

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Jaime dos Santos Viana

**ELETROEXTRAÇÃO MULTIFÁSICA E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS
APLICADAS A ANÁLISE DE CORANTES ANTIMICROBIANOS EM ÁGUA
SUPERFICIAL POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS E IMAGEM DIGITAL**

Belo Horizonte
2024

UFMG/ICEX/DQ. 1.610

T. 735

Jaime dos Santos Viana

**ELETROEXTRAÇÃO MULTIFÁSICA E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS
APLICADAS A ANÁLISE DE CORANTES ANTIMICROBIANOS EM ÁGUA
SUPERFICIAL POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS E IMAGEM DIGITAL**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

Orientador: Prof. Bruno Gonçalves Botelho

Coorientador: Prof. Ricardo Mathias Orlando

Belo Horizonte

2024

Ficha Catalográfica

V614e
2024
T

Viana, Jaime dos Santos.
Eletroextração multifásica e ferramentas quimiométricas aplicadas a análise de corantes antimicrobianos em água superficial por espectrofotometria UV-VIS e imagem digital [manuscrito] / Jaime dos Santos Viana. 2024.
117 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Bruno Gonçalves Botelho.
Coorientador: Ricardo Mathias Orlando.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.
Bibliografia: f. 103-113.
Apêndices: f. 114-117.

1. Química analítica – Teses. 2. Preparação de amostra (Química) – Teses. 3. Extração (Química) – Teses. 4. Corantes – Teses. 5. Análise discriminante – Teses. 6. Mínimos quadrados – Teses. 7. Espectrofotometria – Teses. 8. Processamento de imagens – Técnicas digitais – Teses. 9. Quimiometria – Teses. 10. Solventes orgânicos – Teses. I. Botelho, Bruno Gonçalves, Orientador. II. Orlando, Ricardo Mathias, Coorientador. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Eletroextração Multifásica e Ferramentas Quimiométricas Aplicadas a Análise de Corantes Antimicrobianos em Água Superficial por Espectrofotometria UV-VIS e Imagem Digital"

Jaime dos Santos Viana

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Bruno Gonçalves Botelho - Orientador
UFMG

Prof. Ricardo Mathias Orlando - Coorientador
UFMG

Profa. Juliana Azevedo Lima Pallone
UNICAMP

Prof. Cleiton Antônio Nunes
UFLA

Profa. Mariana Ramos de Almeida
UFMG

Profa. Leticia Malta Costa
UFMG

Belo Horizonte, 05 de junho de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Cleiton Antônio Nunes, Usuário Externo**, em 05/06/2024, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Gonçalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 05/06/2024, às 21:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Mathias Orlando, Professor do Magistério Superior**, em 05/06/2024, às 21:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Ramos de Almeida, Professora do Magistério Superior**, em 06/06/2024, às 12:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Azevedo Lima Pallone, Usuário Externo**, em 06/06/2024, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Malta Costa, Professora do Magistério Superior**, em 08/06/2024, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3284130** e o código CRC **266CBB91**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por Sua Misericórdia ter me sustentado em todos os momentos dessa trajetória de formação profissional e pessoal.

Aos meus pais José Gonçalves Viana e Maria Rosa dos Santos Viana por todo o esforço, dedicação, apoio e orações.

Aos meus irmãos Celso, Maurício e Vanderley pelo apoio e incentivo, que não me faltaram em nenhum momento.

Ao Prof. Bruno Gonçalves Botelho pela orientação e por compartilhar seu conhecimento e experiência profissional e por todo o apoio, motivação, compreensão e paciência que estiveram sempre presentes e, acima de tudo, pela amizade.

Ao Prof. Ricardo Mathias Orlando pela coorientação, pela confiança e oportunidade de crescimento profissional, por compartilhar comigo seu amplo conhecimento e experiência profissional e, sobretudo, pela amizade.

Aos amigos do LAMS que convivi no início do doutorado (Glaucimar, Denise, Julia, Mariana, Millena, Tarlene, Marina, Victória, Victor Boratto, Marden, Willian, Keila, Ana Fulgêncio, Bruna, Dafne e Matheus) pelo apoio, pela amizade e por todos os momentos de conversa, descontração e brincadeiras que tornaram mais leve a rotina de pesquisa.

Aos amigos do LAMS que chegaram posteriormente (Ludmilla, Stephanie, Beatriz, Iasmin, Gabriela, Gabriel, Gabriel Machado, Flávia, Pedro e Bricia) pelo apoio, amizade, conversas e momentos de convivência e confraternização.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao INCTAA, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro à pesquisa.

À UFMG e à Pós-Graduação do Departamento de Química pela oportunidade.

À Profa. Letícia Malta e Profa. Clésia Nascentes por possibilitar o uso do equipamento Espectrofotômetro UV/Vis Agilent Technologies Cary 60.

À Gelza Melo por todo carinho, apoio, compreensão e orações e por tornar mais leve esse período difícil que foi finalizar esse trabalho.

Ao Gabriel, pela ajuda psicológica, pela motivação, conselhos e orações.

Aos amigos do Ministério Universidades Renovadas de Belo Horizonte pelas orações e por serem instrumentos de Deus na minha vida

RESUMO

Corantes antimicrobianos como verde malaquita, violeta de genciana e azul de metileno são micropoluentes ambientais cuja análise constituem grandes desafios analíticos devido às baixas concentrações monitoradas e à complexidade das matrizes. Apesar das proibições, estes corantes continuam sendo utilizados de forma irregular na aquicultura na prevenção de infecções. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes, propondo o uso de técnicas simples, rápidas, acessíveis e com alta frequência analítica. Para isso, foram empregadas no preparo de amostra a técnica de eletroextração multifásica, e na determinação analítica, empregou-se análise de imagem digital e espectrofotometria associadas com ferramentas quimiométricas. Na primeira aplicação, o silicato de magnésio foi utilizado na eletroextração multifásica e mostrou-se crucial para integração desta técnica com a análise de imagem digital, sendo, portanto, uma alternativa adequada para análise de compostos catiônicos por ser um material custo-efetivo, de fácil manuseio e com carga residual negativa. Além disso, foi proposto um método de discriminação usando *PLS-DA*, distinguindo eficazmente amostras contaminadas e não contaminadas mesmo em níveis extremamente baixos ($0,2 \mu\text{g L}^{-1}$) em uma matriz complexa de água superficial (lago), sendo obtido sensibilidade acima de 95% e especificidade próxima de 90% para os conjuntos treinamento e teste. Na segunda aplicação, pontas de papel odontológico e um sistema de eletroextração automatizado possibilitou um aumento da praticidade e reprodutibilidade da técnica. Adicionalmente, foi proposto um método de classificação *one-class* por meio de um modelo *DD-SIMCA* utilizando tanto dados espectrofotométricos quanto dados de imagem digital. Os dados espectrofotométricos apresentaram bom desempenho, sendo obtido uma sensibilidade de 0,96 (treinamento) e 1 (teste), além de especificidade de 0,94. Adicionalmente, para os dados espectrofotométricos os erros de classificação ficaram limitados à menor concentração testada ($2 \mu\text{g L}^{-1}$). O modelo com dados de imagem digital, por sua vez, obteve melhor desempenho, alcançando sensibilidade de 0,96 (treinamento) e 1 (teste) além de especificidade de 1. Em conclusão, os modelos obtidos são simples, rápidos e promissores para triagem de contaminação por corantes antimicrobianos em matrizes de água superficial.

Palavras-chave: extração assistida por campo elétrico; corantes trifenilmetanos; azul de metileno; *DD-SIMCA*; *PLS-DA*; química verde.

ABSTRACT

Antimicrobial dyes such as malachite green, gentian violet, and methylene blue are environmental micropollutants whose analysis presents significant analytical challenges due to low monitored concentrations and matrix complexity. Despite prohibitions, these dyes continue to be irregularly used in aquaculture for infection prevention. The present study aimed to develop efficient analytical methods, proposing the use of simple, rapid, accessible techniques with high analytical frequency. To achieve this, multiphase electroextraction was employed in sample preparation, while for analytical determination was utilized digital image analysis and spectrophotometry associated with chemometric tools. In the first application, magnesium silicate was employed in multiphase electroextraction, proving pivotal for its integration with digital image analysis, therefore being a suitable alternative for the analysis of cationic compounds as it is cost-effective, easy to handle, and known to have a negative residual charge. Furthermore, a discrimination method using *PLS-DA* was proposed, effectively distinguishing between contaminated and uncontaminated samples, even at extremely low levels ($0.2 \mu\text{g L}^{-1}$) within complex surface water matrices, obtaining a remarkable accuracy rate exceeding 95%. In the second application, dental paper points and an automated electroextraction system facilitated increased practicality and reproducibility of the technique. Additionally, a one-class classification method was proposed using a *DD-SIMCA* model, utilizing both spectrophotometric and digital image data. Spectrophotometric data exhibited great performance, obtaining a sensitivity of 0.96 (training) and 1 (test), in addition to a specificity of 0.94, where the classification errors was confined to the lowest tested concentration ($2 \mu\text{g L}^{-1}$). Conversely, the model incorporating digital image data outperformed, achieving sensitivity of 0.96 (training) and 1 (testing), along with a specificity of 1. In conclusion, the obtained models are simple, rapid, and promising for screening antimicrobial dye contamination in surface water matrices.

Keywords: electric field-assisted extraction; triphenylmethane dyes; DD-SIMCA; PLS-DA; methylene blue; green chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos principais corantes antimicrobianos usados em aquicultura.....	24
Figura 2: Eventos de notificação no RASFF da União Europeia 2001-2021.....	26
Figura 3: Esquema ilustrativo de técnica de EME e do sistema de eletroextração três fases.....	32
Figura 4: Ilustração esquemática do sistema de EEMP para pequenos volumes e grandes volumes	34
Figura 5: Representação gráfica dos espaços de cor aditivo RGB	40
Figura 6: Fluxo do processo de análise de imagens digitais	41
Figura 7: Exemplo de gráfico de área de aceitação para um modelo construído com DD-SIMCA.....	50
Figura 8: Configuração do sistema de EEMP de grandes volumes.....	56
Figura 9: Procedimento de montagem da ponteira com material sorvente	57
Figura 10: Dispositivo de Eletroextração Multifásica Automatizado.....	58
Figura 11: Esquema ilustrativo do sistema de eletroextração multifásica automatizado	59
Figura 12: Aquisição de imagem em scanner de mesa	65
Figura 13: Perfil visual da extração de VM a partir solução aquosa usando diferentes suportes sólidos para a fase acceptora.....	67
Figura 14: Perfil de corrente elétrica para cada suporte de fase acceptora	69
Figura 15: Perfil de corrente da eletroextração utilizando o florisil forma comum e forma triturada 106 – 90 µm	70
Figura 16: Imagens RGB para o corante VM obtidas a partir do split em canais individuais.....	71
Figura 17: Intensidade de cor observada depois da extração de diferentes concentrações de VM.....	72

Figura 18: Histogramas do canal R extraídas de ROI de imagens após eletroextração de amostras de água superficial fortificadas com VM.	72
Figura 19: Histogramas obtidos a partir das imagens capturadas após extração de VM a partir de água superficial em diferentes concentrações.	73
Figura 20: Valor predito de Y para o modelo <i>PLS-DA</i> distinguindo amostras de água contaminadas e não contaminadas	75
Figura 21: Gráficos com interpretação informativa de vetores do modelo <i>PLS-DA</i> distinguindo amostras de água de lago contaminadas e não contaminadas por VM....	78
Figura 22: Área retangular demarcada da região de interesse ROI	85
Figura 23: Resultados para análise simultânea dos corantes VM, VG e AM.....	89
Figura 24: Gráfico de área de aceitação para os dados espectrofotométricos.....	91
Figura 25: Gráfico de extremos para o modelo 4 CP alfa 0,05.....	93
Figura 26: Gráfico de área de aceitação para os dados de imagens digitais	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alguns dados físico-químicos dos principais corantes antimicrobianos usados em aquicultura, bem como de alguns de seus metabólitos	25
Tabela 2: Tabela de métodos analíticos para análise de corantes e metabólitos em matrizes de água ambiental	29
Tabela 3: Exemplo de tabela de contingência para duas classes	45
Tabela 4: Diferentes aplicações envolvendo a combinação de eletroextração e análise de imagens digitais.....	61
Tabela 5: Análise de corantes por técnicas quimiométricas de classificação.....	63
Tabela 6: Matriz de contingência para ambos os conjuntos treinamento e teste do modelo <i>PLS-DA</i> proposto.....	76
Tabela 7: Figuras de mérito qualitativo (FOM) para ambos os conjuntos treinamento e teste para do modelo <i>PLS-DA</i> proposto	76
Tabela 8: Métodos de calibração multivariada para análise simultânea de corantes	82
Tabela 9: Resultados da espectrofotometria no método DD-SIMCA	92
Tabela 10: Resultados de imagens digitais no método DD-SIMCA	96
Tabela 11: Comparação dos métodos <i>DD-SIMCA</i> construídos com dados UV-Vis e Imagem Digital em scanner.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ADASYN	<i>Adaptive Synthetic Sampling</i> (Amostragem Sintética Adaptativa)
AID	Análise de Imagem Digital
Alt-SIMCA	<i>Alternative SIMCA</i> (alternativo SIMCA)
AM	Azul de Metileno
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CCD	<i>Charge Coupled Devices</i> (Carga de Dispositivos Acoplados)
CI-SIMCA	<i>Combined Index SIMCA</i> (Índice combinado SIMCA)
CMOS	<i>Complementary Metal Oxide Semiconductors</i> (Semicondutores complementares de óxido metálico)
CMYK	<i>Cyan-Magenta-Yellow-Key</i> (Ciano-Magenta-Amarelo-Preto)
CP	Componentes Principais
CPE	<i>Cloud Point Extraction</i> (Extração em Ponto de Nuvem)
CV	Cristal Violeta
CVCE	<i>Cross Validation Classification Error</i> (Erros de Classificação da Validação Cruzada)
DAD	<i>Diode array Detector</i> (Arranjo de Fotodiodos)
DEPH	di(2-etilhexil-fosfato)
DDSGUI	<i>Software Guide User Interface for DD-SIMCA on MATLAB</i> (Software Guia de Interface de Usuário para DD-SIMCA em MATLAB)
DD-SIMCA	<i>Data Driven Soft Independent Modelling of Class Analogy</i> (Modelagem Flexível e Independente por Analogia de Classe Dirigida por Dados)
D-SPE	<i>Dispersive Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida Dispersiva)
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona
D-PLS	<i>Discriminant Partial Least Square</i> (Mínimos Quadrados Parciais Discriminante)
EFIC	Eficiência
EE	Eletroextração
EEMP	Eletroextração Multifásica

EEMPA	Eletroextração Multifásica Automatizada
EME	<i>Electromembrane Extraction</i> (Eletroextração em Membrana)
EU	<i>European Union</i> (União Europeia)
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para Alimentação)
FD	<i>Full Distance</i> (Distância Total)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FN	Falso Negativo
FP	Falso Positivo
FOM	<i>Figures of Merit</i> (Figuras de Mérito)
GL	Graus de Liberdade
HCA	<i>Hierarchical Components Analysis</i> (Análise de Componentes Hierárquicos)
HF-LPME	<i>Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction</i> (Microextração em Fase Líquida em Fibra Oca)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Performance)
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas de Alta Resolução)
HSV	<i>Hue-Saturation-Intensity</i> (matiz- Saturação-Brilho)
INPI	Instituto Nacional de Proteção Intelectual
KNN	<i>kth nearest neighbor</i> (k-ésimo vizinho mais próximo)
LC	Cromatografia Líquida
LDA	<i>Linear Discriminant Analysis</i> (Análise Discriminante Linear)
LD	Limite de Detecção
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Extração Líquido-Líquido)
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LMDR	Limite Mínimo de Desempenho Requerido
LPME	<i>Liquid Phase Microextraction</i> (Microextração em Fase Líquida)
logP	Partição Óleo - Água
LQ	Limite de Quantificação

LVM	Leuco Verde Malaquita
LVG	Leuco Violeta Genciana
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MCC	<i>Mathew's Correlation Coefficient</i> (Coeficiente de Correlação de Mathew)
MCPE	<i>Cloud Point Microextraction</i> (Microextração em Ponto de Nuvem)
MIA	<i>Multivariate Image Analysis</i> (Análise Multivariada de Imagem)
MIP-SPE	<i>Solid Phase Extraction with Molecularly Imprinted Polymer</i> (Extração em Fase Sólida com Polímero Molecularmente Impresso)
MIR	<i>Multivariate Images Regression</i> (Regressão Multivariada de Imagem)
MLR	<i>Multiple Linear Regression</i> (Regressão Linear Múltipla)
MPEE	<i>Multiphase Electroextraction</i> (Eletroextração Multifásica)
AMPEE	<i>Automated Multiphase Electroextraction</i> (Eletroextração Multifásica Automatizada)
MSPE	<i>Magnetic Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida Magnética)
MS/MS	Espectrometria de Massas Sequencial
NIPALS	<i>Nonlinear Iterative Partial Least Squares</i> (Mínimos Quadrados Parciais Iterativos Não-Lineares)
NIR	<i>Near Infrared</i> (Espectroscopia no Infravermelho Próximo)
NPOE	2-nitrofenil octil éter
OD	<i>Orthogonal Distance</i> (Distância Ortogonal)
OPLS-DA	<i>Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis</i> (Análise Discriminante com Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais)
PCA	<i>Principal Components Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
PCR	<i>Principal Components Regression</i> (Regressão de Componentes Principais)
pKa	Constante de Acidez
PLS	<i>Partial Least Square</i> (Mínimos Quadrados Parciais)

PLS-DA	<i>Partial Least square Discriminant Analysis</i> (Análise Discriminante com Mínimos Quadrados Parciais)
PM	Peso Molecular
RASFF	<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i> (Sistema de Alerta Rápido para Géneros Alimentícios e Alimentos para Animais)
RGB	<i>Red-Green-Blue</i> (Vermelho-Verde-Azul)
RMSEC	<i>Root Mean Square error of calibration</i> (Raíz Quadrada Média dos Erros de Calibração)
RMSEP	<i>Root Mean Square error of prediction</i> (Raíz Quadrada Média dos Erros de Predição)
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROI	<i>Region of Interest</i> (Região de Interesse)
SD	<i>Scores Distance</i> (Distância de Escores)
SENS	Sensibilidade
SENS_CV	Sensibilidade do conjunto de validação cruzada
SENS_T	Sensibilidade no conjunto treinamento
SENS_V	Sensibilidade no conjunto teste
SERS	<i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i> (Espectroscopia Raman com ampliação de Superfície)
SIMCA	<i>Soft Independent Modelling of Class Analogy</i> (Modelagem Flexível e Independente por Analogia de Classe)
Sim-SIMCA	<i>Simple SIMCA</i> (Simples SIMCA)
SLM	<i>Supported Liquid Membrane</i> (Membrana Líquida Suportada)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida)
SPEC	Especificidade
SS-LPME	<i>Liquid Phase Microextraction based on Supramolecular Solvent</i> (Microextração em Fase Líquida baseado em Solvente Supramolecular)
SVD	<i>Singular Values Decomposition</i> (Decomposição em Valores Singulares)
TEPH	tris(2etilhexil-fosfato)
UA-SPE	<i>Ultrasound-Assisted Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida Assistida por Ultrassom)

UHPLC	<i>Ultra High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance)
USA	<i>United States of America</i> (Estados Unidos da América)
USA-DSPME	<i>Ultrasound-Assisted Solid Phase Microextraction</i> (Microextração em Fase Sólida Dispersiva Assistida por Ultrassom)
UV-Vis	Espectrofotometria Ultravioleta Visível
VA-DLLME-DES	<i>Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction with Deep Eutectic Solvent</i> (Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Vórtex com solvente eutético profundo)
VB	Verde Brilhante
VG	Violeta Genciana
VIP	<i>Variable Importance in Projection</i> (Projeção de Variáveis Importantes)
VL	Variáveis Latentes
VM	Verde Malaquita
VN	Verdadeiro Negativo
VP	Verdadeiro Positivo
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de máxima absorção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. Contaminantes e micropoluentes em água superficial	20
2.2. Corantes como contaminantes em água ambiental	20
2.3. Corantes antimicrobianos usados na aquicultura	22
2.3.1. Evidências toxicológicas	26
2.3.2. Limites estabelecidos na legislação	26
2.3.3. Técnicas de análise de corantes antimicrobianos em água superficial	28
2.4. Extrações assistidas por campos elétricos no preparo de amostras	31
2.4.1. Parâmetros que influenciam na eletroextração	34
2.5. Análise de imagens digitais	39
2.6. Análises quimiométricas	42
2.6.1. Análise discriminante pelo método dos quadrados mínimos parciais – PLS-DA	43
2.6.2. Modelagem independente e flexível por analogia de classe baseada em dados – DD-SIMCA	47
3. OBJETIVOS	52
3.1. Objetivo geral	52
3.2. Objetivos específicos	52
4. EXPERIMENTAL	53
4.1. Reagentes e solventes	53
4.2. Materiais e equipamentos	53
4.3. Preparo das soluções	54
4.4. Preparo das amostras de água superficial de lago	54
4.5. Sistema de eletroextração multifásica e extrações das amostras	55
4.6. Sistema automatizado de eletroextração multifásica	57

5. Eletroextração multifásica de verde malaquita em água superficial de lago e sua determinação usando imagens digitais e Ferramentas quimiométricas	60
5.1. Considerações gerais	60
5.2. Materiais e métodos	64
5.2.1. Eletroextração das amostras	64
5.2.2. Análise de imagens digitais	64
5.2.3. Análise quimiométrica e classificação supervisionada por PLS-DA	65
5.3. Resultados e discussão	67
5.3.1. Otimização do suporte sólido da fase aceptora	67
5.3.2. Análise de imagem digital e modelo quimiométrico	70
5.3.3. Construção do modelo PLS-DA	71
5.4. Conclusões parciais	79
6. Análise simultânea de múltiplos corantes em água superficial usando imagens digitais e dados UV-Vis associados a ferramentas quimiométricas	81
6.1. Considerações gerais	81
6.2. Materiais e métodos	84
2.1.1. Eletroextração das amostras	84
2.1.2. Análise de imagens digitais	84
2.1.3. Análise de espectrofotometria UV-Vis	85
2.1.4. Classificação supervisionada por DD-SIMCA	86
2.2. Resultados e discussão	87
2.2.1. Modelo DD-SIMCA para os dados espectrofotométricos	90
2.2.2. Modelo DD-SIMCA para os dados com imagens digitais	94
2.3. Conclusões parciais	99
7. CONCLUSÕES GERAIS	101
REFERÊNCIAS	103
APÊNDICE A	114
APÊNDICE B	117

1. INTRODUÇÃO

O crescimento contínuo da contaminação dos recursos hídricos por substâncias químicas potencialmente perigosas se deve sobretudo ao avanço industrial. Neste contexto, deve ser destacado alguns corantes usados primariamente como agentes colorantes na indústria têxtil, mas que são também extensamente aplicados ilegalmente na aquicultura devido à efetividade antimicrobiana (Tkaczyk *et al.*, 2020; Chequer *et al.* 2013). As matrizes ambientais são complexas, o que torna desafiador a análise química de contaminantes e micropoluentes. Por isso, o desenvolvimento de métodos analíticos seletivos, sensíveis e com baixo impacto ambiental é essencial para um monitoramento ambiental eficaz, embora esse processo represente um grande desafio para a ciência analítica (Rathi *et al.*, 2021).

Quanto a etapa do preparo de amostra, apesar das técnicas tradicionais serem indiscutivelmente eficientes, elas apresentam limitações importantes, entre elas, baixa seletividade, etapas laboriosas, longo tempo de análise, elevado consumo de solventes e amostras, e muitas vezes, um custo elevado (Campos *et al.*, 2015). Na etapa da determinação analítica, por sua vez, dificuldades também são encontradas, pois na maioria das vezes, esta etapa envolve equipamentos com custo elevado e de difícil manutenção e operação. Diante dessas desvantagens, há uma necessidade premente de alternativas mais simples, rápidas e acessíveis e que ao mesmo tempo ofereçam eficiência e robustez, seja no preparo de amostra ou na etapa de análise.

Independente das limitações das técnicas analíticas, estas podem ser minimizadas empregando-se estratégias de preparo de amostras. Nessa etapa busca-se extrair ou purificar a substância de interesse, eliminando o efeito dos interferentes, além de pré-concentrar essa substância ou torná-la adequada à análise. O sucesso no cumprimento desses objetivos possibilita a obtenção de um método analítico mais seletivo, sensível e adequado aos propósitos de uso. O surgimento de novos procedimentos de preparo de amostras, empregando novas tecnologias de extração e pré-concentração tem possibilitado superar parte dessas limitações. Dentre as estratégias está o desenvolvimento de novos materiais com maior potencial extrativo ou o uso de forças auxiliares ao processo de extração (Nazario *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, o uso de procedimentos de extração assistidos por campos elétricos tem ganhado importância, com destaque para a eletroextração em

membrana (EME) (Drouin *et al.*, 2019; Pedersen-Bjergaard, 2019), bem como outras modalidades de eletroextração (EE) (Raterink *et al.*, 2013; Orlando *et al.*, 2019; Oedit *et al.*, 2020; Oedit *et al.*, 2021; He *et al.*, 2021). Essas técnicas baseiam-se na aplicação de um campo elétrico entre duas fases, uma doadora (amostra) e uma aceptora, promovendo a migração eletroforética seletiva das espécies carregadas, levando ao aumento da cinética de transferência dos analitos.

Além de inovações no preparo de amostras, pesquisas têm sido direcionadas para novos métodos de determinação analítica empregando análise de imagens digitais (AID), muito exploradas nas últimas décadas (Capitán-Vallvey *et al.*, 2015). Essas técnicas buscam extrair informações químicas a partir de imagens digitais capturadas por diferentes dispositivos, incluindo câmeras digitais e scanners. Entre as principais vantagens estão os resultados com acurácia e robustez aceitáveis, após análises simples e rápidas utilizando equipamentos de baixo custo e acessíveis. Aliado a isso, os dados multivariados obtidos a partir das imagens digitais podem ser analisados por ferramentas quimiométricas (Prats-Montalbán *et al.*, 2011). Essa combinação tem sido muito explorada nos últimos anos abrindo caminhos para um novo campo de desenvolvimento analítico também conhecido como análise multivariada de imagens na qual diferentes métodos quimiométricos podem ser empregados na construção de diferentes modelos, sejam eles de classificação (qualitativos) ou de regressão (quantitativos) (Ferreira *et al.* 2015).

O presente trabalho apresenta grandes contribuições para o desenvolvimento analítico, com especial destaque para o uso da técnica de eletroextração multifases (EEMP) na etapa de preparo de amostra, sendo avaliado um novo material para fase aceptora baseado em sólido particulado de silicato de magnésio, além de serem propostos e avaliados novos modos de aplicação da técnica. Particularmente, este trabalho apresenta um impacto direto na área de química ambiental, por meio do desenvolvimento de métodos analíticos empregando técnicas de análise de imagens digitais associadas a ferramentas quimiométricas para classificação de amostras de água superficial contaminadas com corantes antimicrobianos.

Como mencionado anteriormente, a complexidade das matrizes ambientais exige constante inovação em procedimentos de preparo de amostras, bem como em técnicas de determinação analítica, de modo a superar os desafios analíticos associados à análise química nessas matrizes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Contaminantes e micropoluentes em água superficial

Ao longo das últimas décadas houve um crescimento da poluição em recursos hídricos, sobretudo devido ao desenvolvimento econômico e industrial, juntamente com o avanço tecnológico no setor da agricultura e pecuária. Estes fatores conduzem à elevada ocorrência de contaminantes e poluentes potencialmente perigosos cuja presença e persistência nos ecossistemas naturais geram preocupação crescente do ponto de vista ambiental e de saúde pública (Rathi *et al.*, 2021; Schreiner *et al.*, 2020). Em particular, os micropoluentes de água superficial exigem especial atenção, considerando suas baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1}) e o maior risco à saúde humana.

Dentre os principais exemplos de contaminantes e poluentes persistentes no ambiente estão os corantes, produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, metais pesados, fertilizantes e pesticidas. A contaminação ambiental por estes compostos se origina sobretudo dos efluentes domésticos e industriais, além de outros segmentos incluindo agricultura e pecuária. Considerando que contaminantes ambientais têm sido encontrados em água superficial e em organismos aquáticos, existe um risco ambiental e sanitário envolvido. Desse modo, o monitoramento da presença desses compostos nos ecossistemas aquáticos é necessário, visando a avaliação dos riscos associados e a aplicação de medidas que garantam a qualidade da água para consumo e para preservação da vida aquática (Rathi *et al.*, 2021).

As matrizes ambientais são complexas e por isso a análise química dos micropoluentes nessas matrizes é desafiador. Porém, o monitoramento ambiental é essencial para identificação e quantificação dos contaminantes bem como para avaliação do cumprimento dos limites máximos exigidos pelos órgãos sanitários e ambientais para esses compostos (Tkaczyk *et al.*, 2020; Pérez-Fernández *et al.*, 2017).

2.2. Corantes como contaminantes em água ambiental

Corantes são substâncias orgânicas naturais ou sintéticas capazes de adicionar ou alterar a cor de um substrato, sendo classificadas de acordo com sua

estrutura química em diferentes classes tais como antraquinonas, ftalocianinas, azo, índigo, nitrosos, tiazina, triarilmetanos, xantenos, entre outros. Eles são amplamente usados como colorantes nos setores têxtil, cosmético, alimentício, de impressão e de papeis. Alguns corantes são também usados na medicina humana e veterinária, seja como agente colorante em histologia, microbiologia e diagnóstico, seja como antisséptico tópico ou antimicrobiano de uso veterinário (Tkaczyk *et al.*, 2020; Rathi *et al.*, 2021).

Após o surgimento do primeiro corante sintético (mauveína por William H. Perkin – 1857) e a obtenção de azo compostos (Peter Griess – 1858) iniciou-se a partir de 1861 a produção de corantes em larga escala. Neste cenário, os corantes azo representam a classe mais amplamente utilizada (cerca de 65% do total de corantes fabricados mundialmente), seguido pela classe das antraquinonas e dos triarilmetanos (Zanoni & Yamanaka, 2016). A produção em larga escala e a diversidade de áreas de aplicação, tem contribuído para a contaminação do ecossistema aquático e do solo, sendo descritos a presença de corantes em água superficial e subterrânea, sedimentos e em espécies aquáticas (Rathi *et al.*, 2021).

Assim, estes corantes têm sido encontrados no meio ambiente representando um risco ambiental e de saúde, uma vez que, apresentam toxicidade comprovada para a biota aquática, prejudicam o equilíbrio desse ecossistema, além de apresentarem efeitos tóxicos, carcinogênicos, alergênicos e dermatológicos, conforme descrito na literatura para diversos corantes (Tkaczyk *et al.*, 2020; Chequer *et al.*, 2013).

As principais fontes de contaminação por corantes em água ambiental incluem: (i) Indústrias têxteis, de couro e papel; (ii) corantes antimicrobianos usados na aquicultura; (iii) descarte de corantes em esgoto doméstico, incluindo corantes presentes em produtos farmacêuticos, tinturas de cabelo, cosméticos e outros produtos químicos de uso doméstico; e (iv) descarte inadequado de resíduos de corantes em aterros sanitários e lixões (Tkaczyk *et al.*, 2020).

A principal fonte de contaminação direta do ecossistema aquático por corantes corresponde à indústria têxtil, de couro e papel, as quais são responsáveis pela geração de cerca de 200.000 toneladas de efluentes contendo corantes por ano (Ogugbue & Sawidis; 2011). Sobretudo devido à ineficiência do processo de tingimento, estima-se que 10 – 50% dos corantes usados são perdidos e descartados como efluentes (Zaharia & Suteu, 2012). Uma vez que a legislação exige das

indústrias apenas a descolorização dos efluentes gerados antes de lançá-los nos corpos d'água, os procedimentos de tratamento utilizados não removem totalmente os corantes presentes. Adicionalmente, a maioria dos corantes empregados são resistentes à luz, temperatura, sabões, detergentes, água sanitária e outros produtos químicos, sendo ainda resistentes à biodegradação, e, portanto, persistem também no meio ambiente por longos períodos (Chequer *et al.*, 2013).

Outra fonte potencial de contaminação direta por corantes em água ambiental é a aquicultura, o qual representa um segmento de produção de alimentos em contínuo crescimento especialmente pela ampliação do sistema de cultivo intensivo. Alguns corantes apresentam alta efetividade antimicrobiana, dentre eles incluem verde malaquita (VM), cristal violeta (CV, também conhecido como violeta genciana – VG), verde brilhante (VB) e azul de metileno (AM). Por esse motivo, são largamente empregados ilegalmente na aquicultura para prevenção e tratamento de infecções por parasitas, fungos e bactérias, embora o uso destes compostos seja aprovado apenas para peixes ornamentais, mas proibidos na produção de pescados para consumo humano (López-Gutiérrez *et al.*, 2013).

Poucas opções terapêuticas são regulamentadas para uso na aquicultura, sendo que no Brasil apenas o florfenicol e a oxitetraciclina são aprovados, enquanto substâncias como o cloranfenicol, os nitrofuranos e os corantes antimicrobianos são proibidos (MAPA, 2019; FAO, 2005; Shiogiri *et al.*, 2015).

2.3. Corantes antimicrobianos usados na aquicultura

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a aquicultura é considerada um setor estratégico para alimentação da população mundial, que segue em crescimento sobretudo devido à alta produtividade, o baixo impacto ambiental e à geração de alimentos saudáveis e nutritivos. Estima-se que a produção global de pescados atingiu cerca de 179 milhões de toneladas em 2018 (Kresic *et al.*, 2020; FAO, 2020). Por outro lado, a busca contínua por ampliar a produção de pescados na aquicultura promove a implementação de sistemas de cultivo intensivo ou superintensivo onde o excesso de peixes por metro cúbico, juntamente com o manejo muitas vezes inadequado, favorece a disseminação de doenças infecciosas.

Entre os corantes de importância ambiental, destacam-se àqueles considerados corantes antimicrobianos, que incluem os da classe trifenilmetanos, tais como VM, VG e VB, juntamente com o AM (classe fenotiazina). Estes corantes são originalmente utilizados como agentes colorantes na indústria de papeis, lã, seda, algodão e couro, tendo começado a ser usados na aquicultura a partir da década de 1930 com a descoberta das suas propriedades antimicrobianas (López-Gutiérrez et al., 2013).

O VM foi o primeiro corante a ser utilizado na aquicultura, introduzido em 1933, devido à sua alta efetividade como ectoparasiticida, antifúngico e antisséptico. Posteriormente, passaram a ser empregados outros corantes da classe trifenilmetanos tais como VG e VB, que também apresentam eficácia como antimicrobiano, antifúngico e antiparasitário no tratamento e prevenção de infecções. Por fim, o corante AM tem sido utilizado na aquicultura como agente desinfetante no tratamento e prevenção de saprolegniose (doença fúngica) e doenças parasitárias (Wang et al., 2020; Xu et al., 2012).

Após serem absorvidos no organismo do peixe, os corantes VM e o VG são extensivamente metabolizados gerando os seus respectivos metabólitos que são substâncias apolares e incolores: leuco verde malaquita (LVM) e leuco cristal violeta (LVG), ambos capazes de se acumular nos tecidos adiposos dos peixes por meses. Xu *et al.*, (2012) relatam que o AM também produz metabólitos após absorção pelo peixe, sendo eles, o *azure A*, *azure B* e *azure C* (Xu et al., 2012; Hashimoto et al., 2012).

Na **Figura 1** é apresentado as estruturas químicas desses compostos e na **Tabela 1** são apresentadas algumas das suas informações físico-químicas.

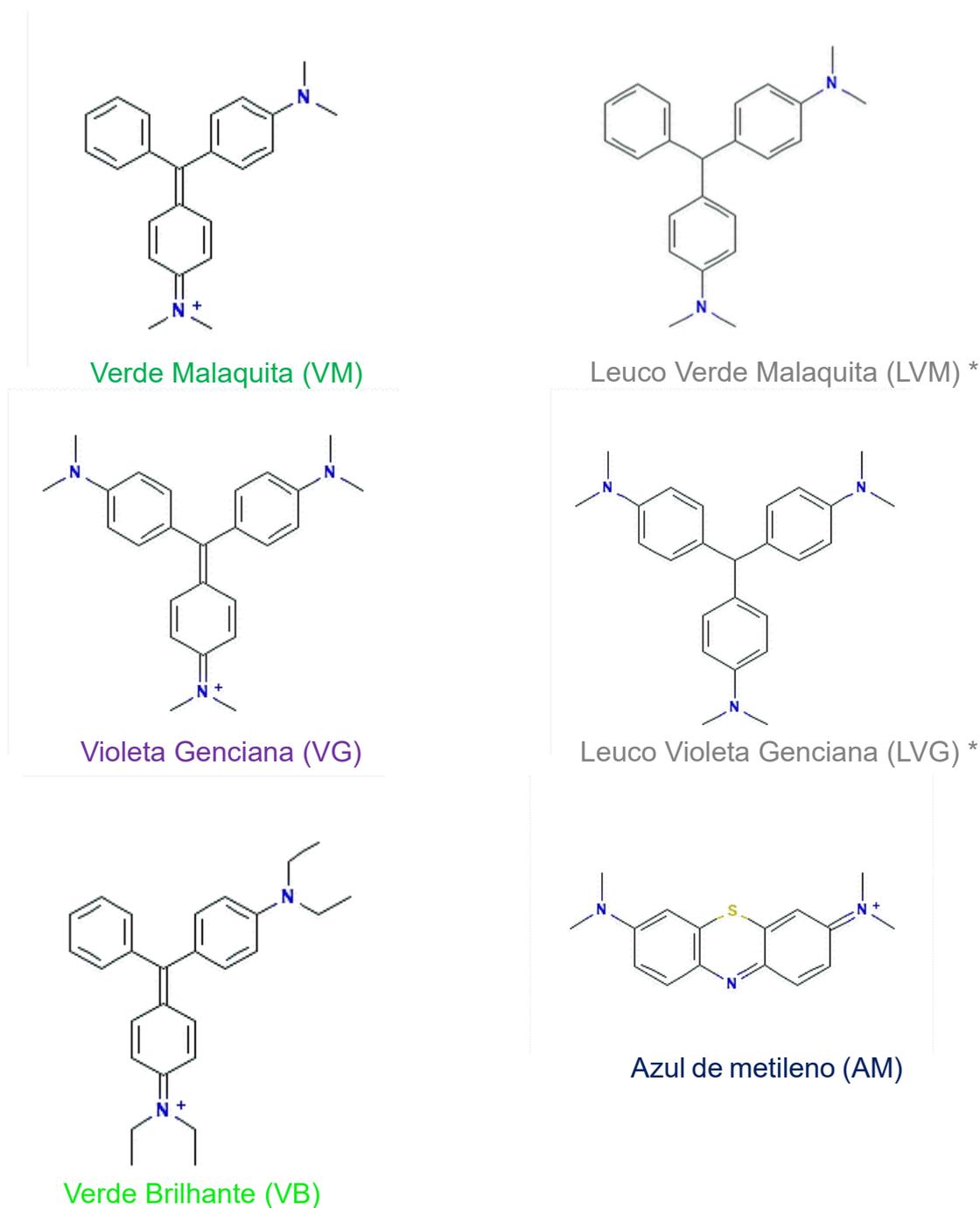


Figura 1: Estrutura química dos principais corantes antimicrobianos usados em aquicultura. A substâncias com * representam os principais metabólitos. Fonte: PubChem 2021

Tabela 1: Alguns dados físico-químicos dos principais corantes antimicrobianos usados em aquicultura, bem como de alguns de seus metabólitos

Substância	CAS ²	Fórmula molecular ⁴	PM (g·mol ⁻¹) ²	logP	pKa	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
VM	2437-29-8	C ₂₃ H ₂₅ N ₂ C ₂ HO ₄	418,0	0,62	pKa1 = 4,08; pKa2 = 3,47	617
LVM	129-73-7	C ₂₃ H ₂₆ N ₂	330,47	5,72	pKa = 5,46	262
VG	548-62-9	C ₂₅ H ₃₀ N ₃ Cl	407,98	0,59	pKa1 = 5,31; pKa2 = 8,64	590
LVG	603-48-5	C ₂₅ H ₃₁ N ₃	373,5	5,06	pKa1 = 5,93	260
VB	633-03-4	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₄ S	482,6	2,71	pKa = 5,36	627
AM	61-73-4	C ₁₆ H ₁₈ ClN ₃ S	319,8	0,75	pKa1 = 5,5; pKa2 = 6,0	664

MM: massa molar; logP: coeficiente de partição óleo:água; pKa: constante de dissociação ácida; $\lambda_{\text{máx}}$: comprimento de onda de máxima absorção; ¹ChemAxon; ²PubChem, ³Chemicalbook; ⁴Sigmaaldrich; ⁵Lookchem.

Conforme apresentado na **Figura 2**, os eventos de notificações no Sistema de Alerta Rápido para Géneros Alimentícios e Alimentos para Animais (RASFF) da União Europeia (UE) no período 2001-2021 mostram que os corantes antimicrobianos representam mais de 50% das notificações superando outros grupos de antimicrobianos, indicando que estes compostos ainda são muito utilizados sobretudo devido à alta efetividade antimicrobiana, fácil acesso e baixo custo (Guardone *et al.*, 2022; López-Gutiérrez *et al.*, 2013).

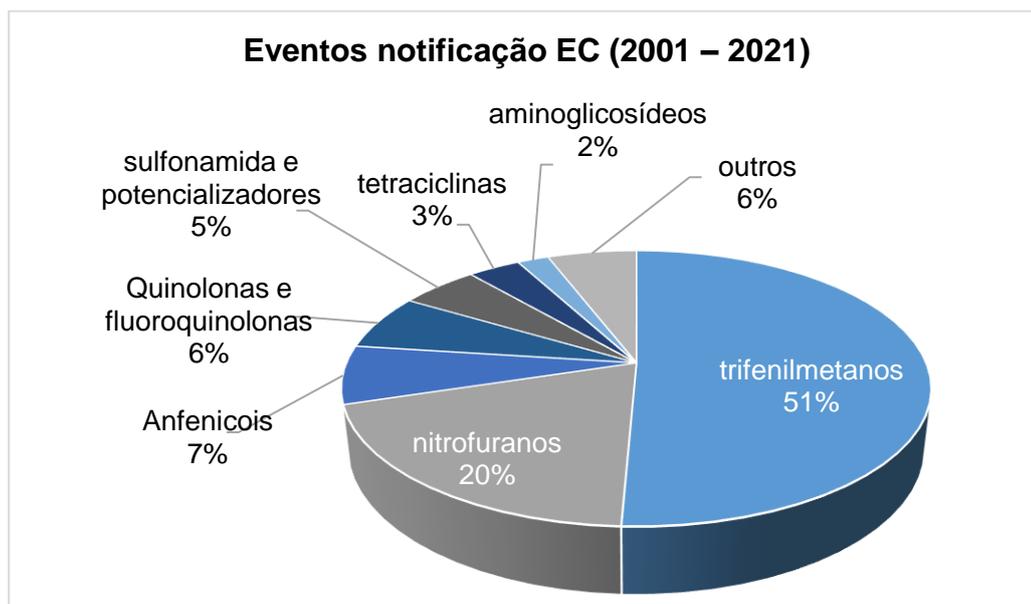


Figura 2: Eventos de notificação no RASFF da União Europeia 2001-2021. Dados obtidos a partir de Guardone *et al.*, (2022).

2.3.1. Evidências toxicológicas

A partir das inúmeras evidências toxicológicas apresentadas na literatura para os corantes descritos na **Tabela 1**, estas substâncias foram proibidas na aquicultura em diversos países, entre eles, Estados Unidos, Canadá, Japão, países da União Europeia e Brasil (Xu *et al.*, 2018; Hashimoto *et al.*, 2011; Andersen *et al.*, 2009). Para o VM, os estudos toxicológicos em animais evidenciaram anomalias reprodutivas em células de coelhos e peixes, e danos em diversos órgãos como fígado, baço, pulmão, rim e coração. Adicionalmente, também foram observados efeito tóxico em células de mamíferos, além de efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos. Para o VG, os estudos toxicológicos indicaram genotoxicidade, enquanto para o VB, foram observados irritação e necrose de pele, além de irritação no trato gastrointestinal e respiratório quando a exposição ocorre por inalação ou ingestão (Sristava *et al.*, 2004; Stammati *et al.*, 2005; Hashimoto *et al.*, 2011; López-Gutiérrez *et al.*, 2013).

2.3.2. Limites estabelecidos na legislação

As evidências da toxicidade e mutagenicidade dos corantes antimicrobianos levaram à proibição do seu uso em cultivo de peixes e à proposição de legislações

importantes para proteção da saúde do consumidor. Nos Estados Unidos, o FDA (*Food and Drug Administration*), além do banimento do uso dos corantes VM e VG em cultivo de peixes para consumo humano, definiu um nível mínimo de sensibilidade de $1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ para os métodos analíticos com fins regulatórios em matriz de pescados. Nos países da União Europeia, por outro lado, definiu-se, para os métodos analíticos, um limite mínimo de desempenho requerido de $2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ para a soma de VM e LVM em tecidos de peixes (Chen & Miao, 2010; Council Regulation EU – 2377/90).

No Brasil, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) publica anualmente uma Instrução Normativa (IN) indicando os Limites Máximos de Resíduos (LMR) para diferentes contaminantes atendendo aos programas setoriais incluídos no plano, sendo eles carne, pescados, ovos, leite e mel (Brasil, 2019). Nessa instrução normativa, as substâncias permitidas para uso possuem no LMR o limite de referência para tomada de ações, enquanto para as substâncias proibidas, onde não há LMR estabelecido, define-se apenas o limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) para o método analítico. Para VM, o Brasil segue a legislação europeia e define o LMDR para a soma VM e LVM como 2 ng g^{-1} , e o mesmo limite é definido para a soma VG e LVG (Brasil, 2019).

O corante VM é considerado um contaminante com persistência ambiental, mas apesar disso, não estão bem estabelecidos os limites aceitáveis dessa substância no ambiente para a proteção da vida humana e aquática. Na União Europeia trata-se de uma substância banida para uso em aquicultura, mas a legislação da comissão europeia se restringe à área de alimentos. Por outro lado, há regulamentações específicas de alguns países que permitem inferir os limites adequados à segurança ambiental. Por exemplo, na Irlanda foi estabelecido o limite de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em efluentes de cultivo de peixes, enquanto o limite para água extraída para consumo foi estabelecido como aceitável quando abaixo de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Adicionalmente, o limite máximo recomendado para proteção da vida aquática de água doce foi estabelecido em $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ pelo centro de pesquisa em água do departamento ambiental do Reino Unido (Safarik & Safarikova, 2002; Zhu et al., 2016).

2.3.3. Técnicas de análise de corantes antimicrobianos em água superficial

Considerando que não são conhecidos níveis considerados seguros para os corantes, torna-se fundamental a proposição de métodos de análise visando a obtenção de baixos limites de detecção e quantificação (Hashimoto *et al.*, 2011).

Muitos métodos têm sido publicados nas últimas décadas para análise dos corantes antimicrobianos em diferentes matrizes, sendo a cromatografia líquida de alta e ultra eficiência (*High and Ultra-high Performance Liquid Chromatography* – HPLC e UHPLC, respectivamente) e a espectrofotometria na região do visível as principais técnicas utilizadas (**Tabela 2**). Outras técnicas destacadas são a espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS), bem como técnicas eletroquímicas e imunoenaios. A vantagem da cromatografia líquida em relação às outras técnicas é a sua eficiência e versatilidade, podendo ser acoplada à diversos sistemas de detecção, tais como espectrofotométricos (canal simples, duplo ou arranjo de fotodiodos – DAD), detector de fluorescência e a espectrometria de massas, sendo essa última, indiscutivelmente a mais importante e amplamente utilizada, especialmente no modo sequencial (MS/MS) devido à sua eficiência, sensibilidade, seletividade, além da capacidade de confirmação estrutural, sobretudo com o uso da espectrometria de massas de alta resolução (HRMS – *High Resolution Mass Spectrometry*) (Zhou *et al.*, 2019; López-Gutiérrez *et al.*; 2012).

Embora observe-se uma expansão do uso de espectroscopia Raman na análise de corantes, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial se destaca entre os métodos de determinação, sendo ainda muito utilizada. Além disso, a técnica LC-MS/MS foi também recomendada pela comissão europeia para métodos confirmatórios quantitativos para análise dessa classe de compostos em amostras de peixes (Hurtaud-Pessel *et al.*, 2011; Hurtaud-Pessel *et al.*, 2013; Andersen *et al.*, 2015; Andersen *et al.*, 2018; Hashimoto *et al.*, 2011).

Tabela 2: Tabela de métodos analíticos para análise de corantes e metabólitos em matrizes de água superficial

Instrumentação	Analitos	Amostras	Preparo de amostras	Faixa linear ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Ref.
HPLC-UV-Vis	VM	Água de aquicultura e efluente	TC-IL-DLLME	0,25–20	0,086	-	119
UV-Vis	VM	Água de lago	VA-DLLME-DES	10–350	2	-	84
UV-Vis	VM	Água de aquicultura e água de torneira	SS-LPME	30 – 182	16.3	54.5	101
UV-Vis	VM, AM	Água de torneira, água de cultivo de peixe e efluente	UA-SPE	70 – 550	16.5	-	90
HPLC-Vis	VM, VG	Água de lago, de rio e de cultivo de peixes	MSPE-Fe3O4/nanopartículas de óxido de grafeno	0.5–200	0.091	-	118
UV-Vis	VM	Água ambiental	USA-DSPME	20 – 4000	1.386	-	22
UV-Vis	VM, VG	Água de torneira e efluente	MCPE	60 – 600	4.1	13.6	29
UPLC-MS/MS	VM	Efluente	Biomassa de lignina-celulose SPE	1 - 1000	0.1	0.4	45
UV-Vis	VM	Água de rio	Nano-alumina-MIP-SPE	2 – 750	0.655	-	57
UV-Vis	VM, VG	Água de lago	CPE	9.9 – 800	2.9	-	6
UPLC-DAD-MS/MS	VM	Água de lago	EEMP	0,5 – 5	0,014	0,095	103
AID	AM	Água de torneira e de rio	PP-HF-EE	5 – 100	5	10	61

* * UV-Vis: Espectrofotômetro no ultravioleta visível; HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance; UPLC-MS/MS: Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplado à espectrometria de massas sequencial; VM: Verde Malaquita; VG: Violeta Genciana; AM: Azul de Metileno; VA-DLLME-DES: Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Vórtex com solvente eutético profundo; SS-LPME: Microextração em Fase Líquida baseado em Solvente Supramolecular; MSPE: Extração em Fase Sólida Magnética; USA-DSPME: Microextração em Fase Sólida Dispersiva Assistida por Ultrassom; UA-SPE: Extração em Fase Sólida Assistida por Ultrassom; MCPE: Microextração em Ponto de Nuvem; MIP-SPE: Extração em Fase Sólida com Polímero Molecularmente Impresso; CPE: Extração em Ponto de Nuvem; D-SPE: Extração em Fase Sólida Dispersiva; PP-HF-EE: Eletroextração com pontas de papel em fibra oca (*Hollow Fiber*); EEMP: Eletroextração multifásica de grandes volumes; TC-IL: líquido iônico controle temperatura.

Devido à complexidade das matrizes, a etapa de preparo de amostras é de fundamental importância para a análise. Esta etapa tem o objetivo de extrair e pré-concentrar os analitos e, de forma seletiva, remover os interferentes da amostra, tornando-a mais limpa (*cleanup*) e compatível com o instrumental analítico. Os novos desafios da ciência analítica e a grande demanda por novos métodos exigem a constante evolução dos procedimentos de preparo de amostras, ampliando o poder de *cleanup* e pré-concentração e alcançando maior simplicidade, rapidez e praticidade, além de agredir minimamente o meio ambiente (Huang *et al.*, 2022).

Além da eficiência, as características de baixo custo, rapidez e atendimento aos princípios da química verde são também desejáveis e, por isso, muitas outras técnicas estão sendo desenvolvidas sobretudo na direção da miniaturização e automação das técnicas clássicas (Zhou *et al.*, 2019).

Os principais métodos de análise de corantes em matrizes ambientais baseiam-se nos procedimentos clássicos de preparo de amostras como extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction* – LLE) e extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* – SPE). Considerando a eficiência reconhecida desses procedimentos, especialmente o potencial de pré-concentração e limpeza (*cleanup*) da SPE, são ainda amplamente empregadas na análise de diferentes corantes como VM, LVM (Mitrowska *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2019), VG, LVG (Schuetze *et al.*, 2008) e AM (Khan *et al.*, 2014) em água superficial.

Os procedimentos derivados das referências citadas acima também são descritas na literatura para análise de corantes, dentre elas estão a extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction* – d-SPE) (Razi-Asrami *et al.*, 2017), extração em fase sólida magnética (*Magnetic solid phase extraction* – MSPE) (Mosevi *et al.*, 2018), microextração líquido-líquido dispersiva (*Dispersive liquid-liquid microextraction* – DLLME) (Dadfarnia *et al.*, 2016), microextração em fase líquida (LPME – *Liquid phase microextraction*) (Uzcan *et al.*, 2019) entre outras. Além disso, são descritas modificações nas técnicas citadas através da incorporação de diferentes materiais recém desenvolvidos, tais como compostos de nanotubos de carbono, óxidos de grafeno, polímeros molecularmente impressos, entre outros (Zhou *et al.*, 2018).

Adicionalmente, procedimentos de preparo de amostras que envolvem o uso de forças auxiliares como ultrassom, aquecimento, radiação eletromagnética e

campos elétricos têm ganhado grande destaque por proporcionar várias vantagens ao processo extrativo incluindo eficiência, seletividade, limpeza e menor tempo de extração (Campos *et al.*, 2015).

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa do Departamento de Química na UFMG propôs novos procedimentos de extração assistidos por campos elétricos empregados na análise de corantes em diferentes matrizes, especificamente na análise de violeta genciana em tecido de peixe (tilápia) e de VM em água de criação de tilápia. Nesses métodos, a eletroextração multifásica (MPEE) apresentou alta eficiência e baixos limites de detecção e quantificação, mesmo sendo matrizes complexas (Orlando *et al.*, 2019; Orlando *et al.*, 2024; Viana *et al.*, 2021).

2.4. Extrações assistidas por campos elétricos no preparo de amostras

Os procedimentos de extração assistidos por campos elétricos, comumente denominadas eletroextração, baseiam-se na aplicação de um campo elétrico entre duas fases, uma doadora (amostra) e uma aceptora, promovendo a migração eletroforética seletiva das espécies carregadas, levando ao aumento da cinética de transferência dos analitos. Algumas modalidades empregam um solvente imiscível em água como fase intermediária entre as fases doadora e aceptora aquosas. A seletividade pode ser ajustada pela direção e magnitude do campo elétrico, do pH e da força iônica da amostra, bem como pelas características físico-químicas do solvente imiscível. O uso de campos elétricos, portanto, oferece vantagens importantes como maior eficiência, seletividade, *cleanup* e um menor tempo de extração (Campos *et al.*, 2015; Raterink *et al.*, 2013).

O interesse científico nessa área cresceu significativamente a partir do trabalho de Pedersen-Bjergaard & Rasmussen (2006), com a eletroextração em membrana (*Electromembrane Extraction* – EME). A EME é uma técnica de microextração onde o campo elétrico é aplicado entre duas fases líquidas separadas por uma membrana líquida suportada (*supported liquid membrane* – SLM) nas paredes de uma fibra oca de polipropileno. A configuração da EME é semelhante àquela da microextração em fase líquida em fibra oca (*Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction* – HF-LPME), exceto pela presença dos eletrodos (**Figura 3A**).

A partir da EME clássica, houve um grande avanço nessa área, levando ao surgimento de diversas outras modalidades de extração assistida por campo elétrico, consolidando-as como eficientes, versáteis e repletas de aplicações (Martins *et al.*, 2023). Entre as diversas modalidades destacam-se: EME planar (Xu *et al.*, 2008), EME simultânea (Bansheer *et al.*, 2010), EME pulsado (Rezazadeh *et al.*, 2012), EME nano (Payán *et al.*, 2013), eletroextração 3-fases (Raterink *et al.*, 2013), EME paralela (Eibak *et al.*, 2014), μ -EME (Kubáň & Boček *et al.*, 2014), EME em gel (Tabani *et al.*, 2017) e EEMP (Orlando *et al.*, 2019).

O surgimento das modalidades de eletroextração com membranas líquidas livres (com duas ou três fases) modificou significativamente a configuração das técnicas de eletroextração ao propor a remoção da membrana polimérica que suporta o líquido imiscível e conduzindo ao uso do solvente na forma livre (conhecida como membrana líquida livre ou como filtro orgânico) (Raterink *et al.*, 2013; Kubáň & Boček *et al.*, 2014; Šlampová, A.; Kubáň *et al.*, 2020; Šlampová, A.; Kubáň *et al.*, 2021; Šlampová, A.; Kubáň *et al.*, 2023).

Na proposta da eletroextração três fases proposta por Raterink *et al.* (2013), os autores utilizaram a mistura acetato de etila/acetato de metila (3:2) como solvente orgânico que separou a fase doadora aquosa (amostra) de uma gota pendente de fase aceptora também aquosa suspensa por uma ponteira condutora. A extração de aminoácidos acetilados (carnitinas) foi realizada aplicando uma diferença de potencial de 140 V por três minutos entre fases doadora e aceptora e os analitos concentrados foram analisados diretamente em espectrômetro de massas (**Figura 3B**).

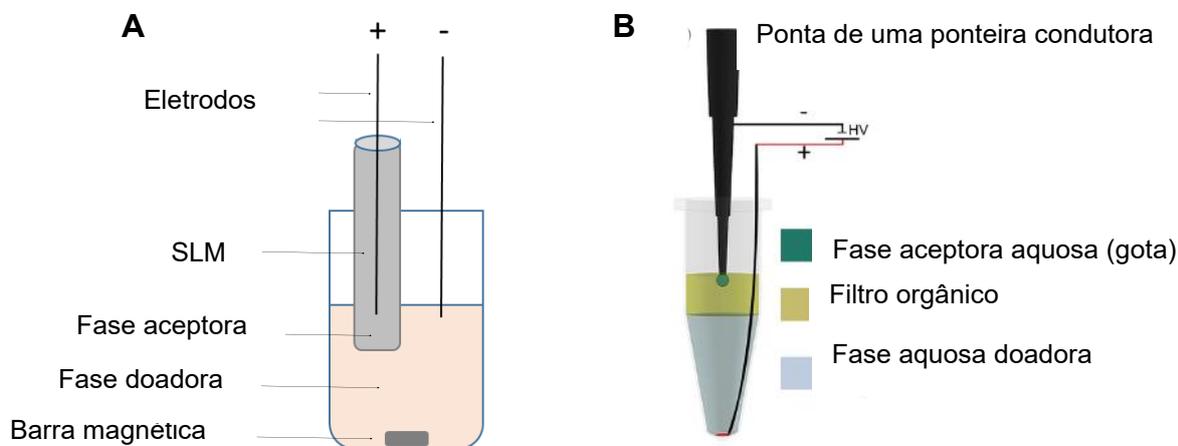


Figura 3: Esquema ilustrativo de (A) técnica de EME e (B) do sistema de eletroextração três fases. Fonte: Adaptado de Pedersen-Bjergaard & Rasmussen (2006) e de RATERINK *et al.* (2013).

Recentemente, uma nova variedade de preparo de amostras auxiliada por campos elétricos e denominada de EEMP foi proposta por Orlando *et al.* (2019). Este trabalho ampliou o leque de possibilidades para a evolução das técnicas de eletroextração através da introdução do conceito de suporte sólido poroso como fase acceptora. Os autores utilizaram uma ponta de papel odontológico conectado a um eletrodo como um suporte da fase acceptora que imobiliza uma solução eletrolítica e é mergulhado em um solvente orgânico que separa as fases aquosas acceptora e doadora (**Figura 4A**). Uma diferença de potencial é aplicada entre as fases doadora e acceptora promovendo a migração dos analitos através do filtro orgânico em direção ao suporte sólido, sendo posteriormente, dessorvidos e analisados. O dispositivo de eletroextração multifásico desenvolvido apresentou diversas vantagens, como por exemplo, a capacidade de múltiplas extrações simultâneas (66 poços), a alta estabilidade química e física do suporte sólido da fase acceptora, inclusive na aplicação de altas voltagens, além de uma ampla área superficial para pré-concentração dos analitos. O sistema foi aplicado na extração dos compostos básicos cocaína e lidocaína (em saliva) e do corante antimicrobiano violeta genciana (em tecido de peixe), mostrando uma alta capacidade de limpeza e pré-concentração, sendo, portanto, uma excelente alternativa para análise de amostras complexas (Orlando *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2020).

Posteriormente, a EEMP foi adaptada para análise de grandes volumes de amostra (**Figura 4B**). Além das vantagens já mencionadas, o novo sistema implementa um sistema de agitação magnética e acondiciona o material sorvente da fase acceptora em ponteira de micropipeta, possibilitando múltiplas variações do material utilizado (Viana *et al.*, 2021; Orlando *et al.*, 2024). Na aplicação da técnica um método foi validado para análise do corante VM em água de criação de peixe, sendo obtido baixos limites de detecção e quantificação (ordem de 14 – 96 ng L⁻¹) e ausência de efeito de matriz na determinação por UHPLC-DAD (Viana *et al.*, 2021).

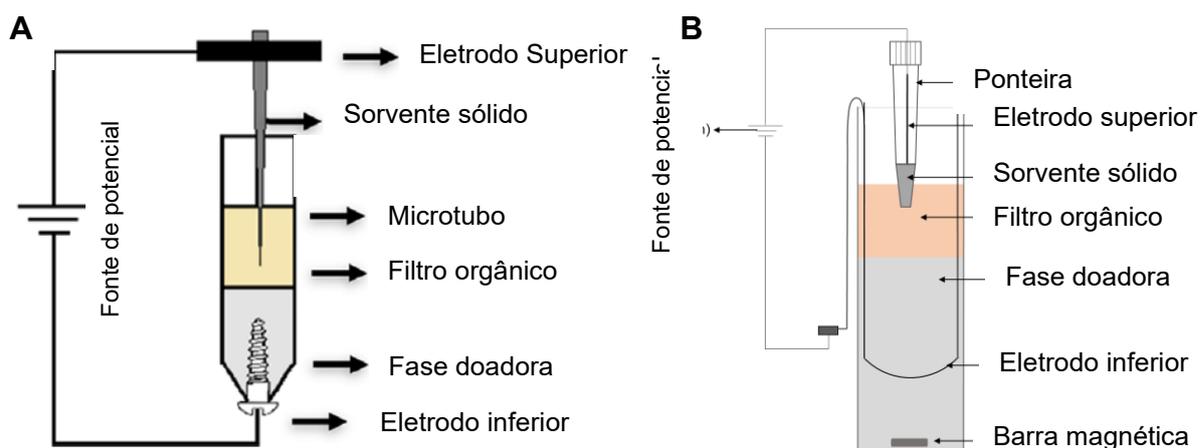


Figura 4: Ilustração esquemática do sistema de EEMP para (A) pequenos volumes e (B) grandes volumes. Fonte Adaptado de Orlando et al. (2019) e Viana (2021).

2.4.1. Parâmetros que influenciam na eletroextração

A transferência de massa na eletroextração envolve a migração direcionada e seletiva dos analitos carregados de uma fase doadora para uma fase aceptora, ambas conectadas à eletrodos que promovem a passagem de corrente elétrica. Em algumas modalidades essa migração ocorre através de uma ou mais fases intermediárias. A fase doadora corresponde à matriz aquosa da amostra que está sendo analisada onde os analitos estão inicialmente presentes e pode ser acrescida de solvente orgânico, eletrólitos ou tampões conforme a necessidade. Desse modo, os analitos migram em direção à fase aceptora que será posteriormente analisada (Campos *et al.*; 2015; Yamini, 2014; Wuethrich, 2016).

As técnicas clássicas de extração e suas variações miniaturizadas como a extração líquido-líquido se fundamentam no princípio da partição. Para as técnicas de eletroextração, por outro lado, o mecanismo completo de transferência de massa ainda estão sendo intensamente estudados e grandes esforços têm sido feitos para compreender os princípios fundamentais (Huang *et al.*, 2016).

Sabe-se que três fenômenos ocorrem na extração assistida por campo elétrico, sendo eles, difusão, convecção e eletromigração, sendo essa última a de maior contribuição. Por isso, dois modelos têm sido propostos para descrever a transferência de massa em técnicas de eletroextração, sendo eles, o modelo estático e o modelo dependente do tempo (Huang *et al.*, 2016).

No modelo estático, supõe-se que na extração em EME o comportamento seja similar ao que ocorre na migração iontoforética de fármacos através de membranas cutâneas, de modo que o fluxo J_i de íons através da SLM obedeça ao modelo teórico previsto pela equação de Nernst-Planck (Gjelstad, Rasmussen & Pedersen-Bjergaard, 2007; Yamini *et al.*, 2014) (**Equação 1**).

$$J_i = -\frac{D_i}{h} \times \left(1 + \frac{\vartheta}{\ln X}\right) \times \left(\frac{X-1}{X-e^{-\vartheta}}\right) \times (C_i - C_{io} \times e^{-\vartheta})$$

Equação 1

Na **Equação 1**, D_i corresponde ao coeficiente de difusão do íon na SLM; ϑ é uma função do potencial elétrico aplicado (**Equação 2**); h é a espessura da SLM; C_i é a concentração do íon na interface fase doadora-SLM; C_{io} é a concentração desse íon na interface SLM-fase aceptora; e X é o balanço de íons (razão entre as concentrações totais de íons na fase doadora e aceptora). Na **Equação 2**, Z_i corresponde à carga do íon; F é a constante de Faraday; $\Delta\phi$ é a diferença de potencial através da SLM; R é a constante universal dos gases e T é a temperatura.

$$\vartheta = \frac{z_i \cdot F \Delta\phi}{R \cdot T}$$

Equação 2

O modelo estático se mostra muito útil em diversas situações, pois ele permite explicar e prever diversos aspectos da transferência de massa em eletroextração. Porém, sabe-se que o tempo desempenha uma influência significativa na transferência de massa nessas técnicas e por isso, um modelo cinético simples tem sido proposto e estudado, no qual é avaliado a dependência do tempo no transporte através da SLM como mostra as **Equação 3 – 5** (Seip *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2016).

No modelo dependente do tempo assume-se alguns pressupostos: (1) há um tempo lag (t_{lag}) que corresponde ao tempo de residência do analito na SLM; (2) o transporte através da SLM corresponde a etapa limitante da velocidade; (3) a

convecção (agitação) do sistema é suficiente para não ser um fator limitante; (4) o transporte através da SLM é unidirecional e com um tempo suficientemente longo, todo o analito presente na amostra poderá ser recuperado na fase acceptora (Seip *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2016).

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

Equação 3

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

Equação 4

$$k_d^* = \exp\left(\frac{Z_i F}{RT} (\Delta_w^0 \phi - \Delta_o^0 \phi_i^0)\right)$$

Equação 5

Como mostrado na **Equação 3**, $C_{A_i}(t)$ equivale à concentração do analito i na fase acceptora no tempo (t), sendo igual a zero no tempo $t < t_{lag}$ e podendo ser calculada pela diferença entre a quantidade de matéria do analito originalmente presente na fase doadora e a quantidade presentes nas fases doadora e na SLM após o tempo t . Nessa **Equação 3**, $C_{D_i}(t)$ corresponde à concentração do analito i na fase doadora em função do tempo t ; o termo $C_{D_i}^0$ corresponde à concentração inicial do analito i na fase doadora, enquanto os termos V_D , V_A e V_m correspondem aos volumes de fase doadora, acceptora e SLM, respectivamente. O termo $C_{D_i}(t)$, como mostrado na **Equação 4** depende da área superficial da SLM (A_f) e da constante de permeabilidade do analito na SLM ($P_i^{D \rightarrow A}$). Na **Equação 5**, k_d^* corresponde ao coeficiente de distribuição do analito e será afetada pela diferença de potencial aplicada ($\Delta_w^0 \phi$) e da carga do analito i (Z_i). O termo F corresponde à constante de Faraday; R é a constante dos gases; T é a temperatura e o termo $\Delta_w^0 \phi_i^0$, por fim, está relacionado à hidrofobicidade do analito i .

Ambos os modelos teóricos (estático e dependente do tempo) apontam para a contribuição de diferentes parâmetros sobre a eficiência da eletroextração e

conduzem a conclusões similares. Por exemplo, os efeitos da espessura da SLM e do coeficiente de difusão mostrados na **Equação 1** (modelo estático) são contemplados no termo coeficiente de permeabilidade da **Equação 4** (modelo tempo-dependente), além disso, a diferença de potencial, ajustado pela voltagem aplicada, será uma contribuição significativa para a extensão da extração (Huang *et al.*, 2016).

Os modelos teóricos são de suma relevância para a compreensão do comportamento geral das extrações assistidas por campos elétricos, porém, deve-se sempre ressaltar que tais modelos assumem alguns pressupostos que nem sempre são verdadeiros na aplicação experimental. De um modo geral tempo e voltagem influenciam de forma diretamente proporcional à eficiência de extração, contudo, resultados experimentais mostram que essa correlação é verdadeira apenas até um certo limite, acima do qual, maiores tempo e voltagem diminuirão a eficiência, além disso, esses parâmetros se limitam mutuamente (Marothu *et al.*, 2013; Seidi *et al.*, 2011).

Como discutido anteriormente na análise das equações teóricas, o coeficiente de difusão ou permeabilidade do íon na SLM se relaciona com a afinidade do analito pelo solvente que compõe a membrana e por isso, afeta diretamente o tempo de residência do analito na SLM e conseqüentemente a cinética da extração. Portanto, a migração através da SLM corresponde a etapa limitante de toda eletroextração, de modo que, a composição da membrana dependerá das características físico-químicas do analito e deverá ser cuidadosamente otimizada para alcançar maiores níveis de eficiência de extração (Drouin *et al.*, 2019).

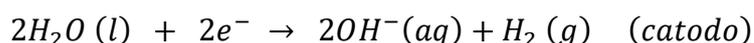
Algumas propriedades físico-químicas são desejáveis para o solvente da SLM, entre elas, baixa viscosidade; baixa solubilidade em água; baixa pressão de vapor e baixa condutividade elétrica. A afinidade do analito pelo solvente e o nível de solvatação serão os parâmetros primordiais, sendo em geral, descrito na literatura que analitos básicos são mais bem extraídos por solventes com maior número de sítios aceptores de prótons capazes de solvatá-los, sendo o solvente 2-nitrofenil octil éter (NPOE) o principal exemplo. Por outro lado, analitos ácidos são descritos serem melhor extraídos utilizando solvente com sítios doadores de prótons como álcoois alifáticos, sendo o 1-octanol o mais utilizado. O solvente NPOE é considerado solvente mais eficiente na extração de analito básicos polares ($\text{Log } P < 2$), tendo sua eficiência diminuída para analitos não polares ($\text{Log } P > 2$). Nesse último caso, têm sido

reportados a adição de substâncias carreadoras pela formação de pares iônicos, tendo como por exemplos o di(2-etilhexil-fosfato) (DEPH) e o tris(2-etilhexil-fosfato) (TEHP) (Yamini et al., 2014; Drouin *et al.*, 2019; Huang et al., 2016).

Observações experimentais têm evidenciado que o pH das fases acceptora e doadora é um parâmetro relevante para eficiência da eletroextração, influenciando também na estabilidade do sistema (RAHMANI *et al.*, 2016). A otimização do pH tem como objetivo principal deslocar o equilíbrio ácido-base e obter a forma ionizada dos analitos, contudo, a adição de eletrólitos no sistema modifica também o balanço iônico que, por sua vez, também influencia na eficiência de extração como visto na **Equação 1**. O aumento na concentração de eletrólitos afeta ainda a magnitude da corrente elétrica que atravessa o sistema, sendo reconhecido que níveis muito elevados estão associados à ocorrência de eletrólise na superfície dos eletrodos **Equação 6 – 7**, gerando conseqüentemente algumas instabilidades, incluindo deslocamento de pH, formação de bolhas e aquecimento por efeito Joule. O perfil de corrente elétrica, portanto, deve ser monitorado a fim de controlar essas instabilidades (DAVARANI et al., 2012; RAHMANI *et al.*, 2016).



Equação 6



Equação 7

O deslocamento de pH nas fases doadora e acceptora devido às reações de eletrólise pode levar à formação da forma não ionizada do analito. Desse modo, o efeito na fase doadora será a ausência de migração, enquanto na fase acceptora será o retorno do analito para a SLM, em ambos os casos diminuindo a eficiência de extração. O uso de tampões, em detrimento de ácidos e bases fortes, é uma alternativa para evitar deslocamento significativo de pH e por isso pode contribuir para a eficiência de extração, desde que o aumento na magnitude da corrente elétrica não provoque outras instabilidades como aquecimento Joule (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2017; Kubáň & Boček *et al.* 2015).

2.5. Análise de Imagens digitais

O aparecimento, desaparecimento ou mudança de cor são muito úteis na pesquisa química a fim de identificar, classificar, separar e quantificar compostos, além de caracterizar soluções e reações químicas. A área da ciência voltada para caracterização e quantificação das cores é conhecida como colorimetria (Fan *et al.*, 2021; Diniz *et al.*, 2019; Capitán-Vallvey *et al.*, 2015).

A análise colorimétrica instrumental através de equipamentos tais como colorímetros e espectrofotômetros são amplamente utilizados na análise química graças a sua precisão e robustez, porém apresentam custos relativamente elevados.

Nas últimas décadas, técnicas de análise de imagens digitais (AID) têm sido exploradas como alternativa para análise colorimétrica e reúnem um conjunto de ferramentas que buscam extrair informações químicas a partir de imagens digitais capturadas por diferentes dispositivos, incluindo câmeras digitais, scanners, smartphones, microscópios eletrônicos, webcam, entre outros. As técnicas de AID têm permitido alcançar resultados com alta acurácia e robustez através de análises simples e rápidas utilizando equipamentos de baixo custo e acessíveis (Fan *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2015; Barbosa *et al.*, 2017).

As imagens digitais são constituídas de um grid regular em 2-dimensões formadas por pixels, que é a menor unidade de uma imagem. Os dispositivos de aquisição capturam imagens por meio de sensores que, por sua vez, são constituídos por muitas células, onde cada célula corresponde a um pixel da imagem. Os sensores mais utilizados são CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductors*) e CCD (*Charge Coupled Devices*). As células do sensor agem como elementos sensíveis à luz, convertendo sinal luminoso em uma resposta elétrica, de modo que a combinação de todas as respostas de um sensor é digitalizada para formação da imagem (Solana-Altabella *et al.*, 2018; Capitán-Vallvey *et al.*, 2015).

Em um pixel colorido de uma imagem digital, as cores primárias são também chamadas de componentes (canais) de cor e podem assumir valores de intensidade conforme a profundidade de bits. A profundidade de cor (ou profundidade de “bits”) é um parâmetro importante para a definição da qualidade de uma imagem e representa a quantidade de “bits” usadas para especificar uma cor em uma imagem. Assim, esse parâmetro define quantas cores únicas estão disponíveis em uma paleta de cores

(Capitán-Vallvey *et al.*, 2015; Mchugh, 2021). As imagens obtidas de câmeras digitais e scanners possuem 8-bits por canal, ou seja, utilizam oito números 0's e 1's para especificar suas cores, de modo que são possíveis 2^8 combinações diferentes, isto é, 256 valores de intensidade para cada cor primária. Considerando que cada pixel apresenta os três canais de cor, esses dispositivos possuem 24-bits por pixel e isso representa 2^{8*3} ou 16.777.216 cores diferentes, sendo esses sistemas chamados de “*true color*” (cores reais) (Mchugh, 2021).

Para as imagens digitais, as cores são especificadas de forma padronizada através de sistemas conhecidos como espaço de cor, que representam um espaço ortogonal de coordenadas cartesianas em três dimensões onde cada cor é representada por um ponto único. Existem diversos espaços de cor conhecidos, entre eles estão RGB (*Red-Green-Blue*), HSV (*Hue-Saturation-Intensity*), escala de cinza (*grayscale system*) e CMYK (*Cyan-Magenta-Yellow-Key*), sendo o espaço RGB o sistema mais utilizado (Costa *et al.*, 2015).

A maioria dos espaços de cor estão embasadas na teoria tricromática de Young-Helmholtz, na qual é definida que qualquer cor pode ser obtida a partir da combinação de três cores primárias. Em um sistema aditivo, como no espaço de cor RGB, essas cores primárias são vermelho, verde e azul e a soma dessas cores formam o branco. No sistema RGB, os valores de intensidade para cada canal correspondem a coordenadas cartesianas de espaço de cor aditivo que variam de $[0, 0, 0]$ (preto) ao $[2^8 - 1, 2^8 - 1, 2^8 - 1]$ (branco) (Figura 5) (Capitán-Vallvey *et al.*, 2015).

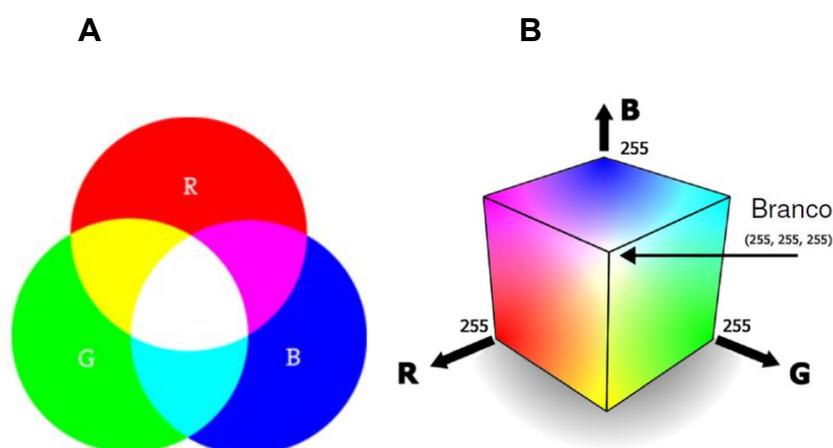


Figura 5: Representação gráfica dos espaços de cor (A) aditivo RGB (B) Espaço de distribuição de cores RGB. Fonte: https://www.stt.eesc.usp.br/andre/palestras/CEFET-MG/01_Intro.html

A possibilidade de conversão de sinais coletados a partir de sensores de imagens em dados químicos têm aberto um novo campo de estratégias e oportunidades em química analítica, de modo que o uso de imagens digitais como método analítico tem se destacado no meio científico. A principal forma de extrair informações de uma imagem é através dos histogramas de cor, os quais representam a frequência de distribuição dos pixels de uma região de interesse (ROI – *region of interest*) selecionada na imagem em função da intensidade em um determinado canal do espaço de cor (Costa *et al.*, 2015). Portanto, o histograma de uma amostra representa um vetor de dados multivariados, sendo então passíveis de análise por meio de técnicas quimiométricas.

A aplicação da quimiometria ao processamento de imagens digitais deu origem à análise multivariada de imagens (MIA - *Multivariate Image Analysis*) e a regressão multivariada de imagens (MIR - *Multivariate Images Regression*) (Prats-Montalbán *et al.*, 2011; Lied *et al.*, 2000; Geladi & Grahn, 1996). O número de trabalhos envolvendo análise química a partir de imagens digitais cresceu significativamente nos últimos 15 anos, evidenciando o potencial desse novo campo de desenvolvimento analítico (Capitán-Vallvey *et al.*, 2015).

A **Figura 6** resume as principais etapas na análise digital de imagens, sendo elas, aquisição das imagens, a definição do espaço de cor, a quantificação da cor em *software* de processamento de imagem e, por fim, o tratamento e análise estatística para obtenção de informações (Fan *et al.*, 2021).

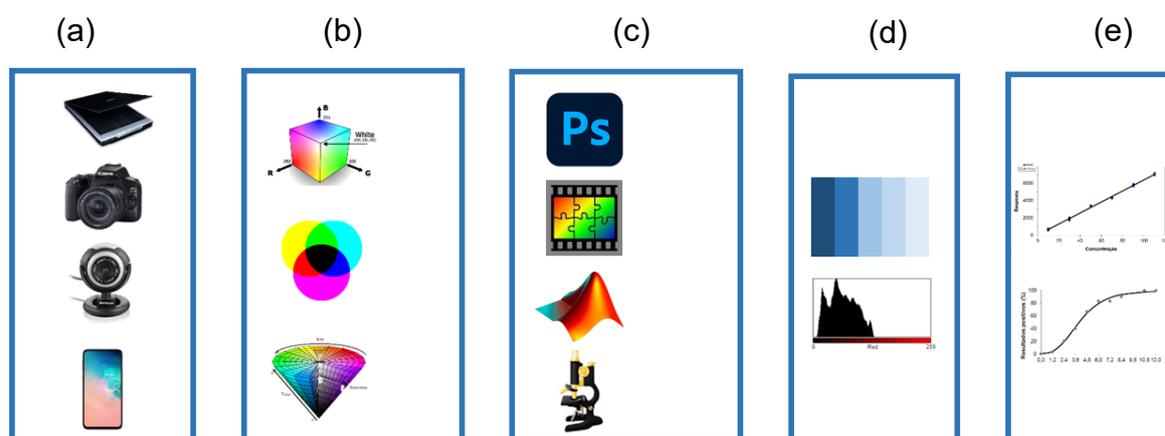


Figura 6: Fluxo do processo de análise de imagens digitais. (a) dispositivos de aquisição; (b) espaços de cor; (c) software de imagens; (d) histogramas; (e) informações analíticas. (Adobe Photoshop®, ImageJ, PhotoFiltre e Matlab®)

2.6. Análises quimiométricas

O avanço tecnológico dos instrumentais analíticos ao longo das últimas décadas é notável seja no nível de *hardware* ou *software*. O interfaceamento desses instrumentais com computadores possibilitou alcançar um patamar sofisticado nas medições analíticas possibilitando a obtenção de medidas de numerosas variáveis simultaneamente a partir de uma única amostra. Assim, juntamente com o avanço instrumental, a quantidade de dados obtidas aumentou consideravelmente, exigindo que novas ferramentas fossem desenvolvidas para analisar essa grande quantidade de dados. Neste cenário, a quimiometria se desenvolveu com o objetivo de otimizar a extração de informações relevantes a partir de dados químicos multivariados fazendo uso de ferramentas matemáticas, estatísticas e computacionais para esse fim (FERREIRA *et al.* 1999). Desse modo, uma definição formal da quimiometria pode ser dada como: “... uma disciplina química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos” (VANDEGINSTE *apud.* FERREIRA *et al.* 1999).

A primeira etapa de uma análise quimiométrica corresponde à organização e preparação dos dados, visando especialmente organizar, visualizar e pré-processá-los previamente à etapa de análise. A etapa seguinte consiste muitas vezes em uma análise exploratória desses dados através de métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados tais como a análise de componentes principais (*Principal Components Analysis* – PCA) e o agrupamento por métodos hierárquicos (*Hierarchical Components Analysis* – HCA), sendo a PCA especialmente importante, uma vez que representa a base fundamental da quimiometria e muito utilizado na construção de diferentes modelos sejam eles de calibração ou de classificação (Ferreira *et al.*, 2015). Posteriormente, métodos quimiométricos mais específicos podem ser empregados na construção de modelos de classificação (qualitativos) ou de regressão (quantitativos).

Existem também os métodos supervisionados de reconhecimento de padrões que são utilizados na construção de modelos de classificação, entre eles destaca-se o método do k-ésimo vizinho mais próximo (KNN) e a modelagem independente e flexível por analogia de classe (*SIMCA – Soft Independent Modelling of Class Analogy*), além do método de análise discriminante (*PLS-DA*) no qual o grande

potencial do modelo de regressão PLS é aplicado também em modelos de classificação (Ferreira *et al.*, 2015).

2.6.1. Análise discriminante pelo método dos quadrados mínimos parciais – PLS-DA

Os métodos quimiométricos de reconhecimento de padrões são divididos em supervisionado e não supervisionado. Os métodos supervisionados requerem conhecimento prévio das amostras e qual classe pertencem para definir as diretrizes do modelo necessárias para classificar as amostras. O *PLS-DA* é um método de classificação supervisionado, ou seja, a informação sobre a qual classe pertence cada amostra é conhecida. Na construção do modelo, é utilizada a técnica de regressão multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS), onde se busca relacionar a resposta instrumental (matriz \mathbf{X} – variáveis independentes) com a propriedade de interesse (matriz \mathbf{Y} ou vetor \mathbf{y} – variáveis dependentes). Porém no *PLS-DA*, o vetor \mathbf{y} ou matriz \mathbf{Y} contém uma propriedade categórica que relaciona o pertencimento ou não à uma determinada classe (Barker & Rayens 2003).

Portanto, o vetor \mathbf{y} ou matriz \mathbf{Y} contém apenas números “0” ou “1”, sendo geralmente atribuído o valor “1” para indicar o pertencimento à classe e o valor “0” para indicar que não pertence à classe. Se as variáveis dependentes \mathbf{y} compõe um vetor, uma única classe será modelada e, por isso, é empregado o *PLS1-DA*. Por outro lado, se houver uma matriz \mathbf{Y} , mais de uma classe está sendo modelada e por isso pode-se usar o modo *PLS2-DA* (para modelar todas as classes simultaneamente) ou o *PLS1-DA* (para modelar uma classe por vez) (Ferreira *et al.*, 2015).

Algoritmos apropriados são utilizados para decompor as matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} conforme mostrados na **Equação 8** e **Equação 9**. Onde, T e U são os escores (as coordenadas das amostras na projeção das variáveis latentes), P e Q são os pesos (coeficientes da combinação linear das variáveis originais) e R_x e R_y são os resíduos das matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente. Diversos algoritmos estão disponíveis, sendo o algoritmo dos quadrados mínimos parciais iterativos não lineares (*non linear iterative partial least squares* – NIPALS) um dos mais utilizados (Santana *et al.*, 2020).

$$X = T \cdot P^T + R_x$$

Equação 8

$$Y = U \cdot Q^T + R_y$$

Equação 9

Para realizar essa construção, primeiramente o conjunto total de amostras é dividido em dois subconjuntos, sendo eles o treinamento e teste. Para realizar essa separação é necessário aplicar um método sistemático capaz de discriminar as amostras mais representativas do conjunto total. Alguns algoritmos são utilizados para essa finalidade, sendo o algoritmo *Kennard-Stone* um dos mais utilizados, sendo capaz de obter uma separação contendo a maior variabilidade dentro do conjunto total de amostras (Kennard & Stone, 1965). Na *PLS-DA*, o algoritmo deve ser aplicado a cada classe individualmente.

Uma das etapas cruciais da construção do modelo *PLS-DA* é a definição do número apropriado de variáveis latentes (VL). Quantidade insuficiente de VL implica em subajuste do modelo, de modo que informações relevantes ficaram fora da modelagem. Um número excessivo de VL, por outro lado, resulta em sobreajuste, e nesse caso, informações não importantes, tais como ruídos espectrais são incorporados no modelo. Em ambos os casos, a calibração incorreta pode resultar em erros de classificação das amostras na etapa de validação (Santana *et al.*, 2020).

A escolha do número adequado de VL é feita através de um processo de validação cruzada, no qual parte das amostras do conjunto de treinamento são separadas em um conjunto de validação interna, sendo então construídos vários modelos para diferentes números de VL. Em geral, quando o número de amostras é pequeno, a estratégia mais comum é usar o *leave-one-out*, onde uma amostra do conjunto do treinamento é removida por vez e constrói-se, com as demais, o modelo de discriminação que é usado para prever a amostra retirada. O processo é repetido até que todas as amostras de treinamento tenham sido previstas. Por outro lado, quando o conjunto de amostras é grande é recomendado a retirada de blocos de amostras para formar o conjunto de validação interna, e estratégias como blocos contínuos, subconjuntos aleatórios ou *venetian blinds* podem ser usadas para retirada dos blocos de amostras. Do mesmo modo, as amostras restantes são usadas na construção de modelos para prever o conjunto de amostras que foi retirado, repetindo o processo até que todas as amostras tenham sido previstas. Na *PLS-DA*, o número de VL será àquele que minimiza o percentual de erros de classificação para cada

classe na validação cruzada (*Cross Validation Classification Error – CVCE*) (Santana *et al.*, 2020).

Os valores previstos pelo modelo *PLS-DA* não serão exatamente “0” e “1” mas valores aproximados e, portanto, é necessário estabelecer um valor limite (*threshold*) para atribuir ou não o pertencimento de uma amostra à uma classe modelada. Esse valor de limiar (*threshold*) pode ser estimado através da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), ou com base na estatística bayesiana, visando minimizar erros de classificação.

A identificação de amostras anômalas (*outliers*) é avaliada, por meio da estatística Q (resíduos) e T^2 (*Hotelling*) nos conjuntos de treinamento e teste ao nível de confiança de 95%. Onde Q representa os resíduos da soma quadrática, ou seja, a parte do bloco X que não foi modelada pela *PLS-DA* enquanto o T^2 de *Hotelling* corresponde à distância de cada amostra ao centro dos dados. Valores elevados de Q e T^2 ao nível de 95% de confiança indicam que a amostra é um *outlier* e deve ser removido, respeitando o limite de remoção de até 2/9 do número total de amostras (Horwitz, 1995; Thompson, Ellison & Wood, 2002).

Para avaliação do modelo, as amostras externas (conjunto teste) que não foram utilizadas na etapa de treinamento serão empregadas na validação do modelo e figuras de mérito são calculadas para estimar a qualidade do modelo construído. Para isso, é utilizado as tabelas de contingência, o qual relaciona o resultado previsto pelo modelo com os respectivos resultados de referência, como mostrado **Tabela 3**. Onde as amostras corretamente classificadas correspondem ao verdadeiro positivo (VP) e ao verdadeiro negativo (VN) enquanto as amostras classificadas erroneamente são chamadas de falso positivo (FP) ou falso negativo (FN).

Tabela 3: Exemplo de tabela de contingência para duas classes

Tabela de contingência		Previsto pelo modelo	
		Classe 1	Classe 0
Referência	Classe 1	VP	FP (Erro tipo I)
	Classe 0	FN (Erro tipo II)	VN

Fonte: Adaptado de Santana *et al.*, 2020.

A partir das tabelas de contingência, parâmetros que refletem a qualidade da classificação das amostras podem ser calculados. Entre eles, estão a sensibilidade (*SENS*) e a especificidade (*SPEC*). A sensibilidade é calculada como a razão entre os resultados verdadeiros positivos e o total de amostras positivas, enquanto a especificidade, por sua vez, é calculada como a razão entre os resultados verdadeiros negativos e o total de amostras negativas.

$$SENS = \frac{VP}{VP + FN}$$

Equação 10

$$SPEC = \frac{VN}{VN + FP}$$

Equação 11

Um parâmetro global que combine a sensibilidade e especificidade pode ser calculado conforme a **Equação 12** e recebe o nome de acurácia ou eficiência (*EFIC*).

$$EFIC = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN}$$

Equação 12

Outra estratégia de avaliação da eficiência global do método de classificação é o coeficiente de correlação de *Mathew* (*MCC – Mathew’s Correlation Coefficient*) calculado como mostrado na **Equação 13**. Esse parâmetro fornece uma visão geral da eficiência de classificação do modelo pois inclui simultaneamente as taxas de verdadeiro positivos e verdadeiros negativos. Os valores de *MCC* variam na faixa entre -1 e 1 , onde 1 corresponde a uma classificação perfeita, sendo esse parâmetro considerado uma extrapolação do coeficiente de correlação de Pearson para aplicação em métodos qualitativos.

$$MCC = \frac{VN \times VP - FN \times FP}{\sqrt{(VP + FP)(VP + FN)(VN + FP)(VN + FN)}}$$

Equação 13

2.6.2. Modelagem independente e flexível por analogia de classe baseada em dados – DD-SIMCA

Além dos métodos de análise discriminante, outra abordagem supervisionada de reconhecimento de padrões é o método da modelagem de classe, também conhecida como classificação *one-class*, na qual o modelo é construído utilizando informações exclusivamente da classe alvo (Rodionova *et al.*, 2016).

Comparativamente, os métodos de análise discriminante dividem o espaço das variáveis em tantas regiões quantas forem as categorias (classes) de objetos em estudo no conjunto treinamento, de modo que cada amostra é atribuída a uma única classe. Na modelagem de classe, por outro lado, é estabelecido um limite ou fronteira para cada classe individualmente delimitando uma sub-região do espaço das variáveis onde as amostras que pertencem a uma determinada classe se agrupam, de modo que, é possível para uma amostra em estudo pertencer a uma, nenhuma ou múltiplas classes modeladas (Vitale *et al.*, 2023).

Nesse contexto, a classe alvo que está sendo modelada corresponde à classe da qual tem-se o interesse de conhecer as propriedades que caracterizam seus membros. Essas propriedades, obtidas por técnicas espectroscópicas, cromatográficas, eletroanalíticas ou quaisquer outras técnicas analíticas, permitem obter uma matriz de dados ou *fingerprint* que é característica dos objetos desta classe alvo. A partir disto, todos os objetos que não pertençam a esta classe são considerados objetos estranhos que podem pertencer à alguma das diferentes classes alternativas ou mesmo não pertencer a nenhuma classe específica. Diferentemente dos métodos de análise discriminante, as classes alternativas ou objetos estranhos não são usados na modelagem da classe alvo (Rodionova *et al.*, 2016).

Entre os métodos de modelagem de classe (*one-class*) mais populares e mais amplamente utilizados na quimiometria está o *SIMCA* (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*), proposto originalmente por Wold (1977), bem como suas principais variações, entre elas *simple* (*sim-SIMCA*) (Albano *et al.*, 1978 *apud.* Pomerantsev & Rodionova, 2020), *alternative* (*alt-SIMCA*) (Eigenvector Research, 2022 *apud.* Pomerantsev & Rodionova, 2020), *Combined Index* (*CI-SIMCA*) (Yue & Qin, 2001) e o *data driven* (*DD-SIMCA*) (Pomerantsev, 2008; Pomerantsev & Rodionova, 2020).

No método *SIMCA*, a classe alvo é modelada individualmente a partir de um conjunto de treinamento por meio de análise de componentes principais (PCA). Todas as versões do *SIMCA* possuem a mesma sequência de etapas: (i) organização dos dados do conjunto treinamento; (ii) decomposição e análise PCA desse conjunto de dados; (iii) definição de uma regra de tomada de decisão; (iv) otimização dos parâmetros do modelo *SIMCA*; (v) validação do modelo *SIMCA*. A etapa iii é uma etapa crítica e corresponde a principal diferença entre as diferentes versões do *SIMCA* (Pomerantsev & Rodionova, 2020; Vitale *et al.*, 2023).

Na etapa de análise PCA, tem-se a matriz \mathbf{X} ($I:J$), contendo os dados das “ I ” amostras do conjunto treinamento e suas respectivas medidas das “ J ” variáveis. Esta matriz, após o pré-tratamento (i.e., centrado na média ou auto escalamento) é decomposta conforme a **Equação 14** a seguir utilizando um algoritmo apropriado, tal como, por exemplo, a decomposição em valores singulares (*Singular Values Decomposition* – SVD).

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T + \mathbf{E}$$

Equação 14

Onde \mathbf{T} ($I \times A$), \mathbf{P} ($J \times A$) e \mathbf{E} ($I \times J$) correspondem as matrizes de escores, pesos e resíduos, respectivamente e “ A ” corresponde ao número de componentes principais incluídas. No método *SIMCA*, duas medidas estatísticas de distâncias métricas são fundamentais na construção da modelagem da classe, sendo a primeira delas a estatística de *Hotelling* (H , T^2 ou estatística D), também chamada de distância de escores (*Score Distance* – SD), e a segunda medida estatística, estatística Q , também conhecida como distância ortogonal (*Orthogonal Distance* – OD).

O cálculo dessas distâncias é feito através da **Equação 15** e **Equação 16** a seguir, onde \mathbf{x}^T ($1 \times J$) representa o vetor de medidas de uma amostra e a matriz $\mathbf{\Lambda} = \mathbf{T}^T\mathbf{T} = \text{diag}(\lambda_1, \dots, \lambda_A)$ representa a diagonal com elementos λ_a , que, por sua vez, correspondem aos autovalores da matriz $\mathbf{X}^T\mathbf{X}$ dispostos em ordem decrescente (Pomerantsev & Rodionova, 2020; Vitale *et al.*, 2023).

$$SD = \mathbf{x} \mathbf{P} \mathbf{\Lambda}^{-1} \mathbf{P}^T \mathbf{x}^T$$

Equação 15

$$OD = \|\mathbf{x}^T (\mathbf{I} - \mathbf{P} \mathbf{P}^T)\|^2$$

Equação 16

A medida SD representa o quadrado da distância Mahalanobis a partir do centro do modelo até a projeção da amostra \mathbf{x} no subespaço das CP. Enquanto o OD representa o quadrado da distância euclidiana de uma amostra até o subespaço das CP.

O método $DD-SIMCA$, proposto por Pomerantsev (2008), é descrito com detalhes em diversos trabalhos (Pomerantsev & Rodionova, 2014; Zontov *et al.*, 2017; Pomerantsev & Rodionova, 2020; Vitale *et al.*, 2023). Nessa variante do $SIMCA$, é calculada uma soma ponderada das medidas de SD e OD , a qual é conhecida como *full distance* (FD) (**Equação 17**).

$$FD = L_H \frac{H}{H_0} + L_Q \frac{Q}{Q_0} \propto \chi^2(N_H + N_Q)$$

Equação 17

Onde, N_H e N_Q representam o número de graus de liberdade (GL) H_0 e Q_0 são fatores de escalamento, sendo os GL calculados como se segue na **Equação 18** a seguir.

$$L_U = \frac{2 \hat{U}}{s^2_U}, \hat{U} = U_0, U = \{H \text{ ou } Q\}$$

Equação 18

Onde \hat{U} e s^2 correspondem a média aritmética e a variância, respectivamente das medidas de H ou Q.

Como mostrado na **Equação 17**, a medida FD segue uma distribuição Chi quadrada (χ^2) com $GL = L_H + L_Q$. Esta medida será comparada com o valor crítico (FD_α) calculado como mostrado na **Equação 19** a seguir e a regra de decisão será dada como na **Equação 20**.

$$FD_\alpha = \chi^{-2}(\alpha, L), L = L_H + L_Q$$

Equação 19

$$FD < FD_\alpha$$

Equação 20

Após a construção do modelo, novas amostras podem ser avaliadas e representadas em um gráfico de área de aceitação plotado no espaço distância ortogonal vs distância de escores definido para um dado valor de α (significância do

modelo). As amostras testadas serão classificadas como regulares, isto é, pertencem à classe alvo e se encontram dentro da área de aceitação, ou como extremos, os quais não pertencem à classe alvo e se encontram fora da área de aceitação (Figura 7).

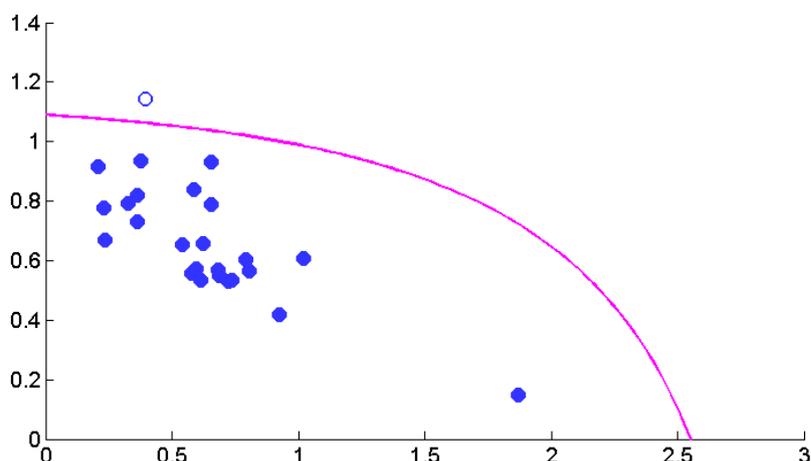


Figura 7: Exemplo de gráfico de área de aceitação para um modelo construído com DD-SIMCA; círculos cheios: amostras pertencentes à classe alvo; círculo vazio: amostra extremo.

2.6.2.1. Otimização do método DD-SIMCA

Uma etapa importante da modelagem de classe é a otimização do modelo, sendo possível utilizar duas abordagens de otimização: a abordagem rigorosa (*rigorous approach*) e a abordagem compatível (*compliant approach*). A análise rigorosa utiliza apenas as informações da classificação de amostras da classe alvo para avaliação do modelo, enquanto na análise compatível, as informações da classe não alvo também são utilizadas para essa otimização (Rodionova *et al.*, 2016).

Nesse contexto, nos modelos de classificação *one-class*, a sensibilidade e a especificidade também são parâmetros muito importante na análise de performance dos modelos. De maneira similar ao que foi discutido anteriormente na sessão sobre *PLS-DA*, no método de modelagem de classe *SIMCA*, a sensibilidade (*SENS*) representa a fração de amostras da classe alvo que foram corretamente classificadas como tal e que corresponde à taxa de verdadeiro positivo, de modo que seu complementar (erro do tipo I, α) é a taxa de falso negativo. Analogamente, a especificidade (*SPEC*) representa a fração de amostras não pertencente à classe alvo

e que foram corretamente identificadas como amostras estranhas, correspondendo assim à taxa de verdadeiros negativos e seu complementar (erro do tipo II, β), portanto, é a taxa de falso positivo. A eficiência global dos métodos de classificação *one-class* é obtida a partir da média geométrica da sensibilidade e especificidade (Radionova *et al.*, 2016).

É importante considerar que o parâmetro da sensibilidade pode ser calculado para diferentes conjuntos de amostras tais como conjunto treinamento (*SENS_T*), conjunto teste (*SENS_V*) e conjunto de validação cruzada (*cross-validation*, *SENS_CV*). Para alguns métodos *one-class*, p.ex. o *DD-SIMCA*, na construção do modelo é possível definir previamente um valor de α para ser usado na estimação do valor de corte (*threshold*), sendo avaliado em seguida a sensibilidade do modelo no conjunto de treinamento. É importante destacar que a sensibilidade obtida deve ser comparada com α configurado *a priori*. Os parâmetros *SENS_T* e *SENS_V* são análogos aos parâmetros de raiz quadrada do erro médio quadrado de calibração (*Root Mean Square error of calibration* – RMSEC) e previsão (*Root Mean Square error of prediction* – RMSEP) calculados nos métodos de calibração multivariada (Radionova *et al.*, 2016).

Em conclusão, verifica-se que a otimização do modelo de classificação *one-class* pode ser realizado por uma abordagem rigorosa (*rigorous*) ou compatível (*compliant*). No primeiro caso, a condição ótima é alcançada utilizando apenas o erro tipo I, α , ou sensibilidade estimada como $1 - \alpha$, sendo que o α configurado *a priori* deve ser comparado com o α calculado *a posteriori*. No segundo caso, é utilizado informações sobre as classes alternativas (não-alvo) para avaliar a performance do modelo, sendo estimado o erro do tipo II, β , para cada classe alternativa considerada, ou o correspondente valor de especificidade, estimado como $1 - \beta$, sendo a condição ótima estimada pela análise de ambos α e β e o modelo de máxima eficiência é escolhido, conforme a **Equação 21** (Malyjurek *et al.*, 2020).

$$EFIC = \sqrt{SENS \times SPEC}$$

Equação 21

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver, otimizar e aplicar diferentes modalidades de EEMP de grandes volumes na determinação de corantes antimicrobianos em amostra de água de lago empregando a técnica de análise de imagens digitais e espectrofotometria UV-Vis associada a ferramentas quimiométricas.

3.2. Objetivos específicos

- Otimizar o uso de florisil como fase aceptora da EEMP para possibilitar análise direta de corante por imagem digital;
- Implementar o uso de pontas de papel odontológico como fase aceptora em sistema automatizado de eletroextração multifásica ajustado para reposição contínua da solução eletrolítica durante a extração;
- Aplicar o modo de eletroextração dinâmica com movimentação da fase aceptora durante a extração.
- Desenvolver método *screening* de discriminação para monitoramento de amostras de água superficial (lago) contaminadas por VM usando imagem digital por scanner de mesa e modelo quimiométrico por *PLS-DA*;
- Desenvolver método de *screening* para classificação de amostras de água superficial (lago) contaminadas por múltiplos corantes (VM, VG e AM) usando espectrofotômetro UV-Vis e imagem digital através de modelo quimiométrico por *DD-SIMCA*;

4. EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e solventes

Foram utilizados os solventes orgânicos acetonitrila (Supelco, Merck – Alemanha), metanol (J.T. Baker – EUA), n-octanol (Neon – Brasil) e ácido acético (Synth – Brasil), todos grau HPLC. Foram utilizados reagentes de grau analítico ou superior, sendo eles, ácido cítrico (Neon – Brasil), fosfato de sódio bibásico (Synth – Brasil) e 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona (DDQ, Sigma Aldrich – Alemanha). Foram utilizados os compostos dos corantes, sendo eles, oxalato de verde malaquita (Sigma Aldrich – Alemanha), azul de metileno (Synth – Brasil) e violeta genciana (VG) (Synth – Brasil). Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura obtida do sistema Milli-Q Simplicity 185 purification system (Millipore – Molsheim, França).

4.2. Materiais e equipamentos

Silicato de magnésio em pó (Florisol; Aldrich Chemical Company®; Milwaukee, WIS, EUA) e papel cromatográfico (Whatman® GE Healthcare companies®, Amersham, UK), usados como material sorvente da fase aceptora da eletroextração.

Ponta de papel odontológico nº60 (cones odontológicos #60) da marca Dentsply®, (Rio de Janeiro; Brasil), usado como suporte sólido da fase aceptora da eletroextração; ponteiras de micropipeta 1000 µL; pinça metálica.

Dispositivo de eletroextração multifásica; dispositivo automatizado de eletroextração multifásica, fonte de eletroforese KASVI modelo K33-300V, multímetro Tekpower modelo TP4000ZC com um comunicador RS-232 (EUA) conectado ao microcomputador; Computador Pentium (Intel), sistema operacional Microsoft Windows XP, aquisição de dados software Multi Meter Interface, entrada RS-232; balança analítica Shimadzu ATX 224; agitador Vórtex ZXClassic VELP Scientifica; banho ultrassom ULTRASONIK™, marca Ney; pHmetro da marca JKI modelo JK-PHM-005, agitador rotatório (Kacil, HM01), peneiras granulométricas; almofariz de ágata; scanner de mesa Canon Scan Lide 110, Mac book (Apple; EUA). espectrofotômetro UV/Vis Agilent Technologies Cary 60.

4.3. Preparo das soluções

As soluções-estoque dos corantes VM, VG e AM foram preparadas na concentração $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pela dissolução dos respectivos sólidos em acetonitrila. Soluções intermediárias de cada corante na concentração $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ foram preparadas pela diluição das respectivas soluções estoques.

Todas essas soluções foram armazenadas em congelador a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ protegidas da luz. Nessas condições as soluções-estoque permanecem estáveis por até 6 meses, enquanto as soluções intermediárias ficaram estáveis por até 2 semanas.

A solução do oxidante DDQ $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução do reagente sólido em acetonitrila, sendo posteriormente armazenada em $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por até 1 mês. A solução de trabalho de DDQ foi preparado no momento do uso pela diluição da solução estoque para obter uma concentração igual a $0,001 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Solução de ácido acético $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi preparada a partir do ácido acético glacial concentrado pela diluição com água deionizada.

O tampão foi preparado pela mistura de solução McIlvaine com acetonitrila na proporção 1:1 (v/v; 50%). A solução McIlvaine foi preparada a partir de soluções de (A) ácido cítrico ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e (B) fosfato de sódio dibásico ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) preparadas individualmente em água ultrapura e misturadas na proporção 5,70 mL de A para cada 14,30 mL de B (Vogel, 2005). Esse tampão será designado ao longo do texto de **tampão pH 3,4** quando preparado com água deionizada e de **tampão matrizado**, quando preparado em água superficial (lago).

Para a primeira aplicação deste trabalho, as soluções de trabalho de VM em tampão pH 3,4 ou tampão matrizado nas concentrações de $0,5$ a $5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, foram preparadas no momento do uso a partir da diluição das soluções estoque padrão descritas acima. Para a segunda aplicação deste trabalho, as soluções de trabalho dos corantes foram preparadas diretamente na matriz de água de lago.

4.4. Preparo das amostras de água superficial de lago

Os métodos propostos no presente trabalho foram desenvolvidos e aplicados na determinação dos corantes VM, VG e AM em amostras de água de lago fortificadas. Para esse propósito, frascos de vidro previamente lavados foram utilizados para coleta

de cerca de 5 litros de amostras de água superficial em lago localizado em bairro da regional Pampulha em Belo Horizonte, Minas Gerais (Coordenadas 19° 53' 7" S 44° 0' 3" W). Após a coleta, as amostras foram transportadas ao laboratório e imediatamente armazenadas em condições refrigeradas (4 °C) para minimizar qualquer alteração na composição. Previamente às extrações, as amostras foram submetidas a um pré-tratamento por meio de centrifugação (4000 rpm por 20 min) para remoção de material particulado e material orgânico suspenso.

Para evitar efeito de diluição, a própria amostra de água de lago foi usada no preparo do tampão McIlvaine por meio da adição de quantidades adequadas de ácido cítrico e fosfato de sódio dibásico, sendo o pH ajustado posteriormente para 3,4 usando solução HCl ou NaOH 0,1 mol L⁻¹. Após o preparo da amostra tamponada, 5 mL da solução amostra foram pipetados para o frasco de extração e misturados com 5 mL de acetonitrila.

4.5. Sistema de eletroextração multifásica e extrações das amostras

Para a primeira aplicação deste trabalho (análise do corante VM em água de lago) empregou-se na etapa de preparo de amostra o dispositivo multipoços de EEMP de grandes volumes (INPI n° BR1020190178612) desenvolvido por Orlando e colaboradores (2017; 2019) e construído similarmente como descrito por Viana *et al.*, (2021), com capacidade de análise de até 30 mL de amostra e múltiplas extrações simultâneas (até 10).

Uma visão detalhada desse dispositivo é apresentada na **Figura 8**. As condições ótimas para extração dos corantes, tais como, pH, volume de acetonitrila, filtro orgânico, voltagem e tempo de extração foram destacados em trabalhos anteriores (Orlando *et al.*, 2019; Viana *et al.*, 2021). Um potencial elétrico (200 V for 25 minutos) foi aplicado entre as fases doadora (amostra) e a fase aceptora (suporte sólido que suporta uma solução de eletrólito – ácido acético 0,5 mol L⁻¹), sendo essas fases separadas por um filtro orgânico (n-octanol, 3 mL).

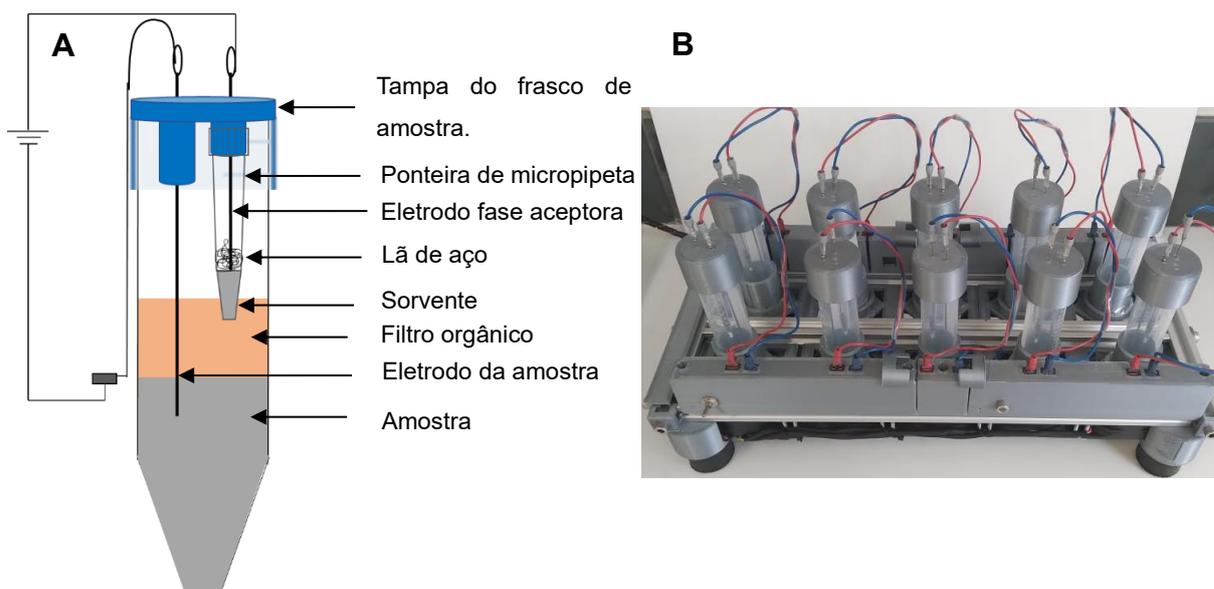


Figura 8: Configuração do sistema de EEMP de grandes volumes. (A) Visão detalhada da unidade de extração; (B) Mesa multipoços de eletroextração.

Para o suporte sólido da fase acceptora, dois materiais sorventes foram testados, sendo eles, silicato de magnésio (Florisil; 0,05 g) e papel cromatográfico (0,2 g). Na **Figura 9** é apresentada as etapas para compactação do papel cromatográfico e florisil, sendo muito semelhante à compactação de ambos os materiais, exceto o fato do florisil ser umedecido com solução acceptora previamente à compactação.

Fez-se a compactação do material sorvente (Florisil ou papel cromatográfico) na ponta da ponteira de micropipeta de polipropileno (1000 μL de capacidade) (**Figura 9a**), adicionou-se solução de eletrólito no suporte sólido (sorvente) (**Figura 9b**) e então conectou-se o eletrodo superior ao material, utilizando lã de aço para ampliar o contato elétrico (**Figura 9d,e**). Finalmente, toda a unidade de extração foi acoplada à tampa do frasco de amostra onde também foi acoplado o eletrodo inserido na amostra.

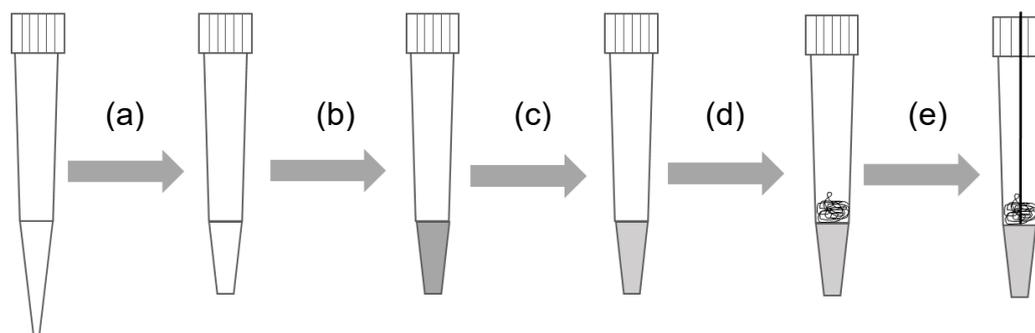


Figura 9: Procedimento de montagem da ponteira com material sorvente; (a) corte da ponta da ponteira; (b) compactação do suporte sólido; (c) adição de solução aceitadora ao material; (d) adição de contato elétrico; (e) adição de eletrodo inferior.

Durante as extrações, os frascos de amostra, constituídos de tubos de polietileno (Falcon), foram posicionados na mesa de extração multipoços. Em seguida foram adicionados a estes tubos 10 mL de amostra (VM; $0.05 - 5 \mu\text{g L}^{-1}$) preparadas na mistura tampão pH 3,4:acetonitrila (1:1, v/v) preparado com água deionizada (durante os testes iniciais) ou água superficial de lago (durante o desenvolvimento do método), adicionando-se em seguida 3 mL de n-octanol (filtro orgânico). Finalmente, acoplou-se a tampa ao frasco, de modo a posicionar a ponta da ponteira de micropipeta dentro do filtro orgânico e o eletrodo inferior dentro da fase doadora.

O potencial elétrico foi aplicado através de uma fonte de eletroforese conectada em um multímetro que operou como amperímetro e as medidas de corrente elétrica foram realizadas e enviadas para um microcomputador para monitoramento e registro.

4.6. Sistema automatizado de eletroextração multifásica

Para a segunda aplicação deste trabalho (análise simultânea de corantes em água superficial por espectrofotometria UV-Vis e imagem digital), um sistema de eletroextração multifásica automatizado (EEMPA) (**Figura 10C**) desenvolvido em laboratório foi utilizado na etapa de preparo de amostra (INPI aditivo de patente n° BR1320220135168). A **Figura 10A** e **Figura 10B** representam a fonte de eletroforese e o gabinete de comandos, respectivamente. Esse dispositivo foi construído conforme descrito por Boratto (2023). O EEMPA também é capaz de analisar grandes volumes de amostra (até 45 mL) além de realizar múltiplas análises simultâneas (até 12).

O dispositivo MPEEA contém um conjunto inferior que consiste em um porta amostras multipoços removível construído através de impressão 3D e que possibilita a análise simultânea de até 12 frascos de amostras. O sistema MPEEA contém ainda um conjunto superior que consiste em uma base superior removível contendo 12 suportes para o encaixe de ponteiros de micropipetas, além de 12 conjuntos de eletrodos superiores e inferiores, conforme mostra a **Figura 10C**.

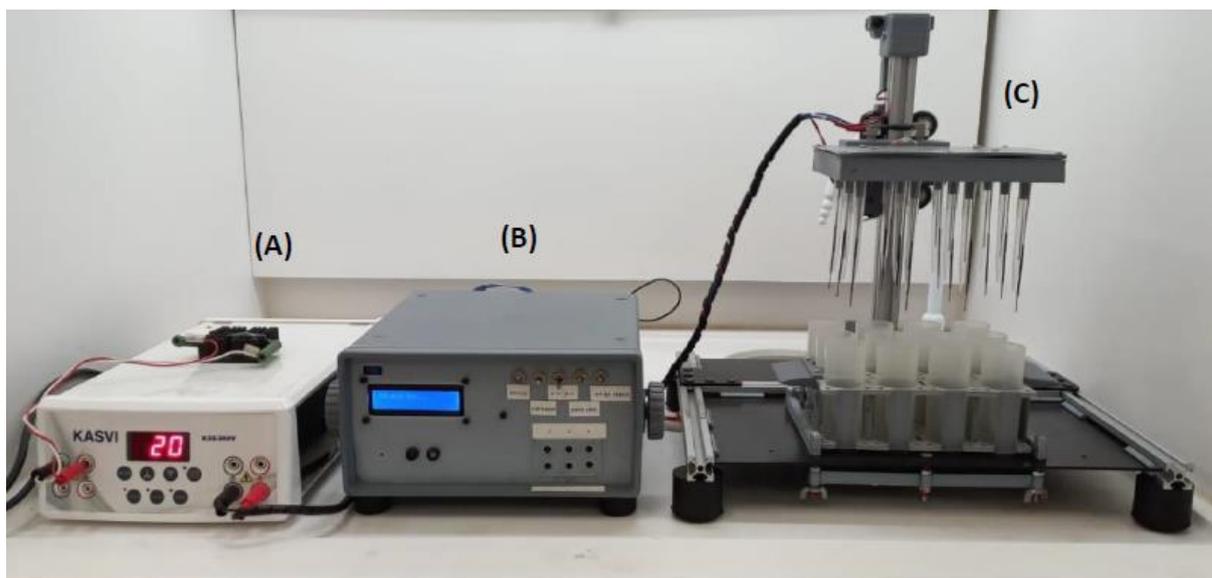


Figura 10: Dispositivo de Eletroextração Multifásica Automatizado. Fonte: Boratto (2023). (A) fonte de eletroforese; (B) gabinete do sistema; (C) sistema de eletroextração automatizado.

O conjunto inferior é encaixado sobre uma base inferior do sistema automatizado sendo os frascos posicionados acima de um sistema de ímãs que possibilita o uso de agitação magnética durante as extrações. O conjunto superior, por sua vez, é acoplado à uma mesa de movimentação automatizada (eixo Z) contendo um motor de passo, cujo movimento vertical é controlado por *software* escrito em linguagem C++ com auxílio do programa Arduino IDE. Neste trabalho, o código foi modificado para possibilitar a aplicação de uma eletroextração com movimento durante a aplicação do campo elétrico (eletroextração dinâmica).

O código do *software* foi escrito em laboratório como descrito no trabalho de Boratto (2023) e contém funções específicas para controlar cada operação unitária, configurar as condições de extração (*input*), bem como exibir em uma tela LED algumas de mensagens emitidas pelo sistema (*output*). Os comandos para executar

cada função do código podem ser acionados por botões e chaves presentes na parte externa do gabinete do sistema como mostrado na **Figura 10B**.

Para realizar as extrações, foi realizada a montagem conforme mostrado na **Figura 11**, na qual o frasco de amostra foi preenchido com a amostra (solução doadora) e com o solvente usado como filtro orgânico. A fase aceitadora, constituída por pontas de papel sorvente embebida em solução de eletrólitos, foi alocada na ponta de ponteiros de micropipetas vedando a extremidade inferior, de modo que a parte da ponta de papel que se encontra no interior da ponteira de micropipeta esteja em contato com um excesso da solução de eletrólito.

Uma vez que todas as ponteiros montadas como descrito acima são colocadas no conjunto superior, este é acoplado ao eixo Z do sistema. Por fim, a montagem do sistema multifásico é finalizada por meio do movimento automático do motor de passo que posiciona a ponta de papel sorvente de modo que a parte localizada externamente à ponteira esteja posicionada no filtro orgânico (**Figura 11**).

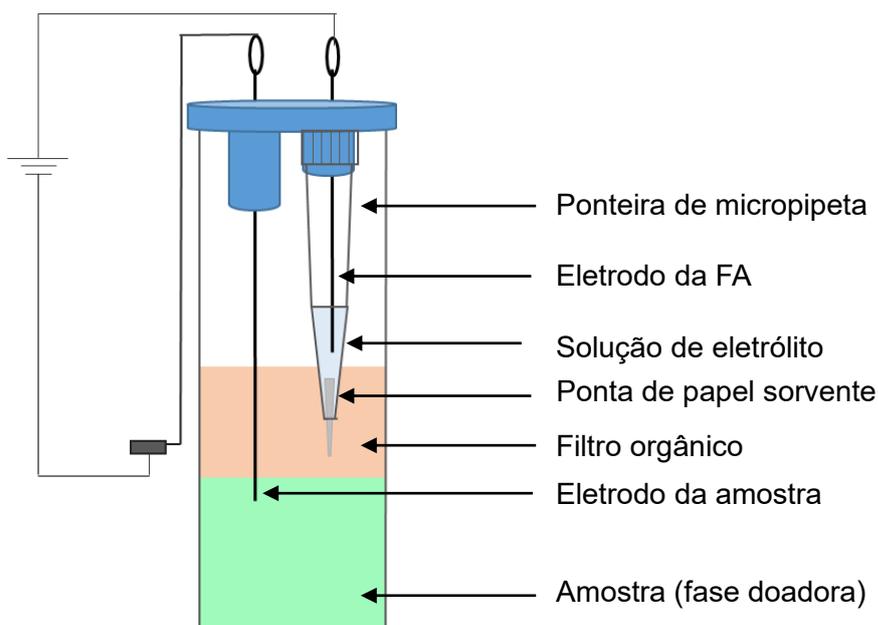


Figura 11: Esquema ilustrativo do sistema de eletroextração multifásica automatizado

Uma fonte de potencial externa foi conectada ao gabinete do dispositivo de MPEEA para aplicação do potencial durante às extrações (**Figura 10A**). A corrente elétrica foi monitorada e registrada por meio de multímetro conectado à microcomputador.

5. ELETROEXTRAÇÃO MULTIFÁSICA DE VERDE MALAQUITA EM ÁGUA SUPERFICIAL DE LAGO E SUA DETERMINAÇÃO USANDO IMAGENS DIGITAIS E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

5.1. Considerações gerais

Para fins de proteção da saúde humana e ambiental é fundamental a proposição de métodos analíticos sensíveis, seletivos e robustos para o monitoramento da contaminação dos recursos hídricos por micropoluentes. Porém esse processo continua sendo desafiador devido à complexidade das matrizes ambientais e aos rigorosos limites que devem ser atendidos.

O avanço tecnológico e o aprimoramento dos instrumentais analíticos modernos contribuíram para ampliar poderosamente a sensibilidade das técnicas analíticas. Apesar disso, esses sistemas são frequentemente caros para aquisição e manutenção além de necessitarem de analistas qualificados para operá-los. Além disso, para que a maioria dos métodos alcancem o desempenho desejado é necessária uma etapa de preparo de amostra eficiente. Esforços têm sido empreendidos nessa área visando superar as limitações das técnicas clássicas, que embora comprovadamente eficientes, apresentam etapas laboriosas, demoradas e com grande consumo de solventes.

Visando superar esses problemas e simplificar a instrumentação analítica, duas abordagens têm sido exploradas, sendo uma da fase de preparo de amostras e outra da fase de determinação analítica, tendo ambas como objetivos, a obtenção de métodos simples, rápidos, de baixo custo, com alta frequência analítica e que gerem resultados confiáveis. A primeira estratégia, envolve técnicas de extração assistidas por campos elétricos, conhecidas como eletroextração (EE). Nessas técnicas, o campo elétrico atua como força motriz auxiliar que promove a eletromigração dos analitos iônicos, ampliando a capacidade extrativa bem como a velocidade de extração. Além disso, substâncias aniônicas e catiônicas podem ser seletivamente extraídas modulando a polaridade dos eletrodos, do mesmo modo que esta seletividade também pode ser modulada por meio do solvente orgânico colocado entre as fases doadora (amostra) e aceptora.

A segunda estratégia, envolve uma determinação analítica baseada na análise de dados coletados a partir de imagem digitais (AID). Essas técnicas permitem a obtenção de resultados com elevada acurácia e robustez por meio do uso de equipamentos baratos e acessíveis como celulares, câmeras digitais e scanners. A combinação dessas duas estratégias possibilita obter métodos sensíveis, seletivos, robustos e custo-efetivos por meio do uso de dispositivos acessíveis e fácil utilização.

Como apresentado na **Tabela 4**, alguns trabalhos têm explorado a combinação dessas estratégias no desenvolvimento de métodos analíticos para diferentes aplicações, porém, é possível notar que é uma tendência ainda recente na literatura. O nosso grupo de pesquisa, por meio da eletroextração multifásica, têm explorado o potencial da técnica de análise de imagens digitais na análise de corantes em diferentes matrizes (biológicas, ambiental e alimentos), tendo sido obtidos bons resultados (Souza *et al.*, 2023; Orlando *et al.*, 2019; Orlando *et al.*, 2024).

Tabela 4: Diferentes aplicações envolvendo a combinação de eletroextração e análise de imagens digitais

Analito	Matriz	Ref.
Cobre (II)	Água de poço e de efluente	Khan <i>et al.</i> , 2020
Violeta Genciana	Músculo de peixe	Orlando <i>et al.</i> , 2019
Azul de metileno	Água de torneira	Orlando <i>et al.</i> , 2024
Ácido salicílico	Medicamento e plasma	Rezaei <i>et al.</i> , 2023
Cromo (VI), Níquel (II) e Cobre (II)	Água de torneira, de nascente e de rio	Rezaei <i>et al.</i> , 2024
Ciprofloxacino	Sangue	Seidi <i>et al.</i> , 2019
Doxorrubicina	Saliva	Souza <i>et al.</i> , 2023
Cromo (VI)	Água de torneira e efluente	Zarghampour <i>et al.</i> , 2020
Eritrosina e Cristal Violeta	Água de torneira e efluente	Zarghampour <i>et al.</i> , 2023
Cobre (II)	Água, solo e alimento (tomate e batata)	Zaroudi <i>et al.</i> , 2023

Como discutido anteriormente, corantes antimicrobianos como os trifenilmetanos (VM, VG) e fenotiazídico AM são ampla e ilegalmente usados na aquicultura, sendo o VM reconhecidamente o mais utilizado. Além dos efluentes da aquicultura, os efluentes de indústrias têxtil também são fontes de contaminação dos ecossistemas aquáticos, onde eles são persistentes e não são removidos de forma eficiente pelas estações de tratamento de efluentes ou de água potável.

Para análise de corantes, o desenvolvimento de métodos empregando imagens digitais é facilitado devido às suas propriedades coloridas, embora, como ilustrado na **Tabela 4**, analitos incolores incluindo alguns íons metálicos possam ser analisados dessa forma desde que sejam previamente tratados em alguma reação colorimétrica para formação de cor.

Alguns poucos trabalhos têm analisado VM por imagem digital (Apolonio *et al.*, 2020; Duan *et al.*, 2023; Qashqai *et al.*, 2023), porém nenhum deles exploram o potencial das ferramentas quimiométricas para a análise e interpretação analítica dos dados de imagem. Mesmo para outros corantes, poucos trabalhos fazem uso dessa combinação (Reile *et al.*, 2020). Para outras formas mais convencionais de detecção de sinal multivariado (Espectroscopias como Raman, Raman ampliado por superfície – SERS, Infravermelho Próximo – NIR, Ultravioleta-Visível e Fluorescência), corantes têm sido analisados por meios de técnicas quimiométricas de classificação para detecção de contaminação ou adulteração, sobretudo em alimentos (**Tabela 5**).

Tabela 5: Análise de corantes por técnicas quimiométricas de classificação

Corantes	Matriz	Detecção	Técnica Quimiométrica	Ref.
Sudam I e Vermelho Congo	Páprica	NIR	OPLS-DA	Castell <i>et al.</i> , 2024
Sudam I, II, III, IV	Pimentas	UV-Vis	PLS-DA; KNN; SIMCA	Di Anibal <i>et al.</i> , 2009
Sudam I	Pimentas	Fluorescência	PLS-DA	Di Anibal <i>et al.</i> , 2015
Sudam I	Pimenta em pó	Raman	PCA e PLS-DA	Haughei <i>et al.</i> , 2015
Sudam I, Rodamina B e Verde Malaquita	Peixe	SERS	D-PLS	He <i>et al.</i> , 2015
Corantes polifenóis	Óleo de germe-lim	RGB	DD-SIMCA	Liu <i>et al.</i> , 2022
Sudam I	Ketchup	RGB	LDA	Reile <i>et al.</i> 2020

* NIR: *Near Infrared*; OPLS-DA: Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis; KNN: K Nearest Neighbor; SIMCA: Soft Independent Modeling of Class Analogy; PCA: Principal Component Analysis; D-PLS: Discriminant Partial Least Square; DD-SIMCA: Data Driven Soft Independent Modeling of Class Analogy; LDA: Linear Discriminant Analysis.

Portanto, a combinação das técnicas de AID com ferramentas quimiométricas de classificação oferece uma estratégia de grande potencial para detecção de contaminantes em matrizes complexas. Desse modo, neste trabalho, buscou-se explorar essa alternativa, propondo um método de análise de VM em água superficial de lago por meio das técnicas inovadoras, eficientes e de baixo custo descritas acima, a saber: EEMP seguido de determinação por análise de imagem digital (AID) e técnica quimiométrica de classificação (PLS-DA).

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Eletroextração das amostras

As soluções de trabalho de VM em concentrações de $0,5 - 5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ foram preparadas no momento do uso a partir da diluição em tampão matrizado das soluções estoque padrão descritas anteriormente. Um potencial elétrico (200 V por 25 minutos) foi aplicado entre as fases doadora (amostra) e a fase aceptora (suporte sólido que suporta uma solução de eletrólito – ácido acético $0,5 \text{ mol L}^{-1}$), sendo essas fases separadas por um filtro orgânico (n-octanol, 3 mL). Mais detalhes do procedimento de eletroextração para primeira aplicação foram dados na seção 4.1.3. (*Sistema de eletroextração multifásica de grandes volumes*).

5.2.2. Análise de imagens digitais

Após a eletroextração, as ponteiros contendo o analito VM extraído foram direcionadas para a análise de imagens digitais, que consiste basicamente em três etapas, sendo elas, (1) a aquisição de imagens digitais das pontas das ponteiros; (2) a decomposição das imagens em histogramas de cor e, por fim, (3) análise dos dados quimiométricos.

Para aquisição das imagens, as ponteiros contendo o suporte sólido da fase aceptora foram fixadas temporariamente em lâminas de vidro com o auxílio de pistola de cola quente de silicone a fim de preservar o corante VM extraído por longos períodos durante a manipulação, prevenindo, assim, a perda do pó de silicato de magnésio contendo o corante (**Figura 12A**). Após ser destacado da lâmina de vidro, as ponteiros foram posicionadas verticalmente sobre um scanner de mesa Canon Scan Lide 110, cobertos com um aparato para bloqueio da luz externa (**Figura 12B**) e as imagens foram então capturadas e salvas no formato TIF com resolução 600 dpi (**Figura 12C**).

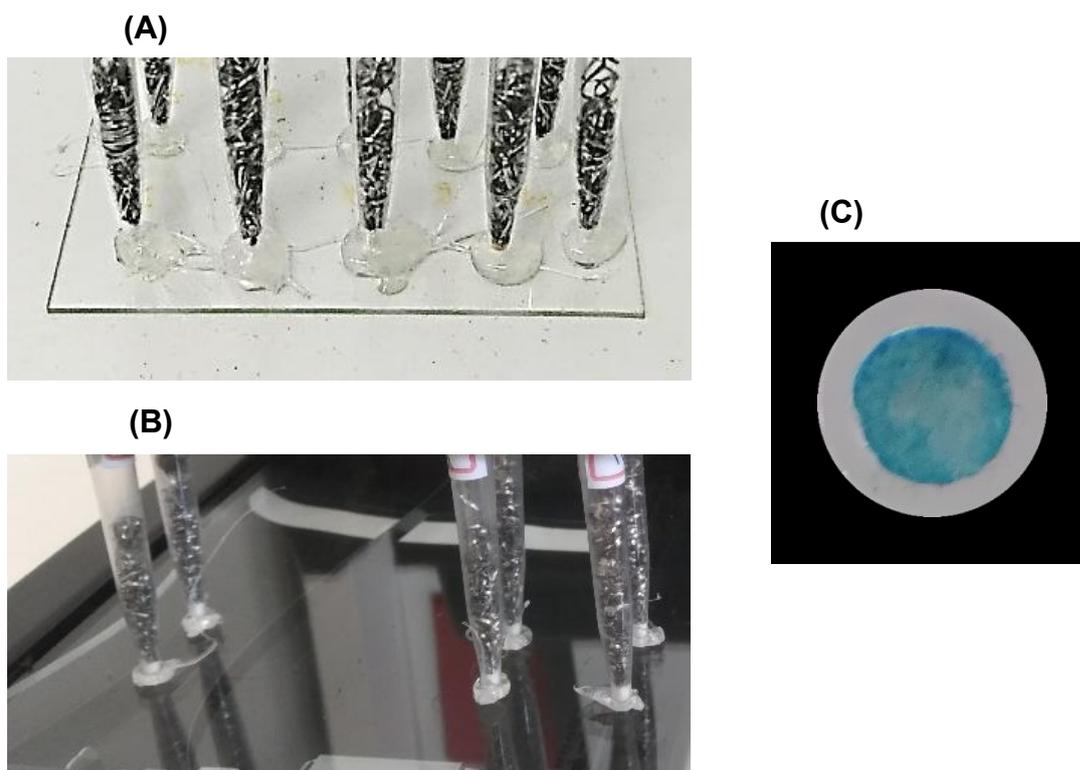


Figura 12: Fixação de ponteira de micropipeta com cola quente de silicone e aquisição de imagem em scanner de mesa; (A) Ponteiros fixos em lâmina de vidro; (B) Aquisição de imagem em scanner de mesa; (C) Imagem adquirida.

A decomposição das imagens foi realizada utilizando o software de domínio público ImageJ v. 1.53k para Windows (64-bits) Java 1.8.0_172, desenvolvido pelo National Institutes of Health, USA. As imagens foram processadas nesse software selecionando a região de interesse (ROI – *region of interest*) com área circular com diâmetro de 30 pixels na imagem obtida em scanner para gerar os histogramas para cada componente de cor do sistema de cor RGB.

5.2.3. Análise quimiométrica e classificação supervisionada por PLS-DA

Na etapa de análises quimiométricas dos dados, para construção do modelo, oito níveis de concentração na faixa $0,05 - 0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, além das amostras branco, foram incluídos e analisados em 20 replicatas: branco, 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 e $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Os modelos foram construídos empregando o software MATLAB®, versão 7.13 (MathWorks, Natick, USA), acoplado com o pacote PLS Toolbox, versão 8.92 (Eigenvector Technologies, Manson, USA).

Para construção dos modelos *PLS-DA*, as amostras foram divididas em dois grupos, sendo eles, o conjunto de treinamento e o conjunto de teste contendo cada um $2/3$ e $1/3$ das amostras, respectivamente. Para garantir uma distribuição representativa e uniforme das amostras em cada grupo, foi utilizado o algoritmo Kennard-Stone. O bloco **X**, das variáveis independentes, continha os histogramas de cada amostra, enquanto o bloco **Y** consistia em uma matriz de “0” e “1” de acordo com o pertencimento ou não da amostra à uma classe específica. O método da curva *ROC* foi utilizado para obtenção dos valores de *threshold*. Após a decomposição dos blocos **X** e **Y**, o número de *VL* foi escolhido com base no menor valor de *CVCE* calculado a partir de validação cruzada usando subconjuntos aleatórios. Amostras anômalas (*outliers*) foram removidos pelo método da alavanca e do resíduo Q, sendo a cada remoção, as amostras remanescentes foram novamente avaliadas e novas amostras anômalas removidas respeitando o limite máximo de $2/9$ de amostras removidas.

Os modelos construídos foram avaliados e o seu desempenho monitorados por meio de Figuras de Mérito (FOM – *Figures of Merit*) apropriadas, sendo elas, sensibilidade (*SENS*), especificidade (*SPEC*) e o coeficiente de correlação de Mathew (*MCC*).

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Otimização do suporte sólido da fase aceptora

Algumas condições experimentais da eletroextração de VM e outros corantes catiônicos em soluções aquosas foram otimizados em trabalhos prévios do grupo de pesquisa (Viana, 2019; Orlando et al, 2019) e foram estabelecidos como ponto de partida para o presente trabalho. Entre as condições do *setup* inicial estão n-octanol como filtro orgânico, ácido acético 0,5 mol·L⁻¹ como solução aceptora, tampão McIlvaine:acetonitrila (1:1, v:v) como solvente da fase doadora, voltagem de 200 V e tempo de 25 minutos.

Na avaliação comparativa de papel cromatográfico e Florisil como possíveis materiais para o suporte sólido da fase aceptora, como apresentado na **Figura 13**, observou-se que no papel cromatográfico, o corante VM se espalha por todo o material, de modo que, ao atingir a fase aceptora, o analito continua o processo de migração eletroforética em direção ao eletrodo. Ao empregar Florisil, por outro lado, observa-se uma intensa concentração do corante no início do material.

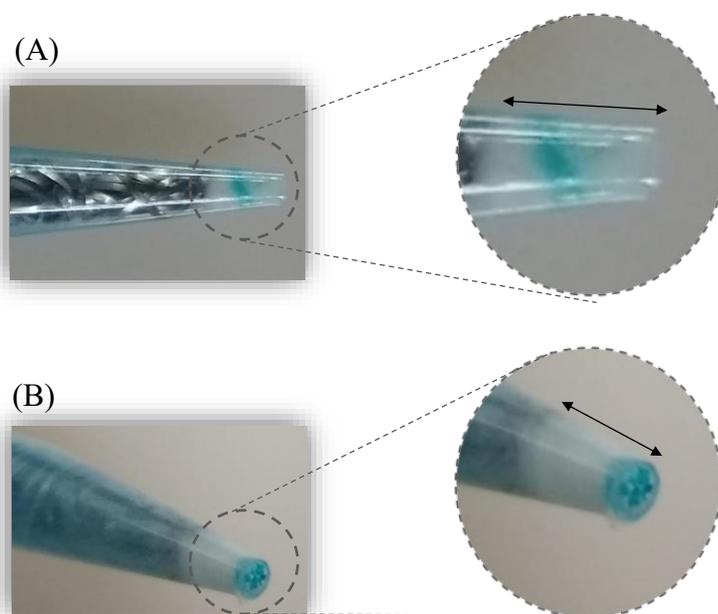


Figura 13: Perfil visual da extração de VM a partir solução aquosa usando diferentes suportes sólidos para a fase aceptora; (A) papel cromatográfico; (B) florisil. Fase doadora: 15 mL VM 20 µg·L⁻¹ em tampão pH 3,4; filtro orgânico: 3 mL n-octanol; fase aceptora: ácido acético 0,5 mol·L⁻¹; potencial: 200 V; tempo: 25 min.

Para compreender estes diferentes perfis de migração do corante em papel cromatográfico e Florisil é necessário analisar a composição química destes materiais. O papel cromatográfico é um material poroso constituído essencialmente por fibras de celulose (polímero de moléculas de glicose), é altamente hidrofílico e possui grande superfície sortiva e, por isso, é capaz de atuar como suporte da solução aquosa da fase acceptora e de conduzir corrente elétrica durante a extração. O florisil, por sua vez, é um sólido particulado constituído de silicato de magnésio, sendo também altamente hidrofílico e com alta superfície de contato na sua forma pulverizada. Embora ambos os materiais sejam altamente hidrofílicos e apresentem grande área superficial, os grupos silanois negativamente carregados presentes no Florisil promovem uma forte interação eletrostática com o corante VM catiônico, enquanto no papel cromatográfico, as interações do corante com os sítios hidrofílicos da celulose são relativamente mais fracas. Desse modo, para a fase acceptora constituída por Florisil, quando o corante VM atinge essa fase, ocorre forte adsorção por interação eletrostática entre o analito e esse material e, por isso, não há continuidade do processo de eletromigração em direção ao eletrodo, ao contrário do que ocorre para o papel cromatográfico.

Como mostrado na **Figura 14**, apesar das diferenças físico-químicas, os dois materiais apresentaram perfil de corrente elétrica estáveis e com mesma magnitude (em torno de 0,2 mA), ou seja, os materiais tiveram desempenho similares quanto à estabilidade da corrente e capacidade de extração.

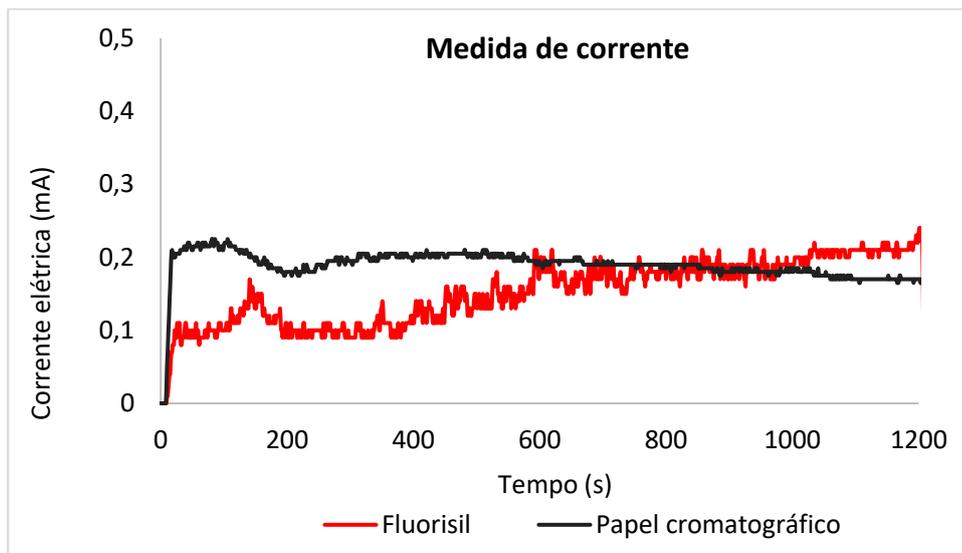


Figura 14: Perfil de corrente elétrica para cada suporte de fase aceptora; Florisil (cinza) e papel cromatográfico (amarelo). Fase doadora: VM 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em tampão pH 3,4; filtro orgânico: 3 mL n-octanol; solução aceptora: solução ácido acético 0,5 $\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$; potencial elétrico: 200 V; tempo: 25 min; média de duplicata.

Considerando o objetivo do presente trabalho de analisar o corante VM por técnica de análise de imagem digital, é desejado que o analito colorido se concentre em uma área do material sorvente para a qual a imagem digital será capturada. Nesse sentido, o Florisil se mostrou mais adequado para a técnica de análise proposta e, por isso, foi o material escolhido como suporte sólido da fase aceptora para extração de VM nas etapas seguintes.

Foi realizada a comparação entre Florisil antes e após redução do tamanho de partícula por trituração. Foi observado que a redução do tamanho das partículas de Florisil melhora a compactação do material na ponteira quando comparado à forma não triturada. Para o perfil de corrente elétrica (**Figura 15**) de ambas as formas do material, observa-se que não houve diferença significativa na magnitude da corrente elétrica para os diferentes tamanho de partícula avaliados, evidenciando que mesmo com a maior área de superfície do sistema com partículas mais finas, a quantidade de solução eletrolítica (aceptora) recobrindo a superfície das partículas permanece constante e, conseqüentemente, resulta em níveis comparáveis de passagem de corrente elétrica. É importante ressaltar que o perfil de corrente desejado para um sistema de eletroextração deve apresentar estabilidade ao longo do tempo de extração além disso deve ser suficientemente alta para maximizar a extração do

analito e, ao mesmo tempo, suficientemente baixa para evitar ocorrência de instabilidades comuns em condições de corrente elétrica elevadas, tais como eletrólise na superfície do eletrodo, aquecimento por efeito Joule, formação de bolhas de gás e alteração do valor de pH (Yamini *et al.*, 2014).

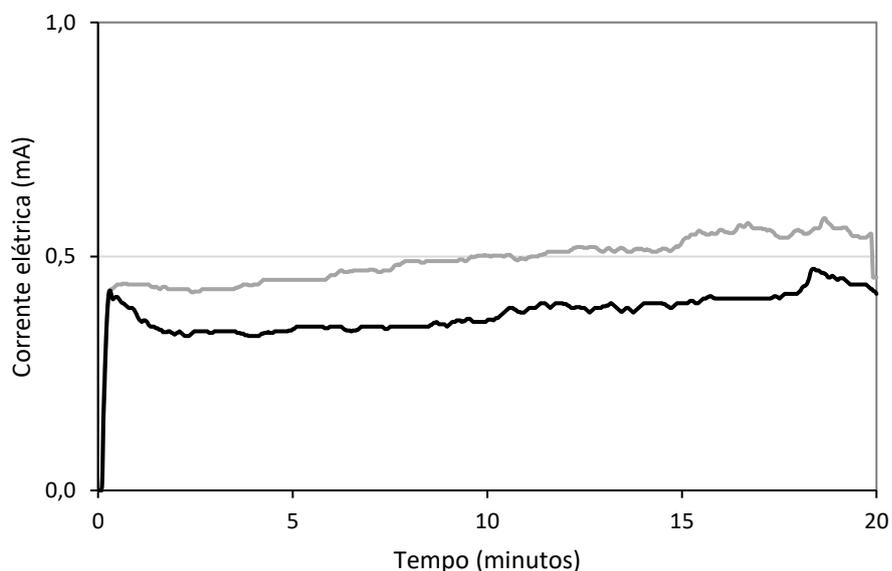


Figura 15: Perfil de corrente da eletroextração ($n = 2$) utilizando o florisil forma comum $> 250 \mu\text{m}$ (cinza) e forma triturada $106 - 90 \mu\text{m}$ (preto). Fase doadora: $\text{VM } 2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em tampão pH 3,4; filtro orgânico: 3 mL n-octanol; solução aceptora: solução ácido acético $0,5 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$; potencial elétrico: 200 V; tempo: 25 min; média de duplicata.

5.3.2. Análise de imagem digital e modelo quimiométrico

A intensidade da cor de uma imagem do material que contém analitos coloridos pode ser associada à sua concentração em um espaço de cor como o RGB. Neste sistema de cores aditivas, cada componente de cor (R, G e B) pode assumir valores na faixa de 0 a 255, e o branco é formado nas coordenadas (255, 255, 255) de um espaço tridimensional cartesiano ortogonal.

Na **Figura 16**, é apresentado o resultado da obtenção das imagens RGB através da decomposição (*split*) da imagem original (**Figura 16a**) em três imagens contendo as informações dos canais R (**Figura 16b**), G (**Figura 16c**) e B (**Figura 16d**) individualmente. É possível observar que o canal R apresenta alto contraste, enquanto observa-se transparência à luz para os canais G e B.

A formação da cor está diretamente relacionada com o fenômeno da reflexão/absorção da luz branca composta pela radiação eletromagnética com comprimento de onda na região do visível (400 – 700 nm), sendo a cor observada oriunda da combinação da radiação de todos os comprimentos de onda não absorvidos, isto é, refletidos. Desse modo, o alto contraste observado na imagem do componente de cor R indica que a maior parte da luz dessa região do espectro é refletida, ao passo que para os componentes G e B, a luz nessa região é absorvida pelo material. Conclui-se assim, que o componente R apresenta maior sensibilidade pois nele é obtida a maior resposta analítica (luz refletida). Por isso, o componente R foi escolhido para a sequência das análises.

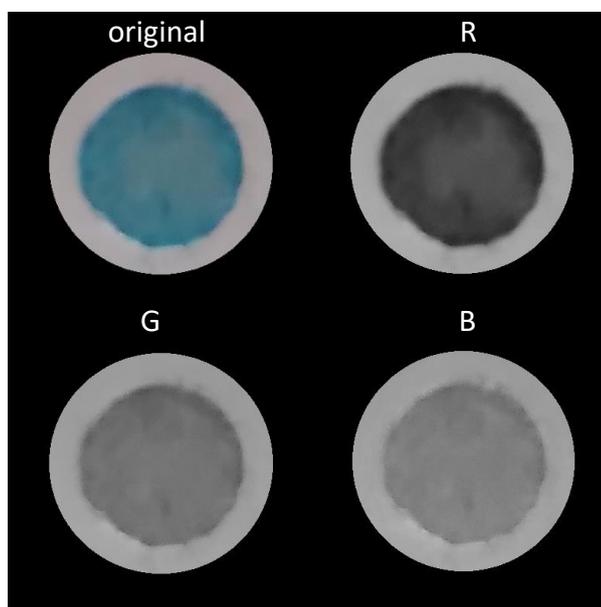


Figura 16: Imagens RGB para o corante VM (após extração) obtidas a partir do split em canais individuais; (a) imagem original; (b) canal R; (c) canal G; (d) canal B.

5.3.3. Construção do modelo PLS-DA

Conforme mencionado acima, a partir de uma imagem capturada, a intensidade da cor de uma região de interesse (ROI) pode ser relacionada à concentração do analito e assim informações quantitativas podem ser obtidas a partir dos dados da imagem. A **Figura 17** mostra o resultado da recuperação após eletroextração de VM a partir de amostras de água fortificadas a $0,5 - 2 \mu\text{g L}^{-1}$.



Figura 17: Intensidade de cor observada depois da extração de diferentes concentrações de VM; (A) $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$; (B) $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$; (C) $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

A reprodutibilidade do processo de extração é outro parâmetro crítico em uma análise química, e pode ser avaliada utilizando os histogramas obtidos a partir das imagens das diferentes replicatas de análise. Na **Figura 18**, observa-se a reprodutibilidade de uma extração por meio dos histogramas individuais de diferentes replicatas de uma extração no nível $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Observa-se grande similaridade entre os histogramas obtidos para diferentes replicatas, o que evidencia a reprodutibilidade do processo de extração.

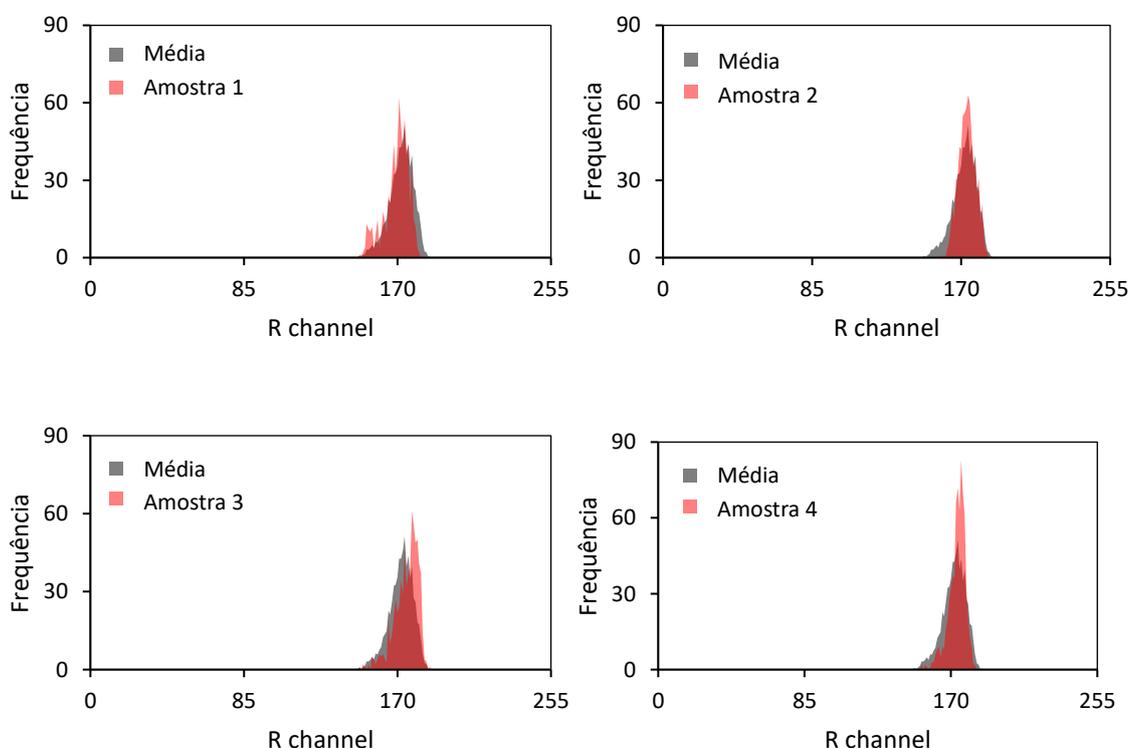


Figura 18: Histogramas do canal R extraídas de ROI de imagens ($n = 4$) após eletroextração de amostras de água superficial fortificadas em $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de VM.

A partir da **Figura 17**, pode-se concluir que para altas concentrações ($> 1 \mu\text{g L}^{-1}$), a diferença na intensidade de cor é visualmente identificada com facilidade, sendo essa evidência ainda mais acentuada quando observamos os histogramas de distribuição de frequência normalizada. Como mostrado na **Figura 19**, o padrão de distribuição é bem diferente em concentrações acima de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, mas muito próximas abaixo dessa concentração, sendo os níveis branco e $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ estão quase totalmente sobrepostas.

Por outro lado, para amostras com concentrações mais baixas do analito ($< 1 \mu\text{g L}^{-1}$), a associação da intensidade da cor com a concentração é difícil e uma análise qualitativa ou semiquantitativa torna-se mais apropriada especialmente quando são utilizadas abordagens assistidas por ferramentas quimiométricas.

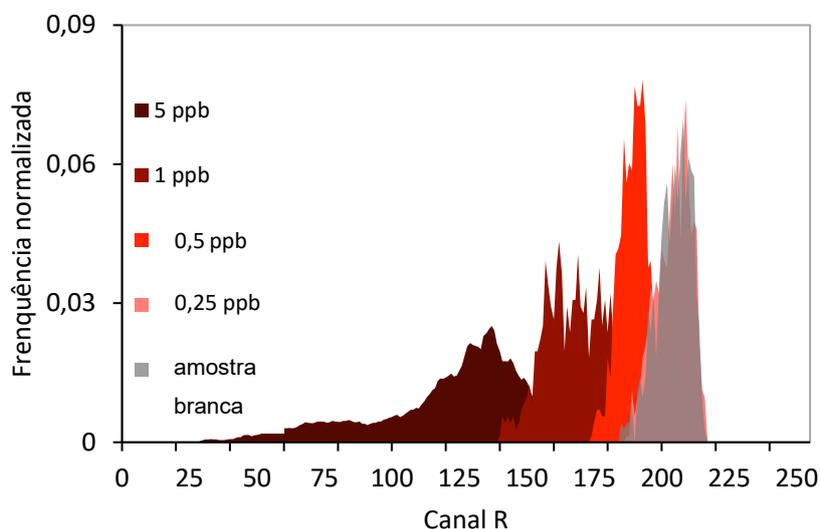


Figura 19: Histogramas obtidos a partir das imagens capturadas após extração de VM a partir de água superficial em diferentes concentrações.

Considerando o número de níveis analisados (branco; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 e $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$), observou-se um problema de balanceamento do modelo. O balanceamento dos dados refere-se à distribuição das amostras em diferentes classes ou categorias dentro do conjunto de dados. Sabendo que quando o conjunto de dados não está balanceado, isto é, uma das classes apresentam maior número de amostras que as outras, o modelo tende a apresentar erros na direção da classe majoritária, prejudicando, assim, a performance das classes minoritárias. Conjuntos de dados

balanceados são de suma importância para obtenção de modelos quimiométricos confiáveis e robustos.

Nesse contexto, técnicas como amostragem sintética adaptativa (ADASYN) permite balancear o conjunto de dados por meio da criação de amostras sintéticas, de modo que pontos adicionais são adicionados à classe minoritária baseado no nível de desbalanceamento. O algoritmo ADASYN atua na fronteira entre as classes majoritária e minoritária, gerando novas amostras pela atribuição de diferentes pesos às amostras da classe minoritária. Desse modo, o uso da técnica ADASYN possibilita melhorar a capacidade do modelo fazer previsões precisas, ampliando, conseqüentemente, a confiabilidade dos resultados analíticos (He *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2023).

A partir das amostras analisadas, obtidas conforme descrito na sessão “5.2.1”, dois grupos foram formados, sendo um grupo contendo amostras com os níveis menores que $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ (**Grupo 1**: níveis brancos; 0,05; 0,1 e $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$) e o outro grupo contendo amostras nos níveis maior ou igual a $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ (**Grupo 2**: níveis 0,2; 0,3 e $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$). As amostras do **Grupo 1** foram consideradas amostras “não contaminadas” e para elas foram atribuídas o número “1” no modelo quimiométrico, as amostras do **Grupo 2**, por sua vez, foram consideradas como “contaminadas” e receberam a atribuição “0” na construção do modelo. Uma vez que, foram realizadas cerca de 20 replicatas para cada nível de concentração, obteve-se 80 amostras no Grupo 1 e 60 amostras no Grupo 2. Fazendo o balanceamento dos grupos, 20 amostras sintéticas foram adicionadas ao grupo minoritário, resultando em dois grupos devidamente balanceados (80 amostras cada).

Para construção do modelo *PLS-DA*, as 160 amostras foram divididas em dois subconjuntos de dados, sendo eles, o conjunto treinamento e o conjunto teste numa proporção de aproximadamente dois terços/um terço. Utilizando o algoritmo Kennard-Stone para distribuir as amostras no subconjunto treinamento a partir das duas classes de amostras (contaminadas e não contaminadas) e obteve-se 108 amostras no conjunto treinamento, sendo as 52 amostras restantes foram alocadas no subconjunto teste.

A seleção do número ótimo de variáveis latentes (VL) foi realizada utilizando a abordagem da validação cruzada com subconjunto aleatório sendo usados 5 *splits* e 20 iterações. O melhor modelo *PLS-DA* foi escolhido usando a validação cruzada com

a menor classificação de erro (CVCE). Após detecção de *outliers*, o modelo *PLS-DA* com 3 VL foi escolhido, cobrindo 69,2 % da variância espectral (bloco X) e 80,8% da variância no bloco Y. A remoção de *outliers* foi realizada pelo método da alavanca e Q espectral em 95% de confiança. É permitido a remoção de 2/9 (22,2%) de *outliers* em cada subconjunto. Uma amostra foi removida do conjunto treinamento (0,93 % do conjunto de dados) e 4 amostras foram removidas do conjunto teste (5,76 % dos dados).

Os resultados do modelo *PLS-DA* estão apresentados na **Tabela 6** e **Tabela 7**, bem como no gráfico de valores preditos para cada y individual é mostrado na **Figura 20**. O *threshold* obtido pelo método da curva ROC foi de 0,42, ou seja, cada amostra com valor y maior que 0,42 foi classificada como “não contaminada” e cada amostra com valor y menor que 0,42 foi considerada “contaminada”.

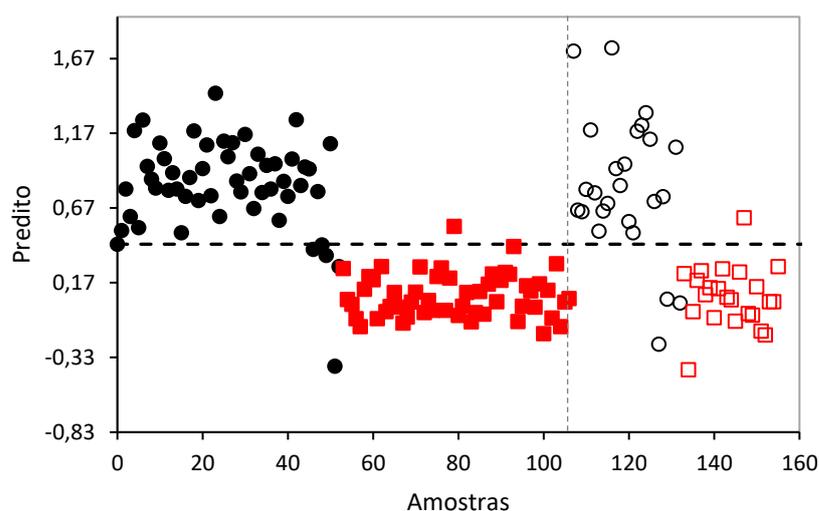


Figura 20: Valor predito de Y para o modelo *PLS-DA* distinguindo amostras de água contaminadas (i.e., fortificadas com $VM \geq 0,20 \mu\text{g L}^{-1}$) e não contaminadas (i.e., amostras brancas ou fortificadas com $VM < 0,20 \mu\text{g L}^{-1}$) com o valor limite indicado pela linha tracejada. Círculos cheios = amostras não contaminadas no conjunto treinamento; círculos vazios = amostras não contaminadas no conjunto teste; quadrados cheios = amostras contaminadas no conjunto treinamento; quadrados vazios = amostras contaminadas no conjunto teste.

Como mostrado na **Tabela 6**, no conjunto treinamento, apenas uma amostra contaminada foi classificada incorretamente como não contaminada, enquanto quatro amostras não contaminadas foram incorretamente classificadas como contaminadas.

O conjunto teste, por sua vez, apresentou resultados similares, sendo uma amostra contaminada e três não contaminadas foram classificadas erroneamente. É importante ressaltar que as amostras próximas do *threshold*, bem como àquelas classificadas incorretamente pertenciam aos níveis de concentração próximos de $0,15 - 0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, próximo ao nível estabelecido como limite entre as classes contaminada ($VM \geq 0,20 \mu\text{g L}^{-1}$) e não contaminada ($VM < 0,20 \mu\text{g L}^{-1}$). O modelo proposto apresentou excelentes parâmetros de desempenho qualitativo conforme evidenciado pelas figuras de mérito (*FOM*) mostradas na **Tabela 7**.

Tabela 6: Matriz de contingência para ambos os conjuntos treinamento e teste do modelo *PLS-DA* proposto

	Conjunto Treinamento		Conjunto Teste	
	C ^a	NC ^b	C	NC
Predito como C	53	4	22	3
Predito como NC	1	49	1	22

^a amostra contaminada. ^b amostra não contaminada.

Tabela 7: Figuras de mérito qualitativo (*FOM*) para ambos os conjuntos treinamento e teste para do modelo *PLS-DA* proposto

FOM	Conjunto Treinamento	Conjunto Teste
SEN^a	0,98	0,96
SPE^b	0,92	0,88
MCC^c	0,90	0,85

^a sensibilidade. ^b especificidade. ^c coeficiente de correlação de Mathews.

Os parâmetros de *SENS* e *SPEC* representam uma avaliação da capacidade do método de identificar amostras verdadeiro positivo e verdadeiro negativo, respectivamente. Os resultados indicaram que para ambos os conjuntos (treinamento e teste), a sensibilidade foi acima de 95%, indicando alta capacidade do modelo de identificar amostras contaminadas. Do mesmo modo, a especificidade do modelo foi próxima de 90% para os dois conjuntos. Esses resultados evidenciam o modelo proposto apresenta grande potencial para ser usado como método de *screening*,

considerando sua alta capacidade de identificar tanto amostras contaminadas quanto não contaminadas.

Outro parâmetro de desempenho relevante mostrado na **Tabela 7** é o coeficiente de correlação de Mathew (MCC – *Mathew's Correlation Coefficient*). Esse parâmetro fornece uma visão geral da eficiência de classificação do modelo pois inclui simultaneamente as taxas de verdadeiro positivos e verdadeiros negativos. Os valores de MCC variam na faixa entre -1 e 1 , onde 1 corresponde a uma classificação perfeita. Para o modelo proposto, foram obtidos valores de MCC de 90% e 85% para os conjuntos treinamento e teste, respectivamente, indicando uma alta correlação entre as classificações e as classes reais.

Adicionalmente aos modelos quimiométricos construídos, outras ferramentas muito relevantes para análise e interpretação dos resultados são os vetores informativos, uma vez que estes permitem correlacionar os dados químicos fornecidos pelo instrumental analítico com o próprio modelo quimiométrico obtido. Desse modo, torna-se possível avaliar a importância de cada variável na discriminação das classes.

Diferentemente das técnicas analíticas clássicas, como técnicas espectroscópicas ou espectrometria de massas, onde os vetores informativos são prontamente relacionados com a composição das amostras, nas técnicas AID, a única relação possível entre estes vetores e as classes é a intensidade de cor.

Os principais vetores informativos utilizados são o *VIP scores* (*Variable Importance in Projection*) (**Figura 21A**) e os coeficientes de regressão **Figura 21B**. Apesar de ambos os vetores informativos permitirem avaliar a importância relativa das variáveis e a significância de cada uma delas na capacidade de predição do modelo, eles atuam de forma ligeiramente diferente.

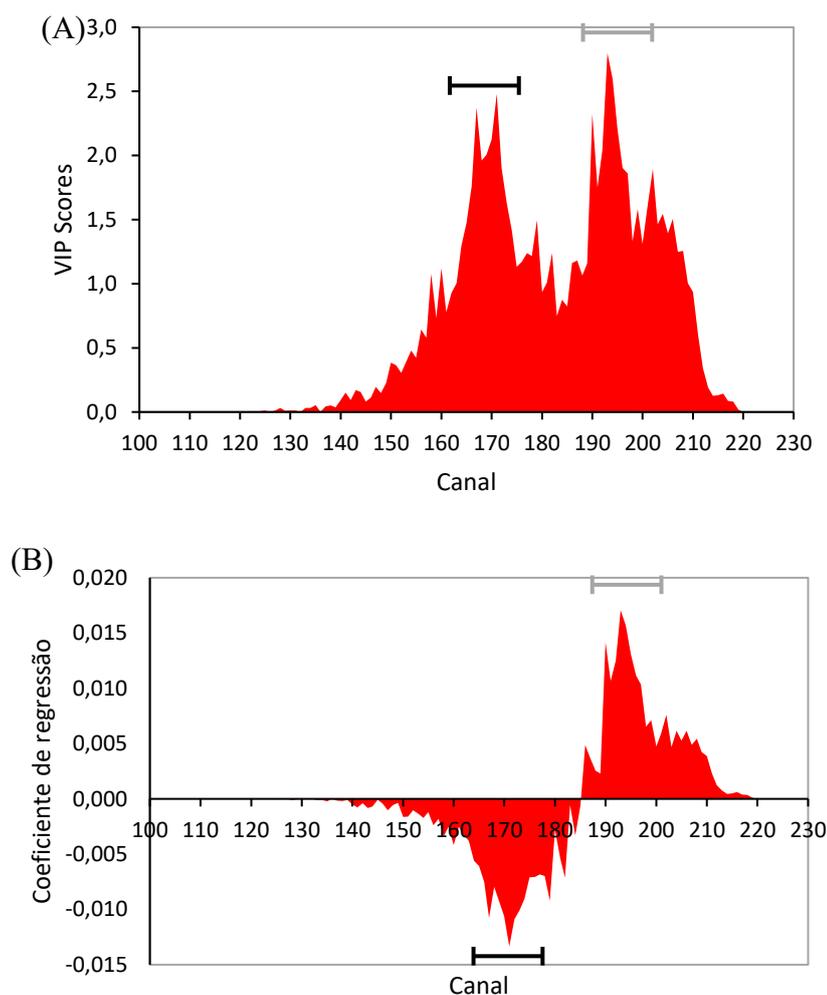


Figura 21: Gráficos com interpretação informativa de vetores do modelo PLS-DA distinguindo amostras de água de lago contaminadas e não contaminadas por VM; (A) vetor de regressão e (B) VIP scores. As regiões destacadas indicam os canais que contribuíram mais significativamente para a classificação de amostras contaminadas (linha preta) e amostras não contaminadas (linha cinza).

Especificamente, o VIP score quantifica a contribuição geral de cada variável ao longo de todos os componentes do modelo, levando em consideração tanto a importância individual quanto sua covariância com as outras variáveis. Desse modo, variáveis com altos valores de VIP scores contribuem significativamente para o potencial preditivo do modelo. Na **Figura 21A**, é possível observar duas regiões com alta contribuição para o modelo *PLS-DA* obtido, sendo eles, a faixa de canais 160-170, responsável pela previsão de amostras contaminadas e a faixa 190-200, que contribuíram para classificação das amostras não contaminadas.

Os coeficientes de regressão, por sua vez, atuam como indicadores quantitativos da contribuição das diferentes variáveis na classificação das amostras. Este coeficiente mensura simultaneamente a magnitude e a direção das contribuições das variáveis sobre o resultado observado. De modo que, valores positivos indicam que o aumento da variável resulta no aumento do resultado previsto, enquanto valores negativos implicam na relação contrária. Na **Figura 21B**, coeficientes negativos foram obtidos para os canais menores (entre 135 e 185, com pico em 171), indicando que estes são principalmente relacionados à classe “0”, ou seja, as amostras “contaminadas”, estando conforme com o que era esperado pois esse grupo de amostras apresentam cores mais intensas devido às maiores concentrações de VM. Por outro lado, os canais acima de 185 (com pico em 193) apresentam coeficientes de regressão positivos e estão relacionados primariamente à classe “1” de amostras “não contaminadas”, isto é, àquelas que contém menores concentrações de VM.

Em comparação com outros métodos apresentados na literatura, conforme apresentado na **Tabela 2**, apenas poucos estudos alcançaram níveis de discriminação comparáveis com o obtido no presente método, embora utilizem técnicas mais sofisticadas de análise, tais como HPLC-UV-Vis, UHPLS-MS/MS, UV-Vis e espectroscopia Raman, evidenciando assim, o potencial do modelo desenvolvido para análise de *screening* do corante VM em amostras ambientais.

5.4. Conclusões parciais

Na presente aplicação, um novo material de suporte para a fase aceptora foi implementado na EEMP sendo composto de silicato de magnésio, de modo que este material desempenhou um papel fundamental na associação da eletroextração com técnicas de análise de imagens digitais. O silicato de magnésio apresenta carga residual negativa sendo assim uma alternativa de material custo-efetivo para análise de analitos catiônicos, além de ser de fácil manipulação.

A presença de cargas negativas ocasionou uma forte interação eletrostática com VM e por isso possibilitou a concentração do corante na sua superfície de modo a facilitar a aquisição de imagens de alto contraste e com excelente reprodutibilidade entre replicatas. Além disso, um perfil de corrente elétrica estável durante a aplicação

do campo indicou que o silicato de magnésio é adequado como suporte de fase acceptora em EEMP.

A aplicação do modelo de classificação *PLS-DA* associado com a análise de imagem digital possibilitou discriminar amostras contaminadas e não contaminadas ao nível de confiança de 95% mesmo em níveis extremamente baixos ($0,2 \mu\text{g L}^{-1}$) em uma matriz complexa como água superficial, além de apresentar um curto tempo de análise (cerca de 45 min montagem, extração e análise), múltiplas análises simultâneas (até 10 extrações) e com fácil execução. Desse modo, o método proposto empregando eletroextração multifásico associado com *AID-PLS-DA* representa uma alternativa promissora para análise de *screening* custo-efetivo no monitoramento de corantes em água superficial.

6. ANÁLISE SIMULTÂNEA DE MÚLTIPLOS CORANTES EM ÁGUA SUPERFICIAL USANDO IMAGENS DIGITAIS E DADOS UV-VIS ASSOCIADOS A FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

6.1. Considerações gerais

Há uma preocupação global com a contaminação ambiental por corantes, como discutido anteriormente, de modo que a quantidade de publicações científicas incluindo novos métodos de análise têm crescido anualmente conforme pesquisa no Web of Science (2024) pelos termos associados a este tema. Indubitavelmente, os métodos de análise individual de corantes são muito relevantes considerando cada contexto de aplicação e sobretudo pela inovação seja nos procedimentos de preparo de amostra ou nas técnicas de determinação analítica. É importante destacar que embora o VM seja o principal alvo devido ao seu uso mais disseminado na aquicultura, ele não é o único, sendo necessário que os outros corantes também sejam analisados. Neste cenário, em situações reais é mais comum a presença de mais de um corante presentes como contaminantes ambientais e por isso, métodos de análise simultânea de corantes são extremamente relevantes para o monitoramento ambiental mais efetivo destes contaminantes.

Por outro lado, uma vez que todos estes corantes apresentam absorção na região do visível, é inevitável que haja sobreposição dos seus espectros de absorção em algumas faixas espectrais, sendo muito variável o percentual dessa sobreposição. Desse modo, a análise simultânea de corantes requer uma separação prévia dos analitos por técnicas de separação como a cromatografia, por exemplo. Atualmente, porém, há uma tendência pela busca de métodos que permitam uma discriminação “matemática” por meio de ferramentas quimiométricas, especialmente os métodos de calibração multivariada, que possibilitam ajustar modelos de regressão para cada analito mesmo que haja acentuada sobreposição dos dados espectrais. O uso dessas ferramentas e estratégias são muito relevantes pois contribuem para proposição de métodos mais acessíveis e que reduzam gastos com solventes orgânicos. Na **Tabela 8**, são resumidos alguns métodos de análise simultânea de corantes por meio de técnicas de calibração multivariada, bem como seus desempenhos.

Tabela 8: Métodos de calibração multivariada para análise simultânea de corantes

Analitos	Matriz	Quimiometria	Determinação	preparo de amostra	LD (μL^{-1})	Ref.
VM e VB	água	PLS	UV-Vis	Separação magnética (nanocompósito polimérico magnético)	-	Bagtash & Zolgharnein, 2017
VM e VG	água	PLS	UV-Vis	d-SPE (óxido de grafeno)	LD: 9 – 15 LQ 30 - 50	Razi-Asrami <i>et al.</i> , 2017
VM, VG e AM	água	PLS e ANN	UV-Vis	-	LD: 750 LQ: 2230;	Karim <i>et al.</i> , 2016
VM e VG	água	PLS	UV-Vis	LLE, pré-concentração por evaporação /ressuspensão	LD: 9 - 17	Yu <i>et al.</i> , 2015
AM e VM	água	MLR, PCR e PLS	UV-Vis	Adsorção	LD (VM): 901,43 LD (AM): 1001,06	Issa <i>et al.</i> , 2013
VM e VG	água	PLS	UV-Vis	Extração em ponto de nuvem	LD (VM): 2,9 LD (VG): 4,8	An <i>et al.</i> , 2010
VG e VB	água	PLS	UV-Vis	Adsorção	-	Ashrafi <i>et al.</i> , 2018
VM, VG e AM	água	PCR e PLS	UV-Vis	SPE	LD (VM): 67 LD (VG): 28 LD (AM): 48	Al-Degs <i>et al.</i> , 2010

LD: limite de detecção; VM: verde malaquita; VB: verde brilhante; VG: violeta genciana; AM: azul de metileno; PLS: *Partial Least Square*;

ANN: *Array of Neural Network*; MLR: *Multiple Linear Regression*; PCR: *Principal Component Regression*.

Apesar da importância das técnicas quimiométricas de calibração multivariada para análise simultânea de corantes, não têm sido propostos métodos envolvendo o uso das ferramentas quimiométricas de discriminação ou classificação multivariada como estratégia de análise de múltiplos corantes. Considerando um contexto de análise de monitoramento ambiental, a detecção eficiente e rápida de contaminantes por meio de métodos de *screening* são muito relevantes, uma vez que essa estratégia possibilita reduzir consideravelmente a quantidade de amostras que precisam ser analisadas por técnicas instrumentais sofisticadas que demandam maior custo e tempo de análise, além apresentarem maior gasto de solventes, de modo que estas técnicas ficariam reservadas apenas para confirmação de amostras potencialmente contaminadas.

Nesse contexto, para construção dos modelos, o emprego de técnicas espectrofotométricas como o UV-Vis para obtenção de dados multivariados representa uma redução considerável nos custos de análise, além da facilidade para treinamento dos analistas. Adicionalmente, como vem sendo discutido neste trabalho, técnicas de AID podem contribuir ainda mais com esse aspecto, uma vez que as imagens dos corantes proporcionam dados multivariados de histogramas de cor que são altamente qualificados para construção de modelos quimiométricos robustos.

Portanto, verifica-se que métodos de *screening* podem contribuir profundamente com o monitoramento ambiental rápido e eficiente de micropoluentes como os corantes antimicrobianos e, apesar disso, não tem sido explorado na literatura propostas de métodos de classificação multivariada para esse fim. Neste trabalho, buscou-se desenvolver um método de classificação *one-class* (DD-SIMCA) por meio de dados multivariados obtidos por espectrofotometria na região do UV-Vis e imagem digital para rápida detecção de contaminação por múltiplos corantes em água superficial. O potencial da EEMP e da AID-DD-SIMCA foi explorado para obtenção de um método eficiente (alta sensibilidade e especificidade) em baixos níveis de concentração.

6.2. Materiais e Métodos

2.1.1. Eletroextração das amostras

Para a extração da mistura de corantes, as amostras foram preparadas diretamente em água superficial de lago (matriz). Foram adicionadas ao frasco de amostras o volume de 20 mL de amostras brancas (matriz) ou amostras fortificadas com misturas dos corantes VM, VG e AM em diferentes proporções preparadas conforme mostrado na **Tabela A – Apêndice**. As ponteiras contendo os cones odontológicos foram montadas usando 200 µL de solução de ácido acético 0,5 M como eletrólito na fase aceptora. Após a adição de 3 mL de n-octanol (filtro orgânico), as ponteiras contendo os cones odontológicos foram inseridas e o potencial de 300 V foi aplicado por 3 min.

Para garantir que a distância da ponta do cone fosse constante em relação à fase doadora, e considerando a diferença de tamanho das diferentes unidades e lotes dos cones papel, a extensão da porção externa, isto é, a porção voltada para fora da ponteira foi fixada em 1,5 cm.

Para esta aplicação do presente trabalho, foi empregado o modo de “eletroextração sob movimentação”, ou “eletroextração dinâmica” no qual o motor de passo foi configurado para mergulhar os cones na fase doadora repetidamente por um curto intervalo de tempo (500 milissegundos) até uma certa altura de mergulho (480 passos). Neste modo de eletroextração, os cones são inicialmente imersos na fase orgânica para formar um filme ao redor desse suporte sólido que imobiliza a solução de eletrólitos, em seguida eles são deslocados em 480 passos tocando a fase doadora, após 500 milissegundos ele retorna ao ponto inicial na fase orgânica, permanecendo por 500 milissegundos de modo a restabelecer o filme orgânico. Esse processo se repete até o final da eletroextração.

2.1.2. Análise de imagens digitais

Após as extrações, os cones odontológicos foram retirados do sistema de eletroextração mantidos sob proteção da luz e esperou-se 2-3 minutos para secar naturalmente. As imagens foram obtidas por meio de scanner de mesa. Para obtenção de imagens scanner, os cones foram posicionados no vidro do scanner e um fundo

preto foi adicionado sobre eles, sendo então as imagens adquiridas em uma resolução de 600 dpi e salvas no formato “.TIFF”. Após a aquisição das imagens, foi adicionado sobre cada cone 20 μ L do oxidante DDQ por gotejamento e após secar novamente os cones por cerca de 2-3 minutos, o processo de aquisição das imagens foi repetido.

Após a obtenção das imagens, uma ROI com dimensões de 60 x 30 pixels foi recortada da ponta de todos os cones de cada experimento utilizando o *software* Photofiltre7. A decomposição das imagens e obtenção dos histogramas de cor foi realizada utilizando uma rotina de automação no MATLAB® software, versão 7.13 (MathWorks, Natick, USA) a partir de uma área retangular com dimensões 50 x 15 pixels da região de interesse (ROI – *region of interest*) conforme mostrado na **Figura 22**, sendo os histogramas obtidos para cada componente do sistema de cor RGB.



Figura 22: Área retangular demarcada da região de interesse ROI

Os modelos foram construídos em MATLAB® software, versão 7.13 (MathWorks, Natick, USA), acoplado com o pacote DDSGUI versão 1.2 (Zontov, Pomerantsev & Rodionova, 2008), bem como o pacote PLS Toolbox, versão 8.92 (Eigenvector Technologies, Manson, USA).

2.1.3. Análise de espectrofotometria UV-Vis

As amostras também foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis. Para isso, após a eletroextração das misturas de corantes, bem como das amostras brancas, um segmento de 1,5 cm da porção inferior do cone odontológico, foi cortado e submetido ao processo de dessorção. Para essa etapa, o segmento recortado do cone foi imerso em microtubo *ependorf* (3 mL) contendo 1 mL de solução de dessorção, composta por uma mistura de metanol, acetonitrila e ácido acético na proporção 2:2:1 (v/v), conforme descrito por Miranda (2020). Os microtubos foram colocados em banho ultrassom por 1 minuto seguido de agitação rotatória por 15

minutos. Após dessorção, a solução obtida foi analisada em espectrofotômetro UV-Vis para obtenção dos espectros de absorbância na faixa 500 a 700 nm de comprimento de onda com resolução de 5 nm.

2.1.4. Classificação supervisionada por DD-SIMCA

Na construção do modelo *DD-SIMCA*, 37 amostras brancas foram utilizadas na modelagem de classe e para estimar o erro tipo I, α , ou correspondente sensibilidade $1 - \alpha$ (*SENS*). Um total de 105 fortificadas com diferentes misturas, cujas proporções são apresentadas na **Tabela A – Apêndice**, foram utilizadas para estimar o erro tipo II, β ou a correspondente especificidade $1 - \beta$ (*SPEC*).

As matrizes de dados **X** obtidas por histogramas das imagens digitais capturadas em *scanner* ou por espectros de espectrofotômetro UV-Vis foram usados na construção de modelos de classificação supervisionado *SIMCA* usando o software MATLAB®, versão 7.13 (MathWorks, Natick, USA), acoplado com o pacote DD-SIMCA versão 1.2 (Zontov, Pomerantsev & Rodionova, 2008), bem como o pacote PLS Toolbox, versão 8.92 (Eigenvector Technologies, Manson, USA).

Assim como no método *PLS-DA* apresentado anteriormente, as amostras foram divididas em dois grupos (treinamento e teste) usando o algoritmo Kennard-Stone para garantir uma distribuição representativa e uniforme das amostras em cada grupo. O bloco X, das variáveis independentes, continha os histogramas de cor ou os espectros UV-Vis de cada amostra. Para otimização do modelo, foram avaliadas diferentes combinações para erro tipo I configurado a priori ($\alpha = 0,01$ ou $\alpha = 0,05$), bem como do número de CP, sendo que para todos os modelos avaliados, a área de aceitação foi calculada considerando uma distribuição Chi quadrado e um nível de significância para detecção de outlier configurado como $\alpha = 0,01$.

2.2. Resultados e Discussão

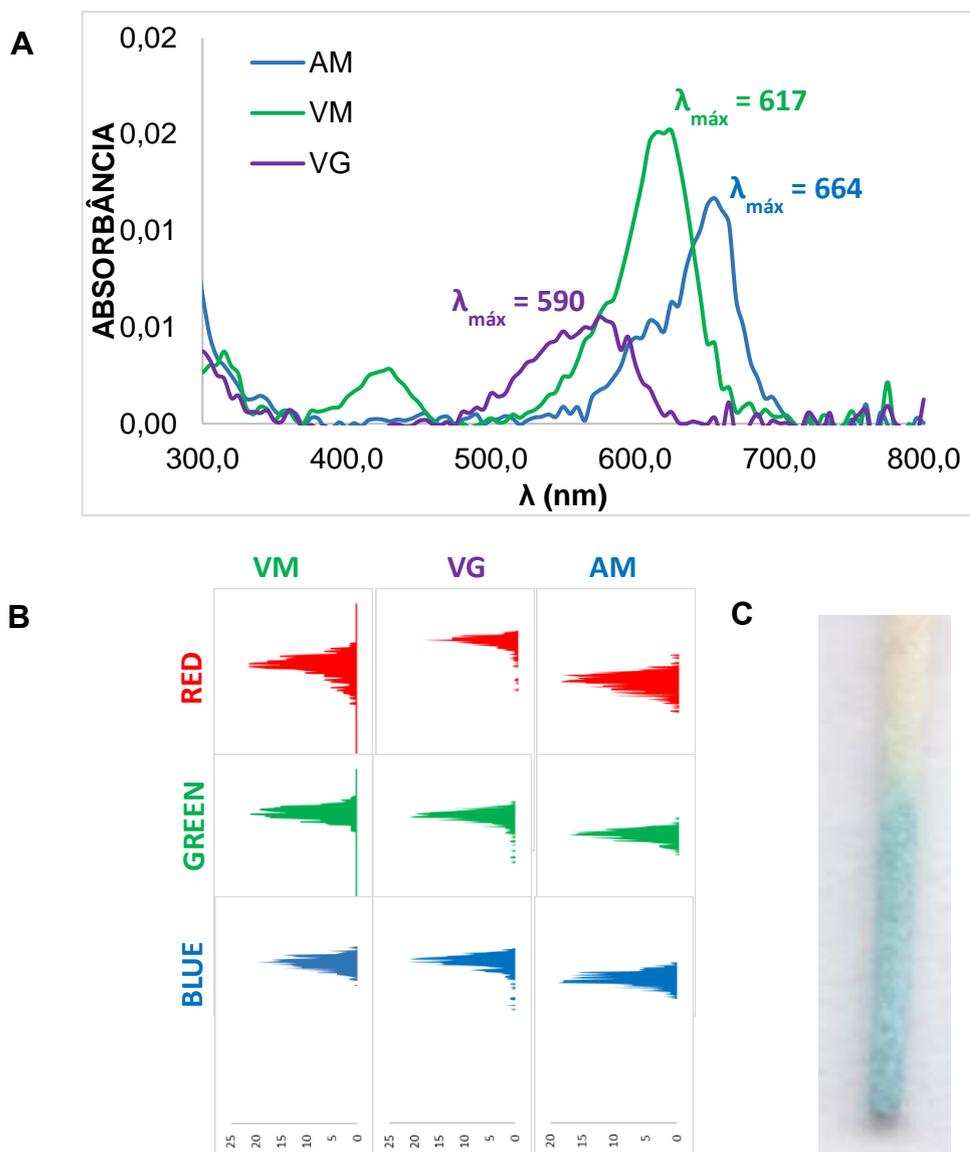
As condições empregadas na eletroextração dos corantes estão baseadas em trabalhos anteriores do grupo (Orlando *et al.*, 2019; Boratto, 2023). A modalidade de eletroextração empregada envolveu o uso de pontas de papel odontológico (cone odontológico) em uma configuração baseada no trabalho de Orlando e colaboradores (2024), porém com algumas modificações como mostrado na **Figura 11**. Nesta configuração adaptada, não foi empregada membranas ocas porosas uma vez que a estratégia foi usar o filtro orgânico livre. Como descrito por Orlando (2024), a ponta de papel foi encaixada diretamente em ponteiros de micropipetas vedando sua extremidade inferior, de modo que os cones odontológicos, embebidos em solução acceptora, estivessem em contato com um excesso de solução de eletrólitos contidos no interior dessa ponteira. Essa estratégia promove o suprimento de eletrólitos na fase acceptora contornando assim algumas limitações como uma possível secagem da solução de eletrólitos presente no suporte sólido na fase acceptora, e uma adequada estabilização do meio mesmo com correntes elétricas mais elevadas. Isso é especialmente importante durante a aplicação do campo elétrico devido ao efeito de aquecimento promovido pela passagem de corrente elétrica e a eletrólise da água.

O dispositivo de EEMP empregado possui um sistema automatizado que possibilita o posicionamento da fase acceptora no interior do filtro orgânico. Esse sistema (**Figura 10**) foi construído conforme descrito por Boratto (2023) e no aditivo de patente INPI n° BR1320220135168. Uma importante inovação incorporada ao sistema descrito por Boratto (2023) foi a implementação de um modo de eletroextração sob movimentação, no qual o braço automatizado foi programado para realizar movimentos constantes do suporte de ponteiros para cima e para baixo durante a etapa de extração. Essa estratégia foi denominada de eletroextração dinâmica.

O uso da eletroextração dinâmica confere grandes vantagens ao processo, sobretudo quanto a capacidade extrativa. Considerando que a resistência total do sistema é proporcional à espessura do filtro orgânico, ao fazer o suporte da fase acceptora tocar a fase doadora, a espessura da camada de filtro orgânico que separa a ponta do papel odontológico e a fase doadora, bem como a resistência através do sistema à passagem de corrente elétrica se reduz consideravelmente. Por outro lado, esse contato deve acontecer em um intervalo de tempo reduzido, de modo que o filme

orgânico formado ao redor do suporte da fase aceptora não se desfaça por completo e assim a seletividade seja perdida. Esse aspecto é de fundamental importância, uma vez que, o filme orgânico formado ao redor do cone é responsável por sustentar uma resistência elétrica suficiente para manter a integridade do sistema evitando a ocorrência de eletrólise e suas consequências no sistema, a saber: o superaquecimento, formação de gás, degradação dos analitos.

Na **Figura 23A e B**, observa-se que tanto os espectros de absorbância dos corantes puros quanto os histogramas individuais dos corantes apresentam grande sobreposição dos seus dados, do mesmo modo que, visualmente, a ponta de papel odontológico mostra uma tonalidade única após a extração da mistura de corantes. Essas observações indicam, portanto, que a identificação dessas amostras como contaminadas necessita de uma abordagem multivariada.



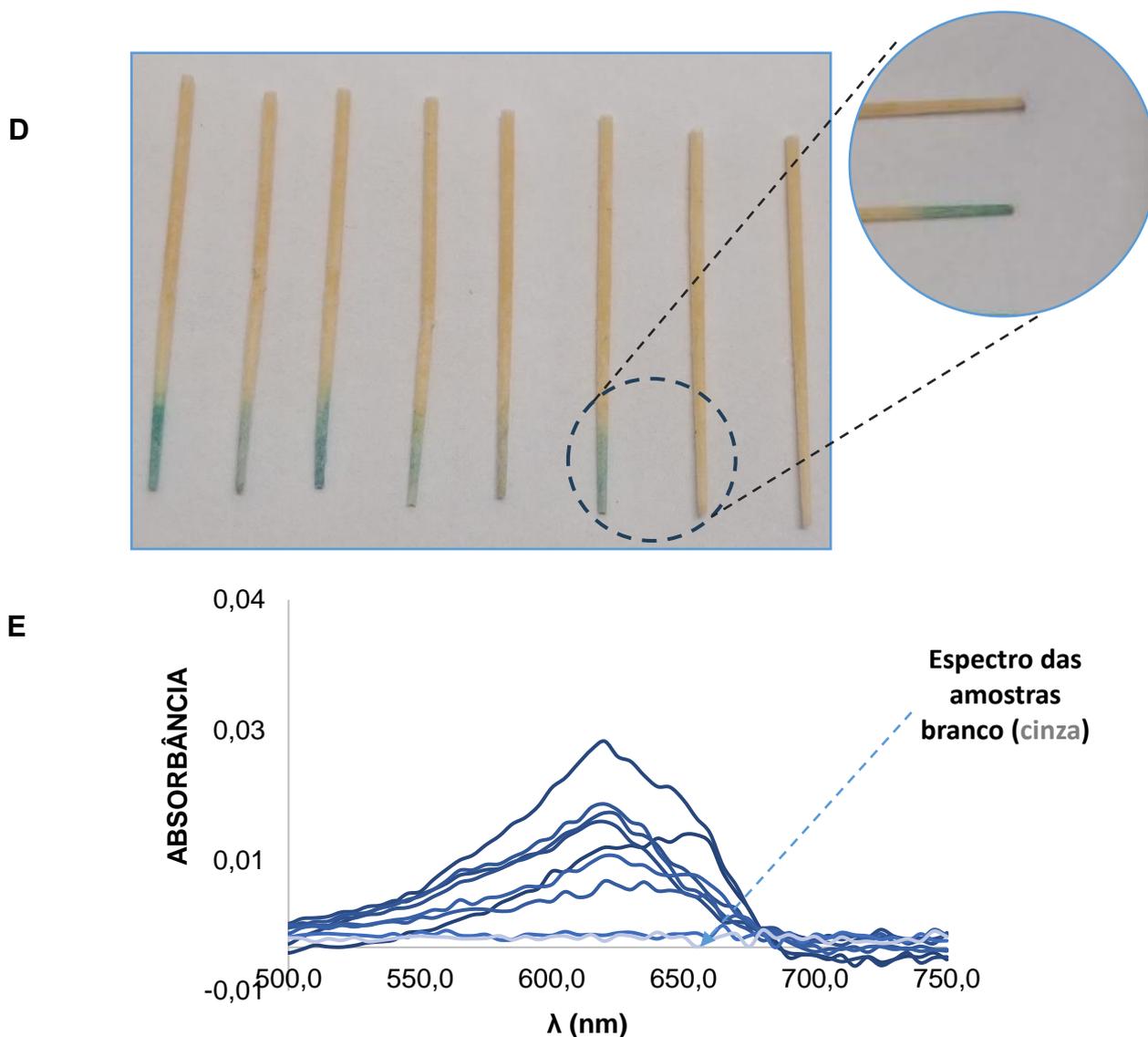


Figura 23: Resultados para análise simultânea dos corantes VM, VG e AM. (A) Espectros UV-Vis e (B) histogramas de cor de imagem dos três corantes individuais puros; (C) análise visual da ponta de papel odontológico contendo mistura de corantes; (D) contraste das extrações de amostras fortificadas e amostras brancas; (E) espectros UV-Vis para amostras fortificadas (azuis) e branca (cinza) das misturas de corantes em diferentes faixas de concentrações.

Adicionalmente, conforme mostra a **Figura 23D**, as diferentes proporções de misturas dos corantes VM, VG e AM mostradas na **Tabela A – Apêndice**, resulta em diferentes intensidades de cor na ponta dos cones após a eletroextração e que se distingue significativamente das amostras brancas, isto é, não fortificadas. Do mesmo modo, esse aspecto é refletido nos espectros de absorção no UV-Vis medidos após

dessorção dos corantes, porém em concentrações mais baixas há uma similaridade com os espectros de amostras brancas (**Figura 23E**). Considerando todos esses aspectos, portanto, no presente trabalho o método quimiométrico *DD-SIMCA* foi utilizado na análise das matrizes de dados obtidas por espectrofotometria e por análise de imagem digital.

2.2.1. Modelo *DD-SIMCA* para os dados espectrofotométricos

Modelos *DD-SIMCA* foram construídos a partir dos dados dos espectros UV-Vis de todas as amostras brancas e fortificadas. Conforme explicado anteriormente, uma vez que apenas as amostras da classe alvo são utilizadas na modelagem de classe, os modelos foram construídos utilizando apenas as amostras brancas, isto é, amostras de tampão matrizado não fortificadas com os corantes. Para a construção dos modelos foi utilizado o pacote livre DDSGUI v. 1.2 (Zontov, Pomerantsev & Rodionova, 2008) acoplado ao ambiente MATLAB®, sendo que os resultados obtidos são resumidos na **Tabela 9**.

Como discutido anteriormente, na abordagem rigorosa (“*rigorous*”) são consideradas apenas informações sobre a classe alvo usada para modelagem, de modo que apenas a sensibilidade é utilizada como critério de otimização. Considerando essa abordagem o melhor resultado foi obtido nos modelos construídos com valor de $\alpha = 0,01$, cuja sensibilidade foi igual a 1. Por outro lado, ao considerar a especificidade na otimização como sugere a abordagem compatível (“*compliant*”), melhores resultados são obtidos nos modelos construídos com $\alpha = 0,05$, onde o ganho em especificidade acontece à custa de uma leve perda de sensibilidade. Isso pode ser explicado, considerando que o valor de α configurado previamente nos parâmetros do modelo representa o risco assumido de rejeição errônea de amostras que pertence à classe alvo.

É importante destacar que α calculado *a posteriori* precisa estar em conformidade com o α configurado *a priori*, de modo que o erro de classificação de uma amostra alvo do conjunto de treinamento não é um problema em si, mas é resultado de um risco de erro assumido previamente de forma controlada (Radionova *et al.*, 2016). Convém ressaltar ainda que a interpretação de qual dos parâmetros é mais importante, sensibilidade ou especificidade, dependerá do propósito de uso do

método. Um método de *screening*, como o que é proposto no presente trabalho, a especificidade merece maior atenção, uma vez que, amostras contaminadas poderão ser confirmadas posteriormente por meio de métodos instrumentais mais sensíveis.

Os gráficos de área de aceitação para 4 CP e $\alpha = 0,05$ são apresentados na **Figura 24A, B**.

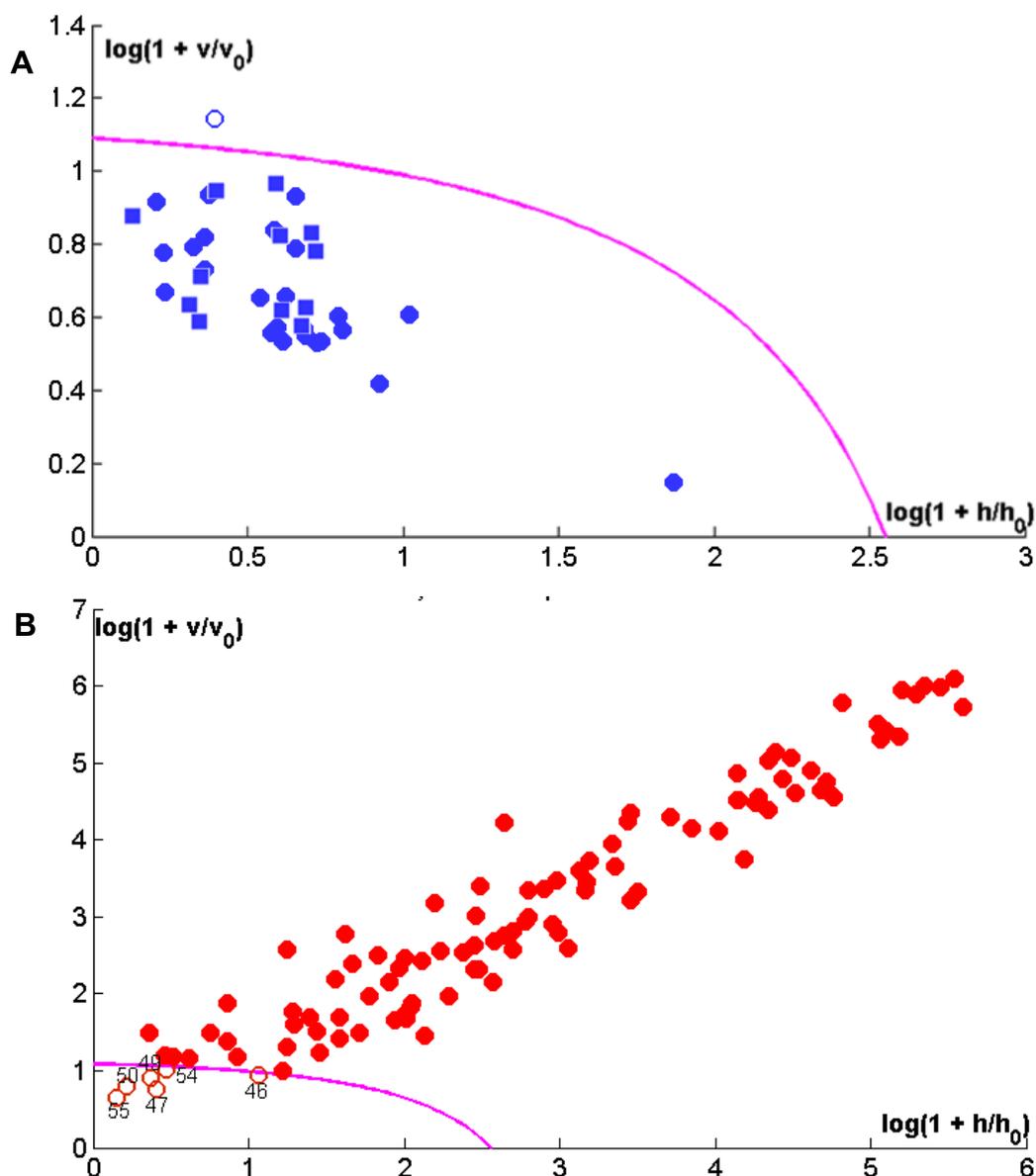


Figura 24: Gráfico de área de aceitação para os dados espectrofotométricos para 4 CP e $\alpha = 0,05$, (A) amostras brancas conjunto treinamento (círculos azuis) e validação (quadrados azuis); (B) amostras fortificadas (círculos vermelhos). São apresentadas amostras classificadas erroneamente (círculos vermelhas ou azuis não preenchidas).

Tabela 9: Resultados da espectrofotometria UV-Vis no método *DD-SIMCA*

Espectrofotometria	$\alpha = 0,01$				$\alpha = 0,05$			
	n° de CP	α calculado	SENS_T	SENS_V	n° de CP	α calculado	SENS_T	SENS_V
Sensibilidade	2 CP	0	1	1	2 CP	0,04	0,96	1
	3 CP	0	1	1	3 CP	0,08	0,92	1
	4 CP	0	1	1	4 CP	0,04	0,96	1
Especificidade	n° de CP	β calculado	SPEC	Falso positivo	n° de CP	β calculado	SPEC	Falso positivo
	2 CP	0,09	0,91	9	2 CP	0,07	0,93	7
	3 CP	0,1	0,9	11	3 CP	0,05	0,95	5
	4 CP	0,1	0,9	10	4 CP	0,06	0,94	6
Eficiência	2 CP		0,954				0,945	
	3 CP		0,949				0,935	
	4 CP		0,949				0,950	

CP: n° de componentes principais; SENS_T: sensibilidade no conjunto treinamento; SENS_V: sensibilidade no conjunto teste; SPEC: especificidade.

Os parâmetros otimizados para o modelo foram 4 CP e $\alpha = 0,05$, sendo número de componentes principais escolhido com base na eficiência global do método que foi calculado em 0,950 pela **Equação 21**. Adicionalmente, o gráfico de extremos (**Figura 25**) também foi utilizado na escolha do número de CP, como um instrumento auxiliar uma vez que esse gráfico representa uma avaliação da qualidade geral do método (Zontov *et al.*, 2017). Este gráfico é calculado pelo pacote *DDSGUI* e estabelece limites de tolerância para os dados usados no conjunto treinamento, sendo um indicativo da presença de outliers. Os modelos com mais de 4 CP apresentaram pontos mais distantes da diagonal central, como mostrado na **Figura A - Apêndice**.

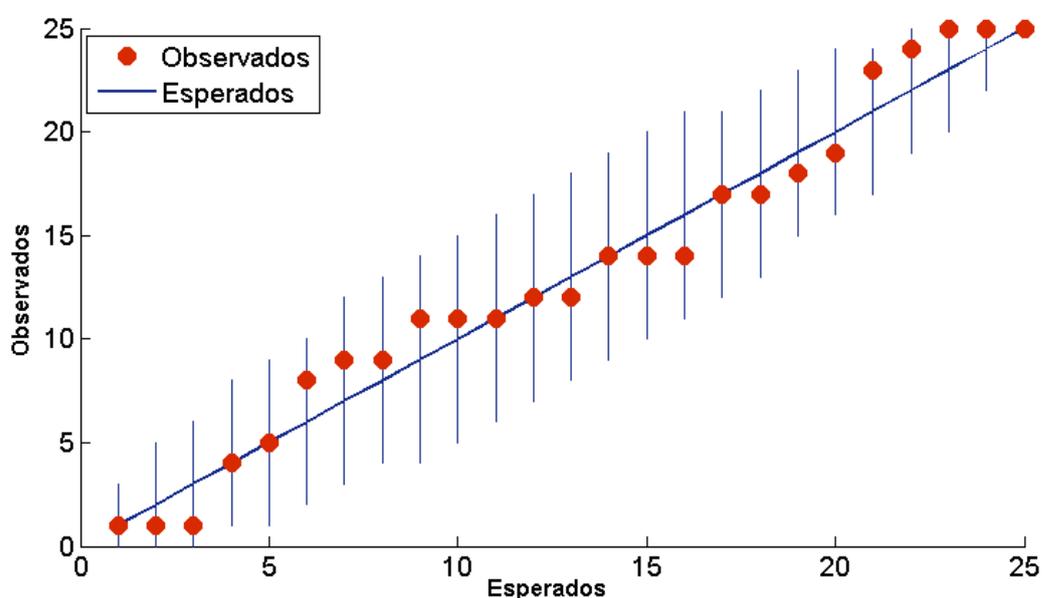


Figura 25: Gráfico de extremos para o modelo 4 CP alfa 0,05

É importante destacar que conforme mostrado na **Figura 24B**, as amostras fortificadas e classificadas incorretamente como amostras brancas correspondem exatamente às amostras 46, 47, 49, 50, 54 e 55. Conforme mostrado na **Tabela A – Apêndice**, as amostras na faixa 46 a 55 apresentam as mais baixas concentrações de corantes testadas no modelo, ou seja, concentrações até $2 \mu\text{g L}^{-1}$ para a soma dos corantes nas respectivas misturas. Os erros de classificação de amostras contaminadas coincidindo com a faixa de concentração pode ser indicativo do limite do método construído com os dados espectrofotométricos.

2.2.2. Modelo DD-SIMCA para os dados com imagens digitais

Para as imagens digitais capturadas em scanner, a região de interesse (ROI) foi recortada das imagens dos cones contendo os corantes e os histogramas foram coletados empregando uma rotina automatizada no MATLAB®, sendo combinados os dados dos três componentes de cor do sistema RGB. As dimensões das matrizes X para as amostras brancas (não fortificadas) conjunto treinamento e para amostras fortificadas foram respectivamente, 25 x 768 e 105 x 768. A combinação dos três componentes de cor é essencial na construção do modelo, uma vez que devido às diferentes tonalidades de cor dos corantes analisado, mais informações precisam ser fornecidas ao modelo, para se obter maior representatividade da contribuição individual dos corantes. Como discutido nos resultados da primeira aplicação, VM (verde-azulado), AM (azul) e VG (violeta) apresentaram sensibilidade maior na região da cor complementar, sendo o RED para o VM e AM e BLUE ou GREEN para o VG.

Empregou-se as mesmas estratégias de otimização descritas anteriormente nesse novo conjunto de dados, sendo escolhida a abordagem compatível (“*compliant*”) para a otimização do modelo. É possível notar, conforme mostrados nos dados resumidos na **Tabela 10**, que o modelo com 2 CP e valor de $\alpha = 0,01$ são suficientes para obtenção da sensibilidade máxima. Por outro lado, verifica-se que a especificidade é baixa para 2 ou 3 CP em ambos os valores de α avaliados (0,01 e 0,05) sendo necessários modelos mais complexos para otimização do modelo. É importante destacar que para $\alpha = 0,05$ com 3 ou 4 CP não houve concordância com α calculado *a posteriori* (0,08 vs 0,05 e 0,00 vs 0,05). Com base nesses aspectos e priorizando a especificidade frente a sensibilidade, a condição otimizada escolhida foi, portanto, 5 CP e $\alpha = 0,05$, apresentando uma eficiência global calculada em 0,980.

A **Figura 26** apresenta os gráficos de área de aceitação para a condição ótima do modelo *DD-SIMCA* construído com os dados de imagens digitais obtidas com *scanner*. Desse modo, assumindo um risco ao nível de $\alpha = 0,05$, tem-se uma leve perda de sensibilidade, porém com a obtenção de uma especificidade máxima, isto é, para um método de *screening*, como a proposta deste trabalho, qualquer amostra contaminada seria detectada.

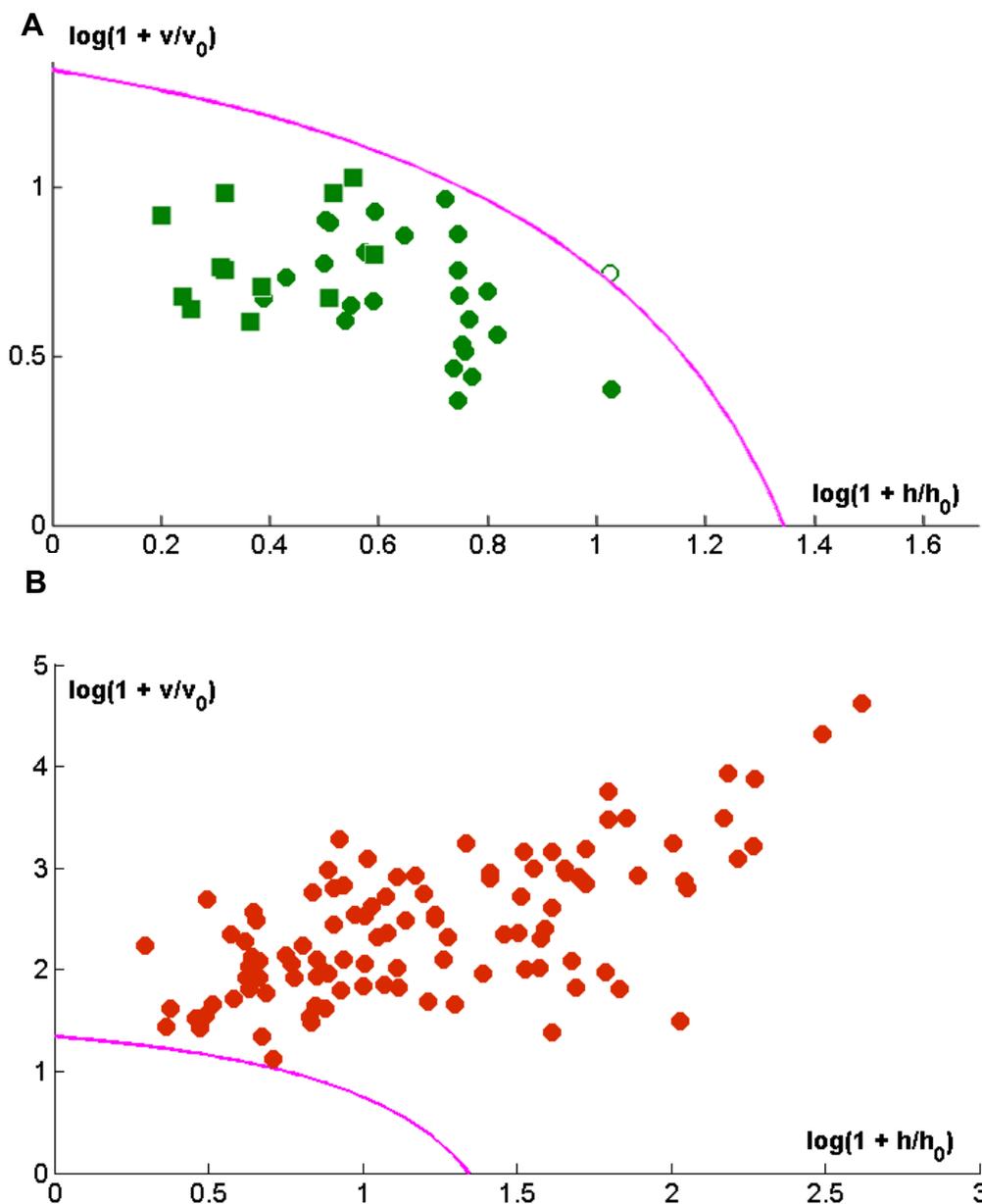


Figura 26: Gráfico de área de aceitação para os dados de imagens digitais para 5 CP e $\alpha = 0,05$, (A) amostras brancas conjunto treinamento (círculos verdes) e validação (triângulos verdes); (B) amostras fortificadas (círculos vermelhos). São apresentadas amostras classificadas erroneamente (círculos verdes não preenchidos).

Tabela 10: Resultados de imagens digitais no método *DD-SIMCA*

Imagem Digital	$\alpha = 0,01$				$\alpha = 0,05$			
	nº de CP	α calculado	SENS_T	SENS_V	nº de CP	α calculado	SENS_T	SENS_V
Sensibilidade	2 CP	0	1	1	2 CP	0,04	0,96	1
	3 CP	0	1	1	3 CP	0,08	0,92	1
	4 CP	0	1	1	4 CP	0	1	1
	5 CP	0	1	1	5 CP	0,04	0,96	1
Especificidade	nº de CP	β calculado	SPEC	Falso positivo	nº de CP	β calculado	SPEC	Falso positivo
	2 CP	0,14	0,86	15	2 CP	0,08	0,92	8
	3 CP	0,07	0,93	7	3 CP	0,05	0,95	5
	4 CP	0,01	0,99	1	4 CP	0	1	0
	5 CP	0,01	0,99	1	5 CP	0	1	0
Eficiência	2 CP		0,927				0,940	
	3 CP		0,964				0,935	
	4 CP		0,995				1,000	
	5 CP		0,995				0,980	

CP: nº de componentes principais; SENS_T: sensibilidade no conjunto treinamento; SENS_V: sensibilidade no conjunto teste; SPEC: especificidade.

Convém ressaltar que as misturas de corantes foram realizadas numa ampla faixa de concentração e, por isso, se encontram dispersas na região fora da área de aceitação. Sob esse aspecto, o pacote *DDSGUI* emite um alerta de que possivelmente mais de uma classe alternativa está presente e, por isso, fornece o resultado do cálculo de β calculado levando em considerando apenas as amostras contaminadas que se encontram mais próximas da área de aceitação. Nesse contexto, foi obtido um valor de β calculado igual a 0,004, implicando que o modelo construído com os parâmetros otimizados (5 CP e $\alpha = 0,05$), teoricamente classificaria uma amostra contaminada como branca numa proporção de uma a cada 250 amostras testadas, evidenciando que o método proposto apresenta um excelente desempenho.

Na **Tabela 11**, é apresentada a comparação dos modelos *DD-SIMCA* construídos com os dados UV-Vis e imagens digitais em scanner. Com base nessa comparação e com as discussões apresentadas acima, é possível constatar que o método desenvolvido com imagens digitais apresentou um melhor desempenho na classificação de amostras contaminadas, onde a especificidade obtida foi máxima, além da eficiência global ter sido superior (0,98 vs 0,95).

Tabela 11: Comparação dos métodos *DD-SIMCA* construídos com dados UV-Vis e Imagem Digital em scanner

		UV-Vis	Imagem Digital
		4 CP, $\alpha = 0,05$	5 CP, $\alpha = 0,05$
Sensibilidade	α calculado	0,04	0,04
	SENS_T	0,96	0,96
	SENS_V	1	1
Especificidade	β calculado	0,06	0,00
	Falso positivo	6	1
	SPEC	0,94	1
Eficiência		0,950	0,980

Além disso, o método desenvolvido com dados espectrofotométricos apresentou uma tendência sistemática nos erros de classificação das amostras

contaminadas, uma vez que as baixas concentrações testadas, ou seja, misturas de no máximo $2 \mu \text{L}^{-1}$ para a soma dos corantes na mistura, estiveram entre as amostras classificadas erroneamente como amostras brancas, indicando ser este o limite do método por espectrofotometria UV-Vis.

De maneira geral, os dois modelos propostos apresentaram excelente desempenho e, portanto, possuem grande potencial para aplicação como método de *screening* no monitoramento de contaminação por corantes em água superficial. Porém, o custo dos dispositivos de aquisição de imagens como o scanner de mesa é relativamente mais baixo comparado aos espectrofotômetros UV-Vis, e, além disso, a obtenção dos dados de imagem digital não requer dessorção dos analitos do suporte de fase aceptora, diferentemente da análise em espectrofotômetro.

Por fim, comparativamente aos métodos de calibração multivariado apresentados na **Tabela 8**, os níveis de concentração atingidos no método aqui proposto ($2 \mu \text{L}^{-1}$) é mais baixo do que o que foi alcançado na literatura para soma dos corantes (7,7 a $2980 \mu \text{L}^{-1}$).

2.3. Conclusões parciais

Na presente aplicação, foi apresentado um novo modo para a EEMP, onde o suporte sólido da fase acceptora (cone odontológico) foi disposto em nova configuração que permite alocar um excesso de solução de eletrólito em contato com essa fase de modo a fornecer um suprimento de eletrólitos durante a eletroextração. Esse processo possibilita contornar a perda da solução por evaporação devido ao aquecimento resultante da passagem de corrente, o que de modo geral, limita a capacidade extrativa ao intervalo de tempo no qual não houve secagem da fase acceptora. Esse aspecto contribui, portanto, para aumentar a pré-concentração e, conseqüentemente, a sensibilidade global do método.

O EEMPA utilizado na presente aplicação, possibilitou um aumento da praticidade à rotina e reprodutibilidade nos resultados, uma vez que, além de múltiplas análises simultâneas (12 amostras), o braço automático posiciona as ponteiros contendo a fase acceptora numa posição constante e reprodutível ao longo de diferentes bateladas de extrações. Adicionalmente, o sistema automatizado possibilitou configurar o motor de passo para realizar movimentos contínuos ao longo da corrida de eletroextração, um modo chamado de “eletroextração dinâmica”, no qual o contato da fase acceptora com a fase doadora por um curto intervalo de tempo ampliou consideravelmente a capacidade extrativa da técnica, potencializando ainda mais a sensibilidade global do método.

O modelo quimiométrico de classificação *one-class*, *DD-SIMCA* construído com dados espectrofotométricos UV-Vis obteve um bom desempenho, com sensibilidade de 0,96 no conjunto treinamento e 1 para o conjunto teste, além de especificidade de 0,94. Os erros de classificação foram sistematicamente em amostras nos níveis de concentração mais baixos testados no modelo, isto é, soma total dos corantes nas misturas até $2 \mu\text{L}^{-1}$, o que pode ser um indicativo do limite do método.

O modelo quimiométrico *DD-SIMCA* com dados de imagem digital obteve um excelente desempenho, com sensibilidade de 0,96 no conjunto treinamento e 1 no conjunto teste, além de especificidade de 1 no teste com amostras fortificadas. Além disso, o valor de β calculado pelo modelo para as amostras mais próximas da área de

aceitação foi de 0,004; o que indica do ponto de vista teórico um erro de classificação de apenas 1 amostra a cada 250 amostras testadas.

Por fim, ambos os modelos propostos na presente aplicação apresentaram excelente desempenho e, portanto, possuem grande potencial para aplicação como método de *screening* no monitoramento de contaminação em água superficial por corantes, sendo atingidos níveis de concentração mais baixo ($2 \mu \text{L}^{-1}$) do que o que foi alcançado na literatura em métodos de calibração multivariada para soma dos corantes (7,7 a $2980 \mu \text{L}^{-1}$). Portanto, evidencia-se o potencial da combinação das estratégias exploradas no presente trabalho, em especial a combinação de EEMP com técnicas AID associado às ferramentas quimiométricas.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foram propostos modelos quimiométricos para aplicação como métodos de *screening* no monitoramento de contaminação de água superficial (lago) por corantes antimicrobianos. As aplicações descritas na presente tese envolveram o emprego combinado do potencial de técnicas inovadoras, sendo elas a EEMP para o preparo de amostra seguido da determinação por análise de imagem digital associado a ferramentas quimiométricas.

A EEMP é uma técnica de preparo de amostra com vantagens notórias bem estabelecidas em publicações anteriores, sobretudo quanto a grande capacidade extrativa, de *cleanup* e pré-concentração, além de um tempo reduzido de análise e alta frequência analítica. Neste trabalho, foram feitas contribuições importantes para a técnica, com destaque para implementação de novo material e de nova configuração para o suporte sólido da fase acceptora, bem como a proposição de um modo de eletroextração dinâmica com movimentação do suporte sólido ao longo da extração.

Nesse sentido, o sólido particulado de silicato de magnésio foi proposto e apresentou um excelente desempenho como material sortivo para o corante VM, tendo um perfil de corrente elétrica similar aos convencionalmente usados em EEMP. Com esse material o corante extraído se concentrou de forma localizada na superfície do material, o que possibilitou a análise através de dados de imagem digital.

Do mesmo modo, como descrito na segunda aplicação desta tese, cones odontológicos foram usados como fase acceptora em uma configuração que possibilita que um excesso de solução de eletrólitos esteja sempre em contato com esse material, garantindo que não haja secagem da solução durante a aplicação do campo. Adicionalmente, o sistema automatizado de eletroextração empregado nesta aplicação proporcionou maior praticidade e reprodutibilidade para o preparo de amostra, bem como possibilitou que o uso do modo de eletroextração dinâmica com movimentação da fase acceptora em direção a fase doadora, ampliando consideravelmente a capacidade extrativa da técnica.

Os modelos quimiométricos desenvolvidos associando EEMP com técnicas AID possibilitou distinguir amostras contaminadas de não contaminadas em relação aos corantes antimicrobianos estudados, com alto nível de confiabilidade e alcançando níveis de concentração extremamente baixos. O modelo discriminante

AID-PLS-DA apresentado na primeira aplicação conseguiu discriminar com 95% de confiança níveis na ordem de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para VM em água superficial. Já para os modelos de modelagem de classe, ambos os modelos *DD-SIMCA* (UV-Vis e AID) apresentaram eficiência global acima de 95% na classificação de amostras contaminadas por múltiplos corantes, sendo que para o UV-Vis, erros de classificação se restringiram aos níveis abaixo de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ para a soma dos corantes enquanto para o modelo AID-*DD-SIMCA*, a especificidade de 100% foi obtida independente da concentração.

Os modelos obtidos são simples e rápidos e se mostram promissores como métodos de *screening* no monitoramento de contaminação por corantes antimicrobianos em matriz de água superficial.

REFERÊNCIAS

- [1] ANDERSEN, W. C., TURNIPSEED, S. B., KARBIWNYK, C. M., LEE, R. H., CLARK, S. B., ROWE, W. D., MILLER, K. E. Multiresidue method for the triphenylmethane dyes in fish: Malachite green, crystal (gentian) violet, and brilliant green. **Analytica Chimica Acta**, n. 637, v. (1–2), p. 279–289, 2009.
- [2] ANDERSEN, W. C. CASEY, C. R. SCHNEIDER, M. J., TURNIPSEED, S. B. Expansion of the Scope of AOAC First Action Method 2012.25—Single-Laboratory Validation of Triphenylmethane Dye and Leuco Metabolite Analysis in Shrimp, Tilapia, Catfish, and Salmon by LC-MS/MS **Journal of AOAC International**. v. 98. n. 3. p. 636–648. 2015.
- [3] ANDERSEN W. C. CASEY, C. R. SCHNEIDER, M. J., TURNIPSEED, S. B. Dye Residue Analysis in Raw and Processed Aquaculture Products: Matrix Extension of AOAC INTERNATIONAL *Official Method SM 2012.25*. **Journal of AOAC International**. v. 101, n. 6, 2018.
- [4] AN, L., DENG, J., ZHOU, L., LI, H., CHEN, F., WANG, H., LIU, Y. Simultaneous spectrophotometric determination of trace amount of malachite green and crystal violet in water after cloud point extraction using partial least squares regression. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 883–888, 2010.
- [5] AL-DEGS, Y. S., SWEILEH, J. A. Simultaneous determination of five commercial cationic dyes in stream waters using diatomite solid-phase extractant and multivariate calibration. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, p. 219–224, 2010.
- [6] AN, L., DENG, J., ZHOU, L., LI, H., CHEN, F., WANG, H., LIU, Y. Simultaneous spectrophotometric determination of trace amount of malachite green and crystal violet in water after cloud point extraction using partial least squares regression. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 883–888, 2010.
- [7] ASHRAFI, M., BAGHERIAN, G., MANSOUR ARAB CHAMJANGALI, M. A., GOUDARZI, N. Removal of Brilliant Green and Crystal violet from Mono- and Bi-component Aqueous Solutions Using NaOH-modified Walnut Shell. **Analytical and Bioanalytical Chemical Research**, v. 5, n. 1, p. 95–114, 2018.
- [8] BAGTASH, M., ZOLGHARNEIN, J. Removal of brilliant green and malachite green from aqueous solution by a viable magnetic polymeric nanocomposite: Simultaneous spectrophotometric determination of 2 dyes by PLS using original and first derivative spectra. **Journal of Chemometrics**, v. 32, 2018.
- [9] BARBOSA, M.F., NASCIMENTO, D.S.D., GRUNHUT, M., DANTAS, H.V., BAND, B.S.F., DE ARAÚJO, M.C.U., INSAUSTI, M. Fast determination of biodiesel content in commercial diesel/biodiesel blends by using digital images and multivariate calibration. **Analytical Sciences**. v. 33, p. 1285–1290. 2017.
- [10] BARKER, M.; RAYENS, W. **Partial least squares for discrimination**. J Chemom, v. 17. p.16–173, 2003.

- [11] CAMPOS, C. D. M., DE CAMPOS, R. P. S., DA SILVA, J. A. F., JESUS, D. P., ORLANDO, R. M. Preparo de amostras assistido por campo elétrico: fundamentos, avanços, aplicações e tendências. **Química Nova**, v. 38, n. 8, p. 1093–1106, 2015.
- [12] CAPITÁN-VALLVEY, L. F.; LOPEZ-RUIZ, N.; MARTINEZ-OLMOS, A.; ERENAS, M. M.; PALMA, A. J. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. **Analytica Chimica Acta**, v. 899, p. 23–56, 2015.
- [13] CHEQUER, F. M. D., DE OLIVEIRA, G. A. R., FERRAZ, E. R. A., CARDOSO, J. C., ZANONI, M. V. B., de Oliveira, D. P. Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact. **In Tech Open**, 2013.
- [14] CHEN, G., & MIAO, S. HPLC determination and MS confirmation of malachite green, gentian violet, and their leuco metabolite residues in channel catfish muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7109–7114, 2010.
- [15] COSTA, G., FERNANDES, D.D.S., ALMEIDA, V.E., ARAÚJO, T.S.P., B, MELO, J.P., DINIZ, P.H.G.D., VÉRAS, G. Digital image-based classification of biodiesel. *Talanta*. v. 139, p. 50–55. 2015.
- [16] CASTELL, A., ARROYO-MANZANARES, N., LÓPEZ-GARCÍA, I., ZAPATA, F., VIÑAS, P. Authentication strategy for paprika analysis according to geographical origin and study of adulteration using near infrared spectroscopy and chemometric approaches. **Food Control**, v. 161, 2024.
- [17] DI ANIBAL, C. V., ODENA, M., RUISÁNCHEZ, I., CALLAO, M. P. Determining the adulteration of spices with Sudan I-II-III-IV dyes by UV–visible spectroscopy and multivariate classification techniques. **Talanta**, v. 79, p. 887–892, 2009.
- [18] DI ANIBAL, C. V., RODRÍGUEZ, S., ALBERTENGO, L. Synchronous fluorescence and multivariate classification analysis as a screening tool for determining Sudan I dye in culinary spices. **Food Control**, v. 56, p. 18–23, 2015.
- [19] DAVARANI, S. S. H. *et al.* Electro membrane extraction of sodium diclofenac as an acidic compound from wastewater, urine, bovine milk, and plasma samples and quantification by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**. v. 722, p. 55–62, 2012.
- [20] DINIZ, P.H.G.D. Chemometrics-assisted color histogram-based analytical systems. *Journal of Chemometrics*. v. 34, n. 12. 2019.
- [21] DADFARNIA, S., SHABANI, A. M. H., ESFAHANI, G. S., KAZEMI. E. Dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop for separation and preconcentration of malachite green before its determination by flow injection spectrophotometry. **Spectroscopy Letters**, v. 49, n. 2, p. 140–145, 2016.
- [22] DIL, E.A., GHAEDI, M., ASFARAM, A., ZARE, F., MEHRABI, F., SADEGHFAR, F. Comparison between dispersive solid-phase and dispersive liquid–liquid microextraction combined with spectrophotometric determination of malachite green in water samples

- based on ultrasound-assisted and preconcentration under multi-variable experimental design optimization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 39, p. 374–383, 2017.
- [23] DROUIN, N., KUBÁŇ, P., RUDAZ, S., PEDERSEN-BJERGAARD, S., SCHAPPLER, J. Electromembrane extraction: overview of the last decade. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 113, p. 357–363, 2019.
- [24] EUROPEAN COMMISSION. 1990, August 18. **Council Regulation (EEC) No 2377/90**. Official Journal of the European Communities L224: 1–8.
- [25] FAN, Y., LI, J., GUO, Y., XIE, L., ZHANG, G. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. **Measurement**, v. 171. 2021.
- [26] FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Contributing to food security and nutrition for all**. Rome. 224 pp. 2020.
- [27] FAO. Decision No. 07/2005/QD-BTS of February 24, 2005 **Promulgating the Lists of Chemicals and Antibiotics, Which Are Banned or Restricted from Use in Fisheries Production and Business**. 2005.
- [28] FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015, p. 496.
- [29] GHASEMI, E., KAYKHAI, M. Application of Micro-cloud point extraction for spectrophotometric determination of Malachite green, Crystal violet and Rhodamine B in aqueous samples. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 164, v. 93–97, 2016.
- [30] GJELSTAD, A.; RASMUSSEN, K.E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst-Planck equation. **Journal of Chromatography A**, v. 1174, p. 104–111, 2007.
- [31] GUARDONE, L., TINACCI, L., ARMANI, A., TREVISANI, M. Residues of veterinary drugs in fish and fish products: An analysis of RASFF data over the last 20 years. **Food Control**, v. 135, 2022.
- [32] HASHIMOTO, J., PASCHOAL, J., QUEIROZ, S., FERRACINI, V., ASSALIN, V., & REYES, F. A simple method for the determination of malachite green and leucomalachite green residues in fish by a modified QuEChERS extraction and LC/MS/MS. **Journal of AOAC International**, v. 95, 2012.
- [33] HASHIMOTO, J., PASCHOAL, J., QUEIROZ, S., REYES, F. Considerations on the Use of Malachite Green in Aquaculture and Analytical Aspects of Determining the Residues in Fish: A Review. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 20, n. 3, p. 273–294, 2011.
- [34] HASSANINEJAD-DARZI, K. S., H., TORKAMANZADEH, M. Simultaneous UV-Vis spectrophotometric quantification of ternary basic dye mixtures by partial least squares and artificial neural networks. **Water Science & Technology**, v. 1, 2016.

- [35] HAUGHEY, S. A., GALVIN-KING, P., HO, Y., BELL, S. E. J., ELLIOTT, C. T. The feasibility of using near infrared and Raman spectroscopic techniques to detect fraudulent adulteration of chili powders with Sudan dye. **Food Control**, v. 48, p. 75–83, 2015.
- [36] HE, S., XIE, W., ZHANG, W., ZHANG, L., WANG, Y., LIU, X., LIU, Y., DU, C. Multivariate qualitative analysis of banned additives in food safety using surface enhanced Raman scattering spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 137, p. 1092–1099, 2015.
- [37] HE, Y., MIGGIELS, P., WOUTERS, B., DROUIN, N., GULE, F., HANKEMEIER, T., LINDENBURG, P.W. A high-throughput, ultrafast, and online three-phase electroextraction method for analysis of trace level pharmaceuticals. **Analytica Chimica Acta**, v. 1149, p. 338204, 2021.
- [38] HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, p. 331–343, 1995.
- [39] HUANG, C. **Development of electromembrane extraction technologies for future bioanalysis of pharmaceuticals and peptides**. Thesis – Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of Oslo, Norway, 2017.
- [40] HUANG, P., ZHAO, P., DAI, X., HOU, X., ZHAO, L., LIANG, N. Trace determination of antibacterial pharmaceuticals in fishes by microwave-assisted extraction and solid-phase purification combined with dispersive liquid–liquid microextraction followed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1011, p. 136–144, 2016.
- [41] HUANG, S.; FAN, M.; WAWRYK, N.; QIU, J.; YANG, X.; ZHU, F.; OUYANG, G.; LI, X. Recent advances in sampling and sample preparation for effect directed environmental analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 154, p. 1–13, 2022.
- [42] HUANG, C. Electromembrane extraction. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 95, p. 47–56, 2017.
- [43] HURTAUD-PESSEL, D., COUËDOR, P., VERDON, E. Determination of residues of three triphenylmethane dyes and their metabolites (malachite green, leuco malachite green, crystal violet, leuco crystal violet, and brilliant green) in aquaculture products by LC/MS/MS: First Action 2012.25. **Journal of AOAC International**. v. 96, n. 5, p. 1152–1159. 2013.
- [44] HURTAUD-PESSEL, D., COUËDOR, P., VERDON, E. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of dye residues in aquaculture products: Development and validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 12, p. 1632–1645, 2011.
- [45] ISSA, A. A., AL-DEGS, Y. S., AL-GHOUTI, M. A., OLIMAT, A. A. M. Studying competitive sorption behavior of methylene blue and malachite green using multivariate calibration. **Chemical Engineering Journal**, v. 240, p.554–564, 2013.

- [46] KHAN, M.R., WABAIDUR, S.M., BUSQUETS, R., KHAN, M.A., SIDDIQUI, M.R., AZAM, M. Identification of malachite green in industrial wastewater using lignocellulose biomass composite bio-sorbent and UPLC-MS/MS: a green environmental approach. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 126, p. 160–166, 2019.
- [47] KENNARD, R.W.; STONE, L. **A Computer aided design of experiments**. Technometrics, v. 11, p. 137–148, 1969.
- [48] KREŠIĆ, G., DUJMIĆ, E., LONČARIĆ, D., BUNETA, A. LIOVIĆ, N., ZRNČIĆ, S., PLEADIN J., Factors affecting consumers' preferences for products from aquaculture. **Croatian Journal of Food Science and Technology**, v. 12, n. 2, p. 287–295, 2020.
- [49] KUBAN, P. & BOCEK, P. The effects of electrolysis on operational solutions in electromembrane extraction: The role of acceptor solution. **Journal of Chromatography A**. v. 1398, p. 11–19, 2015.
- [50] LÓPES-GUTIÉRREZ, N., ROMERO-GONZÁLEZ, R., MARTÍNEZ-VIDAL J. L., GARRIDO-FRENICH, A. Analysis of triphenylmethane dyes in seafood products: a review of extraction methods and determination by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Analytical Methods**. n. 5, p. 3434–3449. 2013.
- [51] LIU, R., CHEN, H., BAI, X., HUANG, Y., LI, H., LONG, W., LAN, W., SHE, Y., FU, H. Visual classification for sesame oil adulteration detection and quantification of compounds used as adulterants using flavor compounds targeted array sensor in combination with *DD-SIMCA* and PLS. **Sensors and Actuators: B. Chemical**, v. 357, 2022.
- [52] LÓPES-GUTIÉRREZ, N., ROMERO-GONZÁLEZ, R., PLAZA-BOLAÑOS P., MARTÍNEZ-VIDAL J. L., GARRIDO-FRENICH, A. Simultaneous and Fast Determination of Malachite Green, Leucomalachite Green, Crystal Violet, and Brilliant Green in Seafood by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**. v. 6. n. 2. p. 406–414. 2012.
- [53] MAŁYJUREK, Z. VITALE, R., WALCZAK, B. Different strategies for class model optimization. A comparative study. **Talanta**, v. 215, 2020.
- [54] MAPA. Instrução Normativa número 5 de 23 de abril de 2019. 2019.
- [55] MAROTHU V. K., GORREPATI, M., VUSA, R. Electromembrane extraction – A novel extraction technique for pharmaceutical, chemical, clinical, and environmental analysis. **Journal of Chromatographic Science**. v. 51, n. 7, p. 619–631, 2013.
- [56] MARTINS, R. O., DE ARAÚJO, G. L., SIMAS, R. C., CHAVES, A. R. Electromembrane extraction (EME): Fundamentals and applications. **Talanta Open**, v. 7, p. 1–13, 2023.
- [57] MCHUGH, S. Profundidade de bits. Cambridge in Colour, 2005. Disponível em: <<https://www.cambridgeincolour.com/pt-br/tutoriais/bit-depth.htm>>. Acesso em: 24 set. 2021.

- [58] MIRZAJANI, R., BAGHEBAN, M., Simultaneous preconcentration and determination of malachite green and fuchsine dyes in seafood and environmental water samples using nano-alumina-based molecular imprinted polymer solid-phase extraction. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 96, p.576–594, 2016.
- [59] MITROWSKA, K.; POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J. Determination of malachite green and leucomalachite green residues in water using liquid chromatography with visible and fluorescence detection and confirmation by tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1207, p. 94–100, 2008.
- [60] NAZARIO, C., FUMES, B., DA SILVA, M.R., LANÇAS, F.M. New materials for sample preparation techniques in bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 81–95, 2017.
- [61] ORLANDO, R.M., NASCENTES, C.C., BOTELHO, B.G., MOREIRA, J.S., COSTA, K.A., BORATTO, V.H.M. Development and Evaluation of a 66-Well Plate Using a Porous Sorbent in a Four-Phase Extraction Assisted by Electric Field Approach **Analytical Chemistry**, v. 91, p. 6471–6478, 2019.
- [62] ORLANDO, R.M., DVORÁK, M., KUBÁŇ, P. Electroextraction of methylene blue from aqueous environmental samples using paper points coupled with hollow fiber membranes. **Talanta**, Vol. 273, 2024.
- [63] OEDIT, A., DUIVELSHOF, B., LINDENBURG, P.W., HANKEMEIER, T. Integration of three-phase microelectroextraction sample preparation into capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.1610, p. 460570, 2020.
- [64] OEDIT, A., HANKEMEIER, P.W., LINDENBURG, T. On-line coupling of two-phase microelectroextraction to capillary electrophoresis - Mass spectrometry for metabolomics analyses. **Microchemical Journal**, v. 162, p. 105741, 2021.
- [65] OGUGBUE, C. J., SAWIDIS, T. Bioremediation and Detoxification of Synthetic Wastewater Containing Triarylmethane Dyes by *Aeromonas hydrophila* Isolated from Industrial Effluent. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1–11, 2011.
- [66] PEDERSEN-BJERGAARD, S., HUANG, C., GJELSTAD, A. Electromembrane extraction – Recent trends and where to go. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, p.141–147, 2017.
- [67] PEDERSEN-BJERGAARD, S. & RASMUSSEN, K.E. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. New concept for rapid sample preparation of biological fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, p. 183–190, 2006.
- [68] PEDERSEN-BJERGAARD, S., *et al.* Electromembrane extraction - Recent trends and where to go. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v. 7, n. 3, p. 141–147, 2017.
- [69] PÉREZ-FERNÁNDEZ, V.; MAINERO ROCCA, L.; TOMAI, P.; FANALI, S.; GENTILI, A. Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography, and mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 983, p. 9–41, 2017.

- [70] PEDERSEN-BJERGAARD, S. Electromembrane extraction-looking into the future. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, p.1687–1693, 2019.
- [71] POMERANTSEV, A.L. Acceptance areas for multivariate classification derived by projection methods. **Journal of Chemometrics**, v. 22, p. 601–609, 2008.
- [72] POMERANTSEV, A.L. & RODIONOVA, O.Y. Concept and role of extreme objects in PCA/SIMCA. **Journal of Chemometrics**, v. 28: p. 429–438, 2014.
- [73] POMERANTSEV, A.L. & RODIONOVA, O.Y. Popular decision rules in SIMCA: Critical review. **Journal of Chemometrics**, 2020.
- [74] PRATS-MONTALBÁN, J. M., DE JUAN, A., FERRER, A. Multivariate image analysis: A review with applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.107, p. 1–27, 2011.
- [75] RATHI, B.S.; KUMAR, P.S.; VO, D.V.N. Critical review on hazardous pollutants in water environment: Occurrence, monitoring, fate, removal technologies and risk assessment. **Science of The Total Environment**, v. 797, p.1–22, 2021.
- [76] RATERINK, R.J., LINDENBURG, P.W., VREEKEN, R.J., HANKEMEIER, T. Three-phase electroextraction: a new (online) sample purification and enrichment method for bioanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 7762–7768, 2013.
- [77] RAHMANI, T., RAHIMI, A., NOJAVAN, S. Study on electrical current variations in electromembrane extraction process: Relation between extraction recovery and magnitude of electrical current. **Analytica Chimica Acta**. p. 1–10, 2015.
- [78] RAZI-ASRAMI, M., GHASEMI, J.B., AMIRI, N., SADEGHI, S.J. Simultaneous spectrophotometric determination of crystal violet and malachite green in water samples using partial least squares regression and central composite design after preconcentration by dispersive solid-phase extraction. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 196, p. 189–196, 2017.
- [79] REILE, C. G., RODRÍGUEZ, M. S., FERNANDES, D. D. S., GOMES, A. A., DINIZ, P. H. G. D., DI ANIBAL, C. V. Qualitative and quantitative analysis based on digital images to determine the adulteration of ketchup samples with Sudan I dye. **Food Chemistry**, v. 328, 2020.
- [80] REZAEI, N., SEIDI, S., FOTOUHI, M. On-chip electromembrane extraction using deep eutectic solvent and red-green-blue analysis by quick-response code readable customized application on a smartphone for measuring salicylic acid in pharmaceutical and plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1708, 2023.
- [81] REZAEI, N., DANESHVAR, S. S., NASIHATKON, B., SEIDI, S. REZAZADEH, M. The application of barcode readable assay and linear regression RGB analysis using a customized smartphone app in on-chip electromembrane extraction for simultaneous determination of heavy metal ions. **Microchemical Journal**, v. 197, 2024.

- [82] RODIONOVA, O.Y., OLIVERI, P., POMERANTSEV, A.L. Rigorous and compliant approaches to one-class classification. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 159, p. 89–96, 2016.
- [83] ŠAFAŘÍK, I., ŠAFAŘÍKOVÁ, Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water. **Water Research**. v. 36, p. 196–200. 2002.
- [84] SANTANA, F.B.; SOUZA, A.M.; ALMEIDA, M.R.; BREITKREITZ, M.C.; FILGUEIRAS, P.R.; SENA, M.M., POPPI, R.J. Experimento didático de quimiometria para classificação de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio combinado com análise discriminante por mínimos quadrados parciais: um tutorial, parte V. **Química Nova**, v. 43, p. 371–381, 2020.
- [85] SADRABADI, M.R., RAHMANI, M. Development of a liquid-phase micro-extraction based on the use of deep eutectic solvent for pre-concentration and measurement of malachite green in water and fish samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 1 p. 1–16, 2023.
- [86] SCHREINER, V.C.; LINK, M.; KUNZ, S.; SZÖCS, E.; SCHARMÜLLER, A.; VOGLER, B.; BECK, B.; BATTES, K.P.; CIMPEAN, M.; SINGER, H.P.; HOLLENDER, J.; SCHÄFER, R.B. Paradise lost? Pesticide pollution in a European region with considerable amount of traditional agriculture. **Water Research**, v. 188, p. 1–10, 2021.
- [87] SEIDI, S., RANJBARA, M. H., BAHARFAR, M., SHANEHSAZ, M., TAJIK, M. A promising design of microfluidic electromembrane extraction coupled with sensitive colorimetric detection for colorless compounds based on quantum dots fluorescence. **Talanta**, v. 194, p. 298–307, 2019.
- [88] SEIDI, S., YAMINI, Y., REZAZADEH, M., ESRAFILI, A. Low-voltage electrically-enhanced microextraction as a novel technique for simultaneous extraction of acidic and basic drugs from biological fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 1243, p. 6–13, 2011.
- [89] SEIP, K. F., *et al.* Electromembrane extraction: Distribution or electrophoresis? **Electrophoresis**. v.34, p. 792–799, 2013.
- [90] SHIOGIRI, N. S., DA CRUZ, C., FERNANDES, M. N. Antimicrobianos utilizados no controle de doenças de peixe em sistemas de cultivo. In: TAVARES-DIAS, M., MARIANO, W.S. (Org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. São Carlos, Editora Pedro & João, 2015, 245–262.
- [91] SHOJAEI, S., RAHMANI, M., KHAJEH, M., ABBASIAN, A.R. Ultrasound assisted based solid phase extraction for the preconcentration and spectrophotometric determination of malachite green and methylene blue in water samples. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 16, 2023.

- [92] ŠLAMPOVÁ, A.; KUBÁŇ, P. Two-phase micro-electromembrane extraction with a floating drop free liquid membrane for the determination of basic drugs in complex samples. **Talanta**, v. 206, p. 1–8, 2020.
- [93] ŠLAMPOVÁ, A.; KUBÁŇ, P. Volatile free liquid membranes for electromembrane extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 1182, p. 1–10, 2021.
- [94] ŠLAMPOVÁ, A.; KUBÁŇ, P. Micro-electromembrane extraction through volatile free liquid membrane for the determination of β -lactam antibiotics in biological and environmental samples. **Talanta**, v. 252, p. 32–39, 2023.
- [95] SOLANA-ALTABELLA, A.; SÁNCHEZ-IRANZO, M.H.; BUESO-BORDILS, J.I.; LAHUERTA-ZAMORA, L.; MELLADO-ROMERO, A.M. Computer vision-based analytical chemistry applied to determining iron in commercial pharmaceutical formulations. **Talanta**. 2018, 188, 349–355.
- [96] SOUSA, D. V. M., PEREIRA, F. V., NASCENTES, C. C., MOREIRA, J. S., BORATTO, V. H. M., ORLANDO, R. M. Cellulose cone tip as a sorbent material for multiphase electrical field-assisted extraction of cocaine from saliva and determination by LC-MS/MS. **Talanta**, v. 208, 2020.
- [97] SOUSA, D.V.M.; PEREIRA, F.V.; BORATTO, V.H.M.; ORLANDO, R.M. Multiphase electroextraction as a simple and fast sample preparation alternative for the digital image determination of doxorubicin in saliva. **Talanta**, v. 255, p. 1–6, 2023.
- [98] SRIVASTAVA, S.; SINHA, R.; ROY, D. Toxicological effects of malachite green. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 319–329, 2004.
- [99] STAMMATI, A., NEBBIA, C., DE ANGELIS, I., ALBO, A. G., CARLETTI, M., REBECCHI, C., ZAMPAGLIONI, F., DACASTO, M. Effects of malachite green (MG) and its major metabolite, leucomalachite green (LMG), in two human cell lines. **Toxicology in Vitro**. v. 19. p. 853–858. 2005.
- [100] TKACZYK, A.; MITROWSKA, K.; POSYNIAK, A. Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review. **Science of The Total Environment**, v.717, p.1–19, 2020.
- [101] THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, 74, 835–855, 2002.
- [102] UZCAN, F., ERBAS, Z., SOYLAK, M. Supramolecular solvent-based liquid phase microextraction of malachite green at trace level from water samples for its UV–vis spectrophotometric detection. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 99, p. 595–605, 2019.
- [103] VIANA, J.S. **Preparo de amostras assistido por campo elétrico para determinação de verde malaquita em água de cultivo de peixes por LC-DAD-MS/MS**. Dissertação – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

- [104] VIANA, J.S.; DE FREITAS, M.C.; BOTELHO, B.G.; ORLANDO, R.M. Large-volume electric field-assisted multiphase extraction of malachite green from water samples: A multisample device and method validation. **Talanta**, v. 222, p. 1–8, 2021.
- [105] VITALE, R. COCCHI, M., BIANCOLILLO, A., RUCKEBUSCH, C., MARINI, F. Class modelling by Soft Independent Modelling of Class Analogy: why, when, how? A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 1270, 2023.
- [106] WAJID ALI KHAN, W. A., ARAIN, M. B., BIBI, H., TUZEN, M., SHAH, N., ZADA, A. Selective electromembrane extraction and sensitive colorimetric detection of copper (II). **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, 2020.
- [107] WANG, Y., *et al.* The Metabolism of Methylene Blue and Its Derivatives in Japanese Eel (*Anguilla Japonica*). **Journal of Ocean University of China**. v. 19, p. 653–658. 2020.
- [108] WUETHRICH, A., *et al.* The electric field – An emerging driver in sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 80, p. 604–611, 2016.
- [109] XU, K.; GUO, M.; HUANG, Y.; LI, X.; SUN, J. Rapid and sensitive detection of malachite green in aquaculture water by electrochemical preconcentration and surface-enhanced Raman scattering. **Talanta**. 2018, 180, 383–388.
- [110] XU, Y., TIAN, X., ZHANG, X., GONG, X., LIU, H., ZHANG, H., & HUANG, H. Simultaneous Determination of Malachite Green, Crystal Violet, Methylene blue and the Metabolite Residues in Aquatic Products by Ultra-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**. v. 50, p. 591–597, 2012.
- [111] YU, S., YUAN, X., YANG, J., YUAN, J., SHI, J., WANG, Y., CHEN, Y., GAO, S. A chemometric-assisted method for the simultaneous determination of malachite green and crystal violet in water based on absorbance–pH data generated by a homemade pH gradient apparatus. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 150, p. 403–408, 2015.
- [112] YUE H.H. & QIN J.S. Reconstruction-based fault identification using a combined index. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 40, p. 4403–4414, 2001.
- [113] YAMINI, Y., SEIDI, S., & REZAZADEH, M. Electrical field-induced extraction and separation techniques: Promising trends in analytical chemistry - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 814, p. 1–22, 2014.
- [114] ZAHARIA, C., Suteu, D. Textile Organic Dyes –Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents – A Critical Overview. **In Tech Open**. 2012.
- [115] ZANONI, M. V. B., YAMANAKA, H. **Corantes: Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento**. Cultura acadêmica Editora. São Paulo. 2016.

- [116] ZARGHAMPOUR, F., YAMINI, Y., BAHARFAR, M. JAVADIAN, G., FARAJI, M. On-chip electromembrane extraction followed by sensitive digital image-based colorimetry for determination of trace amounts of Cr (VI). **Analytical Methods**, v. 12, p. 483–491, 2020.
- [117] ZARGHAMPOUR, F., YAMINI, Y., DIL, E. A., SHOKROLLAHI, A., JAVADIAN, G. A new microfluidic-chip device followed by sensitive image analysis of smart phone for simultaneous determination of dyes with different acidic–basic properties. **Talanta**, v. 254, 2023.
- [118] ZAROUDI, F., NASIHATKON, B., HOSSEINZADEH, R., FAKHARI, A. R., SEIDI, S. Miniaturized on-chip electromembrane extraction with QR code-based red-green-blue analysis using a customized Android application for copper determination in environmental and food samples. **Food Chemistry**, v. 414, 2023.
- [119] ZHANG, L., ZHANG, Y., TANG, Y., LI, X., ZHANG, X., LI, C., XU, S. Magnetic solid-phase extraction based on Fe₃O₄/graphene oxide nanoparticles for the determination of malachite green and crystal violet in environmental water samples by HPLC. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 98, p. 215–228, 2018.
- [120] ZHANG, Z., ZHOU, K., BU, Y., SHAN, Z., LIU, J., WU, X., YANG, L., CHEN, Z. Determination of malachite green and crystal violet in environmental water using temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 4, n. 2, p. 429–433, 2012.
- [121] ZHOU, X., ZHANG, J., PAN, Z., LI, D. Review of methods for the detection and determination of malachite green and leuco-malachite green in aquaculture. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. 2018.
- [122] ZHOU, X., ZHANG, J., PAN, Z., LI, D. Review of methods for the detection and determination of malachite green and leuco-malachite green in aquaculture. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. 2018.
- [123] ZHU, D., LI, Q., HONEYCHURCH, K. C., PIANO, M., CHEN, G. Determination of Malachite Green in Aquaculture Water by Adsorptive Stripping Voltammetry. **Analytical Letter**. v. 49, n. 9, p. 1436-1451, 2016
- [124] ZONTOV, Y.V., O.Y. RODIONOVA, O.Y., KUCHERYAVSKIY, S.V., POMERANTSEV, A.L. DD-SIMCA – A MATLAB GUI tool for data driven SIMCA approach. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 167, p. 23–28, 2017.

**APÊNDICE A – Proporções das misturas dos corantes em termos de
concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)**

Amostra	VM	VG	AM	Amostra	VM	VG	AM
1	3	2	3	54	2	0	0
2	5	4	9	55	0	2	0
3	7	10	8	56	2	2	0
4	3	7	6	57	0	2	2
5	13	12	15	58	2	0	2
6	14	15	9	59	2	2	2
7	0	0	7	60	0	0	3
8	9	14	7	61	3	0	0
9	9	7	13	62	0	3	0
10	12	4	2	63	3	3	0
11	5	13	0	64	0	3	3
12	15	5	5	65	3	0	3
13	2	6	2	66	3	3	3
14	11	5	7	67	0	4	1
15	10	9	4	68	2	2	5
16	13	0	9	69	2	5	1
17	1	13	9	70	3	2	2
18	13	0	15	71	1	1	4
19	7	7	8	72	3	2	2
20	14	14	4	73	1	3	1
21	3	12	11	74	2	2	0
22	14	0	8	75	1	5	5

23	13	1	5	76	1	2	2
24	11	8	6	77	3	5	5
25	15	13	10	78	4	0	1
26	3	4	5	79	1	2	1
27	6	5	4	80	4	0	5
28	12	14	2	81	4	3	4
29	6	12	10	82	3	2	3
30	8	10	6	83	0	3	4
31	8	9	9	84	1	5	3
32	6	13	1	85	2	1	4
33	4	15	12	86	2	0	0
34	4	5	2	87	3	5	4
35	0	5	2	88	3	1	2
36	5	8	2	89	1	4	2
37	5	2	4	90	1	1	1
38	14	13	5	91	3	2	5
39	14	15	1	92	1	0	1
40	4	2	1	93	2	0	4
41	6	4	14	94	3	3	4
42	7	15	15	95	1	4	5
43	3	4	6	96	1	0	5
44	11	9	13	97	3	5	0
45	4	14	2	98	2	0	0
46	0	0	1	99	0	0	4
47	1	0	0	100	4	0	0

48	0	1	0	101	0	4	0
49	1	1	0	102	4	4	0
50	0	1	1	103	0	4	4
51	1	0	1	104	4	0	4
52	1	1	1	105	4	4	4
53	0	0	2				

APÊNDICE B – Gráfico de extremos para o modelo DD-SIMCA construído com dados espectrofotométricos com 6 CP e $\alpha = 0,05$

