose. Além disso, como as fibras de celulose no cone são enoveladas, elas podem gerar maior porosidade para a adsorção física das moléculas do corante.

Após a sorção, testou-se a dessorção do corante em metanol e solução aquosa de ácido acético 0,1 % (v/v) e 1 % (v/v) para todos os materiais e os resultados foram expostos na **Figura 10**.



**Figura 10.** Porcentagem de dessorção do azul de metileno dos diferentes sorventes testados, utilizando metanol e ácido acético 0,1 e 1 % (v/v), como agentes dessorventes. Condições: 10,0 mL de solvente de dessorção; tempo de 30 minutos a 25 rpm; (n=1).

É possível perceber que o metanol foi o melhor solvente de dessorção para os materiais sorventes, enquanto o ácido acético 1% (v/v) foi o segundo melhor. Apenas para o

florisil não houve diferença entre os solventes. O maior valor de recuperação do corante foi obtido quando se utilizou o metanol para dessorção do algodão, com um valor de recuperação de 83%.

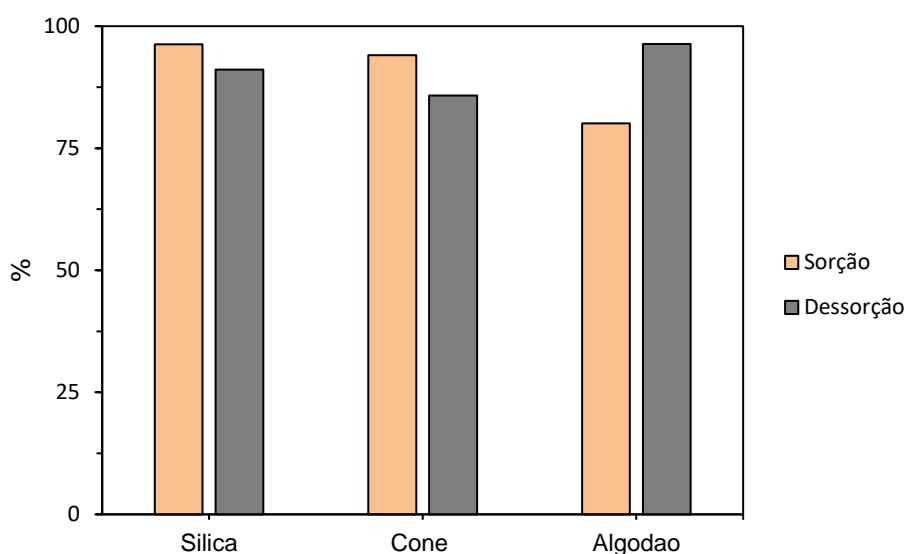
A melhor dessorção do corante ocorrida na sílica frente ao metanol, ocorre por que o hidrogênio da hidroxila do álcool está disponível para participar de uma atração dipolo-dipolo efetiva com os pares de elétrons dos nitrogênios do AM, o que o permite estabelecer ligações de hidrogênio com o corante, fazendo com que o metanol retire o corante da sílica mais efetivamente. Já para o ácido acético, o carboxilato formado pela perda do H<sup>+</sup> pode ser estabilizado por ressonância, não estando o H da hidroxila tão disponível para interações com o corante quanto no metanol. Além disso, a porção orgânica do metanol e do ácido acético permitem a quebra das interações hidrofóbicas do corante com os materiais sorventes. O que justifica o fato do metanol ter apresentado melhor performance, comparado as soluções diluídas de ácido. Uma vez que mais moléculas estavam disponíveis para essa interação com o corante.

O corante presente no florisil foi pouco dessorvido em todos os casos, indicando que a sorção preponderantemente é química. Esse resultado sugere que a interação de natureza eletrostática estabelecida entre o florisil e o corante é mais forte que a com os dessorventes testados.

O melhor resultado de dessorção foi obtido para o algodão, incluindo todos os solventes de dessorção, especialmente com o metanol, indicando que esse solvente polar interage melhor com o corante que com a celulose, tendo então a eficácia de retirá-lo do algodão. Por outro lado, o corante não foi bem dessorvido do cone de papel, nem mesmo com metanol, o que indica uma forte interação de natureza química, provavelmente ligações de hidrogênio, entre o azul de metileno e esse material, favorecida pelas impurezas presentes no cone e justificável pelo mesmo motivo que esse apresentou melhor sorção comparado ao algodão.

## 5.2 Dessorção com mistura de solventes

Com base nos resultados obtidos na triagem para os quatro materiais dessorventes, selecionou-se três: a sílica, o cone e o algodão, para um teste de dessorção utilizando uma mistura de MeOH / ACN / HAc na proporção 40:40:20 (v/v/v), de forma a tentar melhorar o desempenho de dessorção do corante, o que pode ser visto na **Figura 11**.



**Figura 11.** Comparação entre a porcentagem de sorção do AM  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  aquoso e a porcentagem de dessorção utilizando uma mistura de MeOH / ACN / HAc na proporção 40:40:20 (v/v/v), como agente dessorvente; (n=1).

Houve uma significativa melhora nos valores de dessorção nos três materiais, com valores de 91% para a sílica, 86% para o cone e 96% para o algodão. A união desses três reagentes faz com que o corante seja solvatado e facilmente liberado do material sorvente. O pequeno tamanho das moléculas desses reagentes e o fato deles terem um dipolo parcial negativo sobre o oxigênio (álcool e ácido acético) e sobre o nitrogênio (acetonitrila) possibilita que essa extremidade negativa circunde o corante catiônico. Além disso, a união desses três solventes propicia um aumento da hidrofobicidade da mistura, o que auxilia na quebra das interações hidrofóbicas do corante com os materiais sorventes.

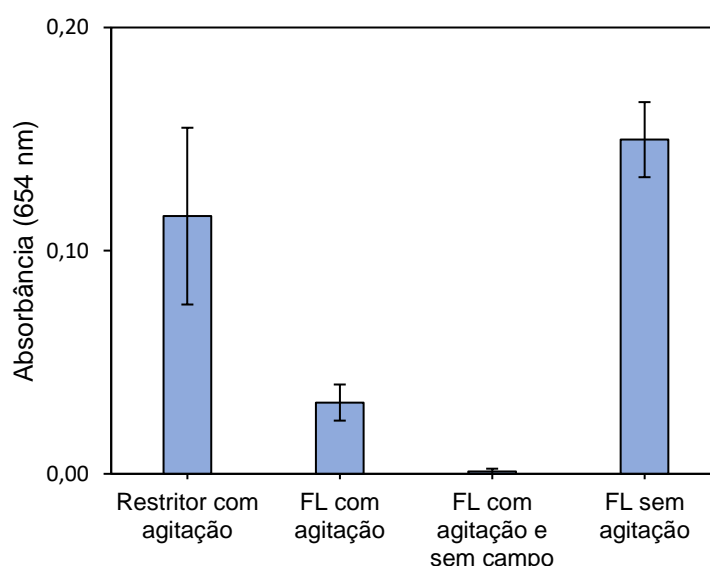
Comparando os resultados para esses três materiais, o que apresentou melhor desempenho na dessorção com a mistura de solventes foi o algodão, com quase 100% de recuperação do AM. Além disso, em comparação ao cone e a sílica, ele possui maior facilidade de aquisição, menor preço e possui fácil acomodação na ponta da ponteira utilizada no sistema de eletroextração, sendo assim, se mostrou um ótimo material para ser usado como suporte da fase acceptora.

O uso de um suporte sólido para receber o analito em um sistema de extração aplicando campo elétrico ainda não é bem difundido na literatura, porém tem apresentado inúmeras vantagens. Em trabalho recente, Orlando *et al.* (2019) usou um cone de papel como suporte para a eletroextração do corante cristal violeta de extrato de peixe e observou que isso conferiu maior estabilidade ao sistema comparado ao dispositivo com gota pendente

usado por Raterink *et al.* (2013), podendo se aplicar potenciais mais altos. Além disso, após a eletroextração o suporte pode ser transportado, armazenado, dessorvido ou ainda pode-se fazer análise direta, como no trabalho de Orlando *et al.* (2019) que usou um scanner para obtenção das imagens digitais dos cones <sup>56,64</sup>.

### 5.3 Avaliação de diferentes configurações do sistema

Diferentes configurações do sistema de eletroextração multifásico foram avaliadas e comparadas no intuito de se escolher a que proporcionasse maiores extrações do corante azul de metileno, com resultados reprodutíveis. Após o procedimento de eletroextração para cada configuração do sistema, as soluções provenientes da etapa de dessorção foram levadas ao espectrofotômetro UV/Vis e os valores médios de absorbância e seus respectivos desvios foram dispostos na **Figura 12**.



**Figura 12.** Gráfico comparativo dos sinais de absorbância média da solução de dessorção para o azul de metileno em 654 nm para quatro diferentes configurações do sistema de eletroextração multifásico. (FL= filtro livre).

A eletroextração com o uso de restritor de volume para o filtro orgânico sob agitação magnética está representada no gráfico com o nome de “restritor com agitação” enquanto as configurações com filtro livre testadas com e sem agitação estão representadas como “FL com agitação” e “FL sem agitação” respectivamente. Na situação sob agitação em que não se aplicou campo elétrico, deu-se o nome de “FL com agitação e sem campo”.

Calculou-se também o coeficiente de variação (CV) para estimar a variabilidade entre as replicatas e esses valores estão registrados na **Tabela 10**.

**Tabela 10:** Valores de absorvância média e coeficiente de variação para as triplicatas de extração das diferentes configurações do sistema multifásico.

	<b>Abs média</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Restritor com agitação</b>	0,120	34
<b>Filtro livre com agitação</b>	0,032	25
<b>Filtro livre com agitação e sem aplicação de campo elétrico</b>	0,001	104
<b>Filtro livre sem agitação</b>	0,150	11

O sistema com restritor de volume apesar de apresentar a vantagem de fazer uso de uma pequena quantidade de filtro orgânico, apresentou-se pouco reprodutível em seu resultado, como facilmente observado pelo valor do coeficiente de variação elevado. Isso pode ser explicado pelo fato do restritor ser confeccionado manualmente, o que dificulta a padronização das medidas do recorte necessário a seu uso, além de possíveis bolhas de ar que podem ser geradas ao se inserir o filtro orgânico dentro do pequeno compartimento. Vale ressaltar também, que comparado ao FL sem agitação essa configuração apresentou uma menor extração do AM, o que pode estar relacionado ao menor diâmetro da ponteira onde a fase acceptora faz contato com o filtro orgânico. Isso pode ser explicado pela resistência elétrica ( $R$ ) de um meio condutor que depende do comprimento ( $l$ ) da seção transversal ( $a$ ) e da resistividade do meio ( $\rho$ ), sendo esse último substituído pelo seu recíproco quando se trata de soluções, recebendo o nome de condutividade elétrica do meio ( $\kappa$ ), como visto na Equação 18. Logo, aumentando-se a área referente ao diâmetro da ponteira, a resistência à passagem de íons diminui, o que favorece a transferência do analito para a fase acceptora <sup>54</sup>.

$$R = \frac{l}{a \kappa}$$

Equação 18

Uma vez que o sistema com restritor de volume não ofereceu resultados reprodutíveis, a configuração com o filtro livre foi testada. Primeiramente fazendo-se o uso da

agitação, com e sem aplicação do campo elétrico, isso porque a transferência de massa em um sistema de eletroextração pode ser realizada tanto por difusão como pela eletromigração e facilitada pela convecção. Sendo assim, a agitação pode favorecer o transporte das espécies carregadas e o campo elétrico aplicado promove a eletromigração dessas.

Yamini *et al.* (2014) publicaram um estudo para um sistema de eletroextração em membrana com agitação para alguns analitos básicos, os quais são colocados em diferentes volumes e diferentes agitações. Neste trabalho os autores concluíram que, de uma forma geral, a medida que se tem maiores volumes de amostra, a importância da agitação aumenta, uma vez que ela passa a ser necessária para favorecer o processo de transferência das espécies carregadas<sup>88</sup>. A necessidade de agitação é explicada pela dupla camada de íons que se forma no início do processo de eletroextração, tanto na interface entre a fase doadora e o filtro orgânico como entre esse último e a fase aceptora. Esse fenômeno provoca um aumento da resistência à corrente elétrica nas interfaces dos líquidos imiscíveis e conseqüentemente dificulta a transferência de massa. Logo, a agitação pode ajudar a evitar a formação dessa dupla camada e conseqüentemente melhorar o processo extrativo<sup>89</sup>. Porém, os resultados obtidos no presente trabalho, mostram que a agitação não favoreceu o processo de migração do analito para a fase aceptora. Yamini *et al.* (2014) também observaram que um analito no volume de 24 mL teve sua recuperação diminuída quando a agitação passou de 1000 para 1250 rpm<sup>88</sup>, sendo assim, a necessidade ou não de agitação dependerá de cada espécie química em questão e das condições empregadas.

Com relação ao teste sem aplicação do campo elétrico, esse foi feito para mostrar a contribuição da aplicação de uma diferença de potencial elétrico em processos extrativos de espécies carregadas. Os baixos valores de absorvância para a condição sem campo elétrico, confirmam que o azul de metileno nas condições estabelecidas é transferido para a fase aceptora majoritariamente por eletromigração. A agitação na configuração filtro livre fez com que a quantidade de azul de metileno eletroextraída diminuísse, assim, optou-se por utilizar o sistema de filtro livre sem agitação com aplicação do campo elétrico, que além de gerar resultados mais reprodutíveis, proporcionou maiores valores de extração, como visto na **Figura 12**.

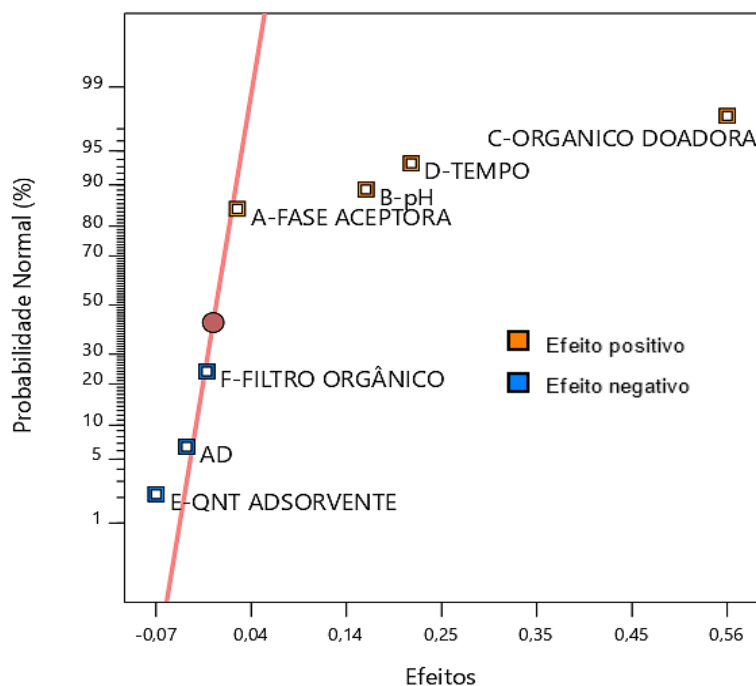
#### **5.4 Estudo multivariado para avaliação das condições de eletroextração multifásica do corante azul de metileno**

Nessa seção os resultados para os planejamentos, exploratório do tipo fatorial e de otimização Box-Behnken, foram discutidos.



### 5.4.1 Planejamento Fatorial Fracionário 2<sub>III</sub> 6-3

Os resultados para o planejamento fatorial fracionário estão apresentados na **Figura 13**, onde vê-se que as variáveis significativas para o processo de eletroextração do azul de metileno em ordem de importância foram: o tipo de orgânico presente na fase doadora (C), o tempo de extração (D) e o pH da fase doadora (B).



**Figura 13.** Gráfico dos efeitos versus probabilidade normal para o planejamento fatorial fracionário 2<sub>III</sub> 6-3. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V; concentração do azul de metileno na fase doadora 4,0 mg L<sup>-1</sup>.

Todos os fatores significativos apresentaram efeitos positivos, ou seja, um aumento no nível dessas variáveis ocasiona um aumento nos valores da resposta, que nesse caso é a absorvância, indicando maior extração. Esses efeitos principais que foram significativos, se afastam da reta normal. Com relação aos efeitos não significativos, esses seguem uma distribuição normal e são os que estão sobre a reta, sendo os efeitos principais a fase aceptora (A) e o filtro orgânico (F). A quantidade de adsorvente (E) foi pouco significativa e teve um efeito negativo. Diante desses resultados as variáveis escolhidas para um planejamento de otimização foram a acetonitrila como solvente orgânico na fase doadora, o tempo de extração e o pH da fase doadora. Quanto as variáveis que foram fixadas para o processo de otimização o 1-octanol foi escolhido por ser economicamente mais acessível e

possuir menor toxicidade. O ácido acético foi escolhido como eletrólito da fase acceptora uma vez que as extrações com HCl estavam gerando um leve aquecimento. Por fim, a quantidade de adsorvente que se apresentou pouco significativa, foi fixada em seu maior nível, mesmo apresentando um efeito negativo, para garantir material sorvente suficiente quando em condições de altos valores de extrações no planejamento de otimização. O efeito negativo para a quantidade de adsorvente pode ser explicado pela elevação da resistência elétrica conferida pelo crescimento da coluna de material sorvente ao aumentar sua massa, diminuindo, dessa forma, a eficiência da eletroextração.

#### 5.4.2 Planejamento de otimização do tipo Box-Behnken

Ao iniciar os primeiros ensaios para execução do planejamento de otimização Box-Behnken, diminuiu-se a concentração da fase doadora de  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  para  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , de forma a garantir fase acceptora suficiente no processo de eletroextração, uma vez que nas novas condições, a extração do corante teve um grande aumento. Como o processo extrativo com aplicação do campo elétrico ocorre com a troca de íons entre as fases acceptora e doadora, para se evitar um esgotamento dessa primeira, com conseqüente ruptura do processo de eletroextração, se faz necessário que haja uma maior concentração iônica na fase acceptora comparada a fase doadora.

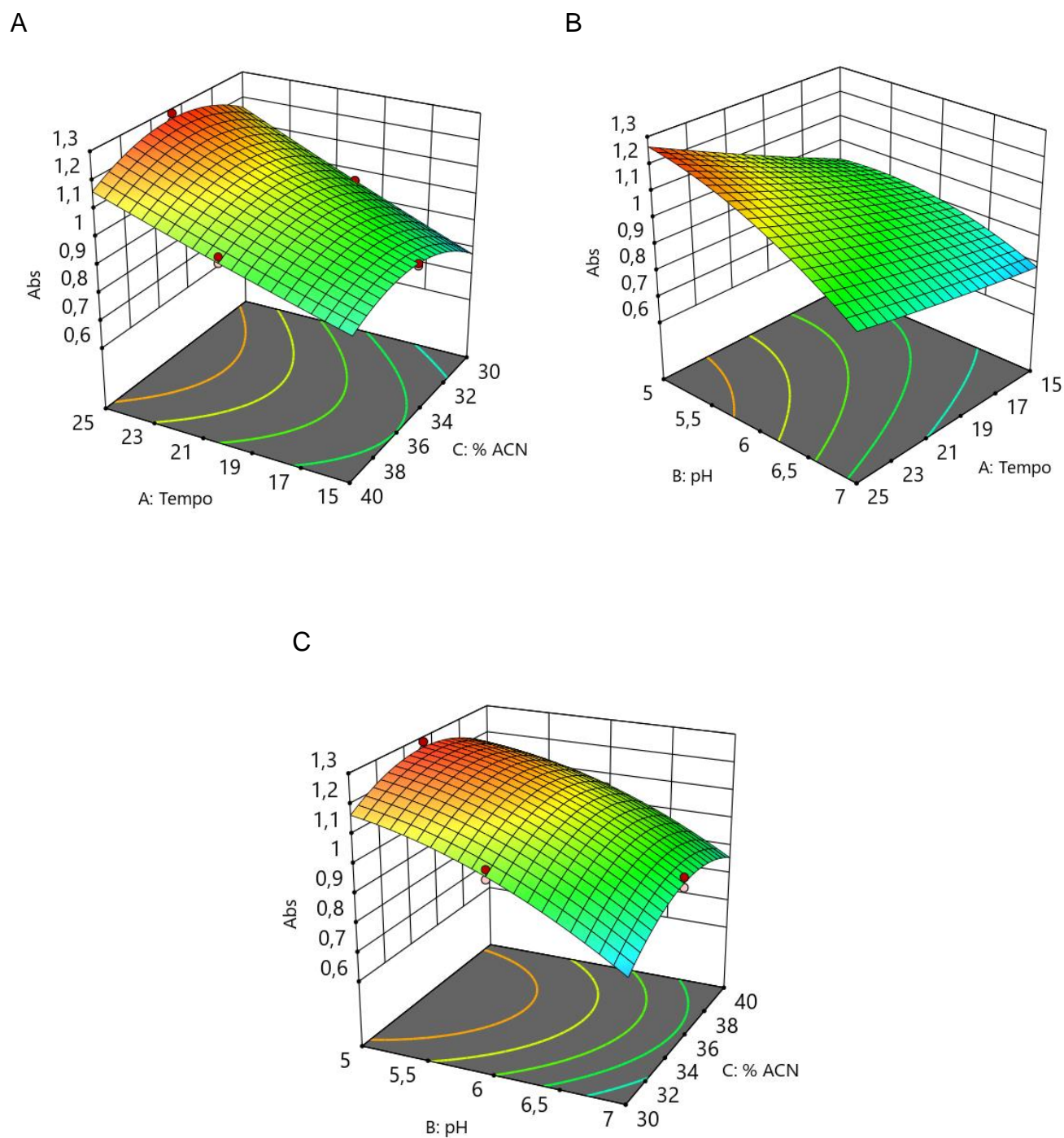
Para avaliação estatística da influência dos fatores porcentagem de acetonitrila na fase doadora, tempo de extração e pH da fase doadora, utilizou-se o software Desing Expert v. 11, o qual ajustou um modelo pelo método dos mínimos quadrados para as absorbâncias obtidas, gerando os resultados obtidos na **Tabela 11**.

**Tabela 11:** Valores de p, coeficientes estimados e coeficiente de determinação para o modelo ajustado.

<b>Fonte de variação</b>	<b>p-valor da falta de ajuste</b>	<b>Coeficiente estimado</b>
<b>A - Tempo</b>	< 0,0001	0,1163
<b>B-pH</b>	< 0,0001	-0,1196
<b>C - % ACN</b>	< 0,0001	0,0439
<b>AB</b>	< 0,0001	- 0,0496
<b>AC</b>	0,0033	- 0,0270
<b>BC</b>	0,0383	0,0178
<b>A<sup>2</sup></b>	0,5137	0,0063
<b>B<sup>2</sup></b>	< 0.0001	- 0,0564
<b>C<sup>2</sup></b>	< 0.0001	- 0,1003
<b>Falta de ajuste</b>	0,2259	-
<b>Modelo</b>	< 0,0001	-
<b>Varição explicada (R<sup>2</sup>) = 0,9855</b>		

A qualidade do ajuste do modelo foi avaliada por ANOVA e o modelo não apresentou falta de ajuste em 95% de confiança, com valor de p maior que 0,05, sendo a regressão significativa, com valor de p para o modelo menor que 0,05 e a variância explicada pelo modelo foi de 98,55%. O coeficiente estimado representa a mudança esperada na resposta quando todos os fatores restantes são mantidos constantes e pelos valores vê-se que o tempo e a porcentagem de ACN tiveram um valor positivo, ou seja, em níveis mais altos dessas variáveis há um aumento da resposta, enquanto que o pH apresentou um coeficiente negativo, ou seja, um aumento na resposta quando esse fator esta em um nível mais baixo.

As interações entre os fatores estudados estão representados pelas superfícies de resposta da **Figura 14**.



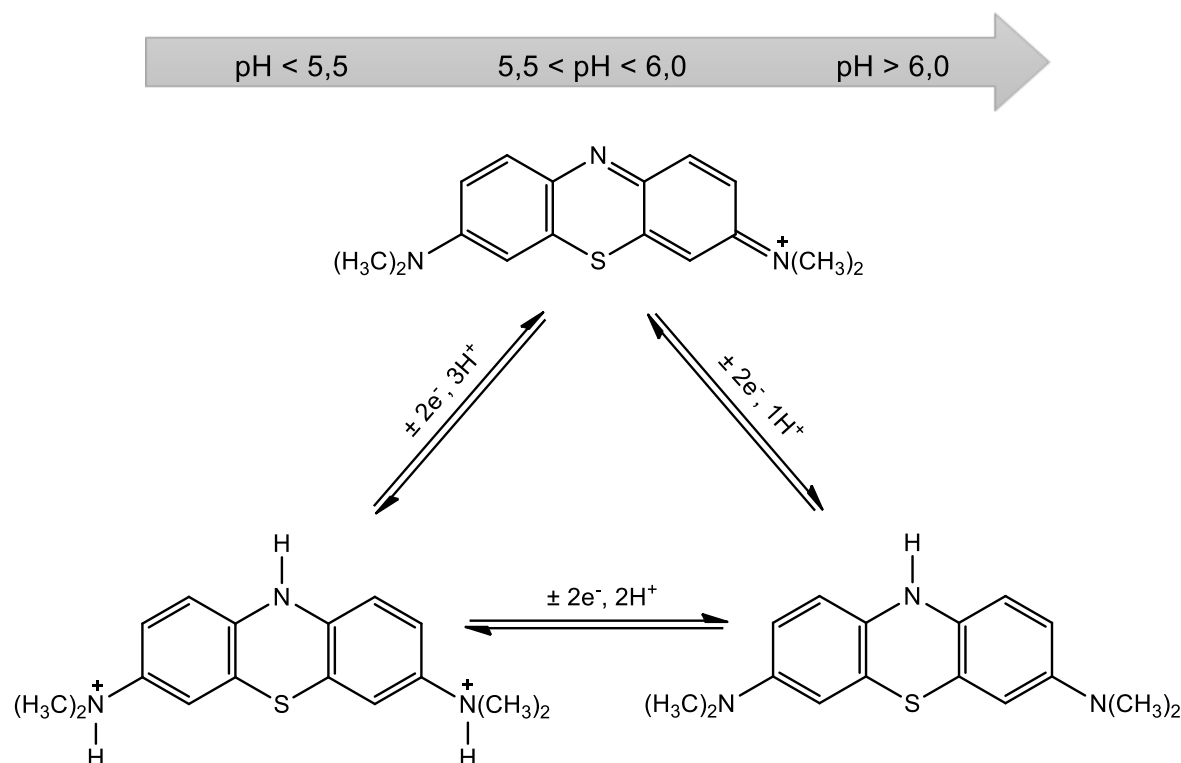
**Figura 14.** Superfícies de resposta para o planejamento Box-Behnken avaliando interação entre: (A) tempo e porcentagem de orgânico na fase doadora; (B) pH da fase doadora e tempo de extração; (C) pH e porcentagem de orgânico ambos da fase doadora. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V; concentração do corante na fase doadora de 0,5 mg L<sup>-1</sup>; fase aceptora constituída de 0,0300 g de algodão embebido em solução 0,50 mol L<sup>-1</sup> de ácido acético.

Ao observar as superfícies de resposta, percebe-se que se tem maiores valores de absorvância para o tempo próximo do nível superior (25 minutos) e para concentrações de ACN próximas do nível zero (35%), enquanto que para o pH, tem-se um aumento na resposta quando esse se encontra próximo a níveis baixos (pH = 5,00).

O tempo em que o potencial elétrico é aplicado também determina o total de íons que serão trocados entre as fases doadora e aceptora, porém há um tempo limite para que ocorra uma extração máxima, e isso ocorre quando há o esgotamento dos íons constituintes da solução eletrolítica da fase aceptora <sup>44</sup>.

O efeito positivo na resposta com o uso de ACN na fase doadora pode ser explicado por dois fatores. Um deles é que na presença desse solvente há uma diminuição da condutividade da solução, o que faz com que haja um aumento do campo elétrico e conseqüentemente um acréscimo na cinética de migração dos íons, gerando maior extração <sup>64</sup>. Além disso, o solvente orgânico presente na fase doadora proporciona uma menor tensão interfacial entre essa e o 1-octanol constituinte do filtro orgânico, facilitando assim o transporte do analito para a fase aceptora.

Para que o azul de metileno migre em direção ao catodo por eletromigração, ele precisa estar positivamente carregado, logo, o pH da fase doadora precisa estar em um valor tal que garanta que o corante esteja protonado. Isso explica por que o pH ótimo foi igual a 5,00 uma vez que, nessa condição o corante assume duas cargas positivas tendo, portanto, sua extração regida preponderantemente pela eletromigração. Em valores de pH maiores que 6,00 ele assume a neutralidade e nessa última condição sua migração passa a ser comandada majoritariamente por difusão. A **Figura 15** mostra as estruturas do azul de metileno em diferentes valores de pH <sup>27</sup>.

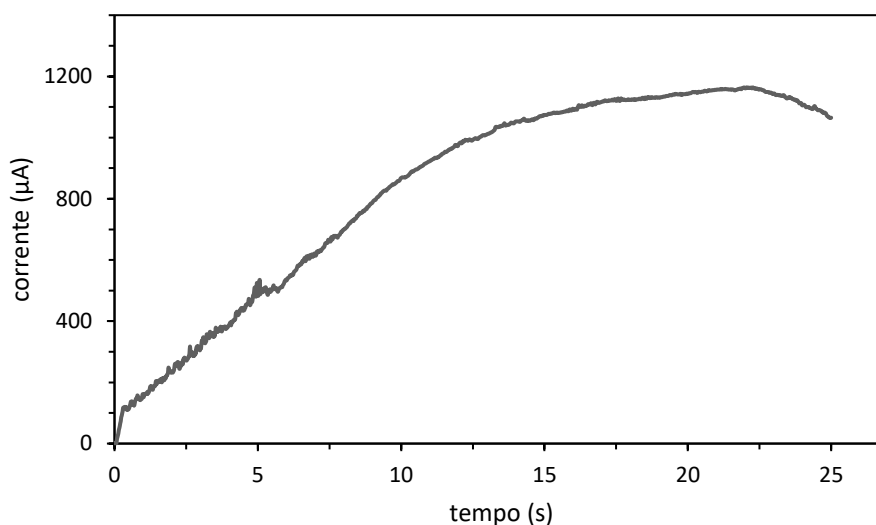


**Figura 15.** Estruturas do azul de metileno em diferentes valores de pH. Fonte: Adaptado de Anastapoulos (2017)<sup>27</sup>.

Diante dos resultados supracitados, as condições ótimas para o método desenvolvido foram fase doadora composta de tampão McIlvaine pH = 5,00 com 35% (v/v) de ACN e tempo de 25 minutos para a eletroextração.

### 5.5 Avaliação do perfil da corrente elétrica para a eletroextração multifásica do azul de metileno.

Durante a aplicação do campo elétrico ao sistema de eletroextração multifásico, a corrente elétrica individual do sistema, foi monitorada e o resultado está apresentado na **Figura 16**.



**Figura 16.** Perfil da corrente elétrica para o sistema otimizado. Condições: fase doadora composta por 32,0 mL de AM 0,5 mg L<sup>-1</sup> em tampão McIlvaine pH = 5,00 com 35% (v/v) de ACN; filtro orgânico formado por 3,00 mL de 1-octanol; fase acceptora constituída por ácido acético 0,50 mol L<sup>-1</sup> imobilizado em 0,0300 g de algodão e diferença de potencial elétrico de 300 V aplicado durante 25 minutos.

Ao analisar a **Figura 16** percebe-se que há um aumento na corrente elétrica nos primeiros minutos e com o passar do tempo essa atinge um patamar estável ao longo do tempo de aplicação do campo elétrico<sup>88</sup>.

Esse aumento da corrente elétrica nos primeiros minutos, pode ser explicado pela migração inicialmente rápida dos íons presentes em direção aos eletrodos de carga oposta, quando um campo elétrico é aplicado. Porém, com o tempo esses íons tendem a se acumular nas interfaces da fase doadora com filtro orgânico e desse com a fase acceptora, formando uma dupla camada de íons a qual oferece resistência à transferência de massa fazendo com que a corrente cesse seu aumento<sup>89</sup>.

O perfil apresentado na **Figura 16** comprova a estabilidade do sistema durante o tempo da extração, uma vez que, uma corrente elétrica muito alta inviabiliza o sistema de extração por causar instabilidade no sistema. Seja por processo de eletrólise na superfície do eletrodo ou sobreaquecimento por efeito Joule, o que acarreta degradação do analito bem como do suporte sólido usado na fase acceptora. O valor da corrente elétrica varia pra cada sistema, uma vez que é dependente de diversos fatores, como por exemplo, das características físico-químicas do analito estudado, da condutividade dos solventes presentes e da concentração total de eletrólitos nas fases doadora e acceptora. A leve queda apresentada

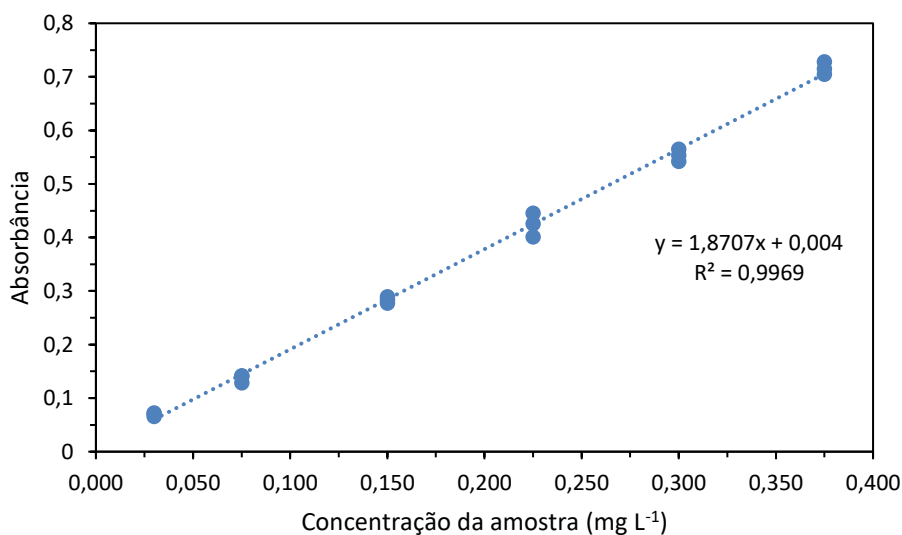
próximo dos 25 minutos pode ser devida a passivação do eletrodo ou até mesmo por esgotamento ou secagem da fase aceptora<sup>80,88,89</sup>.

## 5.6 Figuras de mérito avaliadas para o método

A seguir são apresentados e discutidos os resultados para algumas figuras de mérito do método desenvolvido.

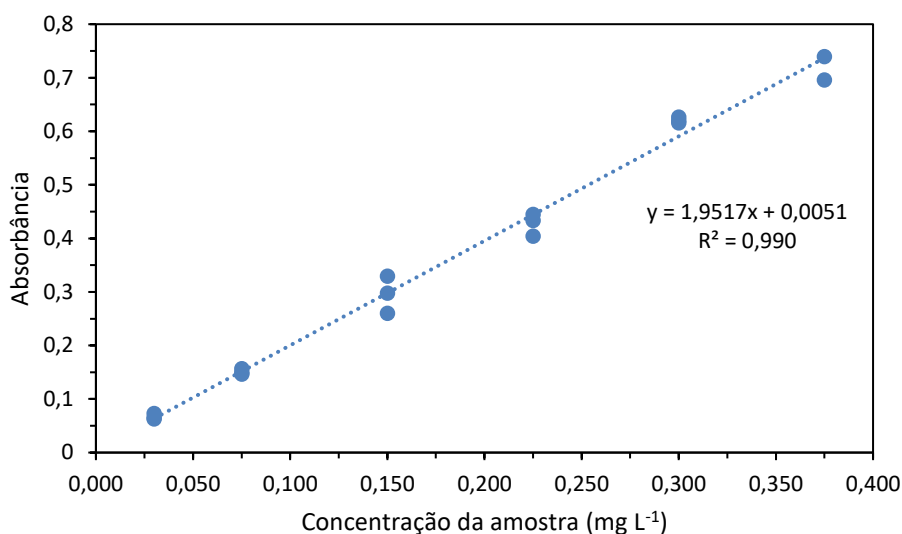
### 5.6.1 Linearidade

Foram construídas duas curvas extraídas em dias distintos, as quais foram designadas curva 1 e curva 2, expostas na **Figura 17** e **Figura 18**, respectivamente.



**Figura 17.** Curva analítica extraída (curva 1) para soluções de azul de metileno em tampão McIlvaine pH = 5,00. Absorbância em 654 nm.





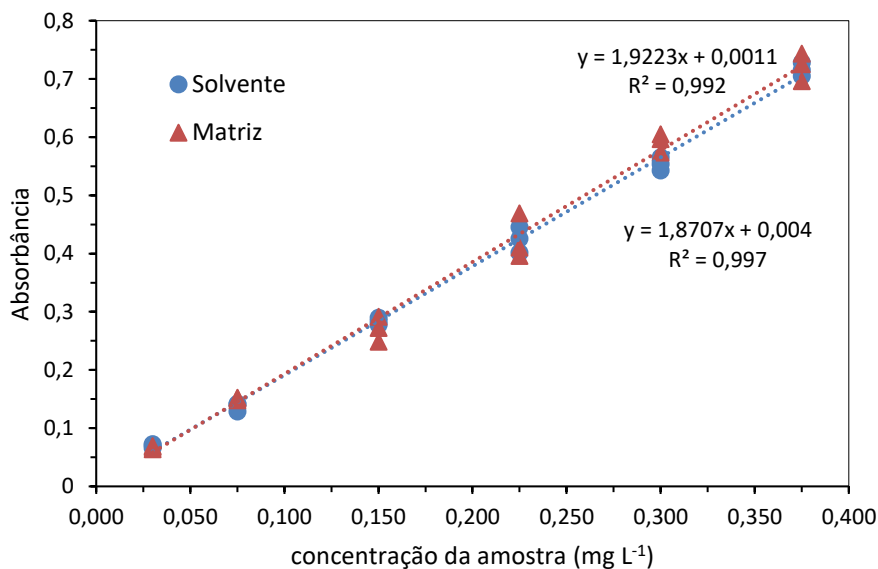
**Figura 18.** Curva analítica extraída (curva 2) para soluções de azul de metileno em tampão McIlvaine pH = 5,00. Absorvância em 654 nm.

Foram construídas duas curvas devido ao teste de precisão intermediária, que foi feito em dois dias diferentes e os dados de cada dia foi interpolado com sua respectiva curva. Essas curvas foram do tipo  $y = ax + b$ , em que  $y$  é o sinal analítico (absorvância) adquirido por EAM-UV/Vis,  $a$  é o coeficiente angular,  $b$  é o coeficiente linear e  $x$  refere-se à concentração do analito. A detecção de *outliers* para as curvas 1 e 2 foi realizada pelo teste do resíduo padronizado de Jackknife. Não houve *outliers* para a curva 1 e houve a necessidade de remoção de um *outlier* da curva 2. No mais, para as duas não houve autocorrelação entre os resíduos com  $p > 0,10$  (teste de Durbin-Watson), os resíduos seguiram a normal com  $p > 0,10$  (teste de Ryan-Joiner) e apresentaram homocedasticidade com  $p > 0,05$  (teste de Brown-Forsythe) e por fim, com uma análise de variâncias (ANOVA) foi verificado que não houve desvio de linearidade com  $p > 0,05$  e a regressão foi significativa com  $p < 0,001$ .

### 5.6.2 Efeito de matriz

Para o teste do efeito de matriz, após construir a curva analítica extraída em água de torneira, analisou-se a linearidade seguindo o mesmo procedimento para a curva preparada em água deionizada e obteve-se resultados idênticos aos da curva 1, como descrito na seção anterior (5.6.1). Em seguida a homogeneidade das variâncias dos resíduos das duas curvas foi testada pelo teste F, encontrando-se  $p < 0,05$ , mostrando heterocedasticidade entre eles. O teste t foi aplicado para comparar as interseções e inclinações das curvas,

encontrando-se para ambos  $p > 0,05$  indicando que as interseções e inclinações não diferem entre si. Assim, verificou-se a ausência do efeito de matriz, o que também pode ser visto observando a sobreposição das curvas na **Figura 19**.



**Figura 19.** Análise do efeito de matriz para as curvas analíticas extraídas em água deionizada e em água de torneira (matriz).

### 5.6.3 Precisão

Para se avaliar a repetibilidade fez-se extrações da amostra para os níveis 0,030; 0,225 e 0,375 mg L<sup>-1</sup> e substituiu-se os valores de absorbância encontrados para as dessorções na curva 1 e então encontrou-se os valores de concentrações para os três níveis analisados. Em seguida, calculou-se a média, o desvio padrão e o DPR das medidas. Em um dia distinto, repetiu-se o mesmo procedimento feito para a repetibilidade, fazendo-se uma nova curva, designada curva 2, e os valores de absorbância encontrados foram lançados na equação dada por essa, para se encontrar as concentrações.

Para o cálculo de DPR para avaliação da precisão intermediária, uniu-se os seis valores de concentrações encontrados no dia 1 e os seis encontrados no dia 2, calculou-se a média, o desvio e o DPR desse conjunto de dados. Os dados estão dispostos na **Tabela 12** e, observando-os, pode-se afirmar que o método é preciso em termos da repetibilidade e da precisão intermediária. Uma vez que o desvio padrão relativo em condições de repetibilidade deve situar-se abaixo de 23 % e abaixo de 35% para a precisão intermediária, segundo os critérios de aceitação, para concentrações menores que 1 mg L<sup>-1</sup> apresentadas pelo guia de validação MAPA <sup>90</sup>.

**Tabela 12.** Valores de desvio padrão relativo para avaliação da precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária.

	Níveis de concentrações das amostras		
	DPR (%)		
	0,030 mg L <sup>-1</sup>	0,225 mg L <sup>-1</sup>	0,375 mg L <sup>-1</sup>
<b>Repetibilidade</b>	8,6	4,9	3,0
<b>Precisão intermediária</b>	9,9	8,8	9,2

#### 5.6.4 Veracidade

Após a execução das sextuplicatas das eletroextrações para os 3 níveis selecionados da curva analítica, a veracidade do método foi avaliada em termos da recuperação, os resultados estão apresentados na **Tabela 13**. Os critérios de aceitação para a recuperação segundo a AOAC (2016) podem variar de 60 a 115 para analitos em concentrações da ordem de 10 ppb (0,01 mg L<sup>-1</sup>) e de 80 a 110 para analitos em concentrações da ordem de 100 ppb (0,1 mg L<sup>-1</sup>). Como as concentrações aqui avaliadas estão dentro dessa faixa, as recuperações foram consideradas aceitáveis.<sup>91</sup>.

**Tabela 13.** Valores de recuperação para o método.

	Níveis de concentrações das amostras		
	0,030 mg L <sup>-1</sup>	0,225 mg L <sup>-1</sup>	0,375 mg L <sup>-1</sup>
<b>Média</b>	0,031	0,22	0,39
<b>Desvio</b>	0,003	0,01	0,01
<b>DPR (%)</b>	8,6	4,9	3,0
<b>Recuperação (%)</b>	102	99	105

### 5.6.5 Limite de detecção e quantificação

Os limites de quantificação e detecção teóricos foram calculados a partir do desvio das concentrações das soluções de dessorção dos brancos da amostra (água deionizada), após passarem pelo processo de eletroextração e estão apresentados na **Tabela 14**.

**Tabela 14.** Limites de detecção e quantificação para o método.

Inclinação da curva (a)	Média (mg L <sup>-1</sup> )	Desvio (s) (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )	LD (mg L <sup>-1</sup> )
1,8707	0,016	0,001	0,004	0,001

Os baixos valores dos limites de quantificação e detecção, referem-se as concentrações das amostras de partida, e indicam que com a pré-concentração de dez vezes oferecida pelo método é possível detectar e quantificar pequenas concentrações do azul de metileno, mesmo com a utilização da técnica de EAM-UV/Vis. Como exposto na **Tabela 1**, Khan *et al.* (2014) utilizando a extração em fase sólida como preparo de amostra e o UHPLC-MS/MS como técnica de análise, conseguiu-se um limite de detecção de 0,0001 mg L<sup>-1</sup> e um limite de quantificação de 0,0004 mg L<sup>-1</sup> para o azul de metileno em água. Esse valor é apenas 10 vezes menor que o apresentado na **Tabela 14**. Isso mostra o potencial do método desenvolvido nesse trabalho e indica a possibilidade de se alcançar valores muito menores de limites de quantificação e detecção que os obtidos por Khan *et al.*(2014), no caso de futuramente, se associar técnicas analíticas mais sensíveis à eletroextração multifásica desenvolvida e otimizada nesse trabalho <sup>51</sup>.

### 5.7 Eficiência de extração

A eficiência de extração foi calculada para seis amostras de concentração de 0,225 mg L<sup>-1</sup> obtendo-se o valor médio de 31% como pode ser visto na **Tabela 15** juntamente com os desvios para as medidas.

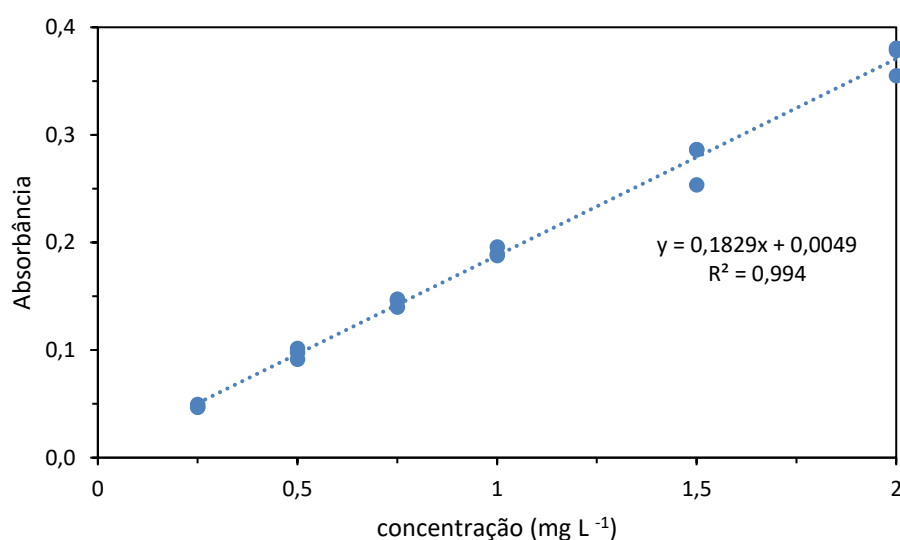
**Tabela 15.** Valor médio da eficiência de extração e seus desvios

EE média (%)	Desvio padrão	DPR (%)
31	2	4,8

O valor encontrado é considerado satisfatório, uma vez que, o objetivo desse trabalho não foi ter uma extração exaustiva do analito e sim conseguir uma pré-concentração capaz de possibilitar a análise de amostras com baixas concentrações de azul de metileno.

## 5.8 Fator de pré-concentração

Após a realização das eletroextrações das amostras de concentração  $0,030 \text{ mg L}^{-1}$ , em sextuplicata, encontrou-se as concentrações das soluções de dessorção empregando-se a equação da curva analítica representada na **Figura 20** e fez-se a razão dessas pela concentração inicial da amostra, encontrando-se assim os valores dos fatores de pré-concentração (FPC) para cada replicata.



**Figura 20.** Curva analítica do azul de metileno preparada em uma mistura de MeOH / ACN / HAc na proporção 40:40:20 (v/v/v).

O valor médio do FPC, bem como o desvio padrão entre as replicatas e o DPR estão representados na **Tabela 16**.

**Tabela 16.** Valor médio do fator de pré-concentração e seus desvios.

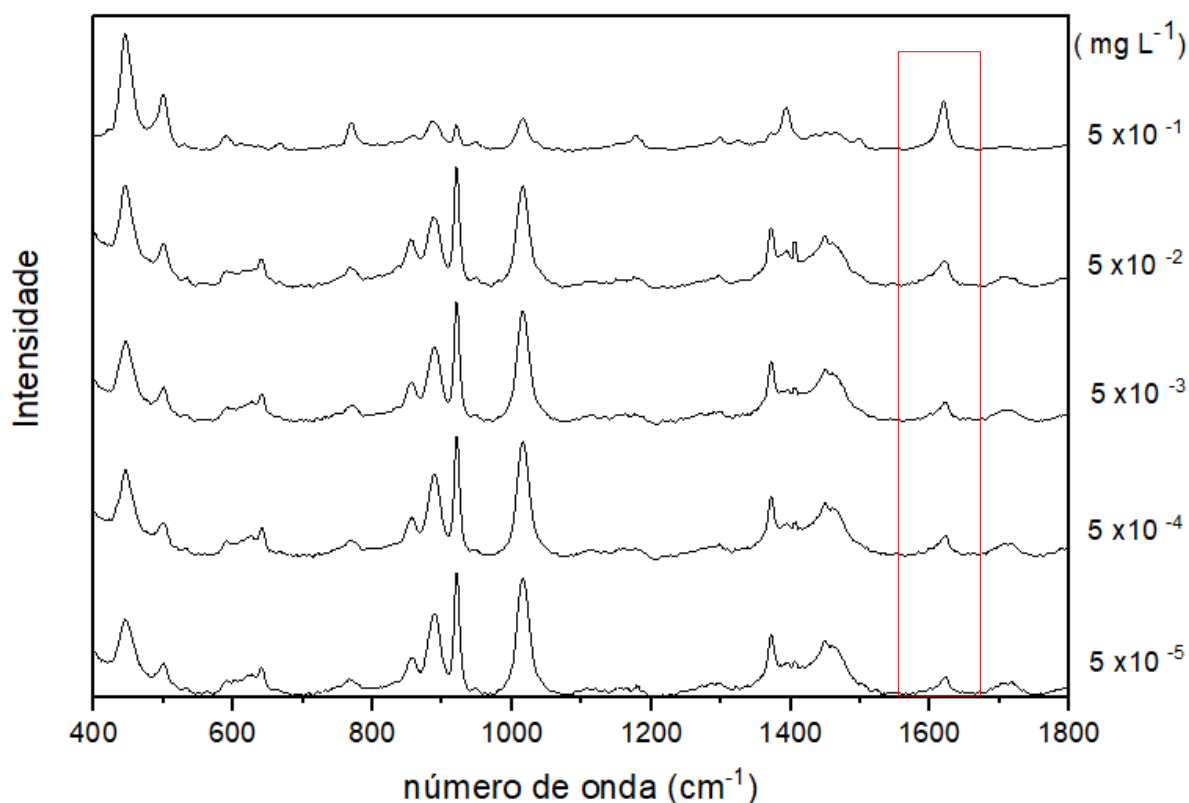
FCP médio	Desvio padrão	DPR (%)
10,3	0,9	8,7

Os cálculos mostraram que foi possível pré-concentrar a amostra 10 vezes. Durante os experimentos, verificou-se que as soluções com baixas concentrações do azul de metileno, que não permitiam uma percepção visual do corante, ao serem pré-concentradas no algodão durante a eletroextração, se mostraram coloridas e usando um pequeno volume de solução de dessorção, foi possível sua determinação. Isso confirma o grande potencial do método de eletroextração multifásico aqui desenvolvido, o qual possibilita a detecção e quantificação de amostras com concentrações muito baixas de analito, mesmo utilizando uma técnica analítica de baixo custo e menor sensibilidade como a espectrofotometria UV/Vis.

A pré-concentração alcançada nesse trabalho, foi maior que a apresentada por Raterink *et al.* (2013) em seu sistema de eletroextração multifásico utilizando uma gota suspensa, o qual conseguiu valores entre 0,7 e 7 para as diferentes carnitinas<sup>64</sup>. Uma grande vantagem do método desenvolvido é que associado ao alto fator de pré-concentração, ele permite o uso de maiores volumes de amostra, comparado aos comumente utilizados na literatura, para os trabalhos de eletroextração. Assim, tem-se a possibilidade do uso de amostras com menores concentrações de analito<sup>64,80,92</sup>.

### **5.8.1 Análise qualitativa da eletroextração multifásica do azul de metileno utilizando o espalhamento Raman intensificado por superfície**

Após as eletroextrações realizadas para as amostras de concentrações de  $5 \times 10^{-1}$  a  $5 \times 10^{-5}$  mg L<sup>-1</sup> de azul de metileno nas condições otimizadas, obteve-se as soluções de dessorções, nas quais se adicionou uma suspensão de nanopartículas de ouro e em seguida solução de NaCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>, o qual agiu como agente agregante das nanopartículas. Geralmente, o colóide não é SERS-ativo quando preparado, necessitando ser ativado pela agregação, de maneira que estruturas de maiores dimensões sejam formadas e mantidas estáveis durante a aquisição dos espectros<sup>72</sup>. A agregação favorece também a criação dos chamados *hot spots* que são regiões de intensificação do campo elétrico o que contribui para a intensificação do sinal Raman. Os espectros obtidos estão apresentados na **Figura 21**.



**Figura 21.** Espectros SERS das desorções do azul de metileno com os respectivos valores de concentrações em  $\text{mg L}^{-1}$ , referentes às amostras antes da eletroextração. Laser de excitação em 785 nm.

O efeito SERS se caracteriza por possuir dois mecanismos de intensificação, o químico e o eletromagnético. Com relação ao primeiro, esse depende da polarizabilidade do sistema metal-molécula e essa polarizabilidade depende do tipo de analito. Como o azul de metileno é uma molécula de alta polarizabilidade, possuindo grupos aminas e anéis aromáticos, há o favorecimento do fenômeno químico e somado a isso, a adsorção das moléculas do corante às nanopartículas favorece o segundo mecanismo. Assim, nessa interação de ambos os processos há uma contribuição de forma variável para a intensificação da banda em  $1620 \text{ cm}^{-1}$  característica do AM, observada nos espectros, mesmo em concentrações baixíssimas como a menor concentração apresentada de  $5 \times 10^{-5} \text{ mg L}^{-1}$  (0,05 ppb).

Ao analisar os resultados apresentados na **Figura 21**, percebe-se que o método é promissor quando une-se a alta pré-concentração da eletroextração com as características de intensificação de sinal do SERS. Podendo-se conseguir detecções e quantificações cada

vez mais baixas, se for realizada uma otimização das condições de análise para a técnica, uma vez que essa é mais sensível e seletiva que a EAM- UV/Vis.



## 6 CONCLUSÕES

Uma nova abordagem de preparo de amostras aplicando campo elétrico foi apresentada nesse trabalho, que se constituiu de um sistema de eletroextração multifásico, para grandes volumes de amostra, com suporte sólido para a fase aceptora. Para a montagem desse sistema, fez-se uso de materiais acessíveis e de baixo custo, o que viabiliza seu uso em laboratórios de análise. Adicionalmente, o dispositivo multipoços, utilizado nesse trabalho, possibilita múltiplas extrações simultâneas, agilizando o processo extrativo, podendo-se agitar ou não a solução, de acordo com a necessidade do sistema em estudo.

Os testes preliminares, mostraram que o sistema de filtro livre sem agitação, proporcionou melhores resultados de extração do corante azul de metileno, utilizando como suporte para a fase aceptora o algodão, o qual é um material de baixo custo, comercialmente acessível e de fácil acomodação na ponteira. O uso do suporte sólido, associado às demais condições de análise, possibilitou a aplicação de um valor elevado de potencial elétrico, 300 V, sem desestabilizar o sistema, o que pôde ser comprovado pelo perfil da corrente elétrica em função do tempo. Além disso, permitiu a dessorção do algodão para posterior análise por EAM-UV/Vis.

A otimização do sistema de eletroextração, foi realizada empregando-se métodos multivariados. As variáveis significativas para o processo de extração, bem como as condições ótimas, foram: tampão pH = 5,00 para a fase doadora com 35% (v/v) de ACN e tempo de extração de 25 minutos.

A pré-concentração de dez vezes, apresentada pelo método otimizado, possibilitou a detecção e quantificação de baixas concentrações do corante, fazendo-se uso de uma técnica acessível como a EAM-UV/Vis, disponível na maioria dos laboratórios. Ao se fazer uma análise qualitativa das dessorções provenientes das extrações, utilizando-se o SERS, verificou-se o grande potencial do método de pré-concentração, quando aliado a sensibilidade dessa técnica, os quais juntos permitiram a detecção de concentrações ainda mais baixas do azul de metileno.

O método desenvolvido se mostrou promissor para detecção e quantificação do corante azul de metileno em água destinada para o consumo humano, servindo também como um marcador para outros contaminantes emergentes catiônicos, que por ventura possam estar presentes na água após essa passar pelas estações de tratamento. Esse método pode ser usado para sinalizar as falhas no processo, com o intuito de corrigir e melhorar as condições de tratamento, de forma a garantir a qualidade da água tratada. Um outro diferencial do método proposto no presente trabalho, é a possibilidade de análise sem a restrição de

volumes menores de amostras, como em outros sistemas apresentados na literatura. Isso é um diferencial quando se tem amostras em baixas concentrações de analito, tendo então a possibilidade de uma pré-concentração e detecção dessas espécies.

Como uma perspectiva futura, o uso do suporte sólido se apresenta também favorável, por possibilitar a leitura direta do algodão no espectrômetro Raman, sem a necessidade de gasto com solventes de dessorção, trazendo economia e agilidade no processo, o que não foi demonstrado nesse trabalho, por questões de disponibilidade do equipamento.

## REFERÊNCIAS

1. He J, Cui A, Deng S, Chen JP. Treatment of methylene blue containing wastewater by a cost-effective micro-scale biochar/polysulfone mixed matrix hollow fiber membrane: Performance and mechanism studies. *J Colloid Interface Sci.* 2018;512:190–7.
2. Bolson JO, Turnipseed SB. A review of aquaculture practices and their impacts on chemical food safety from a regulatory perspective. *J AOAC Int.* 2015;98(3):541–9.
3. Chen RC, Wei KJ, Wang TM, Yu YM, Li JY, Lee SH, et al. Simultaneous quantification of antibiotic dyes in aquatic products and feeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Food Drug Anal.* 2013;21(4):339–46.
4. D. NR, T. EA. A potential tissue culture approach for the phytoremediation of dyes in aquaculture industry. *Biochem Eng J.* 2016;115:23–9.
5. de Castro KC, Cossolin AS, Oliveira dos Reis HC, de Moraes EB. Biosorption of anionic textile dyes from aqueous solution by yeast slurry from brewery. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2017;60:1–13.
6. Fungaro DA, Bruno M. Utilização de zeólitas sintetizadas a partir de cinza de carvão para remoção de azul de metileno em água. *J Orbital.* 2009;1:49–63.
7. Filho MA. Potável Porém Contaminada. *J da Unicamp.* 2012; 527:3.
8. Starling MCVM, Amorim CC, Leão MMD. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. *J Hazard Materials.* 2019;372:17–36.
9. Mayumi R, Fujita L. A Indústria Têxtil no Brasil: uma perspectiva histórica e cultural. *ModaPalavra e-periódico.* 2015;15:153–74.
10. Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecções (ABIT). Disponível em: <https://www.abit.org.br/>. Acesso em: 8 out.2019.
11. de Oliveira Neto GC, Ferreira Correia JM, Silva PC, de Oliveira Sanches AG, Lucato WC. Cleaner Production in the textile industry and its relationship to sustainable development goals. *J Clean Prod.* 2019;228:1514–25.

12. Yagub MT, Sen TK, Afroze S, Ang HM. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review. *Adv Colloid Interface Sci.* 2014;209:172–84.
13. Yagub MT, Sen TK, Ang HM. Equilibrium, kinetics, and thermodynamics of methylene blue adsorption by pine tree leaves. *Water Air Soil Pollut.* 2012;223(8):5267–82.
14. Ferrari AM et al. CaTiO<sub>3</sub> Perovskite in the Photocatalysis of Textile Wastewater. *Rev Ambiente e Agua.* 2019; 3:2-11
15. Satdeve NS, Ugwekar RP, Bhanvase BA. Ultrasound assisted preparation and characterization of Ag supported on ZnO nanoparticles for visible light degradation of methylene blue dye. *J Mol Liq.* 2019;291:1-11.
16. Tenev MD, Farías A, Torre C, Fontana G, Caracciolo N, Boeykens SP. Cotton industry waste as adsorbent for methylene blue. *J Sustain Dev Energy, Water Environ Syst.* 2019;7(4):667–77.
17. Parakala S, Moulik S, Sridhar S. Effective separation of methylene blue dye from aqueous solutions by integration of micellar enhanced ultrafiltration with vacuum membrane distillation. *Chem Eng J.* 2019;375:1-11
18. Khandegar V, Saroha AK. Electrocoagulation for the treatment of textile industry effluent - A review. *J Environ Manage.* 2013;128:949–63.
19. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO). Disponível em: <http://www.fao.org/3/x6941e/x6941e04.htm>. Acesso em: 24 ago.2019.
20. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1144781/>. Acesso em: 24 ago.2019.
21. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Disponível em: <http://www.fao.org/documents/card/es/c/I9540EN/>. Acesso em: 25 ago.2019.
22. López-Gutiérrez N, Romero-González R, Martínez Vidal JL, Frenich AG. Analysis of triphenylmethane dyes in seafood products: A review of extraction methods and determination by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Anal Methods.* 2013;5(14):3434–49.

23. Xu KX, Guo MH, Huang YP, Li XD, Sun JJ. Rapid and sensitive detection of malachite green in aquaculture water by electrochemical preconcentration and surface-enhanced Raman scattering. *Talanta*. 2018;180:383–8.
24. Hashimoto JC, Pachol JA. A simple method for the determination of malachite green and leucomalachite green residues in fish by a modified QuEChERS Extraction and LC/MS/MS. *AOAC*. 2012;95(3):913–22.
25. Bulla LMC, Polonio JC, Portela-Castro AL de B, Kava V, Azevedo JL, Pamphile JA. Activity of the endophytic fungi *Phlebia* sp. and *Paecilomyces formosus* in decolourisation and the reduction of reactive dyes' cytotoxicity in fish erythrocytes. *Environ Monit Assess*. 2017;189(88):1-11
26. Amelin VG, Korotkov AI, Andoralov AM. Simultaneous determination of dyes of different classes in aquaculture products and spices using HPLC–high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Anal Chem*. 2017;72(2):183–90.
27. Anastasopoulos JA, Soto Beobide A, Manikas AC, Voyiatzis GA. Quantitative surface-enhanced resonance Raman scattering analysis of methylene blue using silver colloid. *J Raman Spectrosc*. 2017;48(12):1762–70.
28. Mishra S, Kumar P. Attenuation of methylene blue dye during riverbank filtration through sandy aquifers. *Water Environ J*. 2015;29(4):507–14.
29. Manna S, Roy D, Saha P, Gopakumar D, Thomas S. Rapid methylene blue adsorption using modified lignocellulosic materials. *Process Saf Environ Prot*. 2017;107:346–56.
30. Li C, Huang Y, Lai K, Rasco BA, Fan Y. Analysis of trace methylene blue in fish muscles using ultra-sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy. *Food Control*. 2016;65:99–105.
31. Saneamento SN de. Diagnostico dos serviços de água e esgoto. 2018; Disponível em: <http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos>. Acesso em: 20 dez.2019.
32. Reichert G, Hilgert S, Fuchs S, Azevedo JCR. Emerging contaminants and antibiotic resistance in the different environmental matrices of Latin America. *Environ Pollut*. 2019;255:113140. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113140>

33. Conselho Nacional do Meio Ambiente- CONAMA. Resolução N° 430, De 13 De Maio De 2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Acesso em: 20 ago.2019.
34. Marta-Sanchez AV, Caldas SS, Schneider A, Cardoso SMVS, Primel EG. Trace analysis of parabens preservatives in drinking water treatment sludge, treated, and mineral water samples. *Environ Sci Pollut Res*. 2018;25(15):14460–70.
35. Becerra-Herrera M, Miranda V, Arismendi D, Richter P. Chemometric optimization of the extraction and derivatization of parabens for their determination in water samples by rotating-disk sorptive extraction and gas chromatography mass spectrometry. *Talanta*. 2018;176,551–7.
36. Campestrini I, Jardim WF. Occurrence of cocaine and benzoylecgonine in drinking and source water in the São Paulo State region, Brazil. *Sci Total Environ*. 2017;576:374–80.
37. Rozas O, Vidal C, Baeza C, Jardim WF, Rossner A, Mansilla HD. Organic micropollutants (OMPs) in natural waters: Oxidation by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment and toxicity assessment. *Water Res*. 2016;98:109–18.
38. Campos, Camila D. M.;P. S. de Campos, Richard; Silva, José A; Orlando RM. Preparo de amostras assistido por campo elétrico: fundamentos, avanços, aplicações e tendências. 2015;38(8):1093–106.
39. Kaplan M, Olgun EO, Karaoglu O. A rapid and simple method for simultaneous determination of triphenylmethane dye residues in rainbow trouts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* . 2014;1349:37–43.
40. Long C, Mai Z, Yang X, Zhu B, Xu X, Huang X, et al. A new liquid-liquid extraction method for determination of 6 azo-dyes in chilli products by high-performance liquid chromatography. *Food Chem*. 2011;126(3):1324–9.
41. Zhu Y, Zhao B, Xiao R, Yun W, Xiao Z, Tu D, et al. Simultaneous determination of 14 oil-soluble synthetic dyes in chilli products by high performance liquid chromatography with a gel permeation chromatography clean-up procedure. *Food Chem*. 2014;145:956–62.

42. Asfaram A, Ghaedi M. Simultaneous determination of cationic dyes in water samples with dispersive liquid-liquid microextraction followed by spectrophotometry: Experimental design methodology. *New J Chem*. 2016;40(5):4793–802.
43. Pardo O, Yusà V, León N, Pastor A. Development of a method for the analysis of seven banned azo-dyes in chilli and hot chilli food samples by pressurised liquid extraction and liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2009;78(1):178–86.
44. Nojavan S, Tahmasebi Z, Bidarmanesh T, Behdad H, Nasiri-Aghdam M, Mansori S, et al. Electrically enhanced liquid-phase microextraction of three textile azo dyes from wastewater and plant samples. *J Sep Sci*. 2013;36(19):3256–63.
45. Valero D, Ortiz JM, Expósito E, Montiel V, Aldaz A. Electrochemical wastewater treatment directly powered by photovoltaic panels: Electrooxidation of a dye-containing wastewater. *Environ Sci Technol*. 2010;44(13):5182–7.
46. El-Sayed GO. Removal of methylene blue and crystal violet from aqueous solutions by palm kernel fiber. *Desalination*. 2011;272(1–3):225–32.
47. Bakheet B, Yuan S, Li Z, Wang H, Zuo J, Komarneni S, et al. Electro-peroxone treatment of Orange II dye wastewater. *Water Res*. 2013;47(16):6234–43.
48. Ge Q, Wang P, Wan C, Chung TS. Polyelectrolyte-promoted Forward Osmosis-Membrane Distillation (FO-MD) hybrid process for dye wastewater treatment. *Environ Sci Technol*. 2012;46(11):6236–43.
49. Astuti R, Mukti BI. Simple preparation of rice husk activated carbon ( RHAC ) and applications for laundry and methylene blue wastewater treatment Simple Preparation of Rice Husk Activated Carbon ( RHAC ) and Applications for Laundry and Methylene Blue Wastewater Treatment. 2017;020033: 1-9.
50. Razmara RS, Daneshfar A, Sahrai R. Determination of methylene blue and sunset yellow in wastewater and food samples using salting-out assisted liquid-liquid extraction. *J Ind Eng Chem* . 2011;17(3):533–6.

51. Khan MR, Khan MA, Alothman ZA, Alsohaimi IH, Naushad M, Al-Shaalan NH. Quantitative determination of methylene blue in environmental samples by solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A green approach. *RSC Adv.* 2014;4(64):34037–44.
52. Liang N, Hou X, Huang P, Jiang C, Chen L, Zhao L. Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction combined with functionalized magnetic nanoparticle solid-phase extraction for determination of industrial dyes in water. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–9.
53. Nekouei F, Kargarzadeh H, Nekouei S, Keshtpour F, Makhlof ASH. Efficient method for determination of methylene blue dye in water samples based on a combined dispersive solid phase and cloud point extraction using Cu(OH)<sub>2</sub> nanoflakes: central composite design optimization. *Anal Bioanal Chem.* 2017;409(4):1079–92.
54. Moreira JS, Determinação de cocaína e lidocaina em saliva empregando preparo de amostra assistido por campo elétrico associado á cromatografia líquida-espectrometria de massas sequencial. 2018. Dissertação-Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
55. Sousa DVM, Pereira F V., Nascentes CC, Moreira JS, Boratto VHM, Orlando RM. Cellulose cone tip as a sorbent material for multiphase electrical field-assisted extraction of cocaine from saliva and determination by LC-MS/MS. *Talanta.* 2020; 208:120353. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120353>
56. Orlando RM, Nascentes CC, Botelho BG, Moreira JS, Costa KA, de Miranda Boratto VH. Development and Evaluation of a 66-Well Plate Using a Porous Sorbent in a Four-Phase Extraction Assisted by Electric Field Approach. *Anal Chem.* 2019,91: 6471-78
57. Stichlmair J, Schmidt J, Proplesch R. Electroextraction: A novel separation technique. *Chem Eng Sci.* 1992;47(12):3015–22.
58. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids. *J Chromatogr A.* 2006;1109(2):183–90.
59. Huang C, Chen Z, Gjelstad A, Pedersen-bjergaard S, Shen X. Electromembrane extraction. *Trends Anal Chem.* 2017;95:47–56.



60. Drouin N, Kubáň P, Rudaz S, Pedersen-Bjergaard S, Schappler J. Electromembrane extraction: Overview of the last decade. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2019;113:357–63.
61. Huang C, Jensen H, Seip KF, Gjelstad A, Pedersen-Bjergaard S. Mass transfer in electromembrane extraction - The link between theory and experiments. *J Sep Sci.* 2016;39(1):188–97.
62. Gjelstad A, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S. Simulation of flux during electromembrane extraction based on the Nernst-Planck equation. *J Chromatogr A.* 2007;1174:104–11.
63. Seip KF, Jensen H, Sønsteby MH, Gjelstad A, Pedersen-Bjergaard S. Electromembrane extraction: Distribution or electrophoresis? *Electrophoresis.* 2013;34(5):792–9.
64. Raterink RJ, Lindenburg PW, Vreeken RJ, Hankemeier T. Three-phase electroextraction: A new (Online) sample purification and enrichment method for bioanalysis. *Anal Chem.* 2013;85(16):7762–8.
65. Orlando RM, Nascentes CC, Moreira JS, Costa LPL, Pereira EA, Murta MBD. Dispositivos para extração e purificação de analitos com aplicação de campos elétricos. *BR10 2017 005471 3*, 2017. p. 1-27.
66. Orlando RM, Miranda TP, Viana J dos S, Resende GAP, Almeida MR, Botelho BG. Dispositivo para extração, pré-concentração e purificação de analitos com aplicação de campos elétricos e agitação magnética. *BR 10 2019 017861 2*, 2019. p. 1–35.
67. Viana J dos S. Preparo de amostras assistido por campo elétrico para determinação de verde malaquita em água de cultivo de peixes por LC-DAD-MS/MS. 2019. Dissertação- Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
68. Resende GAP de. Extração assistida por campo elétrico aplicada a determinação do perfil de ácidos graxos livres de cadeia média em sidra e hidromel por Lc-MS/MS. 2019. Dissertação- Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

69. De Faria DLA. Entenda o que é espectroscopia Raman. 2011;4. Disponível em: [https://www.crq4.org.br/default.php?p=texto.php&c=quimica\\_viva&p=texto.php&c=quimica\\_viva](https://www.crq4.org.br/default.php?p=texto.php&c=quimica_viva&p=texto.php&c=quimica_viva). Acesso em: 10 set.2019.
70. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Princípios de Análise Instrumental. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.
71. De Faria DLA. Espectroscopia Raman em Perícia Criminal: Estado da Arte e Perspectivas Futuras. Química Forense-Ampliando o Horizonte da Perícia. 1.ed. São Paulo: Millennium, 2012. p. 232.
72. Sant'Ana, Antonio C. Corio, Paola. Temperini ML. O efeito SERS na análise de traços: O papel das superfícies nanoestruturadas. Química Nova. 2006;29(4):805–10.
73. De Santana H, Zaia DAM, Corio P, El Haber F, Louarn G. Preparação e caracterização de substratos SERS ativos: Um estudo da adsorção do cristal violeta sobre nanopartículas de prata. Quim Nova. 2006;29(2):194–9.
74. De Faria DLA, Temperini MLA, Sala O. Vinte anos de efeito sers. Quim Nova. 1999; 22: 541–52.
75. Jones JC, McLaughlin C, Littlejohn D, Sadler DA, Graham D, Smith WE. Quantitative assessment of surface-enhanced resonance Raman scattering for the analysis of dyes on colloidal silver. Anal Chem. 1999;71(3):596–601.
76. Jahn M, Patze S, Bocklitz T, Weber K, Cialla-May D, Popp J. Towards SERS based applications in food analytics: Lipophilic sensor layers for the detection of Sudan III in food matrices. Anal Chim Acta. 2015;860:43–50.
77. Ouyang L, Yao L, Zhou T, Zhu L. Accurate SERS detection of malachite green in aquatic products on basis of graphene wrapped flexible sensor. Anal Chim Acta. 2018;1027:83–91.
78. Halvorson RA, Vikesland PJ. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for environmental analyses. Environ Sci Technol. 2010;44(20):7749–55.
79. McIlvaine TC. A buffer solution for colorimetric comparison. J Biol Chem. 1921;(49):183–6.

80. Rahmani T, Rahimi A, Nojavan S. Study on electrical current variations in electromembrane extraction process: Relation between extraction recovery and magnitude of electrical current. *Anal Chim Acta*. 2016;903:81–90.
81. Huang C, Eibak LEE, Gjelstad A, Shen X, Trones R, Jensen H, et al. Development of a flat membrane based device for electromembrane extraction: A new approach for exhaustive extraction of basic drugs from human plasma. *J Chromatogr A*. 2014;1326:7–12.
82. Novaes CG, Yamaki RT, De Paula VF, Do Nascimento Júnior BB, Barreto JA, Valasques GS, et al. Optimization of analytical methods using response surface methodology part i: Process variables. *Rev Virtual Quim*. 2017;9(3):1184–215.
83. De Souza SVC, Junqueira RG. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal Chim Acta*. 2005;552(1–2):25–35.
84. Souza SVC De. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: Delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. 2007. Tese- Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
85. Guo S, Xu H, Zhang F, Zhu X, Li X. Preparation and adsorption properties of nano magnetite silica gel for methylene blue from aqueous solution. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2018;546:244–53.
86. Ferrero F. Adsorption of Methylene Blue on magnesium silicate: Kinetics, equilibria and comparison with other adsorbents. *J Environ Sci*. 2010;22(3):467–73.
87. Acemioğlu B, Ertas M, Alma MH, Usta M. Investigation of the adsorption kinetics of methylene blue onto cotton wastes. *Turkish J Chem*. 2014;38(3):454–69.
88. Yamini Y, Seidi S, Rezazadeh M. Electrical field-induced extraction and separation techniques: Promising trends in analytical chemistry - A review. *Anal Chim Acta*. 2014;814:1–22.
89. Restan MS, Jensen H, Shen X, Huang C, Martinsen ØG, Kubáň P, et al. Comprehensive study of buffer systems and local pH effects in electromembrane extraction. *Anal Chim Acta*. 2017;984:116–23.

90. Ministerio da Agricultura P e A. Guia de validação e Controle de Qualidade Analítica . 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/guia-de-validacao-controle-de-qualidade-analitica.pdf/view>. Acesso em: 05 dez.2019.
91. INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008. 2018. Disponível em: [www.inmetro.gov.br](http://www.inmetro.gov.br). Acesso em: 05 dez.2019.
92. Kubáň P, Boček P. Micro-electromembrane extraction across free liquid membranes. Instrumentation and basic principles. J Chromatogr A. 2014;1346:25–33.