

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Fabio Silvestre Bazilio

**CONTROLE SANITÁRIO DE MATERIAIS PLÁSTICOS, COM AÇÃO
ANTIMICROBIANA PELA ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA,
DESTINADOS AO CONTATO COM ALIMENTOS**

Rio de Janeiro

2020

Fabio Silvestre Bazilio

CONTROLE SANITÁRIO DE MATERIAIS PLÁSTICOS, COM AÇÃO
ANTIMICROBIANA PELA ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA,
DESTINADOS AO CONTATO COM ALIMENTOS

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira
Abrantes

Rio de Janeiro

2020

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Bazilio, Fabio Silvestre

Controle sanitário de materiais plásticos, com ação antimicrobiana pela adição de nanopartículas de prata, destinados ao contato com alimentos. / Fabio Silvestre Bazilio. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020.

126 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes

1. Nanotecnologia. 2. Nanopartículas de prata. 3. Migração. 4. Embalagens ativas antimicrobianas. 5. Alimentos. I. Título.

Sanitary control of plastic materials, with antimicrobial action by the addition of silver nanoparticles, intended for contact with food

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Fabio Silvestre Bazilio

CONTROLE SANITÁRIO DE MATERIAIS PLÁSTICOS, COM AÇÃO
ANTIMICROBIANA PELA ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA,
DESTINADOS AO CONTATO COM ALIMENTOS

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira
Abrantes

Aprovado em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS

Bráulio Soares Archanjo (Doutor)

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro

Lisia Maria Gobbo dos Santos (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS

ORIENTADOR

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutora) - Orientadora

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS

Dedico este trabalho as minhas amadas
filha e esposa, que me dão forças para
seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

À minha amada esposa, Adherlene, por todo o amor, carinho, apoio e dedicação. Obrigado pela compreensão e suporte nos momentos mais difíceis.

À minha amada filha Sophia por todo o carinho e momentos de alegria.

À minha orientadora, Profa. Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes, pelo incentivo, orientação, apoio, compreensão, confiança e conhecimentos transmitidos. Obrigado pela contribuição na minha vida acadêmica e por tanta influência na minha vida profissional.

Aos meus pais, Jorge e Marilda, por todo amor, carinho, dedicação e ensinamentos que me conduzem. Obrigado pelo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção de meus próprios valores.

À minha irmã, Daiana, pelo carinho, amizade e momentos de diversão. Ao meu cunhado, Igor, pela amizade e companheirismo.

Aos meus tios, Dalila e Celso, pelo amor, carinho e dedicação.

A toda minha família pelo amor, carinho e dedicação.

Aos meus amigos do laboratório, Thomas, Sônia e Silvan, pelo apoio, colaboração e amizade. Obrigado pelo suporte de fundamental importância e pelos momentos de descontração.

À Lísia, Cristiane e Santos do setor de contaminantes inorgânicos/DQ por permitir que os ensaios em spICP-MS pudessem ser realizados. Além de toda a ajuda, orientação e dedicação.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, pela disponibilização dos laboratórios para o desenvolvimento dos ensaios.

Ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, pelo Apoio financeiro.

Ao Inmetro pelo projeto firmado, possibilitando a realização dos ensaios por MEV.

Ao Bráulio Archanjo e Carlos Senna, do laboratório de microscopia do Inmetro, pela parceria nos ensaios, ensinamentos e orientação.

Ao professor e amigo Sérgio pelos ensinamentos de estatística, fundamentais nesse trabalho.

Aos professores e coordenadores do Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde pelos ensinamentos e dedicação aos alunos do curso.

A todos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde que de alguma forma contribuíram para o sucesso dessa jornada.

Ao programa INOVA/Fiocruz pelo apoio financeiro.

A ciência não é uma ilusão, mas seria uma ilusão acreditar que poderemos encontrar noutra lugar o que ela não nos pode dar.

Sigmund Freud

RESUMO

O presente trabalho apresenta o desenvolvimento e a validação intralaboratorial de um método para o controle sanitário de materiais plásticos com ação antimicrobiana, pela adição de prata, avaliando a concentração de prata total nos polímeros e a migração de nanopartículas de prata dos materiais para alimentos em contato. Foram analisados cinco materiais com função antimicrobiana, pela adição de prata. O teste de migração foi realizado por meio do contato de 1 dm² do material plástico com 50 mL de simulante alimentar, por 10 dias à 20 °C para amostras destinadas ao contato com leite e 10 dias à 40 °C para os demais materiais. As concentrações de migração e os tamanhos médios de partículas de prata foram determinados por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, executado no modo de detecção individual (spICP-MS). O método foi validado intralaboratorialmente e considerado adequado ao propósito. Adicionalmente, foi realizada a caracterização da prata presente no material plástico, quanto ao tamanho da partícula e forma, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com identificação por espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDS). As amostras analisadas apresentaram concentrações de prata total entre não detectável (< 44 ng kg⁻¹) e 473 ng kg⁻¹ do simulante. Todas as amostras apresentaram migração de nanopartículas de prata, sendo as concentrações encontradas entre 0,00433 e 1,35 ng kg⁻¹. O estudo de migração indicou a presença de nanopartículas de prata em todos os simulantes alimentares, com tamanhos entre 26 e 95 nm. Todas as amostras foram consideradas insatisfatórias em relação às legislações brasileira e europeia. O tamanho médio das partículas determinados para o simulante ácido acético 3 % foi superior ao apresentado, para a mesma amostra, para a água desionizada, que foi superior ao apresentado para o etanol 95 %, com médias de 82 nm, 52 nm e 29 nm respectivamente. Nas imagens obtidas por MEV com EDS, foi possível observar a presença de nanopartículas de prata esféricas, entre 17 e 80 nm. O ensaio por spICP-MS apresentou incertezas de medição expandidas, entre 8,7 e 11,6 % para a concentração de partículas, entre 4,2 e 8,8 % para o tamanho da partícula e entre 16 e 21 % para a concentração de prata dissolvida, crescendo para entre 62 a 71 %, para concentrações próximas ao limite de detecção.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanopartículas de prata. Migração. Embalagens ativas antimicrobianas. Alimentos.

ABSTRACT

The present work presents the development and intra-laboratory validation of a method for the sanitary control of plastic materials with antimicrobial action, by adding silver, evaluating the concentration of total silver in the polymers and the migration of silver nanoparticles from the materials in contact with food. Five materials with antimicrobial function, by adding silver, were analyzed. The migration test was carried out by contacting 1 dm² of the plastic material with 50 mL of food simulant, for 10 days at 20 °C for samples destined for contact with milk and 10 days at 40 °C for the other materials. Migration concentrations and average silver particle sizes were determined by mass spectrometry with inductively coupled plasma, performed in single particle mode (spICP-MS). The method was validated in-house and considered adequate for the purpose. Additionally, the characterization of the silver present in the plastic material, in terms of particle size and shape, was performed by scanning electron microscopy (SEM) with identification by Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX). The analyzed samples showed total silver concentrations between undetectable (<44 ng kg⁻¹) and 473 ng kg⁻¹ of the simulant. All samples showed migration of silver nanoparticles, with concentrations found between 0.00433 and 1.35 ng kg⁻¹. The migration study indicated the presence of silver nanoparticles in all food simulants, with sizes between 26 and 95 nm. All samples were considered unsatisfactory in relation to Brazilian and European legislation. The average particle size determined for the 3% acetic acid simulant was higher than that presented, for the same sample, for deionized water, which was larger than that presented for 95% ethanol, with averages of 82 nm, 52 nm and 29 nm respectively. In the images obtained by SEM with EDX, it was possible to observe the presence of spherical silver nanoparticles, between 17 and 80 nm. The spICP-MS assay showed expanded measurement uncertainties, between 8.7 and 11.6% for the particle concentration, between 4.2 and 8.8% for the particle size and between 16 and 21% for the concentration of dissolved silver, growing to between 62 and 71%, for concentrations close to the detection limit.

Keywords: Nanotechnology. Silver nanoparticles. Migration. Active antimicrobial packaging. Foods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sinal contínuo referente ao metal dissolvido (a) e sinal referente à detecção de partículas (b)	39
Figura 2 - Aquisição do sinal no modo padrão (a) e no modo de detecção individual (b)	40
Figura 3 - Conversão da curva de prata dissolvida (a) em fluxo de massa (b).....	41
Figura 4 - Fluxograma do ensaio de migração	51
Figura 5 - Fluxo de preparo das soluções de trabalho de prata dissolvida	54
Figura 6 - Fluxo de preparo das soluções de nanopartículas de prata em água mineral	73
Figura 7 - Fluxo de preparo das soluções de nanopartículas de prata em água desionizada	76
Figura 8 - Imagens adquiridas por MEV, para a amostra de PVC (AM-04) calcinada	83
Figura 9 - Espectrograma da partícula observada na amostra de PVC (AM-04)	84
Figura 10 - Imagens adquiridas por MEV, para a amostra de PEAD (AM-02) calcinada	85
Figura 11 - Imagens adquiridas por MEV, para a amostra de PEBD (AM-03) calcinada	86
Figura 12 - Espectrograma das áreas (a) 1, (b) 2 e (c) 3 da amostra de PEAD (AM-02)	87
Figura 13 - Espectrograma EDS das áreas (a) 1, (b) 2 e (c) 3 da amostra de PEBD (AM-03)	88
Figura 14 - Curva de fluxo de massas final em solvente	90
Figura 15 - Gráfico de Durbin-Watson ($e_i \times e_{i-1}$)	91
Figura 16 - Curva analítica final em matriz	94
Figura 17 - Gráfico de Durbin-Watson ($e_i \times e_{i-1}$), curva em matriz	96
Figura 18 - Comparação entre as curvas analíticas preparadas na presença do solvente (azul) e da matriz (vermelho)	98
Figura 19 - Histograma da distribuição de tamanho das partículas de prata da solução S _{s40}	102
Figura 20 - Histograma da distribuição de tamanho das partículas de prata da solução S _{s80}	103

Figura 21 - Histograma da distribuição de tamanho das partículas de prata da solução Ss ₄₀₊₈₀	104
Figura 22 - Concentrações de prata total nas amostras poliméricas determinadas por spICP-MS	106
Figura 23 - Concentrações da migração de partículas de prata determinadas para as amostras AM-01 a AM-05, por spICP-MS	107
Figura 24 - Concentrações da migração de prata dissolvida determinadas para as amostras AM-01 a AM-05, por spICP-MS	108
Figura 25 - Concentrações de prata total (prata dissolvida + partículas de prata) determinadas, por spICP-MS, para as soluções provenientes do ensaio de migração em simulante alimentar	112

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Simulantes alimentares estabelecidos pela RDC nº 51 de 26 de novembro de 2010	32
Quadro 2 - Seleção de simulantes para cada tipo de alimento	33
Quadro 3. Condições para o ensaio de migração com os simulantes alimentares A, B, C e D'	34
Quadro 4 - Condições para o ensaio de migração com o simulante alimentar D.....	35
Quadro 5 - Condições dos ensaios de migração segundo a RDC nº 51 da ANVISA de 26 de novembro de 2010.....	51
Quadro 6 - Programa para digestão das amostras por micro-ondas.....	58
Quadro 7 - Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade.....	67
Quadro 8 - Amostras ensaiadas.....	82

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Massa de prata em cada evento ($\mu\text{g/ evento}$).....	55
Equação 2 - Diâmetro da partícula em nm.....	55
Equação 3 - Concentração em número de partículas por mL ($\text{partículas mL}^{-1}$)	56
Equação 4 - Concentração em número de partículas por kg de alimento ($\text{partículas kg}^{-1}$)	56
Equação 5 - Concentração em massa de partículas por kg de alimento (ng kg^{-1})	57
Equação 6 - Concentração de prata dissolvida na solução de migração, em ng por kg de alimento (ng kg^{-1}).....	57
Equação 7 - Concentração de prata total, em $\mu\text{g g}^{-1}$	59
Equação 8 - Recuperação da determinação da prata total em %	60
Equação 9 - Inclinação da reta ajustada	61
Equação 10 - Interseção da reta ajustada.....	62
Equação 11 - Resíduo ei	62
Equação 12 - Coeficiente de determinação do ajuste R^2	62
Equação 13 - Resíduo padronizado Jackknife	62
Equação 14 - Valor normal esperado qi	64
Equação 15 - Coeficiente de correlação Req	64
Equação 16 - Coeficiente de correlação crítico $R_{crit}(n)$	64
Equação 17 - Estatística calculada tL do teste de homocedasticidade.....	65
Equação 18 - Estatística d do teste de independência dos resíduos	66
Equação 19 - Limite inferior do teste de independência dos resíduos dL	66
Equação 20 - Limite superior do teste de independência dos resíduos dU	66
Equação 21 - Estatística F do teste de homogeneidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas (Efeito de matriz)	69
Equação 22 - Estatística tb (inclinação) do teste t com variâncias combinadas (Efeito de matriz)	70
Equação 23 - Estatística ta (interseção) do teste t com variâncias combinadas (Efeito de matriz)	70
Equação 24 - Estatística tb' (inclinação) do teste t com variâncias amostrais não homogêneas (Efeito de matriz)	70

Equação 25 - Estatística ta' (intersecção) do teste t com variâncias amostrais não homogêneas (Efeito de matriz)	70
Equação 26 - Graus de liberdade do teste t com variâncias amostrais não homogêneas (Efeito de matriz)	70
Equação 27 - Limite de detecção de tamanho ($LODT$).....	71
Equação 28 - Limite de detecção da concentração de prata dissolvida ($LODd$)	71
Equação 29 - Limite de detecção de concentração de partículas ($LODp$)	71
Equação 30 - Desvio padrão relativo $DPRr$	74
Equação 31 - Desvio padrão relativo previsto de reprodutibilidade $DPRPR$	75
Equação 32 - Desvio padrão relativo previsto $DPRPr$	75
Equação 33 - Razão de Horwitz do teste de repetibilidade.....	75
Equação 34 - Desvio padrão de precisão intermediária relativo ao tempo $sitempo$..	75
Equação 35 - Desvio padrão relativo de precisão intermediária $DPRprecint$	75
Equação 36 - Razão de Horwitz do teste de precisão intermediária	76
Equação 37 - Recuperação calculada do método de splCP-MS $RM\%$	77
Equação 38 - Incerteza associada à curva analítica $uX0$ (Concentração de prata dissolvida e tamanho médio da partícula)	78
Equação 39 - Incerteza associada à repetibilidade $u(rep)$ (Concentração de prata dissolvida e tamanho médio da partícula)	78
Equação 40 - Incerteza combinada final $ucomb$ (concentração de prata dissolvida e tamanho médio da partícula).....	79
Equação 41 - Incerteza associada à repetibilidade $u(rep)CM$ (concentração de partículas).....	79
Equação 42 - Incerteza combinada final $ucomb$ (concentração de partículas)	80
Equação 43 - Incerteza expandida U (concentração de partículas)	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massas medidas das amostras de polímeros	59
Tabela 2 - Preparo das soluções de trabalho do ensaio de linearidade	61
Tabela 3 - Preparo das soluções de trabalho do ensaio de efeito matriz	68
Tabela 4 - Preparo das soluções de trabalho do ensaio de linearidade	89
Tabela 5 - Normalidade dos resíduos da regressão (teste de Ryan-Joiner) - R_{req} e R_{crit} calculados	90
Tabela 6 - Homoscedasticidade dos resíduos da regressão (teste de Levene) - Resultados Obtidos	91
Tabela 7 - Independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin-Watson) - Limites d_L e d_U calculados	91
Tabela 8 - Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade	92
Tabela 9 - Preparo das soluções de trabalho do ensaio de efeito matriz	93
Tabela 10 - Normalidade dos resíduos da regressão (teste de Ryan-Joiner) - R_{req} e R_{crit} calculados	94
Tabela 11 - Homoscedasticidade dos resíduos da regressão (teste de Levene) - Resultados Obtidos	95
Tabela 12 - Independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin-Watson) - Limites d_L e d_U calculados	95
Tabela 13 - Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade (DEHP)	96
Tabela 14 - Avaliação da homoscedasticidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas	97
Tabela 15 - Comparação das inclinações e interseções das curvas	97
Tabela 16 - Médias e desvios padrão calculados para o tamanho médio e para a concentração de prata dissolvida	99
Tabela 17 - Limites de detecção de tamanho ($LODT$) e de concentração de prata dissolvida ($LODd$)	99
Tabela 18 - Avaliação da Repetibilidade	100
Tabela 19 - Avaliação da Precisão Intermediária (Tamanho médio de partículas) .	101
Tabela 20 - Avaliação da Precisão Intermediária (Concentração de partículas)	101

Tabela 21 - Avaliação da Precisão Intermediária (Concentração de prata dissolvida)	101
Tabela 22 - Recuperações calculadas para os tamanhos de partículas de prata de 40 e 80 nm	105
Tabela 23 - Concentrações de prata total nas amostras poliméricas determinadas por spICP-MS	105
Tabela 24 - Concentrações de partículas e de prata dissolvida determinadas, por spICP-MS, nas soluções provenientes do ensaio de migração em simulante alimentar	109

LISTA DE SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBS – Detector de Elétrons Retro Espalhados
CE – Eletroforese Capilar
DAD – Arranjo de diodos
DLS – Espalhamento de Luz Dinâmico
EDS – Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X
EFSA – *European Food Safety Authority*
FAO/WHO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization*
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
ICP AES – Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado
ICP-MS – Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPAC – Instituto Português de Acreditação
ISO – *International Organization for Standardization*
ISO GUM – Guia para a Expressão da Incerteza de Medição
LOAEL – Menor Dose na qual se Observa Efeito Adverso
LOD – Limite de Detecção
MEKC – Cromatografia Eletrocínética Micelar
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MMQO – Método de Mínimos Quadrados Ordinários
MS – Ministério da Saúde
NIST – *National Institute of Standards and Technology*
NOAEL – Nível de Não Observação de Efeito Adverso
PC - Peso corporal
PEAD – Polietileno de Alta Densidade
PEBD – Polietileno de Baixa Densidade
PEN – *Project on Emerging Nanotechnologies*

POP – Procedimento Operacional Padronizado

PVC – Poli (cloreto de vinila)

PVP – Polivinilpirrolidona

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

SCENIHR – *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*

spICP-MS – ICP-MS executado no Modo de Detecção Individual

TE – Eficiência de Transporte

TMAH – Hidróxido de Tetrametilamônio

UE – União Europeia

USP – *United States Pharmacopeia*

VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Vigilância sanitária e segurança alimentar	22
1.2	Embalagens para alimentos	23
1.3	Nanotecnologia.....	24
1.4	Embalagens ativas antimicrobianas.....	25
1.5	Efeitos toxicológicos das nanopartículas de prata	27
1.6	Migração.....	30
1.7	Ensaio de migração.....	31
1.8	Métodos analíticos para a pesquisa de nanopartículas.....	36
1.8.1	Métodos de caracterização de nanopartículas	36
1.8.2	Métodos de quantificação de nanopartículas	36
1.8.2.1	<i>ICP-MS executada no modo de detecção individual</i>	<i>38</i>
1.9	Validação do método	41
1.9.1	Faixa de trabalho.....	42
1.9.2	Curva analítica e linearidade	43
1.9.3	Seletividade	43
1.9.4	Efeito de matriz.....	44
1.9.5	Repetibilidade.....	44
1.9.6	Precisão intermediária.....	45
1.9.7	Limite de detecção	45
1.10	Estimativa da incerteza de medição	45
1.11	Justificativa.....	46
2	OBJETIVO	48
2.1	Objetivo geral.....	48
2.2	Objetivos específicos.....	48
3	METODOLOGIA	49
3.1	Materiais.....	49
3.1.1	Padrões e Reagentes.....	49
3.1.2	Equipamentos.....	49
3.1.3	Seleção das Amostras.....	50
3.2	Ensaio de migração em simulante alimentar	50
3.3	Caracterização das nanopartículas presentes nas amostras.....	52

3.4	Determinação da concentração de prata por spICP-MS	52
3.4.1	Condições de operação do ICP-MS	52
3.4.2	Determinação do fluxo de amostragem	52
3.4.3	Definição da Eficiência de Transporte	53
3.4.4	Preparo da Curva Analítica.....	53
3.4.4.1	<i>Preparo das soluções de trabalho de prata dissolvida</i>	53
3.4.4.2	<i>Curva analítica de prata dissolvida</i>	54
3.4.4.2.1	<u>Definição da curva de fluxo de massas</u>	54
3.4.5	Determinação do tamanho médio de partículas de prata nas soluções provenientes do ensaio de migração.....	55
3.4.6	Determinação da concentração de nanopartículas de prata	56
3.4.7	Determinação da concentração de prata dissolvida	57
3.5	Determinação da concentração de prata total nas amostras poliméricas	58
3.6	Validação da metodologia	60
3.6.1	Avaliação da linearidade da curva analítica.....	61
3.6.1.1	<i>Estimativa dos parâmetros de regressão</i>	61
3.6.1.2	<i>Tratamento de valores extremos</i>	62
3.6.1.3	<i>Teste de normalidade</i>	63
3.6.1.4	<i>Teste de homoscedasticidade</i>	65
3.6.1.5	<i>Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)</i>	66
3.6.1.6	<i>Teste de significância da regressão e do desvio da linearidade</i>	66
3.6.2	Efeito de Matriz.....	68
3.6.2.1	<i>Avaliação dos resultados</i>	69
3.6.3	Determinação dos limites de detecção.....	70
3.6.3.1	<i>Limites de detecção de tamanho e concentração de prata dissolvida</i>	70
3.6.3.2	<i>Limite de detecção de concentração de partículas</i>	71
3.6.4	Seletividade	72
3.6.5	Repetibilidade.....	73
3.6.6	Precisão Intermediária.....	75
3.6.7	Recuperação	76
3.7	Incerteza de medição	77
3.7.1	Incertezas associadas à concentração de prata dissolvida e ao tamanho médio da partícula	77

3.7.1.1	<i>Incerteza associada à curva analítica $u(X_0)$</i>	78
3.7.1.2	<i>Incerteza associada à repetibilidade $u(rep)$</i>	78
3.7.1.3	<i>Estimativa da incerteza combinada final u_{comb}</i>	79
3.7.2	Incerteza associada à concentração de partículas	79
3.7.2.1	<i>Incerteza associada à repetibilidade $u(rep)_{CM}$</i>	79
3.7.2.2	<i>Estimativa da incerteza combinada final u_{comb}</i>	80
3.7.3	Estimativa das incertezas expandidas U	80
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4.1	Amostras selecionadas	82
4.2	Caracterização e identificação	82
4.2.1	Caracterização e identificação de nanopartículas de prata presentes nos materiais plásticos	82
4.3	Validação da metodologia	89
4.3.1	Conversão da curva de prata dissolvida, preparada em água desionizada, em fluxo de massa	89
4.3.2	Avaliação da linearidade da curva de fluxo de massa preparada em solvente	89
4.3.2.1	<i>Tratamento de valores extremos</i>	89
4.3.2.2	<i>Teste de normalidade</i>	90
4.3.2.3	<i>Teste de homoscedasticidade</i>	90
4.3.2.4	<i>Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)</i>	91
4.3.2.5	<i>Teste de significância da regressão e desvio da linearidade</i>	92
4.3.3	Efeito de matriz	93
4.3.3.1	<i>Conversão da curva de prata dissolvida, preparada em matriz, em fluxo de massa</i>	93
4.3.3.2	<i>Avaliação da linearidade da curva preparada na presença da matriz</i>	93
4.3.3.2.1	<u>Tratamento de valores extremos</u>	93
4.3.3.2.2	<u>Teste de normalidade</u>	94
4.3.3.2.3	<u>Teste de homoscedasticidade</u>	94
4.3.3.2.4	<u>Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)</u>	95
4.3.3.2.5	<u>Teste de significância da regressão e desvio da linearidade</u>	96
4.3.3.3	<i>Avaliação do efeito de matriz</i>	97
4.3.4	Determinação dos limites de detecção	98
4.3.4.1	<i>Limites de detecção de tamanho e concentração de prata dissolvida</i>	98

4.3.4.2	<i>Limite de detecção de concentração de partículas</i>	100
4.3.5	Repetibilidade.....	100
4.3.6	Precisão intermediária.....	100
4.3.7	Seletividade.....	102
4.3.8	Recuperação.....	104
4.4	Determinação da concentração de prata total nas amostras poliméricas	105
4.5	Determinação da concentração de migração	107
4.5.1	Estimativa da incerteza de medição.....	114
5	CONCLUSÃO	115
	REFERÊNCIAS	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vigilância sanitária e segurança alimentar

Entende-se por Vigilância Sanitária um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e da circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002). Segundo a Constituição brasileira de 1988 a Saúde é direito de todos e dever do Estado, devendo ser garantida por políticas sociais e econômicas, reduzindo o risco de doença e promovendo acesso universal e igualitário às ações e serviços para promoção, proteção e recuperação da saúde (BRASIL, 1988).

A prática regulatória de alimentos no Brasil foi instituída pelo Decreto nº 68 de 1889 disciplinando a polícia sanitária, com a subsequente definição do seu conjunto de atribuições, incluindo a fiscalização da alimentação pública, consumo e fabrico de bebidas (FIGUEIREDO; RECINE; MONTEIRO, 2017).

O conceito de Segurança Alimentar, iniciado no fim da Primeira Guerra, quando se tornou claro que a segurança nacional de um país dependia da produção e estoque de alimentos, ainda está em construção (CAMPOS; OLIVEIRA; VENDRAMINE, 2014), e está diretamente relacionado à qualidade dos alimentos (BARROS, 2010). Para fins de políticas públicas, dentro de um contexto de promoção à saúde e vigilância sanitária, o conceito de segurança alimentar tem foco na ideia de “alimento seguro”, dando ênfase aos sistemas de qualidade e de boas práticas de fabricação. Outros pontos a serem destacados são a análise de perigos e pontos críticos de controle (CAMPOS; OLIVEIRA; VENDRAMINI, 2014). Dentre os fatores relacionados à qualidade dos alimentos, estão os de natureza física, química e biológica, que atuam no alimento durante o período de tempo compreendido entre a sua produção até o seu consumo (BARROS, 2010).

Um dos maiores problemas relacionados à segurança alimentar é a dificuldade de identificação de responsabilidades na quebra da inocuidade alimentar. Desde a fabricação do alimento, este é manipulado por diversas partes durante a cadeia de fornecimento, podendo haver negligência, nos seus cuidados, por parte do fabricante, revendedores ou mesmo consumidores (CAMPOS; OLIVEIRA; VENDRAMINI, 2014). Assim, o controle da qualidade e da inocuidade dos alimentos

deve ser realizado durante toda a cadeia alimentar, desde a sua produção até o consumo do alimento, in natura ou processado (JACOB, 2014).

1.2 Embalagens para alimentos

O desenvolvimento da tecnologia ampliou a variabilidade de materiais com características adequadas para suprir a grande diversidade de demanda específica, que necessita de uma embalagem para cada determinado tipo de alimento. As características físicas, químicas e sensoriais dos alimentos são bastante variadas, assim como as técnicas para acondicioná-los. Os materiais de embalagem tradicionalmente usados no mercado são o vidro, o papel, o metal e o plástico (ABRANTES, 1998). Todavia, nas últimas décadas houve um expressivo crescimento na indústria de plásticos, favorecendo a produção de embalagens poliméricas (RISH, 1998; BARROS, 2010).

Do ponto de vista da Saúde Pública, o aspecto mais relevante da embalagem é o de conservação dos alimentos, protegendo-os contra agentes externos e da manipulação inadequada. (BARROS, 2010). Outra função de destaque das embalagens é a de informar o consumidor sobre características do produto (GERMANO; GERMANO, 2001). Contudo, alimentos embalados incorretamente podem deteriorar-se e se contaminar, bem como incorporar aos produtos elementos nocivos à saúde (BARROS, 2010). Através da adequação da embalagem ao produto é possível minimizar as alterações indesejáveis, aumentando a estabilidade do alimento. Porém, em função do tempo de contato entre o produto e a embalagem, ainda assim, podem ocorrer interações entre o alimento e sua embalagem (CORSO, 2007).

As embalagens plásticas são as que mais interagem com os alimentos, tanto diretamente, através da migração de monômeros e aditivos para o alimento, quanto indiretamente, através de interações entre o alimento e o ambiente, permitidas pela permeabilidade da embalagem (CORSO, 2007). Os plásticos utilizados em embalagens são constituídos de polímeros de elevado peso molecular, sendo relativamente reduzidas as quantidades de resíduos dos polímeros encontradas em alimentos. Porém, para aplicabilidade dos plásticos, além dos polímeros, são adicionados aditivos ou outras substâncias (SHEPHERD, 1982; UNIÃO EUROPÉIA, 2011), tais como substâncias de baixo peso molecular que podem representar um

risco em potencial à saúde do homem (COULTATE, 2004). Assim, a possibilidade de que ocorra contaminação do produto por constituintes da própria embalagem não pode ser negligenciada (MELO, 2007).

1.3 Nanotecnologia

O conceito de nanotecnologia foi introduzido por Richard Feynman em 1959, em uma reunião da Sociedade Americana de Física. Desde então, a nanotecnologia tornou-se um campo multidisciplinar da ciência e da tecnologia aplicada. A nanotecnologia é a capacidade de trabalhar em uma escala de cerca de 1-100 nm a fim de compreender, criar, caracterizar e utilizar estruturas materiais, dispositivos e sistemas com novas propriedades derivadas de suas nanoestruturas (AZEREDO, 2009).

Devido ao grande número de diferentes definições referentes aos processos, materiais, produtos e aplicações nanotecnológicas, existe a necessidade de harmonização sobre as definições que se relacionam com os setores agrícola e alimentício. A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura/Organização Mundial da Saúde (*Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization - FAO/WHO*), baseada em opiniões da Organização Internacional para Padronização (*International Organization for Standardization - ISO*), Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority - EFSA*) e Comitê Científico dos Riscos para a Saúde Emergentes e Recentemente Identificados (*Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks - SCENIHR*), adotou a seguinte terminologia (FAO/WHO, 2010):

- a) Nanoescala: Tamanho nas dimensões aproximadas de 1-100 nm;
- b) Nanomateriais: qualquer forma de material que possua pelo menos uma dimensão em nanoescala;
- c) Nanopartículas: entidades discretas que apresentam todas as três dimensões em nanoescala.
- d) Nanocompósitos: materiais multifases em que a maior parte dos componentes da fase dispersa tem uma ou mais dimensões da ordem dos nanômetros (100 nm ou menos).

O crescente interesse em nanotecnologia levou ao aumento da produção e aplicação de nanopartículas em todo o mundo (KULTHONG *et al.*, 2010). A aplicação da nanotecnologia oferece importantes perspectivas para o desenvolvimento de produtos e aplicações inovadoras. É esperado que o número de produtos e os volumes de produção envolvendo nanotecnologia irão aumentar no futuro. Devido às propriedades funcionais exclusivas das nanopartículas, estes materiais estão sendo utilizados por muitas indústrias, incluindo os setores agrícola e alimentício. Embora a maior parte destes materiais ainda seja utilizada na indústria, um número crescente de produtos de consumo contendo nanopartículas já pode ser encontrado no mercado. Estes incluem eletrônicos, produtos de limpeza, tintas e revestimentos, produtos esportivos e têxteis, cosméticos e produtos de cuidados pessoais e produtos alimentícios (PETERS *et al.*, 2014; CAPELEZZO *et al.*, 2018; NTIM *et al.*, 2018).

No setor alimentício, a nanotecnologia é utilizada em ingredientes alimentares, aditivos, suplementos e embalagens de alimentos (LIN *et al.*, 2011). Contudo, a maior contribuição desta tecnologia está relacionada às embalagens de alimentos, sendo as aplicações nanotecnológicas para o setor, previstas para aumentar ao longo das próximas duas décadas (METAK; AJAAL, 2013). Os nanomateriais utilizados pelo setor correspondem a um grupo de materiais, geralmente polímeros ou biopolímeros, cuja utilização estaria estritamente relacionada ao fato de apresentar funcionalidades e características que melhoram as propriedades da embalagem em termos de barreira, resistência, elasticidade e clareza ótica. Além disso, os nanomateriais podem ser desenvolvidos de modo a conferir à embalagem outras características, tais como, propriedades antimicrobianas, indicadores visuais da situação dos alimentos, meios de identificação e autenticação, o que facilitaria seu rastreamento. Todos esses aspectos implicariam, direta ou indiretamente, na eficiência da conservação dos alimentos (SILVESTRE; DURACCIO; CIMMINO, 2011).

1.4 Embalagens ativas antimicrobianas

A tecnologia de embalagens de alimentos está em constante evolução, em resposta a desafios crescentes da sociedade moderna. Neste contexto, um dos maiores desafios do setor de embalagens diz respeito ao prolongamento da vida de

prateleira dos alimentos (REALINI; MARCOS, 2014). Isso exige que tecnologias apropriadas possam ser incorporadas em embalagens de alimentos (VANDERROOST *et al.*, 2014). A utilização de embalagens ativas de alimentos é um bom exemplo de inovação que ultrapassa as funções tradicionais da embalagem, onde o produto e a embalagem interagem para prolongar a vida de prateleira de alimentos ou ainda para melhorar a sua segurança ou suas propriedades sensoriais (REALINI; MARCOS, 2014). A maioria dos estudos neste campo é direcionada a embalagens ativas, desenvolvidas com agentes antimicrobianos (BARBOSA-PEREIRA *et al.*, 2014). A embalagem é fabricada a partir de nanocompósitos formados por incorporação de nanopartículas de metal em filmes de polímero (LIN *et al.*, 2011). Os nanocompósitos mais comuns utilizados como filmes antimicrobianos para embalagens de alimentos são com base na prata, que é bem conhecida pela sua forte toxicidade para uma vasta gama de microrganismos, com estabilidade a alta temperatura e baixa volatilidade (AZEREDO, 2009; EFSA, 2014).

Nanopartículas de prata são adicionadas aos materiais em várias formas, por exemplo, como zeólitos de prata, incorporados ao material plástico. Os zeólitos são cristais de alumino-silicatos com elementos da primeira e da segunda família de metais da tabela periódica, nos quais uma porção dos íons do metal é substituída em geral por íons prata, que são liberados gradualmente no alimento (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2004). A forma iônica da prata exibe atividade bactericida pela inibição de uma série de processos biológicos de bactérias, principalmente, gram-negativas (SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004). A liberação sustentada de íons Ag^+ , pelas nanopartículas de prata, danifica a membrana celular microbiana, causando a interrupção da função de enzimas e grupos de ácidos nucleicos nas proteínas e no DNA bacteriano (MASOOD *et al.*, 2019).

Diversos nanocompósitos de nanopartículas de prata têm sido relatados na literatura (DUNCAN, 2011). O Projeto sobre Nanotecnologias Emergentes (Project on Emerging Nanotechnologies – PEN) mantém um inventário com produtos nanotecnológicos de consumo, introduzidos no mercado. No inventário são listados 1833 nanomateriais, dentre os quais, 443 (24%) contém nanopartículas de prata. O inventário indica o uso de nanopartículas de prata em 9 materiais plásticos destinados ao contato com alimentos (PEN, 2013).

A prata possui uma longa história de aplicação como agente antimicrobiano em aplicações alimentares. Inúmeras sociedades antigas armazenavam vinho e

água em frascos de prata. Existem relatos históricos da utilização de dólares ou colheres de prata no fundo de garrafas de leite e água para prolongar a vida de prateleira. É descrita ainda a utilização da prata como revestimento de tanques de água em navios e aviões para manter a água potável por longos períodos de tempo. A prata foi utilizada como agente esterilizante para a água na estação espacial russa MIR e em ônibus espaciais da NASA (DUNCAN, 2011).

Embora zeólitos de prata tenham sido utilizados para a criação de polímeros antibacterianos por algum tempo, nanocompósitos à base de nanopartículas de prata oferecem maior estabilidade e taxas de liberação de íons de prata, para alimentos armazenados, mais lentamente, comparadas à forma elementar, o que é importante para a atividade antimicrobiana sustentada (SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004; DUNCAN, 2011).

Nas duas últimas décadas, foram conduzidas investigações sobre a bioatividade das nanopartículas de prata. Contudo, o mecanismo detalhado da sua ação como agente antimicrobiano permanece obscuro. É possível que a interação das nanopartículas de prata com o oxigênio resulte em um aumento da atividade antimicrobiana em comparação ao óxido de prata ou prata metálica (METAK, 2015). Devido ao reduzido tamanho das partículas, a área de superfície total em solução é maximizada, resultando em um maior efeito (PANYALA; PEÑA-MÉNDEZ; HAVEL, 2008). Contudo, estas propriedades intrínsecas das nanopartículas de prata também as tornam potencialmente prejudiciais aos seres humanos (VAN DER ZANDE et al., 2012). Os efeitos dos nanomateriais de prata parecem estar relacionados à liberação dos íons de prata a partir destes materiais. Estudos também sugerem a formação *in vivo* de nanopartículas de prata, a partir da absorção de íons de prata (EFSA, 2014).

1.5 Efeitos toxicológicos das nanopartículas de prata

A utilização das nanopartículas é capaz de revolucionar o setor de alimentos, desde a produção até o processamento, na embalagem, transporte e armazenamento. Contudo, o aumento do uso de nanopartículas de prata com ação antimicrobiana levantou uma série de preocupações com a segurança do consumidor, contaminação ambiental, ética, política e de regulação (LIN *et al.*, 2011). No setor alimentício, a preocupação acerca da aplicação da nanotecnologia, está relacionada à ingestão de ingredientes e aditivos nanométricos através de

alimentos e bebidas, podendo estes representar perigos para a saúde do consumidor (ECHEGOYEN; NERÍN, 2013). Nanopartículas de prata possuem o maior potencial para a ingestão pela população, devido à sua crescente inclusão em suplementos alimentares e materiais de embalagem de alimentos (BERGIN; WITZMANN, 2013). Em geral, acredita-se que os íons de prata são liberados a partir de nanomateriais de prata e absorvidos no trato gastrointestinal. Em diversos estudos foi verificada a presença da prata no sangue e sua distribuição e acúmulo em diversos órgãos, sendo o fígado relatado como um órgão alvo para a toxicidade, tal como indicado pelo efeito da prata em diversas enzimas hepáticas (KIM, *et al.*, 2010; VAN DER ZANDE *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2013, EFSA, 2014). Relatórios têm indicado que nanopartículas de prata são tóxicas para as células, e podem alterar a função normal das mitocôndrias, aumentar a permeabilidade da membrana, e gerar espécies reativas de oxigênio (LIN *et al.*, 2011). Apesar de o mecanismo de toxicidade das nanopartículas de prata ainda não ser totalmente claro, parece estar relacionado principalmente ao seu tamanho e características físico-químicas. Assim, nanopartículas menores têm exibido maior potencial de penetrabilidade celular (NOGUEIRA; PAINO; ZUCOLOTTO, 2013).

Segundo McShan, Ray e Yu (2014), nanopartículas de prata são capazes de penetrar a membrana celular e atuar como uma fonte de Ag^+ dentro da célula, causando estresse oxidativo por meio da geração de espécies reativas de oxigênio e danos aos componentes celulares, incluindo danos ao DNA, ativação de enzimas antioxidantes, depleção de moléculas antioxidantes, ligação e desativação de proteínas e danos à membrana celular.

Em um estudo de toxicidade subcrônica por via oral de nanopartículas de prata (56 nm), com ratos F344 de ambos os sexos, foi observado um nível de não observação de efeito adverso (NOAEL) de 30 mg kg^{-1} de peso corporal, por dia e a menor dose na qual se observa efeito adverso (LOAEL) de 125 mg kg^{-1} de peso corporal. Alterações significativas, dependentes da dose, foram encontradas em níveis de fosfatase alcalina e colesterol para ratos machos e fêmeas, indicando que a exposição a doses superiores a 125 mg kg^{-1} de peso corporal de nanopartículas de prata pode resultar em lesão hepática. Exames histopatológicos revelaram uma maior incidência de hiperplasia do duto biliar, com ou sem necrose, fibrose, e/ou pigmentação, em animais expostos. Houve também uma acumulação de prata, dependente da dose, em todos os tecidos examinados (KIM *et al.*, 2010).

Walczak e colaboradores (2012), em estudo com nanopartículas de prata (60 nm), realizado em modelo digestivo humano *in vitro*, concluíram que sob condições fisiológicas, as nanopartículas de prata podem chegar à parede intestinal em seu tamanho e composição inicial. Segundo os autores, durante a digestão gástrica, ocorre uma redução no número de nanopartículas de prata, resultado da aglomeração e interação entre as nanopartículas e íons cloro, na presença de proteínas. Contudo, durante a digestão intestinal, as aglomerações são desfeitas, ocorrendo um aumento do número de nanopartículas de prata.

Hussain e colaboradores (2005) relataram em seus estudos toxicológicos *in vitro*, desenvolvidos em células BRL3A de fígado de ratos, que as nanopartículas de prata (15 e 100 nm) foram capazes de entrar nas células e acarretar dano às mitocôndrias. Segundo os autores, ocorre diminuição significativa da função mitocondrial em células expostas a nanopartículas de prata em concentrações de 5-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Além disso, houve redução significativa dos níveis de GSH e aumento nos níveis de ROS, sugerindo que a citotoxicidade da prata em células do fígado é provavelmente mediada por estresse oxidativo.

Liu e colaboradores (2010) realizaram estudo de citotoxicidade com nanopartículas de prata em três tamanhos (5, 20 e 50 nm), utilizando as células humanas A549 (adenocarcinoma alveolar), SGC-7901 (carcinoma gástrico), HepG2 (hepatocarcinoma) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário). Segundo os autores, foi observado efeito na morfologia celular e na membrana celular, induzidos por partículas com 5 e 20 nm. Análise, por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), realizada para detecção de prata nas células mostrou que nanopartículas menores possuem maior facilidade para entrar na célula do que as maiores, podendo esta ser a causa dos efeitos tóxicos mais acentuados.

Gliga e colaboradores (2014) realizaram estudo de citotoxicidade com células BEAS-2B (epitélio brônquico humano), expostas a nanopartículas de prata, revestidas com citrato, em diferentes tamanhos de partícula primária (10, 40 e 75 nm) e nanopartículas de prata com 50 nm sem revestimento e com 10 nm, revestidas de polivinilpirrolidona (PVP). Assim como observado por Liu e colaboradores (2010), os resultados dos testes sugerem claramente que a citotoxicidade das nanopartículas de prata é dependente do seu tamanho. Apenas as partículas de 10 nm afetaram a viabilidade celular. Não houve diferença entre os

efeitos citotóxicos, dependentes do revestimento, entre as partículas de 10 nm revestidas com citrato e PVP.

1.6 Migração

O principal risco de exposição dos consumidores às nanopartículas provenientes de embalagens de alimentos é provavelmente através da migração de nanopartículas para alimentos e bebidas (LIN *et al.*, 2011, ECHEGOYEN; NERÍN, 2013, KUORWEL *et al.*, 2015). No entanto, o potencial de migração e os mecanismos de difusão de nanopartículas provenientes de embalagem de alimentos é uma área da nanotecnologia que ainda não recebeu a mesma atenção que áreas como nano-aerossóis, nanofluidos e medicamentos (JOKAR; RAHMAN, 2014, HANNON *et al.*, 2015). Existe uma lacuna no que diz respeito ao conhecimento do processo de migração de nanopartículas, não sendo conhecido se existe a migração de nanopartículas como um todo, ou somente na forma de íons dissolvidos. É necessário ainda haver um estudo anterior ao processo de quantificação para saber se possíveis nanopartículas observadas foram liberadas diretamente ou formadas a partir de íons durante o tratamento pós-migração. Muitos estudos apresentam somente uma quantidade total de migração por análises da solução simulante. Existe ainda a necessidade de uma caracterização completa dos materiais de teste, envolvendo não somente as partículas provenientes do processo de migração, mas também os polímeros de acolhimento em seu estado primitivo (NOONAN *et al.*, 2014). Diante disto, é necessário um maior aprofundamento sobre a migração de nanopartículas, com ênfase não somente na quantificação, mas também na sua caracterização, uma vez que, a segurança alimentar, relacionada às aplicações nanotecnológicas no setor de embalagens de alimentos, está diretamente ligada à natureza físico-química das nanopartículas migradas para o alimento em contato com a embalagem (COCKBURN *et al.*, 2012; ALDOSSARI *et al.*, 2015).

A contaminação de alimentos por migração de monômeros ou de aditivos é assunto que compete à Vigilância Sanitária (CORSO, 2007). A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 91 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 11 de maio de 2001 estabelece que os componentes utilizados nos materiais destinados a entrar em contato com alimentos devem estar incluídos nas listas positivas e seu uso deve estar autorizado para a fabricação de materiais em

contato com alimentos (BRASIL, 2001). A lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos é estabelecida pela RDC nº 326 de 3 de dezembro de 2019, da ANVISA, e não inclui nanopartículas de prata como um aditivo permitido (BRASIL, 2019). Segundo o Regulamento nº 10/2011 de 14 de janeiro de 2011, da União Europeia (EU), as substâncias em nanoformas só podem ser utilizadas se tiverem sido expressamente autorizadas e mencionadas no seu Anexo I, que trata da lista de substâncias autorizadas na UE. Contudo, nanopartículas de prata não são incluídas na lista (UNIÃO EUROPÉIA, 2011).

1.7 Ensaio de migração

Os testes usualmente efetuados em embalagens para alimentos são denominados testes de migração, cuja finalidade é avaliar a quantidade de substâncias passíveis de migrar da embalagem para o alimento. O teste de migração simula, na medida do possível, as condições a que a embalagem e o alimento serão submetidos, em função do tipo de alimento, tempo de contato e da temperatura. Devido às dificuldades técnicas, e à complexidade química da maioria dos alimentos, os testes são realizados utilizando-se solventes simulantes, ou simulantes alimentares, que tentam reproduzir o pH, o teor de gordura dos alimentos e sua eventual graduação alcoólica (ABRANTES, 1998; GERMANO; GERMANO, 2001). Tais simulantes, são selecionados com base na sua capacidade extrativa, com o objetivo de manter a mesma migração de substâncias ocasionada pelo contato entre o material plástico e o alimento. Quando pertinente, são estabelecidos fatores de correção, que ajustam a concentração de migração, determinada experimentalmente no ensaio de migração com simulante alimentar, para que esta esteja de acordo com a migração que ocorreria quando em contato com o alimento. O Quadro 1 apresenta os simulantes alimentares estabelecidos pela RDC nº 51 de 26 de novembro de 2010, da ANVISA, que dispõe sobre migração em materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos (BRASIL, 2010).

Quadro 1- Simulantes alimentares estabelecidos pela RDC nº 51 de 26 de novembro de 2010

Simulante A	Simulante de alimentos aquosos não ácidos (pH > 4,5)	Água destilada ou desionizada
Simulante B	Simulante de alimentos aquosos ácidos (pH < 4,5)	Solução de ácido acético a 3% (m/v) em água destilada ou desionizada
Simulante C	Simulante de alimentos alcoólicos	Solução de etanol a 10 % (v/v) em água destilada ou desionizada, concentração que se ajustará ao conteúdo real de etanol do produto no caso deste superar os 10% (v/v)
Simulante D	Simulante de alimentos gordurosos	Solução de etanol a 95% (v/v) em água destilada ou desionizada, ou iso-octano, ou MPPO
Simulante D'	Simulante equivalente ao simulante D	Azeites/óleos comestíveis (azeite de oliva, óleo de girassol, óleo de milho) ou misturas sintéticas de triglicerídeos

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada, MPPO: Óxido de polifenileno modificado.

Fonte: (BRASIL, 2010).

A Resolução estabelece condições para o desenvolvimento do ensaio de migração em simulantes alimentares, sendo estes escolhidos com base nas características de cada alimento ou categoria de alimentos, relevante ao estudo, e deve estar de acordo com o disposto no Quadro 2 (BRASIL, 2010).

Quadro 2 - Seleção de simulantes para cada tipo de alimento no ensaio de migração

Tipo de Alimento	Simulante
Somente alimentos aquosos não ácidos	A
Somente alimentos aquosos ácidos	B
Somente alimentos alcoólicos	C
Somente alimentos gordurosos	D ou D'
Alimentos aquosos não ácidos e alcoólicos	C
Alimentos aquosos ácidos e alcoólicos	B e C
Alimentos aquosos não ácidos contendo gorduras e óleos	A e D ou D'
Alimentos aquosos ácidos contendo gorduras e óleos	B e D ou D'
Alimentos aquosos não ácidos alcoólicos e gordurosos	C e D ou D'
Alimentos aquosos ácidos alcoólicos e gordurosos	B, C e D ou D'
Alimentos secos não gordurosos	Não é necessário realizar o ensaio de migração
Alimentos secos gordurosos	D ou D'

Simulante A: Simulante de alimentos aquosos não ácidos (pH > 4,5); Simulante B: Simulante de alimentos aquosos ácidos (pH < 4,5); Simulante C: Simulante de alimentos alcoólicos; Simulante D: Simulante de alimentos gordurosos; Simulante D': Simulante equivalente ao simulante D.

Fonte: (BRASIL, 2010).

Para os leites integral, condensado, desnatado ou parcialmente desnatado, o ensaio de migração deve ser realizado com solução de etanol a 50% (v/v), em água destilada ou desionizada, como simulante alimentar (BRASIL, 2010).

Em ensaios de migração, a amostra de material plástico é colocada em contato com o solvente simulante nas condições de tempo e temperatura correspondentes para que sejam reproduzidas as condições normais ou previsíveis de elaboração, fracionamento, armazenamento, comercialização e consumo do alimento (BRASIL, 2010). O Quadro 3 apresenta as condições de tempo e temperatura a serem selecionados para os simulantes alimentares A, B, C e D'.

Quadro 3 - Condições para o ensaio de migração com os simulantes alimentares A, B, C e D'

Condições de contato previsíveis mais críticas	Condições de ensaio equivalentes (para simulantes A, B, C e D'.
Tempo de contato (t)	Tempo de ensaio
$t \leq 5 \text{ min}$	(1)
$5 \text{ min} < t \leq 30 \text{ min}$	30 min
$30 \text{ min} < t \leq 1 \text{ h}$	1 h
$1 \text{ h} < t \leq 2 \text{ h}$	2 h
$2 \text{ h} < t \leq 4 \text{ h}$	4 h
$4 \text{ h} < t \leq 24 \text{ h}$	24 h
$t > 24 \text{ h}$	10 dias
Temperatura de contato (T)	Temperatura de ensaio
$T \leq 5 \text{ }^\circ\text{C}$	5 $^\circ\text{C}$
$5 \text{ }^\circ\text{C} < T \leq 20 \text{ }^\circ\text{C}$	20 $^\circ\text{C}$
$20 \text{ }^\circ\text{C} < T \leq 40 \text{ }^\circ\text{C}$	40 $^\circ\text{C}$
$40 \text{ }^\circ\text{C} < T \leq 70 \text{ }^\circ\text{C}$	70 $^\circ\text{C}$
$70 \text{ }^\circ\text{C} < T \leq 100 \text{ }^\circ\text{C}$	100 $^\circ\text{C}$
$100 \text{ }^\circ\text{C} < T \leq 121 \text{ }^\circ\text{C}$	121 $^\circ\text{C}$ (2)
$121 \text{ }^\circ\text{C} < T \leq 130 \text{ }^\circ\text{C}$	130 $^\circ\text{C}$ (2)

Simulante A: Simulante de alimentos aquosos não ácidos ($\text{pH} > 4,5$); Simulante B: Simulante de alimentos aquosos ácidos ($\text{pH} < 4,5$); Simulante C: Simulante de alimentos alcoólicos; Simulante D: Simulante de alimentos gordurosos; Simulante D': Simulante equivalente ao simulante D.
 Fonte: (BRASIL, 2010).

Naqueles casos em que as condições reais de contato do material plástico com o alimento não estiverem adequadamente contempladas pelas condições de ensaio presentes no Quadro 3, poderão ser usadas outras condições de contato mais apropriadas. Nos casos em que são selecionados os simulantes alimentares D, são utilizadas as condições descritas no Quadro 4, de acordo com as condições determinadas para os simulantes alimentares D' (BRASIL, 2010).

Quadro 4 - Condições para o ensaio de migração com o simulante de alimentos gordurosos D

Condições de tempo e temperatura para o simulante D'	Condições de tempo e temperatura com simulante D		
	Iso-octano	Solução aquosa de etanol a 95% (v/v)	MPPO
10d a 5°C	12h a 5°C	10d a 5°C	--
10d a 20°C	1d a 20°C	10d a 20°C	--
10d a 40°C	2d a 20°C	10d a 40°C	--
2h a 70°C	30min a 40°C	2h a 60°C	--
30min a 100°C	30min a 60°C	2,5h a 60°C	30min a 100°C
1h a 100°C	1h a 60°C	3h a 60°C	1h a 100°C
2h a 100°C	1,5h a 60°C	3,5h a 60°C	2h a 100°C
30min a 121°C	1,5 a 60°C	3,5h a 60°C	30min a 121°C
1h a 121°C	2h a 60°C	4h a 60°C	1h a 121°C
2h a 121°C	2,5h a 60°C	4,5h a 60°C	2h a 121°C
30min a 130°C	2h a 60°C	4h a 60°C	30min a 130°C
1h a 130°C	2,5h a 60°C	4,5 a 60°C	1h a 130°C
2h a 150°C	3h a 60°C	5h a 60°C	2h a 150°C
2h a 175°C	4h a 60°C	6h a 60°C	2h a 175°C

MPPO: Óxido de polifenileno modificado; Simulante D: Simulante de alimentos gordurosos.
Fonte: (BRASIL, 2010).

O contato entre a embalagem e o solvente simulante deve obedecer a razão de 0,5 a 2,0 cm² mL⁻¹ (BRASIL, 1999). A determinação da concentração de migração específica é realizada no solvente simulante ao término do ensaio de migração, por meio de técnica aplicável à detecção e quantificação da substância de interesse.

A União Europeia convencionou no Regulamento nº 10/2011 a fixação de limites de migração, partindo do pressuposto que uma pessoa de 60 kg tem um consumo diário de 1 kg de alimentos, embalados em recipiente cúbico com 6 dm² de área superficial de contato com alimento, que causaria migração de substâncias (UNIÃO EUROPÉIA, 2011).

1.8 Métodos analíticos para a pesquisa de nanopartículas

1.8.1 Métodos de caracterização de nanopartículas

A caracterização química e física de nanopartículas pode ser realizada por diferentes técnicas analíticas, sendo um dos principais passos para entender a sua estrutura e interação com o meio ambiente. Características como tamanho, forma e estado de dispersão influenciam diretamente nos efeitos à saúde, relacionados a exposição às nanopartículas (SHARMA *et al.*, 2019).

Dentre as técnicas disponíveis para a caracterização de nanopartículas, é possível destacar as abordagens microscópicas. Devido às dimensões nanométricas, as nanopartículas de prata estão além da habilidade de detecção dos microscópios óticos tradicionais. Assim, a microscopia eletrônica tem se tornado uma opção na visualização e caracterização de nanopartículas. Neste contexto, as técnicas de maior destaque são a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens geradas por MET fornecem não só informações sobre a forma e o tamanho da partícula, mas também sobre a morfologia e o estado de agregação. Contudo o maior desafio relacionado à técnica está no preparo da amostra a ser analisada (LIU *et al.*, 2012). Técnicas de espalhamento de luz, como o espalhamento de luz dinâmico (DLS), também estão entre as mais utilizadas para caracterização de nanopartículas, sendo capaz de medir o diâmetro hidrodinâmico das partículas. Contudo a técnica apresenta limitações como baixa sensibilidade em amostras diluídas, detecção não seletiva e inabilidade em distinguir misturas ou matrizes complexas (PODA *et al.*, 2011).

1.8.2 Métodos de quantificação de nanopartículas

A eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos (DAD) é relatada como uma possível técnica para a quantificação de nanopartículas de prata, sendo capaz ainda de separar e caracterizar as partículas por tamanho e forma. A separação eletroforética de nanopartículas é baseada principalmente na dimensão das partículas, forma e modificação química da superfície (LIU *et al.*, 2005; FRANZE; ENGELHARD, 2014). A eletroforese capilar é uma técnica geralmente realizada em um capilar de sílica com diâmetro interno de 25-100 μm , emergindo como uma das

técnicas de separação com maior potencial para íons inorgânicos, substâncias orgânicas, macromoléculas e biomoléculas, como vírus e bactérias. Assim, técnicas de eletro-migração capilar têm sido aplicadas na separação seletiva de várias nanopartículas com tamanho e densidade de superfície de carga, como por exemplo, partículas de látex, poliestirenos, partículas de óxido inorgânico e partículas metálicas (LIU *et al.*, 2012). Estudos revelaram o potencial da Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC) na determinação de nanopartículas. A técnica consiste na adição de um surfactante à solução eletrolítica, causando alteração química da superfície das partículas, alterando o mecanismo de separação (LIU *et al.*, 2005; FRANZE; ENGELHARD, 2014).

A espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP AES) e a ICP-MS são capazes de detectar traços de nanopartículas de prata de maneira eficiente e rápida. Devido à alta velocidade, precisão, sensibilidade e larga faixa linear, estas técnicas têm se tornado populares na determinação de íons metálicos. Contudo, a presença de partículas na amostra pode causar o entupimento do sistema de aspiração e ligantes ou outras substâncias orgânicas presentes na amostra podem ainda dificultar a atomização completa (LIU *et al.*, 2012). Assim, são necessários métodos para a extração das nanopartículas de matrizes complexas, porém sem causar modificações na sua estrutura original. Digestões ácido-base são indicadas somente em situações onde é avaliada a composição elementar total, enquanto a digestão alcalina, associada a aquecimento ou micro-ondas, pode ser eficiente na degradação de matrizes orgânicas sem causar tais modificações (SINGH *et al.*, 2014). Digestões alcalinas concentram-se principalmente na utilização de hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de sódio (NaOH), e hidróxido de tetrametilamônio (TMAH). No entanto, KOH e NaOH podem induzir a agregação de nanopartículas de prata (YU; ZHOU; LIU, 2015).

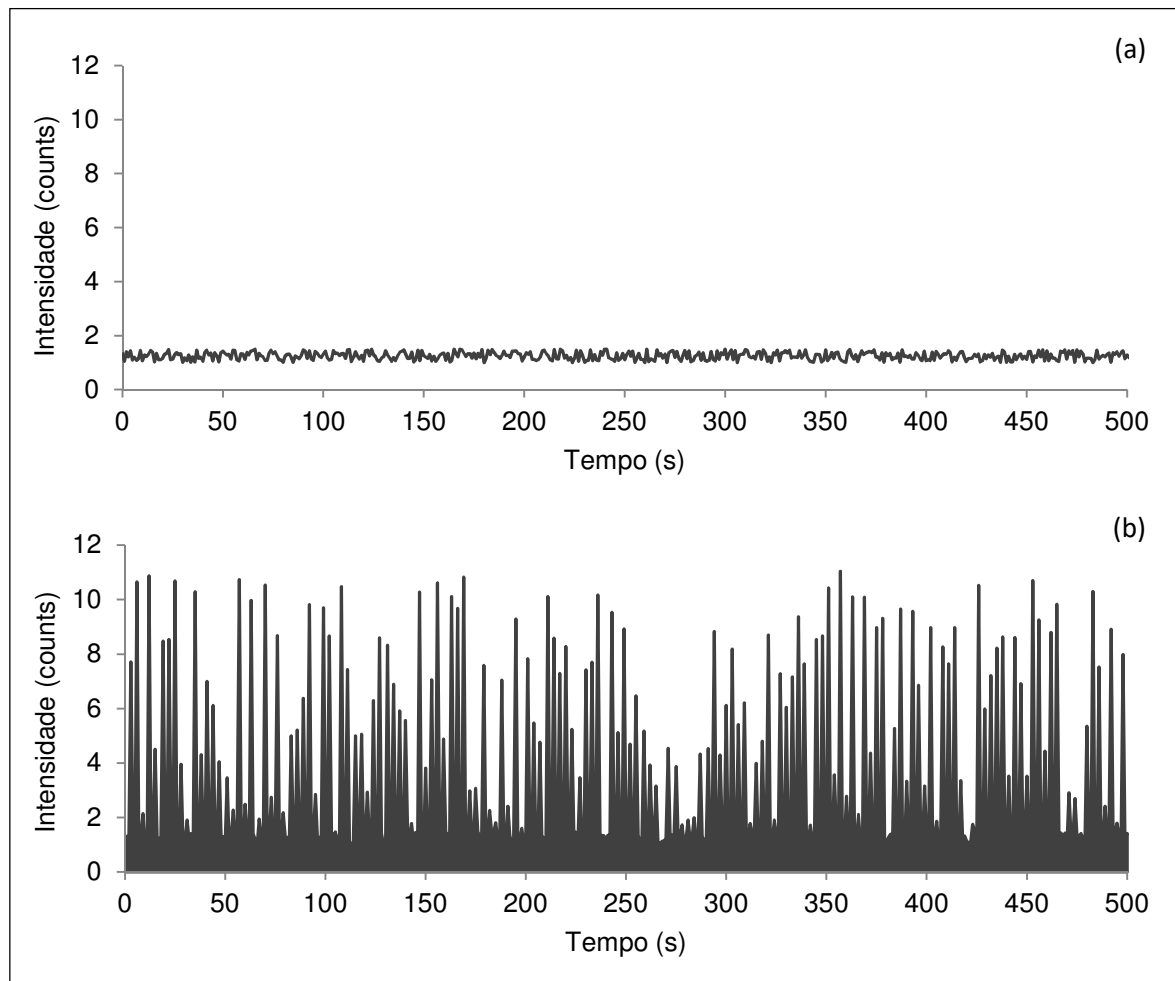
Uma das técnicas mais promissoras para a análise de nanopartículas metálicas é a ICP-MS executada no modo de detecção individual - spICP-MS. A técnica é capaz de determinar características como: composição inorgânica, concentração e distribuição de tamanho. Além disso, a técnica é capaz de apresentar resultados rápidos, o que a torna uma ferramenta vantajosa quando aplicada em análises de rotina (DONOVAN; SHI; STEPHAN, 2018; HAYDER *et al.*, 2020; STEPHAN; HINEMAN, 2014; PETERS *et al.*, 2014; STRENGE; ENGELHARD, 2020). Assim, existe evidente crescimento no interesse pela técnica nos últimos

anos, com um crescente número de laboratórios investindo recursos no seu desenvolvimento e aplicação (BUSTOS; WINCHESTER, 2016).

1.8.2.1 ICP-MS executada no modo de detecção individual

A utilização da técnica de ICP-MS na detecção e medição de nanopartículas requer que o equipamento seja operado de forma diferente do que quando utilizado para análise de soluções de metais dissolvidos (STEPHAN; NEUBAUER, 2014). O princípio básico da técnica de spICP-MS consiste na detecção individual de nanopartículas, introduzidas em suspensões diluídas com alta frequência de leituras do detector, fazendo com que estatisticamente apenas uma nanopartícula por vez entre no plasma. As nanopartículas que chegam ao plasma formam uma massa de íons, proporcional ao seu tamanho, e ao chegar ao detector, geram um pulso com intensidade superior à medição contínua do metal dissolvido (Figura 1). (STEPHAN; NEUBAUER, 2014; LABORDA; BOLEA; JIMÉNEZ-LAMANA, 2016; MEERMANN; NISCHWITZ, 2018; BOLEA-FERNANDEZ *et al.*, 2019; MOZHAYEVA; ENGELHARD, 2020).

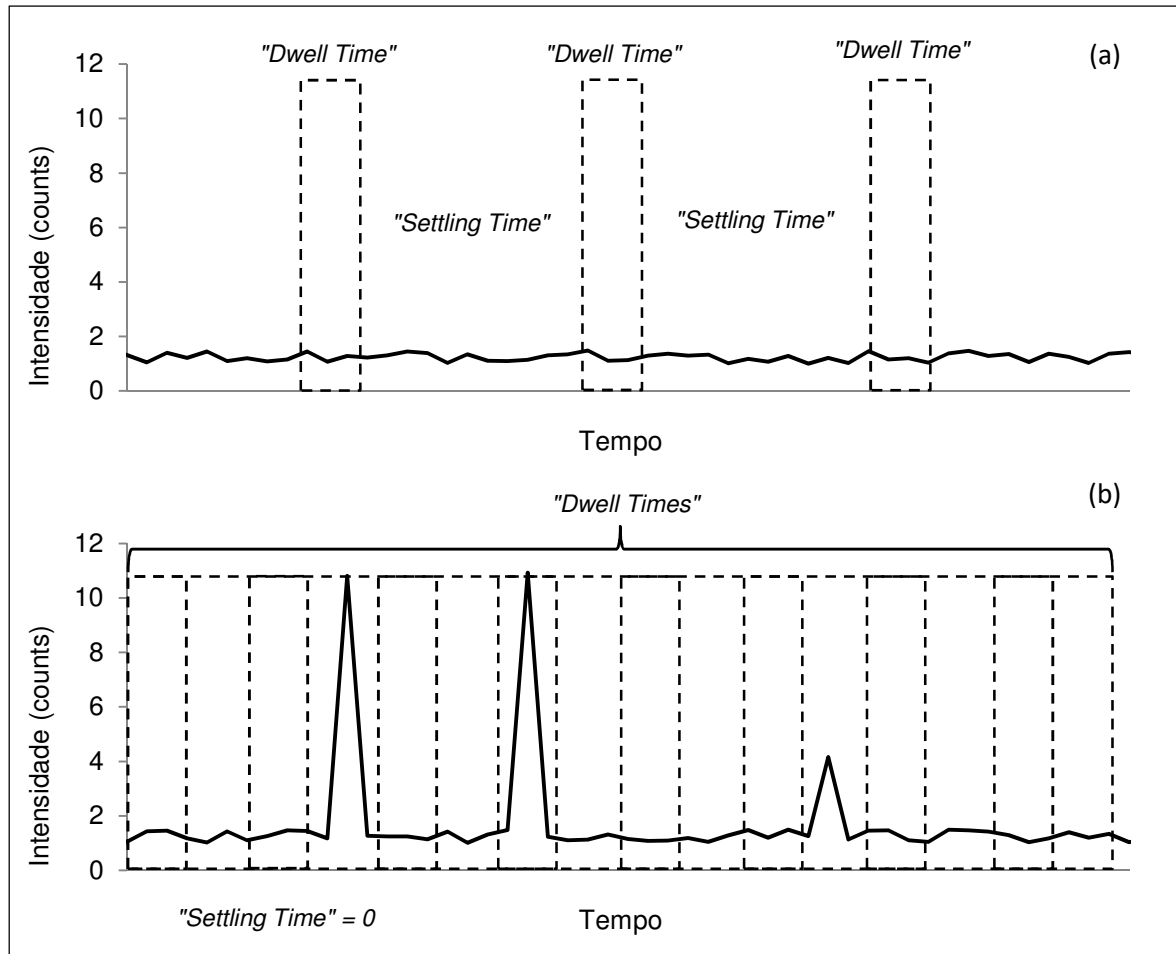
Figura 1 - Sinal contínuo referente ao metal dissolvido (a) e sinal referente à detecção de partículas (b)



Fonte: O Autor, 2020.

Dentre as principais diferenças entre o modo padrão e o modo de detecção individual está a configuração da aquisição do sinal durante o tempo de análise. No modo padrão, o tempo de análise da amostra é dividido entre intervalos de leitura, chamados “dwell time”, e intervalos de estabilização do sinal, chamados de “settling time”, que no modo de detecção individual é eliminado (Figura 2). Assim, todo o tempo de análise é dividido em pequenos intervalos de leitura, impedindo que partículas cheguem até o detector durante o intervalo de estabilização, e não sejam detectadas (STEPHAN; NEUBAUER, 2014).

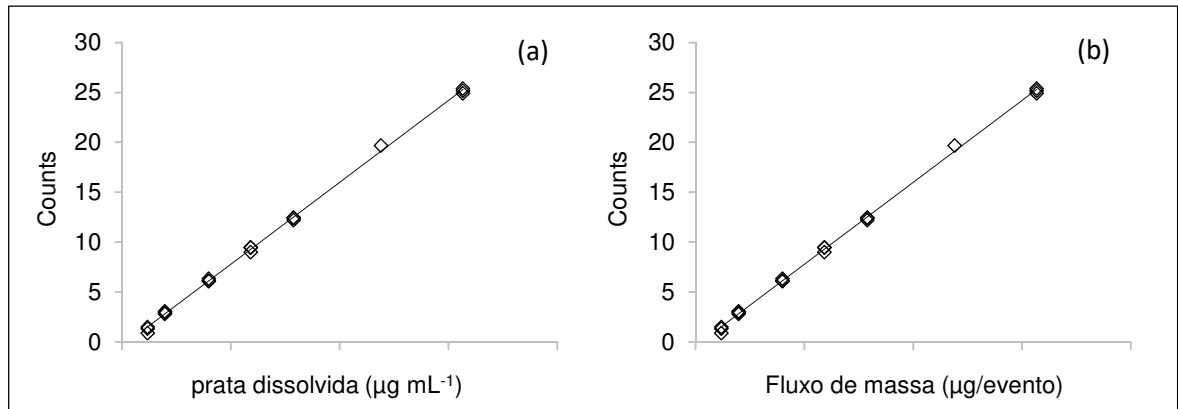
Figura 2 - Aquisição do sinal no modo padrão (a) e no modo de detecção individual (b)



Fonte: O autor, 2020, baseado em STEPHAN e NEUBAUER, 2014.

Após o final do tempo de análise, o tamanho de cada partícula (evento) pode ser calculado por meio da intensidade do pulso correspondente. Para tal, é preparada uma curva analítica, por meio da análise de padrões de metal dissolvido, que é convertida em uma curva analítica de fluxo de massa (Figura 3). A conversão é realizada pela determinação do volume relativo a um intervalo de leitura ("dwell time"). Assim é possível determinar a massa de metal relacionada a uma partícula, uma vez que cada "dwell time" está relacionado a um evento. A massa de cada partícula é então calculada, pela interpolação do sinal correspondente na curva de fluxo de massa, que é convertida em volume através da informação de densidade do metal. Em seguida, o tamanho da partícula é determinado pelo seu volume, sendo a partícula considerada esférica (STEPHAN; NEUBAUER, 2014; LABORDA; BOLEA; JIMÉNEZ-LAMANA, 2016).

Figura 3 - Conversão da curva de prata dissolvida (a) em fluxo de massa (b)



Fonte: O autor, 2020.

1.9 Validação do método

Um importante aspecto a ser levado em consideração no suporte às ações de vigilância sanitária é a confiabilidade das medições analíticas realizadas pelo laboratório de saúde pública (BAZILIO, 2014).

É papel do laboratório de ensaio demonstrar que os resultados obtidos em condições particulares de aplicação são de confiança e adequados para o propósito (SOBOLEVA; AMBRUS, 2004).

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação (RIBEIRO et al., 2008).

A validação de métodos analíticos é assim um importante requisito para dar suporte às atividades de metrologia em análise química e de garantia da qualidade dos produtos nas indústrias (ESTEVES *et al.*, 2007), sendo um componente essencial das medições que um laboratório deve implementar para garantir que o mesmo produza dados analíticos confiáveis (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A norma ABNT NBR ISO/IEC 17025: 2017 estabelece requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, sendo esta a base para a acreditação de tais laboratórios. Segundo a norma, na utilização de métodos desenvolvidos pelo laboratório, este deve assegurar que as características de

desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORAS TÉCNICAS, 2017).

O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) estabelece que para um método de análise de elementos traços, todos os parâmetros de validação devem ser verificados. São considerados traços os elementos em concentração abaixo de 0,01 % (100 mg kg^{-1}). Os parâmetros a serem verificados são: linearidade e faixa de trabalho, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), efeito matriz, e limites de quantificação e detecção (INMETRO, 2020).

O desenho detalhado e a execução do procedimento de validação devem, sempre que possível, proporcionar uma avaliação realista do número e da extensão dos efeitos operacionais que podem ocorrer durante o uso normal do método avaliado, bem como abranger a faixa de concentrações de trabalho e tipos de amostra que estejam dentro do escopo do método (BRATINOVA; RAFFAEL; SIMONEAU, 2009).

1.9.1 Faixa de trabalho

De acordo com o trabalho a ser desenvolvido, uma faixa de concentração do analito, ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado, deve ser definida, sendo denominada faixa de trabalho (GOUVÊA, 2011). A faixa de trabalho de um método analítico é o intervalo compreendido entre os níveis de concentração superior e inferior, incluindo estes níveis, que demonstram precisão, exatidão e linearidade adequada (HUBER, 1998). A faixa de trabalho é uma parte importante da validação do método analítico (BRATINOVA; RAFFAEL; SIMONEAU, 2009).

Para definição da faixa de trabalho a ser utilizada é necessária a observação do limite de restrição do analito, presente na legislação. Esta concentração deve encontrar-se no meio da faixa de trabalho, onde a curva analítica apresenta a menor incerteza para a determinação da concentração. Os níveis de concentração da curva analítica devem ser igualmente espaçados e preparados com três repetições genuínas, ou seja, cada repetição é preparada independentemente, a partir de soluções estoque diferentes (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

1.9.2 Curva analítica e linearidade

A construção de curvas analíticas é uma prática comum em laboratório, sendo este passo de extrema importância para a obtenção de resultados precisos e com boa exatidão (BAZILIO *et al.*, 2012b). Levando-se em consideração que a maioria dos métodos analíticos utilizam relações lineares para quantificação analítica, o exame de uma função de calibração para a linearidade é uma figura de desempenho importante na validação de um método analítico (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

A linearidade do método expressa a capacidade do mesmo em apresentar resultados diretamente proporcionais em relação às concentrações do analito de interesse, ao longo da faixa de trabalho (HUBER; 1998).

A linearidade pode ser testada através do exame de um gráfico de resíduos produzidos por regressão linear das respostas nas concentrações em um conjunto de calibração apropriado. Qualquer padrão de curva sugere falta de ajuste (*lack-of-fit*) devido a uma função de calibração não linear. Um teste de significância pode ser realizado por meio da comparação da variância da falta de ajuste com aquela devido ao erro puro (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Souza e Junqueira propõem um procedimento detalhado para o teste de linearidade de curvas de calibração na validação do ensaio analítico pelo método de mínimos quadrados ordinários (MMQO), incluindo delineamento experimental, a estimativa dos parâmetros, e tratamento de valores extremos (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Valores extremos são valores ou dados que estatisticamente não fazem parte do conjunto de dados estudado, podendo levar a erros na estimativa dos parâmetros da regressão (BELSLEY; KUH; WELSCH, 1980). Sendo assim é importante a avaliação da presença destes e uma possível exclusão.

1.9.3 Seletividade

Segundo Bratinova, Raffael e Simoneau (2009), a seletividade de um método analítico é a sua capacidade de quantificar o analito de interesse na presença de outros analitos, matrizes e outros potenciais interferentes. A determinação do analito deve ser garantida na solução final do ensaio, mesmo na presença de possíveis interferentes na matriz da amostra.

1.9.4 Efeito de matriz

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição, podendo haver acréscimo ou redução do sinal. A magnitude do efeito também pode depender da concentração. Se o efeito matriz for significativo, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2020).

O processo de preparação dos padrões de calibração pode ser simplificado se eles puderem ser preparados como soluções simples do analito. Porém é necessário que seja avaliada uma possível incompatibilidade da matriz analisada antes da utilização desta estratégia simplificada de preparo dos padrões (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

1.9.5 Repetibilidade

A repetibilidade é o grau de concordância entre resultados de testes independentes realizados em condições de repetibilidade, ou seja, obtidos com o mesmo método, com material de ensaio idêntico, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento e em curto intervalo de tempo (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; BRATINOVA, RAFFAEL; SIMONEAU, 2009).

A repetibilidade é normalmente determinada para circunstâncias específicas que na prática podem ser muito variadas (EURACHEM, 1998). Pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados, podendo ser determinada por meio da análise de padrões, materiais de referência ou adição do analito a um branco da amostra (INMETRO, 2020).

Para uma avaliação correta da repetibilidade do método, é necessária a verificação da homogeneidade da amostra utilizada. Amostras heterogêneas podem causar resultados falsos de repetibilidade, uma vez que é possível confundir problemas relacionados à homogeneidade da amostra com a falta de repetibilidade do método.

1.9.6 Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo uma ou mais condições a variar. Dentre estas condições estão diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos (INMETRO, 2020).

1.9.7 Limite de detecção

Sempre que as medições analíticas são realizadas em baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, em níveis de traço, torna-se importante conhecer o nível mais baixo do analito ou de uma propriedade, que pode ser detectado e quantificado com segurança pelo método (EURACHEM, 1998).

Em termos gerais, o limite de detecção (LOD) é a menor quantidade ou concentração do analito na amostra, que pode ser seguramente distinguida de zero (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

1.10 Estimativa da incerteza de medição

Com o objetivo de adequar o ensaio às normas de qualidade de forma a garantir a confiabilidade dos resultados analíticos e obter o reconhecimento da competência do laboratório, um importante passo a ser dado é a acreditação do ensaio, segundo os requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017. Um dos requisitos técnicos abordados trata de métodos de ensaio e calibração, sendo estabelecido que laboratórios de ensaio devem aplicar procedimentos para a estimativa das incertezas de medição (ABTN, 2017).

Diante deste cenário, a estimativa da incerteza de medição em ensaios químicos torna-se de grande importância para a competência dos laboratórios de ensaios e ainda requisito para a confiabilidade do resultado analítico. De uma forma geral, o resultado de uma medição é somente uma aproximação ou estimativa de uma quantidade específica para um mensurando, assim, o resultado somente é completo quando acompanhado por uma declaração quantitativa de sua incerteza (NIST, 1994; DE LA CRUZ *et al.*, 2010; BAZILIO *et al.*, 2012a). O Vocabulário

Internacional de Metrologia – VIM define incerteza como um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas (INMETRO, 2012b).

A tradicional abordagem para estimativa da incerteza de medição é baseada na identificação, quantificação, e combinação de todas as contribuições individuais para a incerteza final. Nesta abordagem, chamada de “*bottom-up*”, a incerteza combinada final é derivada das incertezas dos componentes individuais, sendo adotada pela Organização Internacional de Normalização (ISO) (TOMIĆ; NASIPAK; BABIĆ, 2012).

A estimativa da incerteza do resultado de um ensaio perpassa pelo conhecimento dos pontos críticos do procedimento analítico, sendo necessário conhecer os fatores que podem vir a influenciar o seu resultado final. Alguns destes principais fatores envolvem o preparo dos padrões analíticos, diluição das amostras, medições feitas em um equipamento e procedimento de quantificação por calibração (EURACHEM, 2012). Com as fontes de incerteza relevantes identificadas, através de ferramentas estatísticas, são estimadas as incertezas padrão atribuídas a cada fonte e a incerteza padrão combinada final.

1.11 Justificativa

A utilização de materiais plásticos com ação antimicrobiana, em contato com alimentos, pode ocasionar problemas relacionados à contaminação destes por nanopartículas presentes no material polimérico, utilizadas para promover o controle do crescimento bacteriano. Nanopartículas de prata estão entre os principais aditivos utilizados para este fim, no processo de fabricação do material, sendo capazes de migrar do material polimérico para o alimento em contato. As nanopartículas de prata têm sido relacionadas a efeitos citotóxicos, podendo ainda causar dano ao fígado e alterações no DNA. A legislação brasileira não estabelece a utilização de nanopartículas de prata como um possível aditivo na fabricação de embalagens de alimentos, sendo assim, seu uso até o momento é proibido. Contudo, já existem no mercado diversos materiais plásticos com atividade antimicrobiana, com adição de nanopartículas de prata, para o acondicionamento de alimentos. Assim, é necessário um maior estudo sobre a contaminação de alimentos por nanopartículas de prata provenientes destes materiais. Com o estudo de caracterização e quantificação da

migração de nanopartículas de prata será possível a obtenção de dados para a avaliação da real exposição associada ao consumo de alimentos, acondicionados com este tipo de material. Os resultados obtidos possibilitarão o conhecimento das características físico-químicas das nanopartículas migradas, sendo este conhecimento de crucial importância para que seja avaliada a interação das partículas de prata com as células do corpo humano e possíveis danos causados. Assim, o estudo proposto possibilitará a geração de dados sobre a migração de nanopartículas de prata para alimentos. Os resultados obtidos auxiliarão a área de saúde na análise de risco à saúde humana, visando a regulação deste tipo de material sob o ponto de vista de segurança alimentar. Por meio da regulação do uso de nanopartículas de prata como aditivo em materiais em contato com alimentos, será possível promover ações de vigilância sanitária com o objetivo de prevenir, diminuir ou mesmo eliminar os riscos relativos à exposição às nanopartículas de prata presentes nos produtos e serviços de saúde.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a migração específica de nanopartículas de prata, presentes em materiais plásticos, com ação antimicrobiana, destinados ao contato com alimentos.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer os parâmetros analíticos para o ensaio de migração específica de nanopartículas de prata, de materiais plásticos para os simulantes alimentares etanol 50%, etanol 95 %, água desionizada e ácido acético 3%;
- Otimizar o ensaio, para caracterização por MEV, das nanopartículas de prata contidas nos materiais estudados;
- Caracterizar a prata presente no material plástico, quanto ao tamanho da partícula e forma, por MEV e identificar por EDS;
- Otimizar método analítico para a quantificação de nanopartículas de prata presentes no material plástico e nas soluções provenientes do ensaio de migração, por spICP-MS;
- Validar intralaboratorialmente metodologia analítica para a determinação da migração específica de nanopartículas de prata, de materiais plásticos para o simulante alimentar, por spICP-MS;
- Determinar a migração específica de nanopartículas de prata provenientes de materiais plásticos, com ação antimicrobiana, destinadas ao contato com alimentos, por spICP-MS;
- Estimar a incerteza de medição associada à medição e quantificação de nanopartículas de prata, nas soluções provenientes do ensaio de migração, por spICP-MS;
- Caracterizar as nanopartículas de prata presentes nas soluções de migração, quanto ao tamanho da partícula;
- Quantificar a prata presente nos materiais plásticos, com ação antimicrobiana, destinadas ao contato com alimentos.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais

3.1.1 Padrões e Reagentes

Para o preparo das soluções de prata dissolvida, foi utilizado um padrão multi-elementar contendo $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de prata (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA). As soluções de nanopartículas foram preparadas a partir de padrões de nanopartículas esféricas de prata de 30, 40 e 80 nm (Sigma Aldrich, Missouri, EUA), contendo $1,6 \times 10^{11}$, $7,2 \times 10^{10}$ e $7,4 \times 10^9$ partículas mL^{-1} , respectivamente. No ensaio de seletividade, foi utilizada como matriz para o preparo das soluções de nanopartículas de prata, água mineral alcalino-terrosa fluoretada (Pureza Vital, Nestlé, Vevey, Suíça). Para a digestão em micro-ondas foram utilizados os reagentes: ácido nítrico EMSURE[®] 65 % e peróxido de hidrogênio 30 % do fabricante Merck (Darmstad, Alemanha).

Foram utilizados como simulantes alimentares, o etanol nas concentrações 50 e 95 %, preparados a partir do etanol LiChrosolv do fabricante Merck (Darmstad, Alemanha) com pureza mínima igual a 99,9 %, o ácido acético 3 %, preparado a partir do ácido acético (glacial) do fabricante Merck (Darmstad, Alemanha) com pureza mínima igual a 99,8 %, e água desionizada com resistividade a 25 °C igual a 18,2 Mohm.cm.

3.1.2 Equipamentos

Foram utilizados para o ensaio de migração os seguintes equipamentos: balança analítica do fabricante Sartorius (Goettingen, Alemanha) calibrada, com precisão de 5 casas decimais, modelo R200D; estufa do fabricante FANEM (Guarulhos, Brasil) modelo 347-CD/2 e faixa de trabalho de -10 a 60°C; termômetro digital do fabricante VWR (Radnor, EUA) com capacidade de leitura de -35 a 65°C, calibrado. Para obtenção da água desionizada, utilizada nos ensaios, foi utilizado o sistema de purificação de água modelo Simplicity (Merck, Darmstad, Alemanha).

A medição e quantificação das nanopartículas de prata em suspensão, foi realizada em um ICP-MS modelo NexION 300D do fabricante Perkin Elmer

(Massachusetts, EUA), equipado com um nebulizador concêntrico de vidro, câmara de nebulização ciclônica de vidro e cone do tipo hiper-skimmer. Para a quantificação da prata presente nos materiais plásticos, as amostras foram digeridas em microondas modelo Speedwave do fabricante Berghof (Eningen unter Achalm, Alemanha). Para caracterização das nanopartículas, presentes na amostra, foi utilizado o microscópio modelo Helios Nanolab 650 do fabricante FEI Company (Oregon, EUA), equipado com espectrômetro de energia dispersiva por raios-X.

3.1.3 Seleção das Amostras

Foram selecionados cinco materiais plásticos, com características antimicrobianas pela adição de nanopartículas de prata, destinadas ao contato com alimentos, nas formas de garrafa, filme flexível, saco abre e fecha (“zip lock”) e filme laminado, de diferentes polímeros, sendo eles PEBD, polietileno de alta densidade (PEAD), e PVC. Os materiais foram adquiridos diretamente no comércio e através de parcerias estabelecidas com seus fabricantes.

3.2 Ensaio de migração em simulante alimentar

Para o ensaio de migração específica de nanopartículas de prata, foram cortadas, com o auxílio de um molde calibrado, uma seção com 1 dm² de área da amostra. Cada seção foi colocada em contato com 50 mL de solvente simulante em um erlenmeyer de vidro de 250 mL com tampa, e acondicionado em estufa.

O método analítico de migração foi estabelecido através da RDC nº 51 da ANVISA de 26 de novembro de 2010 (BRASIL, 2010), sendo as condições do ensaio definidas com base no disposto para materiais em contato com alimentos gordurosos, aquosos ácidos e aquosos não ácidos. A Resolução estabelece a solução de etanol a 95 % (v/v), em água desionizada como um dos possíveis simulantes para alimentos gordurosos. Para alimentos aquosos ácidos, é estabelecida a utilização de solução de ácido acético a 3% (m/v) em água desionizada. E para alimentos aquosos não ácidos o simulante estabelecido é a água desionizada. Adicionalmente, foi utilizada, para as embalagens de leite, a solução de etanol a 50 % (v/v) em água desionizada. O solvente é estabelecido para

simulação de leite e bebidas lácteas, integrais, desnatadas e parcialmente desnatadas.

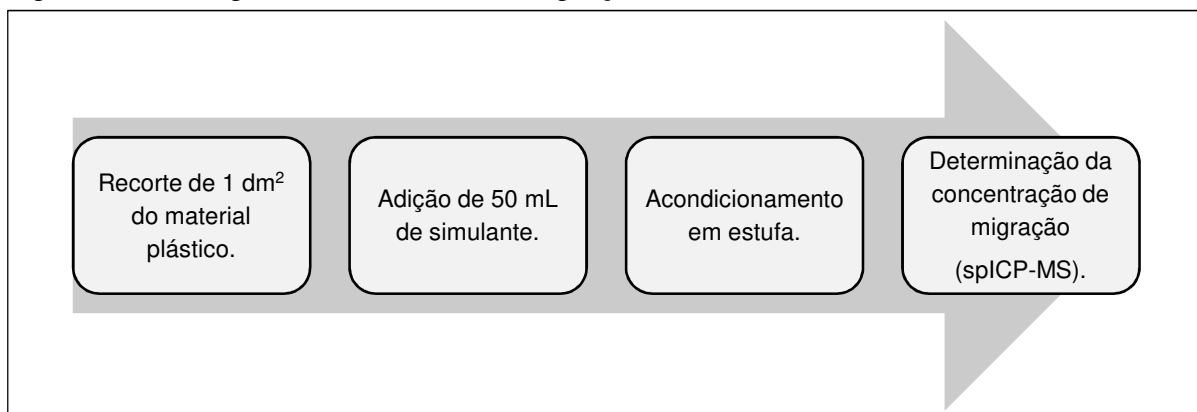
Para as amostras de embalagens de leite, o ensaio de migração foi realizado à temperatura de 20 °C por 10 dias. As condições são recomendadas pelas legislações brasileira e europeia para tempos de contato superiores a 24 h em temperaturas maiores que 5 °C e menores ou iguais a 20 °C, quando utilizados os simulantes selecionados. Para as demais amostras o ensaio foi realizado à temperatura de 40 °C por 10 dias, sendo as condições recomendadas para tempos de contato superiores a 24 h em temperaturas entre 20 °C e 40 °C. As condições foram estabelecidas com base no pior caso de exposição do alimento à embalagem. O Quadro 5 apresenta as condições utilizadas nos ensaios e a Figura 4 apresenta o fluxograma do ensaio de migração.

Quadro 5 - Condições dos ensaios de migração segundo a RDC nº 51 da ANVISA de 26 de novembro de 2010

Amostra	Simulante	Temperatura de Contato	Tempo de Contato
Embalagens de Leite	Etanol 50 % (v/v)	20 °C	10 dias
Demais Materiais	Etanol 95 % (v/v) Ácido acético 3 % (m/v) Água desionizada	40 °C	10 dias

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada; ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
Fonte: (BRASIL, 2010).

Figura 4 - Fluxograma do ensaio de migração



spICP-MS: espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente, executado no Modo de Detecção Individual.
Fonte: O autor, 2020.

Ao final do ensaio de migração, as soluções provenientes do ensaio de migração foram evaporadas até secar e ressuspensas com 10 mL de água desionizada. Em seguida, a solução foi analisada em triplicata (três leituras) por spICP-MS.

3.3 Caracterização das nanopartículas presentes nas amostras

Foi realizada a identificação e caracterização das nanopartículas de prata presentes nos materiais plásticos por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para caracterização das nanopartículas de prata presentes nos materiais plásticos, uma porção de 10 gramas do material foi calcinada, em mufla, à temperatura de 600 °C por 4 horas. As cinzas foram homogeneizadas, uma pequena quantidade foi depositada sobre uma fita de carbono e o excesso foi eliminado soprando-se a fita com nitrogênio. Suportes metálicos (*stub*) contendo as fitas de carbono foram analisados por MEV e a identificação das nanopartículas de prata foi realizada por Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS) (HUANG *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2016).

3.4 Determinação da concentração de prata por spICP-MS

3.4.1 Condições de operação do ICP-MS

O ICP-MS foi operado com potência RF de 1600 W e fluxos de gás no nebulizador, plasma, e auxiliar de 1,1 L min⁻¹, 13 L min⁻¹ e 0,7 L min⁻¹, respectivamente. O tempo de análise foi de 100 s, o “*Dwell Time*” de 50 μs e o fluxo de amostragem nominal de 0,20 mL min⁻¹. O fluxo de amostragem foi determinado experimentalmente para cada dia de análise.

3.4.2 Determinação do fluxo de amostragem

Para a determinação experimental do fluxo de amostragem, foi selecionada a rotação da bomba em -20 RPM. A uma bureta de 1 mL, calibrada, foi adicionada água desionizada e o volume foi ajustado a “zero”. O “probe” de amostragem foi posicionado dentro da bureta e a água desionizada foi aspirada até chegar à câmara

de nebulização. Foi registrado o volume aspirado inicial va_i , em mL, e a bomba foi ligada novamente durante 1 minuto. O volume aspirado final va_f , em mL, foi registrado e o fluxo de amostragem foi definido, em mL min^{-1} , pela diferença entre os volumes va_f e va_i .

3.4.3 Definição da Eficiência de Transporte

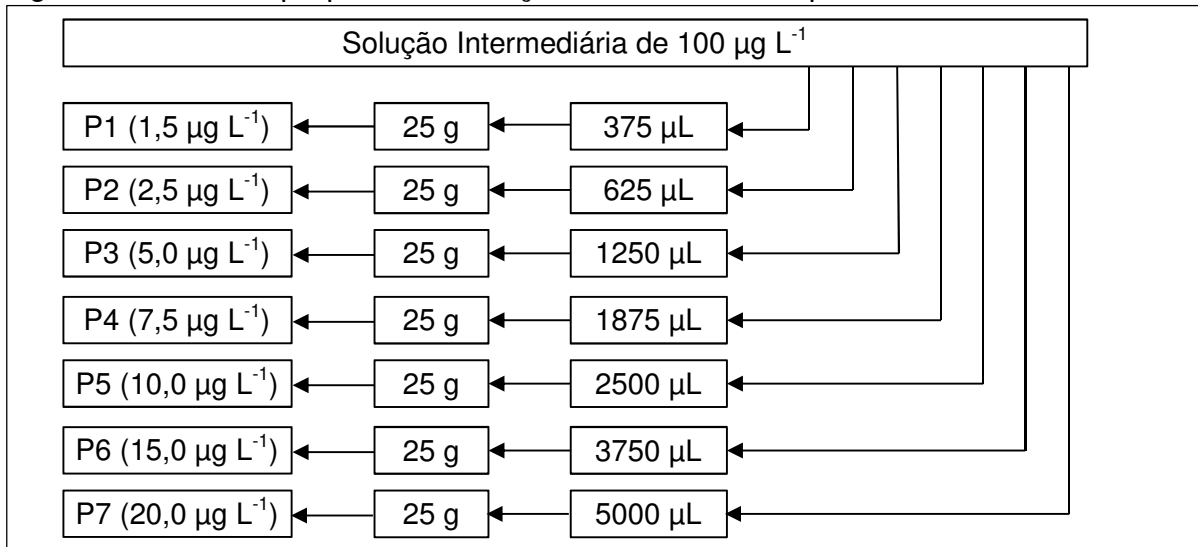
A Eficiência de Transporte - TE foi definida através da análise de uma solução contendo aproximadamente 10^5 nanopartículas de prata com 30 nm. Para o preparo da solução de nanopartículas, inicialmente foi preparada uma solução intermediária medindo-se 15 μL de um padrão de nanopartículas de prata de 30 nm (Silver Nanospheres – 30 nm, Sigma Aldrich, Missouri, EUA), com concentração igual a $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$, equivalente a $1,6 \times 10^{11}$ partículas mL^{-1} . O volume final da solução foi ajustado a 15 mL com água desionizada. Em seguida, a solução de nanopartículas foi preparada medindo-se 31 μL da solução intermediária. O volume final da solução foi ajustado a 50 mL com água desionizada. Os volumes das alíquotas foram medidos com o auxílio de micropipeta calibrada de 100 μL . Segundo Pace e colaboradores (2011), a TE é a razão entre a quantidade de analito que entra no plasma e a quantidade de analito aspirado.

3.4.4 Preparo da Curva Analítica

3.4.4.1 Preparo das soluções de trabalho de prata dissolvida

Uma solução intermediária de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de prata dissolvida foi preparada medindo-se, com o auxílio de uma micropipeta, uma alíquota de 250 μL de um padrão multi-elementar (Multi-Element Calibration Standard, Perkin Elmer) contendo $10.000 \mu\text{g L}^{-1}$ de prata dissolvida. A alíquota foi transferida para um tubo de polipropileno de 50 mL e a sua massa foi medida em uma balança calibrada. A massa final da solução foi ajustada à aproximadamente 25 gramas. Para o preparo da curva analítica, sete soluções de trabalho foram preparadas medindo-se volumes apropriados da solução intermediária preparada. A Figura 5 apresenta o fluxo de preparo das soluções de trabalho.

Figura 5 - Fluxo de preparo das soluções de trabalho de prata dissolvida



P1 a P7: Códigos de identificação das soluções de trabalho.
 Fonte: O autor, 2020.

Os volumes das alíquotas foram medidos com o auxílio de micropipetas calibradas de 1000 e 5000 µL e suas massas foram medidas, em balança calibrada, após a transferência para tubos de polipropileno de 50 mL. As massas finais das soluções foram ajustadas à aproximadamente 25 gramas. Foram determinadas as concentrações finais das soluções, em µg L⁻¹, através da concentração da solução intermediária e das massas medidas das alíquotas e das soluções finais.

3.4.4.2 Curva analítica de prata dissolvida

Para construção da curva de prata dissolvida, foi realizada a leitura das soluções de trabalho P1 a P7 e a intensidade do sinal (*counts*), referente à cada padrão, foi relacionada à sua concentração de prata dissolvida, em µg L⁻¹.

3.4.4.2.1 Definição da curva de fluxo de massas

As concentrações de prata dissolvida das soluções de trabalho foram correlacionadas à quantidade de massa de prata referente a cada leitura (“*dwell time*”) (PACE *et al.*, 2011). A equação 1 apresenta a relação entre a concentração da prata em µg mL⁻¹ e a massa de prata de cada partícula (µg/ evento). A relação é ainda ajustada pela *TE*, que é razão entre a quantidade de analito que entra no plasma e a quantidade de analito aspirado.

$$M = \frac{TE}{100} \times F \times t_{dt} \times C$$

Equação 1

onde,

M = massa de prata em cada evento (μg / evento),

TE = eficiência de transporte em %,

F = fluxo de amostragem em mL ms^{-1} ,

C = concentração da prata dissolvida em $\mu\text{g mL}^{-1}$,

t_{dt} = tempo de leitura “*dwell time*” em ms.

3.4.5 Determinação do tamanho médio de partículas de prata nas soluções provenientes do ensaio de migração

Para determinação do tamanho médio das partículas de prata presentes na solução, a intensidade do sinal medido para cada partícula é correlacionada, por meio da curva de fluxo de massas, com a sua massa e assim calculado o seu tamanho. De uma forma geral, assumindo que a partícula possui forma esférica, o seu tamanho pode ser calculado pela equação 2 (PACE et al., 2011; NAASZ et al., 2018). O resultado final foi reportado na forma de tamanho médio de partículas, em nm.

$$d = \sqrt[3]{\frac{6m_p}{\pi\rho}} \times 10^7$$

Equação 2

onde,

d = diâmetro da partícula em nm,

ρ = densidade da partícula em $\mu\text{g cm}^{-3}$

$m_p = \frac{(I_p - I_{branco}) - b}{a}$, massa da partícula obtida por interpolação na curva de fluxo de massas, em μg . I_p é a intensidade do sinal medido para a partícula, I_{branco} é a intensidade média do sinal do branco, b é o intercepto da curva e a é a inclinação da curva.

O tamanho médio de partículas de prata T_m , nas soluções provenientes do ensaio de migração, foi calculado por meio da média dos valores de tamanho médio

de partículas de prata, em nm, apresentados para as três leituras da solução proveniente do ensaio de migração.

3.4.6 Determinação da concentração de nanopartículas de prata

A concentração de nanopartículas de prata em número de partículas por mililitro é calculada a partir do número de partículas (eventos), levando em consideração o volume total de solução aspirado durante o tempo de análise (Equação 3).

$$N = \frac{n}{F \cdot t_a} \times \frac{100}{TE} \quad \text{Equação 3}$$

onde,

N = Concentração em número de partículas por mL (partículas mL⁻¹),

n = Número de partículas (eventos),

TE = eficiência de transporte em %,

F = fluxo de amostragem em mL ms⁻¹,

t_a = tempo de análise em ms.

No ensaio de migração, o resultado final (Equação 4) foi reportado em número de partículas por kg de alimento, levando em consideração a relação de 6 dm² de amostra por kg de alimento e a razão entre o tamanho da amostra e o volume de migração, referentes ao ensaio de migração (UNIÃO EUROPÉIA, 2011; BRASIL, 2019).

$$C_N = \bar{N} \times \frac{R}{T_A} \times V_R \quad \text{Equação 4}$$

onde,

C_N = Concentração em número de partículas por kg de alimento (partículas kg⁻¹),

\bar{N} = Média das concentrações de partículas (N), em partículas mL⁻¹, calculada para as três leituras da solução de migração,

V_R = Volume de ressuspensão no ensaio de migração, em mL,

T_A = Tamanho da seção da amostra, utilizado no ensaio de migração, em dm²,

R = Razão superfície/volume, igual a $6 \text{ dm}^2 \text{ kg}^{-1}$ (UNIÃO EUROPÉIA, 2011; BRASIL, 2019).

Adicionalmente, a concentração de partículas foi expressa em massa de partículas, em ng, por kg de alimento (Equação 5).

$$C_M = C_N \times \left(\frac{d^3 \times \pi \times \rho}{6} \right) \quad \text{Equação 5}$$

onde,

C_M = Concentração em massa de partículas por kg de alimento (ng kg^{-1}),

C_N = Concentração em número de partículas por kg de alimento ($\text{partículas kg}^{-1}$),

d = tamanho médio de partículas de prata nas soluções provenientes do ensaio de migração, em cm,

$\pi = 3,14159265359$

ρ = densidade da partícula, em ng cm^{-3} .

3.4.7 Determinação da concentração de prata dissolvida

A concentração de prata dissolvida, D em ng L^{-1} , foi calculada por meio da intensidade do sinal contínuo (*counts*), correlacionado à concentração de prata dissolvida em solução, por interpolação na curva de prata dissolvida (concentração de prata, $\mu\text{g L}^{-1}$ x Intensidade do sinal, *counts*). A concentração de prata dissolvida, nas soluções provenientes do ensaio de migração C_{dissol} , foi reportada em μg de prata dissolvida por kg de alimento (Equação 6).

$$C_{dissol} = \bar{D} \times \frac{R}{T_A} \times V_R \quad \text{Equação 6}$$

onde,

C_{dissol} = Concentração de prata dissolvida na solução de migração, em ng por kg de alimento (ng kg^{-1})

\bar{D} = Média das concentrações de prata dissolvida, em ng L^{-1} , calculada para as três leituras da solução de migração

V_R = Volume de ressuspensão no ensaio de migração, em L

T_A = Tamanho da seção da amostra, utilizado no ensaio de migração, em dm^2

R = Razão superfície/volume, igual a $6 \text{ dm}^2 \text{ kg}^{-1}$ (UNIÃO EUROPÉIA, 2011; BRASIL, 2019)

3.5 Determinação da concentração de prata total nas amostras poliméricas

Para a determinação da concentração de prata total no polímero, as amostras foram cortadas em pequenos pedaços e uma porção, de aproximadamente 100 mg, foi medida e transferida para tubos de digestão de teflon. Para cada amostra foram analisadas duas repetições, medindo-se duas porções do material plástico. Em seguida, foram adicionados 5 mL de H_2O_2 30% e 5 mL de HNO_3 65%. Os tubos foram fechados e levados ao micro-ondas. O Quadro 6 apresenta as condições da digestão em micro-ondas.

Quadro 6 - Programa para digestão das amostras poliméricas por micro-ondas

Etapa	Tempo (minutos)	Potência (W)	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)
1	30	882	4,0	160
2	20	882	4,0	210
Ventilação	10	-	-	-

Fonte: O autor, 2020.

Após o resfriamento das amostras, as alíquotas foram transferidas dos tubos de teflon para tubos de centrífuga de 15 mL e o volume foi ajustado para 10 mL (V_d) com água desionizada. Em seguida, as soluções foram diluídas apropriadamente, e analisadas em triplicata (três leituras) por spICP-MS. A Tabela 1 apresenta as massas de amostras e os volumes de diluição. As amostras foram diluídas para que a concentração de prata nas soluções estivesse dentro da faixa de concentração da curva analítica.

Tabela 1 - Massas medidas das amostras de polímeros

Amostra	Polímero	Alíquota de diluição (mL)	Volume final (mL)	Repetição (i)	Massa de amostra (mg)
AM-01	PEBD	0,650	10	1	100,26
				2	104,54
AM-02	PEAD	0,800	10	1	99,73
				2	101,86
AM-03	PEBD	1,000	10	1	103,56
				2	104,00
AM-04	PVC	1,000	10	1	102,04
				2	101,38
AM-05	PVC	0,937	14	1	112,60
				2	105,75

AM-01 a AM-05: Códigos de identificação das amostras; PEBD: Polietileno de baixa densidade; PEAD: Polietileno de alta densidade; PVC: Poli (cloreto de vinila).
Fonte: O autor, 2020.

A concentração de prata total $C_{ma}repe_i$, em cada i repetição da amostra, foi calculada por meio da equação 7. A concentração final de prata total (C_{ma}), para cada amostra, foi calculada pela média das concentrações ($C_{ma}repe_i$) calculadas para as i repetições da amostra.

$$C_{ma}repe_i (\mu g g^{-1}) = \left(\frac{\bar{D} \times V_f}{V_a} \times \frac{V_d}{1000} \right) / m_a \quad \text{Equação 7}$$

onde,

$C_{ma}repe_i$ = Concentração de prata total, em $\mu g g^{-1}$,

\bar{D} = Média das concentrações de prata dissolvida, em $\mu g L^{-1}$, calculada para as três leituras da amostra,

V_f = volume final de diluição, em mL,

V_a = volume da alíquota de diluição, em mL,

V_d = volume de digestão, em mL,

m_a = massa de amostra, em g.

Para avaliação da recuperação da determinação da concentração de prata total no polímero, foram medidos 105,06 mg da amostra AM-03. A massa foi transferida para um tubo de digestão e foram adicionados 50 μL de um padrão contendo 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata, com tamanho de 50 nm. A recuperação da determinação da prata total $RT\%$ foi calculada através da equação 8. Para concentrações da ordem de 1 mg kg^{-1} (ppm), a recuperação é considerada adequada entre 80 e 110 %. O critério é sugerido pela AOAC INTERNATIONAL (AOAC INTERNATIONAL, 2016) e indicado pelo Inmetro no documento orientativo DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos (INMETRO, 2020).

$$RT\% = \frac{C_{mf} - C_{ma}}{C_r} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

onde,

C_{ma} = concentração final de prata total, em $\mu\text{g g}^{-1}$, calculada para a amostra sem fortificação,

C_{mf} = concentração final de prata total, em $\mu\text{g g}^{-1}$, calculada para a amostra fortificada,

$C_r = \frac{C_p \times v_p}{m_a}$, Concentração de adição, em $\mu\text{g g}^{-1}$. C_p é a concentração do padrão de nanopartículas de prata utilizado na fortificação da amostra, em $\mu\text{g mL}^{-1}$, m_a é a massa de amostra, em g, e v_p é o volume da alíquota do padrão adicionado, em mL.

3.6 Validação da metodologia

O método foi validado intralaboratorialmente conforme descrito no Procedimento Operacional Padronizado - POP nº 65.3120.126 (INCQS/FIOCRUZ, 2017). O procedimento segue recomendações do documento DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2020), e dos trabalhos publicados por Thompson, Ellison e Wood (2002), Horwitz e Albert (2006) e Souza (2007). Foram verificados os parâmetros linearidade, efeito de matriz, repetibilidade, precisão intermediária, limite de detecção de tamanho de partícula (LOD_T), limite de detecção de concentração de partículas (LOD_p), limite de detecção da concentração de prata dissolvida (LOD_d) e seletividade.

3.6.1 Avaliação da linearidade da curva analítica

Para a avaliação da linearidade da curva analítica, foram preparadas sete soluções de trabalho como descrito no item 3.4.3. A Tabela 2 apresenta os dados do preparo das soluções de trabalho. A curva analítica foi definida pela análise de três replicatas das soluções de trabalho P1 a P7.

Tabela 2 - Preparo das soluções de trabalho do ensaio de linearidade

Solução de Trabalho	Massa da Alíquota (mg)	Massa Final da Solução (g)	Concentração da Solução de Trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)
P1	368,52	25,08549	1,50
P2	621,07	25,19316	2,52
P3	1245,09	25,01387	5,09
P4	1859,41	25,20335	7,55
P5	2478,19	25,18462	10,07
P6	3706,25	24,94708	15,20
P7	4912,85	25,10321	20,03

P1 a P7: Códigos de identificação das soluções de trabalho do ensaio de linearidade.
Fonte: O autor, 2020.

Com os dados obtidos nas análises dos padrões, a curva analítica de prata dissolvida foi convertida em fluxo de massas, e os parâmetros de regressão foram estimados com o auxílio da planilha intitulada “Planilha para Avaliação de Premissas” elaborada por Bazilio e colaboradores (2012b). Foi avaliada a presença de valores extremos (“*outliers*”), a normalidade, homoscedasticidade e a independência dos resíduos da regressão e o ajuste ao modelo linear.

3.6.1.1 Estimativa dos parâmetros de regressão

Os parâmetros de regressão foram estimados através das Equações 9 e 10.

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

Equação 9

onde,

b é a inclinação da reta ajustada,

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}),$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2.$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

Equação 10

onde,

a é a interseção da reta ajustada,

y é a resposta medida,

x é a concentração do analito,

n é o número total de pontos da curva analítica.

O resíduo e_i referente a cada valor x_i , foi calculado através da Equação 11.

$$e_i = y_i - \hat{y}_i$$

Equação 11

sendo,

\hat{y}_i = variável dependente estimada pela equação de regressão.

O coeficiente de determinação do ajuste R^2 foi calculado, sendo definido pela Equação 12.

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

Equação 12

3.6.1.2 Tratamento de valores extremos

Os valores extremos foram avaliados pelo método dos resíduos padronizados Jacknife, cuja estatística é o resíduo padronizado Jacknife J_{ei} , calculado para cada ponto da curva de calibração, conforme descrito pela Equação 13.

$$J_{ei} = r_i \sqrt{\frac{n-p-1}{n-p-r_i^2}}$$

Equação 13

onde,

J_{ei} = resíduo padronizado,

n = número total de dados,

p = número de parâmetros do modelo,

$r_i = \frac{|e_i|}{s_{e_i}}$ (resíduo padronizado),

$s_{e_i} = s_{res} \sqrt{1 - h_i}$ (erro padrão do resíduo),

$h_i = \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}}$ (ponto de alavanca),

$s_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$ (desvio padrão residual).

Os resíduos padronizados Jackknife foram comparados com a distribuição $t_{(1-\frac{\alpha}{2}; n-p-1)}$. Valores de J_{ei} maiores que o valor de t crítico são considerados valores extremos, podendo ser removidos (BELSLEY; KUH; WELSCH, 1980). Primeiramente a replicata com maior valor absoluto de J_{ei} é excluída e em seguida são excluídas as demais repetições uma a uma, até o máximo de 22,2% do número original de dados (HORWITZ, 1995). Não se deve também excluir todo um nível de concentração, devendo permanecer ao menos uma repetição em cada nível. A cada dado excluído os parâmetros de regressão são novamente estimados.

3.6.1.3 Teste de normalidade

O método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) pressupõe que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, não havendo desvios de normalidade. A normalidade dos resíduos da regressão foi verificada pelo teste Ryan-Joiner (RYAN; JOINER, 1976). A hipótese nula de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal foi testada contra a hipótese alternativa de que os resíduos não seguem a distribuição normal. A hipótese nula é rejeitada quando o coeficiente de correlação de Ryan-Joiner R calculado for menor que o coeficiente de correlação crítico estabelecido (SOUZA, 2007).

Os resíduos foram primeiramente ordenados em ordem crescente. Em seguida, foi construído um gráfico dos valores dos resíduos ordenados e_i versus os

valores dos percentis estimados para uma distribuição normal reduzida q_i (quantis normais). Os quantis normais foram obtidos pela Equação 14.

$$q_i = \phi^{-1} \left\{ \frac{(i-3/8)}{(n+1/4)} \right\}, i = 1, \dots, n \quad \text{Equação 14}$$

onde,

q_i = valor normal esperado,

ϕ^{-1} = inverso de uma função de distribuição normal padrão.

O coeficiente de correlação R_{eq} entre e_i e q_i foi calculado pela Equação 15.

$$R_{eq} = \frac{S_{eq}}{\sqrt{S_{ee} \times S_{qq}}} \quad \text{Equação 15}$$

onde,

$$S_{eq} = \sum_{i=1}^n (e_i - \bar{e})(q_i - \bar{q}) = \sum_{i=1}^n e_i q_i - \frac{\sum_{i=1}^n e_i \sum_{i=1}^n q_i}{n},$$

$$S_{ee} = \sum_{i=1}^n (e_i - \bar{e})^2 = \sum_{i=1}^n e_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n e_i)^2}{n},$$

$$S_{qq} = \sum_{i=1}^n (q_i - \bar{q})^2 = \sum_{i=1}^n q_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n q_i)^2}{n},$$

$$\bar{e} = \frac{\sum_{i=1}^n e_i}{n},$$

$$\bar{q} = \frac{\sum_{i=1}^n q_i}{n}.$$

O coeficiente de correlação R_{eq} foi então comparado com o $R_{crit}(n)$ para um nível de significância α de 0,05, como descrito na Equação 16.

$$R_{crit}(n) \approx 1,0063 - \frac{0,1288}{\sqrt{n}} - \frac{0,6118}{n} + \frac{1,3505}{n^2} \quad \text{Equação 16}$$

O coeficiente de correlação R_{eq} deve ser maior que o valor de $R_{crit}(n)$. Valores abaixo indicam, a não normalidade dos resíduos da regressão.

3.6.1.4 Teste de homoscedasticidade

A homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi verificada através do teste de Levene (LEVENE, 1960), modificado por Brown & Forsythe (BROWN; FORSYTHE, 1974). Foi testada a hipótese nula H_0 de que as variâncias dos resíduos não diferem entre si (homoscedásticas) contra a hipótese alternativa H_1 de que as variâncias dos resíduos são diferentes (heteroscedásticas). A hipótese nula é rejeitada quando a estatística calculada t_L for maior que o valor de t crítico, obtido da distribuição $t_{(1-a/2;n_1+n_2-2)}$.

Os resíduos foram divididos igualmente em dois grupos, porém sem haver separação de repetições de um mesmo nível em grupos diferentes. Um deve conter os níveis de menor concentração e outro os níveis restantes. Foram calculadas as medianas dos resíduos de cada grupo (\tilde{e}_1 e \tilde{e}_2), o valor absoluto das diferenças entre os resíduos e as medianas dos respectivos grupos ($d_{1j} = |\tilde{e}_1 - e_{1j}|$ e $d_{2j} = |\tilde{e}_2 - e_{2j}|$), a média das diferenças \bar{d}_k e a soma dos quadrados dos desvios SQD_k dos valores d_{kj} de cada k grupo. A estatística t_L foi obtida pela Equação 17.

$$t_L = \frac{|\bar{d}_1 - \bar{d}_2|}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) s_p^2}} \quad \text{Equação 17}$$

onde,

$$\bar{d}_k = \frac{\sum_{j=1}^{n_k} d_{kj}}{n_k} \text{ (desvio médio de cada } k \text{ grupo),}$$

$$d_{kj} = |\tilde{e}_k - e_{kj}| \text{ (módulo do desvio da mediana de cada } k \text{ grupo),}$$

n_k = número de dados em cada k grupo,

\tilde{e}_k = mediana de cada k grupo,

$$s_p^2 = \frac{\sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^{n_k} (d_{kj} - \bar{d}_k)^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \text{ (variância combinada).}$$

Há indicação de homoscedasticidade caso a estatística t_L não exceda o valor crítico $t_{(1-a/2;n_1+n_2-2)}$ obtido da distribuição t de Student (LEVENE, 1960; BROWN; FORSYTHE, 1974).

3.6.1.5 Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)

A autocorrelação ou independência dos resíduos foi verificada através do teste de Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1951). A hipótese nula H_0 de que não há autocorrelação dos resíduos, sendo os resíduos independentes, foi confrontada com a hipótese alternativa H_1 de que há autocorrelação dos resíduos. A estatística deste teste é a estatística d , definida pela Equação 18.

$$d = \frac{\sum_{i=1}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad \text{Equação 18}$$

Foram calculados dois limites críticos d_L (limite inferior) e d_U (limite superior). Valores da estatística d entre os dois limites indicam resultado inconclusivo para o teste. Valores de d menores que d_L , indicam autocorrelação e rejeição da hipótese nula com um nível de significância de 2α . Valores de d maiores que d_U indicam independência dos resíduos e não rejeição da hipótese nula. Os limites d_L e d_U para um nível de significância α igual a 0,05 são dados pelas Equações 19 e 20.

$$d_L \approx 1,9693 - \frac{2,8607}{\sqrt{n}} - \frac{3,4148}{n} + \frac{16,6400}{n^2} \quad \text{Equação 19}$$

$$d_U \approx 1,9832 - \frac{3,0547}{\sqrt{n}} + \frac{1,3862}{n} + \frac{16,3662}{n^2} \quad \text{Equação 20}$$

3.6.1.6 Teste de significância da regressão e do desvio da linearidade

O teste de significância da regressão e do desvio da linearidade foi realizado através da análise de variância apresentada no Quadro 7, avaliada através da estimativa dos parâmetros pelo MMQO.

Quadro 7 - Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p – valor</i>
Regressão	1	$\frac{[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$	$\frac{SQ_{Regr}}{GL_{Regr}}$	$\frac{QM_{Regr}}{s_{res}^2}$	Distribuição de probabilidade F <i>DISTF</i> ($F_{Regr}; GL_{Regr}; GL_{Residuo}$)
Resíduos	$n-2$	$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$	$\frac{SQ_{Res}}{GL_{Res}} = s_{re}^2$		
Desvio da Linearidade	$u-2$	$\sum_{k=1}^n n_k (\hat{y}_k - \bar{y}_k)^2$	$\frac{SQ_{Desvio}}{GL_{Desvio}}$	$\frac{QM_{Desvio}}{QM_{ErroPuro}}$	Distribuição de probabilidade F <i>DISTF</i> ($F_{Desvio}; GL_{Desvio}; GL_{ErroPuro}$)
Entre Níveis	$u-1$	$\sum_{k=1}^n n_k (\bar{y}_k - \bar{y})^2$			
Erro Puro	$n-u$	$\sum_{k=1}^u \sum_{j=1}^{n_k} (y_{kj} - \bar{y}_k)^2$	$\frac{SQ_{ErroPuro}}{GL_{ErroPuro}}$		
Total	$n-1$	$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$	$\frac{SQ_{Total}}{GL_{Total}}$		

FV, fonte de variação; *GL*, graus de liberdade; *SQ*, soma dos quadrados; *QM*, média dos quadrados; *F*, estatística da análise de variância; *p – valor*, probabilidade da estatística calculada; *n*, número de pontos da curva analítica; *u*, número de níveis de concentração; *n_k*, número de pontos em cada nível de concentração; *y_i*, resposta medida; *x_i*, concentração do analito; \hat{y}_i , variável dependente estimada pela equação de regressão; \bar{y} , média das respostas medidas; \bar{x} , média das concentrações; *y_{kj}*, *j*-ésima resposta medida do *k*-ésimo nível de concentração; \bar{y}_k , média das respostas medidas do *k*-ésimo nível de concentração, \hat{y}_{kj} , variável dependente estimada pela equação de regressão para o *k*-ésimo nível de concentração.

Fonte: (DRAPER; SMITH, 1998).

Foi testada a hipótese nula H_0 de que a regressão linear não é significativa, contra a hipótese alternativa H_1 de que a regressão linear é significativa. A hipótese nula é rejeitada quando a probabilidade da estatística calculada (*p – valor*) observada para a regressão for menor que a significância α . Assim, a regressão é considerada significativa quando o *p – valor* estimado for menor que 0,001 para um nível de confiança de 99,9%. Para avaliação do desvio da linearidade, é testada a hipótese nula H_0 de que não há desvio da linearidade, contra a hipótese alternativa H_1 de que os dados não se ajustam ao modelo linear. A hipótese nula é rejeitada quando a probabilidade da estatística calculada (*p – valor*) observada para a regressão for menor que a significância α . Com isso, o desvio da linearidade é considerado não significativo quando o *p – valor* estimado for maior que 0,05 para um nível de confiança de 95% (DRAPER; SMITH, 1998).

3.6.2 Efeito de Matriz

Souza (2007) descreve um procedimento analítico para avaliação do efeito de matriz, onde uma curva analítica preparada em solvente é comparada com uma curva preparada na presença da matriz da amostra. O efeito de matriz é considerado não significativo quando as curvas analíticas preparadas não diferem estatisticamente entre si.

Para o preparo da curva na presença da matriz, foram analisadas duas repetições de amostras de filme flexível de PVC e sacos do tipo “abre e fecha” de polietileno de baixa densidade - PEBD, sem a presença de nanopartículas de prata. Todas as etapas previstas no método de migração foram seguidas. Ao final da etapa de migração, as quatro soluções foram reunidas e homogeneizadas formando uma única solução de migração, contendo as matrizes presentes nos dois polímeros. As soluções da curva analítica foram preparadas seguindo-se o procedimento descrito para o preparo da curva analítica em solvente, porém utilizando-se a solução de matriz preparada no lugar da água desionizada. A Tabela 3 apresenta os dados do preparo das soluções de trabalho. A curva analítica foi definida pela análise de três replicatas das soluções de trabalho P1' a P7'.

Tabela 3 - Preparo das soluções de trabalho do ensaio de efeito matriz

Solução de Trabalho	Massa da Alíquota (mg)	Massa Final da Solução (g)	Concentração da Solução de Trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)
P1'	370,44	25,08183	1,51
P2'	617,14	25,55546	2,47
P3'	1238,92	25,44721	4,98
P4'	1853,6	25,25660	7,51
P5'	2472,96	24,73307	10,23
P6'	3698,69	25,58000	14,80
P7'	4973,56	24,43274	20,83

P1' a P7': Códigos de identificação das soluções de trabalho do ensaio de efeito matriz.

Fonte: O autor, 2020.

3.6.2.1 Avaliação dos resultados

Primeiramente foi avaliada a linearidade da curva analítica preparada na presença da matriz. Uma vez confirmadas as premissas dos resíduos da regressão (normalidade, homoscedasticidade e independência) e as premissas do modelo (significância da regressão e não desvio da linearidade), a curva foi comparada com a curva em solvente, preparada anteriormente. Foi verificada a homogeneidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas através do teste de F (SNEDECOR; COCHRAN, 1989). A hipótese nula H_0 de que as variâncias dos resíduos das duas curvas (solvente e matriz) não diferem entre si foi confrontada com a hipótese alternativa H_1 de que as variâncias dos resíduos são diferentes. A hipótese nula é rejeitada quando a probabilidade da estatística F calculada ($p - valor$) for menor que a significância $\alpha/2$, para o nível de confiança estabelecido.

A estatística F do teste foi calculada através da Equação 21, com o maior valor de s_{res}^2 no numerador e foi utilizada para estimativa do $p - valor$. A homoscedasticidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas é observada quando $p - valor$ for maior que a significância $\alpha/2$ de 0,025, para um nível de confiança de 95% e graus de liberdade para as variâncias das curvas iguais a $n_1 - 2$ (numerador) e $n_2 - 2$ (denominador), sendo n o número de pontos da curva.

$$F = \frac{s_{res1}^2}{s_{res2}^2} \quad \text{Equação 21}$$

As curvas foram comparadas através de teste t, confrontando a hipótese nula H_0 de que as inclinações e interseções não diferem entre si (não há efeito de matriz) com a hipótese alternativa H_1 de que as inclinações e interseções são diferentes (há efeito de matriz) (SOUZA, 2007). A hipótese nula de que não há efeito de matriz é rejeitada quando as probabilidades das estatísticas t_a e t_b calculadas ($p - valor$) são menores que a significância $\alpha/2$, para o nível de confiança estabelecido.

Havendo homoscedasticidade entre as variâncias das duas curvas, as inclinações (Equação 22) e interseções (Equação 23) são comparadas através do teste t com variâncias combinadas. Valores estimados para os $p - valores$ de t_a e t_b maiores que a significância $\alpha/2$ de 0,025, para um nível de confiança de 95% e

$n_1 + n_2 - 4$ graus de liberdade, indicam que não há efeito de matriz. Os índices 1 e 2 diferenciam as curvas preparadas no solvente e na matriz respectivamente.

$$t_b = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{s_p^2}{s_{xx1}} + \frac{s_p^2}{s_{xx2}}}} \quad \text{Equação 22}$$

$$t_a = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{s_p^2 \sum x_1^2}{n_1 s_{xx1}} + \frac{s_p^2 \sum x_2^2}{n_2 s_{xx2}}}} \quad \text{Equação 23}$$

onde, $s_p^2 = \frac{(n_1 - 2)s_{res1}^2 + (n_2 - 2)s_{res2}^2}{n_1 + n_2 - 4}$ (variância combinada).

Havendo heterocedasticidade, as inclinações (Equação 24) e interseções (Equação 25) das duas curvas são comparadas através do teste t com variâncias amostrais não homogêneas. Valores estimados para os p - valores de t'_a e t'_b maiores que a significância $\alpha/2$ de 0,025, para um nível de confiança de 95% e v graus de liberdade (Equação 26), indicam que não há efeito de matriz.

$$t'_b = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{s_{res1}^2}{s_{xx1}} + \frac{s_{res2}^2}{s_{xx2}}}} \quad \text{Equação 24}$$

$$t'_a = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{s_{res1}^2 \sum x_1^2}{n_1 s_{xx1}} + \frac{s_{res2}^2 \sum x_2^2}{n_2 s_{xx2}}}} \quad \text{Equação 25}$$

$$v = \frac{\left(\frac{s_{res1}^2}{n_1} + \frac{s_{res2}^2}{n_2}\right)^2}{\frac{(s_{res1}^2/n_1)^2}{n_1 - 2} + \frac{(s_{res2}^2/n_2)^2}{n_2 - 2}} \quad \text{Equação 26}$$

3.6.3 Determinação dos limites de detecção

3.6.3.1 Limites de detecção de tamanho e concentração de prata dissolvida

Para a definição dos limites de detecção de tamanho (LOD_T) e da concentração de prata dissolvida (LOD_d), foram realizadas quinze leituras de uma solução branca. Com os resultados obtidos, foram calculados a média e o desvio padrão do tamanho médio de partícula e da concentração de prata dissolvida,

encontrados para as leituras realizadas. Os limites LOD_T e LOD_d foram calculados conforme descrito pelas equações 27 e 28, respectivamente, com um grau de confiança de 95% (SOUZA, 2007; INMETRO, 2020).

$$LOD_T = \bar{T} + t_{(n-1,1-\alpha)} \times s_T \quad \text{Equação 27}$$

Onde,

\bar{T} = média dos tamanhos médios de partícula, em nm, determinados para os brancos,

t = abscissa da distribuição de Student unicaudal, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança,

s_T = desvio padrão dos tamanhos médios de partícula, em nm, determinados para os brancos.

$$LOD_d = \bar{C} + t_{(n-1,1-\alpha)} \times s_C \quad \text{Equação 28}$$

Onde,

\bar{C} = média das concentrações de prata dissolvida, em ng kg^{-1} , determinadas para os brancos,

t = abscissa da distribuição de Student unicaudal, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança,

s_C = desvio padrão das concentrações de prata dissolvida, em ng kg^{-1} , determinadas para os brancos.

3.6.3.2 Limite de detecção de concentração de partículas

Segundo Laborda e colaboradores (2013), o limite de detecção de concentração de partículas (LOD_p) é associado à capacidade do método de contar 3 partículas. Assim o LOD_p , em partículas kg^{-1} , foi determinado pela equação 29.

$$LOD_p = \frac{3}{F \times t_a} \times \frac{100}{TE} \times \frac{R}{T_A} \times V_R \quad \text{Equação 29}$$

Onde,

TE = eficiência de transporte em %,

F = fluxo de amostragem em mL ms^{-1} ,

t_a = tempo de análise em ms,

V_R = Volume de ressuspensão no ensaio de migração, em mL,

T_A = Tamanho da seção da amostra, utilizado no ensaio de migração, em dm^2 ,

R = Razão superfície/volume, igual a $6 \text{ dm}^2 \text{ kg}^{-1}$ (UNIÃO EUROPÉIA, 2011; BRASIL, 2019).

Adicionalmente, o LOD_p foi calculado, em ng kg^{-1} de alimento, referente ao tamanho de partículas determinado para o LOD_T .

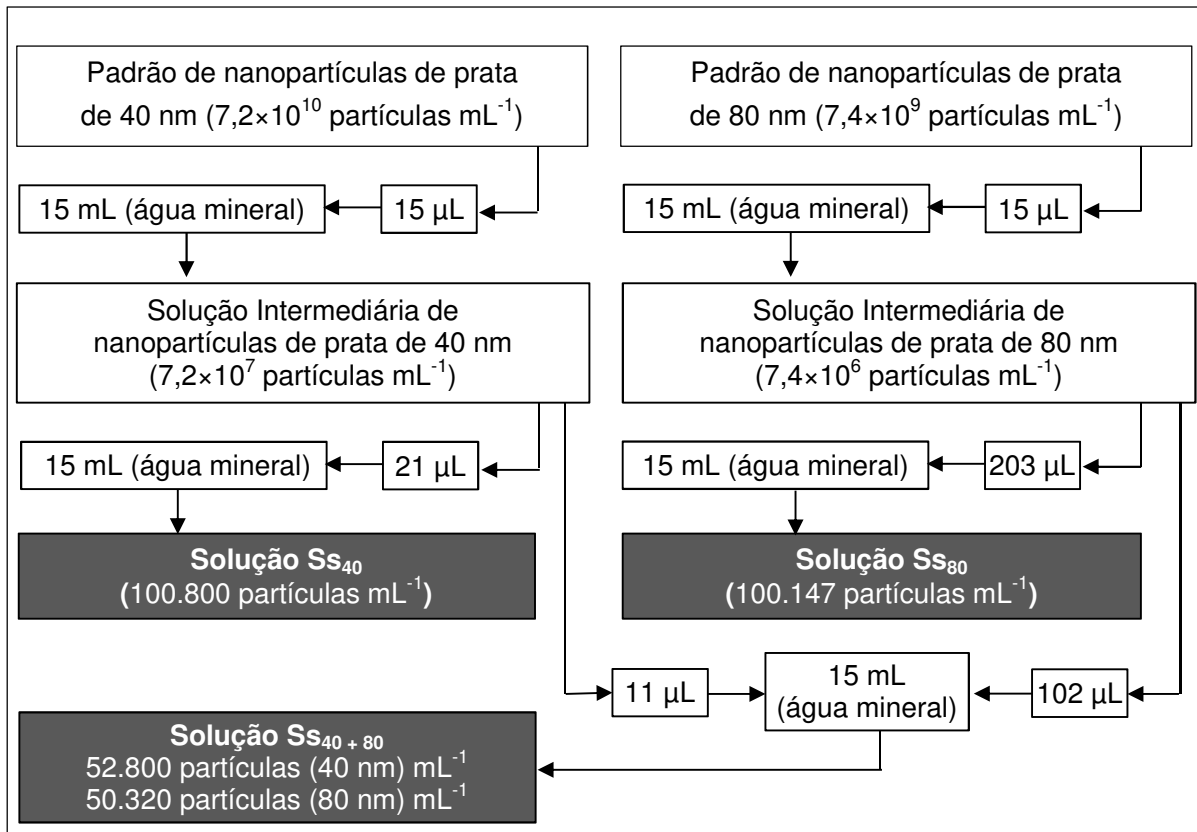
3.6.4 Seletividade

Para a avaliação da seletividade do método, foram preparadas soluções contendo aproximadamente 100.000 nanopartículas de prata por mililitro, com tamanhos de 40 (Ss_{40}) e 80 nm (Ss_{80}), confeccionadas a partir de soluções intermediárias. Adicionalmente, foi preparada uma solução contendo aproximadamente 50.000 nanopartículas de cada tamanho (Ss_{40+80}) por mililitro.

Para o preparo das soluções intermediárias foram medidas alíquotas de 15 μL de padrões de nanopartículas de prata de 40 (Silver Nanospheres – 40 nm, Sigma Aldrich) e 80 nm (Silver Nanospheres – 80 nm, Sigma Aldrich), com concentrações iguais a $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$, equivalentes a $7,2 \times 10^{10}$ e $7,4 \times 10^9$ partículas mL^{-1} , respectivamente. Os volumes finais das soluções foram ajustados a 15 mL com água mineral. Segundo Laborda e colaboradores (2016), na avaliação da seletividade do método, pode-se utilizar água mineral como uma matriz complexa para a medição e determinação da concentração de nanopartículas de prata em solução. Em seguida as soluções de nanopartículas Ss_{40} , Ss_{80} e Ss_{40+80} foram preparadas medindo-se alíquotas apropriadas das soluções intermediárias. Os volumes das alíquotas foram medidos com o auxílio de micropipetas calibradas de 100 e 1000 μL e os volumes finais das soluções foram ajustados a 15 mL com água mineral. Foram determinadas as concentrações finais das soluções, em número de partículas mL^{-1} , através da concentração da solução intermediária e dos volumes

das alíquotas e finais. A Figura 6 apresenta o fluxo de preparo das soluções de nanopartículas.

Figura 6 - Fluxo de preparo das soluções de nanopartículas de prata em água mineral



Ss₄₀: Solução de nanopartículas de prata com tamanho de 40 nm, do ensaio de seletividade; Ss₈₀: Solução de nanopartículas de prata com tamanho de 80 nm, do ensaio de seletividade; Ss₄₀₊₈₀: Solução contendo nanopartículas de prata com tamanhos de 40 nm e 80 nm, do ensaio de seletividade.

Fonte: O autor, 2020.

As soluções S₄₀, S₈₀ e S₄₀₊₈₀ foram analisadas por spICP-MS e a quantidade de partículas determinada experimentalmente, para cada padrão, foi comparada com as concentrações presentes nos certificados dos padrões. Os histogramas obtidos foram inspecionados visualmente.

3.6.5 Repetibilidade

Para avaliação da repetibilidade do método, foram analisadas dez repetições genuínas de uma mesma amostra de PEBD, com ação antimicrobiana, contendo nanopartículas de prata. Para cada repetição, foram realizadas todas as etapas do

ensaio de migração, com simulante alimentar água desionizada, a 40 °C, por 10 dias. As análises foram conduzidas nas mesmas condições analíticas, no menor espaço de tempo possível e pelo mesmo analista. Souza (2007), descreve o procedimento conduzido sob condições de repetibilidade, onde a precisão é expressa em termos de desvio padrão relativo das concentrações das repetições genuínas ensaiadas. Após o ensaio de migração, as soluções foram analisadas em sequência por spICP-MS. A repetibilidade do método foi avaliada para os parâmetros tamanho médio de partícula, concentração de partículas e concentração de prata dissolvida.

O teste foi avaliado por meio da razão de Horwitz (*HorRat*), originalmente calculada para condições de reprodutibilidade. Porém é possível utilizá-la na avaliação da repetibilidade utilizando-se o desvio padrão relativo DPR_r (Equação 30) e o desvio padrão relativo previsto $DPRP_r$, ambos em condições de repetibilidade.

$$DPR_r = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 30}$$

onde,

\bar{x} = média das concentrações ou tamanhos medidos para as repetições,

s = desvio padrão das concentrações ou tamanhos medidos para as repetições genuínas.

Os valores de $DPRP_r$ são tipicamente de meio a dois terços do valor do desvio padrão relativo previsto de reprodutibilidade $DPRP_R$, sendo este calculado através da equação de Horwitz. A equação representa empiricamente as alterações no $DPRP_R$ ocasionadas por variações na concentração da amostra. Para concentrações inferiores a 120 ng kg⁻¹ ou fração de massa de $1,2 \times 10^{-7}$, o $DPRP_R$ é igual a 22 % (Equação 31) (HORWITZ; ALBERT, 2006). Para o cálculo do $DPRP_r$, neste trabalho foi utilizada a razão máxima de dois terços (Equação 32). Para que fosse possível a avaliação dos resultados pela razão de Horwitz, o tamanho de partícula foi convertido em massa de partícula por evento e em seguida em massa de partícula pelo volume relacionado a cada evento (*“dwell time”*), sendo este último convertido em massa. Assim, os desvios relativos foram avaliados em ng de partícula por kg. A concentração de partículas foi convertida em massa de partículas por kg de alimento

(ng kg⁻¹), sendo considerado o tamanho médio de partículas determinado para cada repetição genuína.

$$DPRP_R = 22\% \quad \text{Equação 31}$$

$$DPRP_r = \frac{2}{3} \times 22 = 14,67\% \quad \text{Equação 32}$$

O método é considerado repetitivo com um valor de $HorRat_r$ (Equação 33) menor ou igual a 2.

$$HorRat_r = \frac{DPR_r}{DPRP_r} \quad \text{Equação 33}$$

3.6.6 Precisão Intermediária

Em dois dias diferentes, foram preparadas e analisadas, nove repetições de uma mesma amostra de PEBD, com ação antimicrobiana, contendo nanopartículas de prata. Para cada repetição, foram realizadas todas as etapas do ensaio de migração, com simulante alimentar água desionizada, a 40 °C, por 10 dias. Ao final do ensaio de migração, foram determinados o tamanho médio, a concentração de nanopartículas de prata e a concentração de prata dissolvida, que foram convertidos em massa da partícula (ng) kg⁻¹, ng kg⁻¹ e µg kg⁻¹, respectivamente. O teste foi avaliado através da determinação do desvio padrão de precisão intermediária relativo ao tempo si_{tempo} (Equação 34) e do desvio padrão relativo de precisão intermediária $DPR_{precint}$ (Equação 35).

$$si_{tempo} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2} \quad \text{Equação 34}$$

$$DPR_{precint} = \frac{si_{tempo}}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 35}$$

onde,

t = dias de análise,

n = repetições genuínas por dia,

x = concentração medida para a repetição,

\bar{x} = média das concentrações medidas para as repetições.

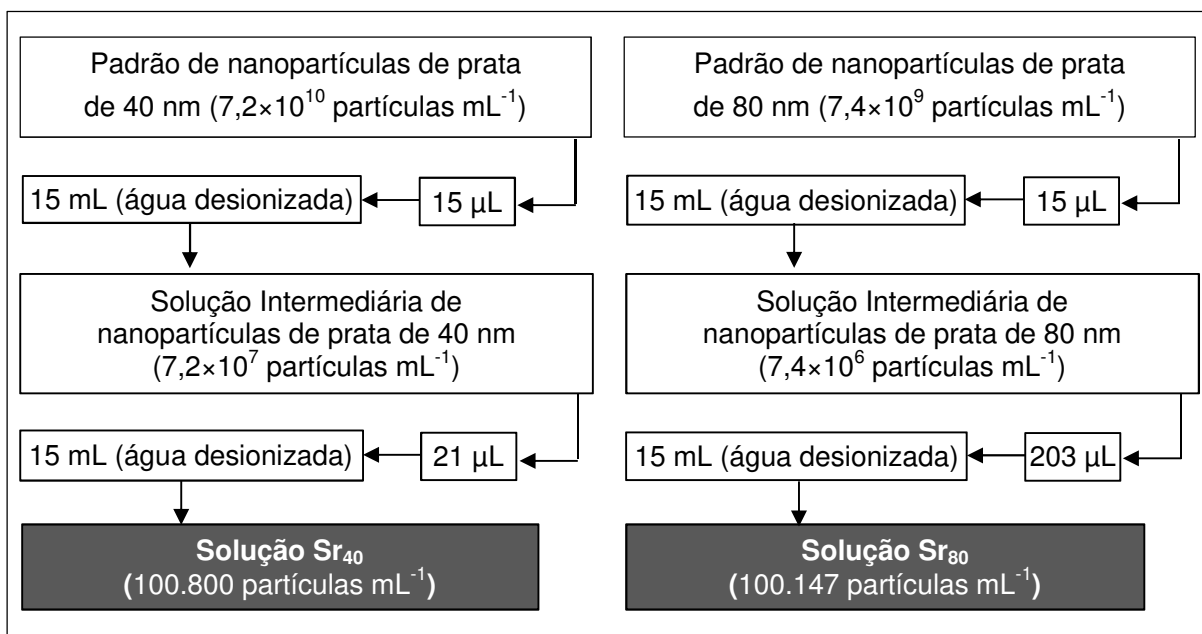
A razão $HorRat_R$ (Equação 36) foi calculada pela divisão entre o desvio padrão relativo de precisão intermediária $DPR_{precint}$ e o $DPRP_R$. Valores de $HorRat_R$ menores ou iguais a 2 indicam precisão intermediária adequada.

$$HorRat_R = \frac{DPR_{precint}}{DPRP_R} \quad \text{Equação 36}$$

3.6.7 Recuperação

Para avaliação da recuperação do método de spICP-MS, foram preparadas soluções de nanopartículas de prata, contendo aproximadamente 100.000 partículas por mililitro, com tamanhos de 40 (Sr40) e 80 nm (Sr80), conforme descrito no item 3.6.4, para o ensaio de seletividade. Contudo, todas as soluções foram preparadas em água desionizada. A Figura 7 apresenta o preparo das soluções em água desionizada.

Figura 7 - Fluxo de preparo das soluções de nanopartículas de prata em água desionizada



Sr₄₀: Solução de nanopartículas de prata com tamanho de 40 nm, do ensaio de recuperação; Sr₈₀: Solução de nanopartículas de prata com tamanho de 40 nm, do ensaio de recuperação.

Fonte: O autor, 2020.

As soluções Sr₄₀ e Sr₈₀ foram analisadas cinco vezes por spICP-MS e a quantidade de partículas média determinada para cada padrão foi comparada com a esperada. A equação 37 apresenta a recuperação calculada do método *RM%*.

$$RM\% = \frac{\overline{cd}}{cs} \times 100 \quad \text{Equação 37}$$

onde,

\overline{cd} = média das concentrações, em número de partículas por mL, determinadas para a solução,

cs = concentração, em número de partículas por mL, calculada para a solução preparada.

3.7 Incerteza de medição

As incertezas de medição, associadas à determinação do tamanho médio de partícula, concentração de partículas e da concentração de prata dissolvida, presentes nas soluções de migração, foram estimadas através da identificação, quantificação, e combinação das contribuições individuais para a incerteza final. Nesta abordagem, chamada de “*bottom-up*”, a incerteza combinada final é derivada das incertezas dos componentes individuais, sendo adotada pela ISO (TOMIĆ; NASIPAK; BABIĆ, 2012). A estimativa da incerteza de medição foi baseada nas diretrizes definidas no guia para Quantificação da Incerteza nas Medições Analíticas (EURACHEM, 2012) e no Guia para a Expressão da Incerteza de Medição – ISO GUM (INMETRO, 2012a).

3.7.1 Incertezas associadas à concentração de prata dissolvida e ao tamanho médio da partícula

As principais fontes de incerteza identificadas para a concentração de prata dissolvida e para o tamanho médio da partícula na solução foram: incerteza associada à curva analítica ($u_{(X_0)}$) e a incerteza associada à repetibilidade do método ($u_{(rep)}$).

3.7.1.1 Incerteza associada à curva analítica $u_{(X_0)}$

A incerteza associada à interpolação na curva analítica $u_{(X_0)}$ é baseada no cálculo do intervalo de confiança da curva de prata dissolvida, construída através do MMQO, considerando-se o modelo de resposta linear (EURACHEM, 2012). A incerteza associada à curva analítica foi estimada através da Equação 38.

$$u_{(X_0)} = \frac{S_{residual}}{b} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(X_0 - \bar{X})^2}{S_{xx}}} \quad \text{Equação 38}$$

onde,

$S_{residual} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (Y_j - Y_{esp})^2}{n-2}}$, $S_{xx} = \sum_{j=1}^n (X_j - \bar{X})^2$, X_0 é a massa média das partículas em μg (Incerteza associada à determinação do tamanho das partículas) ou a concentração de prata dissolvida em $\mu\text{g L}^{-1}$ (Incerteza associada à concentração de prata dissolvida), p o número de repetições para determinar X_0 , n o número total de determinações para construção da curva analítica, \bar{X} a média dos valores da abscissa da curva analítica, e b a inclinação da reta.

3.7.1.2 Incerteza associada à repetibilidade $u_{(rep)}$

A incerteza associada à repetibilidade é oriunda de efeitos aleatórios e é em geral medida a partir de experimentos repetidos e quantificada em termos de desvio padrão de resposta (EURACHEM, 2012). As incertezas associadas à repetibilidade do método $u_{(rep)}$ foram calculadas pelos desvios padrão do tamanho médio da partícula (Incerteza associada à determinação do tamanho das partículas) e da concentração de prata dissolvida (Incerteza associada à concentração de prata dissolvida), das repetições analisadas no ensaio de repetibilidade (Equação 39).

$$u_{(rep)} = \frac{S}{\sqrt{p}} \quad \text{Equação 39}$$

onde, S é o desvio padrão do parâmetro representado pelo tamanho médio da partícula (Incerteza associada à determinação do tamanho das partículas) e pela

concentração de prata dissolvida (Incerteza associada à concentração de prata dissolvida), para as repetições do ensaio de repetibilidade e p o número de repetições do ensaio de repetibilidade.

3.7.1.3 Estimativa da incerteza combinada final $u_{(comb)}$

As incertezas padrão combinadas finais $u_{(comb)}$ associadas aos mensurandos, sendo estes os resultados das medições analíticas (tamanho médio da partícula e concentração de prata dissolvida), foram obtida pela combinação apropriada das incertezas padrão estimadas para as grandezas de entrada relacionadas a cada mensurando (EURACHEM, 2012; INMETRO, 2012a). As incertezas combinadas finais, para o ensaio de migração estudado, foram estimadas através da Equação 40.

$$u_{(comb)} = X_0 \times \sqrt{\left(\frac{u_{(rep)}}{X_0}\right)^2 + \left(\frac{u_{(X_0)}}{X_0}\right)^2} \quad \text{Equação 40}$$

3.7.2 Incerteza associada à concentração de partículas

Foi estimada a incerteza associada à concentração de partículas, calculada em massa de partículas por kg de alimento, para o ensaio de migração.

3.7.2.1 Incerteza associada à repetibilidade $u_{(rep)C_M}$

A incerteza associada à repetibilidade $u_{(rep)C_M}$ foi calculada pelos desvios padrão da concentração de partículas, calculadas em ng kg^{-1} de alimento, das repetições analisadas no ensaio de repetibilidade (Equação 41).

$$u_{(rep)C_M} = \frac{S}{\sqrt{p}} \quad \text{Equação 41}$$

onde, S é o desvio padrão das concentrações de partículas, em ng kg^{-1} de alimento, determinadas para as repetições do ensaio de repetibilidade e p o número de repetições do ensaio de repetibilidade.

3.7.2.2 Estimativa da incerteza combinada final $u_{(comb)}$

A incerteza padrão combinada final $u_{(comb)}$ associada à concentração de partículas, em $\mu\text{g kg}^{-1}$ de alimento foi obtida pela combinação apropriada das incertezas padrão estimadas para as grandezas de entrada (EURACHEM, 2012; INMETRO, 2012a). A incerteza combinada final, para à concentração de partículas, em $\mu\text{g kg}^{-1}$ de alimento, no ensaio de migração, foi estimada através da Equação 42.

$$u_{(comb)} = C_M \times \sqrt{\left(\frac{u_{(rep)C_M}}{\overline{C_M repe}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(comb)T_m}}{T_m}\right)^2} \quad \text{Equação 42}$$

Onde,

$u_{(rep)C_M}$ = Incerteza associada à repetibilidade da concentração de partículas, em ng kg^{-1}

C_M = Concentração em massa de partículas por kg de alimento (ng kg^{-1})

$\overline{C_M repe}$ = Concentração média em massa de partículas por kg de alimento (ng kg^{-1}), das repetições no ensaio de repetibilidade

$u_{(comb)T_m}$ = Incerteza combinada final estimada para o tamanho médio da partícula, em nm

T_m = Tamanho médio da partícula, em nm.

3.7.3 Estimativa das incertezas expandidas U

Através das incertezas combinadas finais foram calculadas as incertezas expandidas associadas ao resultado analítico. A incerteza expandida é uma medida da incerteza, dada para uma função de distribuição de probabilidade apropriada ao resultado, habitualmente distribuição normal, associada a um nível elevado de confiança. A incerteza expandida é dada pelo produto entre a incerteza padrão combinada estimada e um fator de abrangência k para um nível de confiança desejado (Equação 43) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORAS TÉCNICAS, 2003; INSTITUTO PORTUGUÊS DE ACREDITAÇÃO, 2007; OLIVEIRA; AGUIAR, 2009).

$$U = k \times u_{(comb)} \quad \text{Equação 43}$$

onde, k é o fator de abrangência.

Nos casos em que a incerteza $u_{(comb)}(y)$ é aproximadamente normal ou os graus de liberdade efetivos ν_{eff} de $u_{(comb)}(y)$ são de tamanho significativo, utiliza-se $k = 2$ para um nível de confiança de aproximadamente 95%. Para quase todos os fins, devido à natureza aproximativa do processo de estimativa da incerteza de medição, pode-se adotar $k = 2$ (EURACHEM, 2012; INMETRO, 2012a).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amostras selecionadas

Foram selecionadas cinco amostras de materiais plásticos, com ação antibacteriana pela adição de nanopartículas de prata, disponíveis no mercado. As amostras foram identificadas univocamente com código “AM-XX”, sendo XX um número sequencial de 01 a 05 (AM-01 a AM-5) (Quadro 8).

Quadro 8 - Amostras ensaiadas

Amostra	Polímero	Alimento em contato	Apresentação
AM-01	PEBD	Não Especificado	Sacos com dispositivo “abre e fecha”
AM-02	PEAD	Leite	Garrafas plásticas
AM-03	PEBD	Leite	Sacos plásticos do tipo “barriga mole”
AM-04	PVC	Não Especificado	Filme de PVC transparente
AM-05	PVC	Não Especificado	Filme de PVC transparente

PEBD: Polietileno de baixa densidade; PEAD: Polietileno de alta densidade; PVC: Poli (cloreto de vinila).

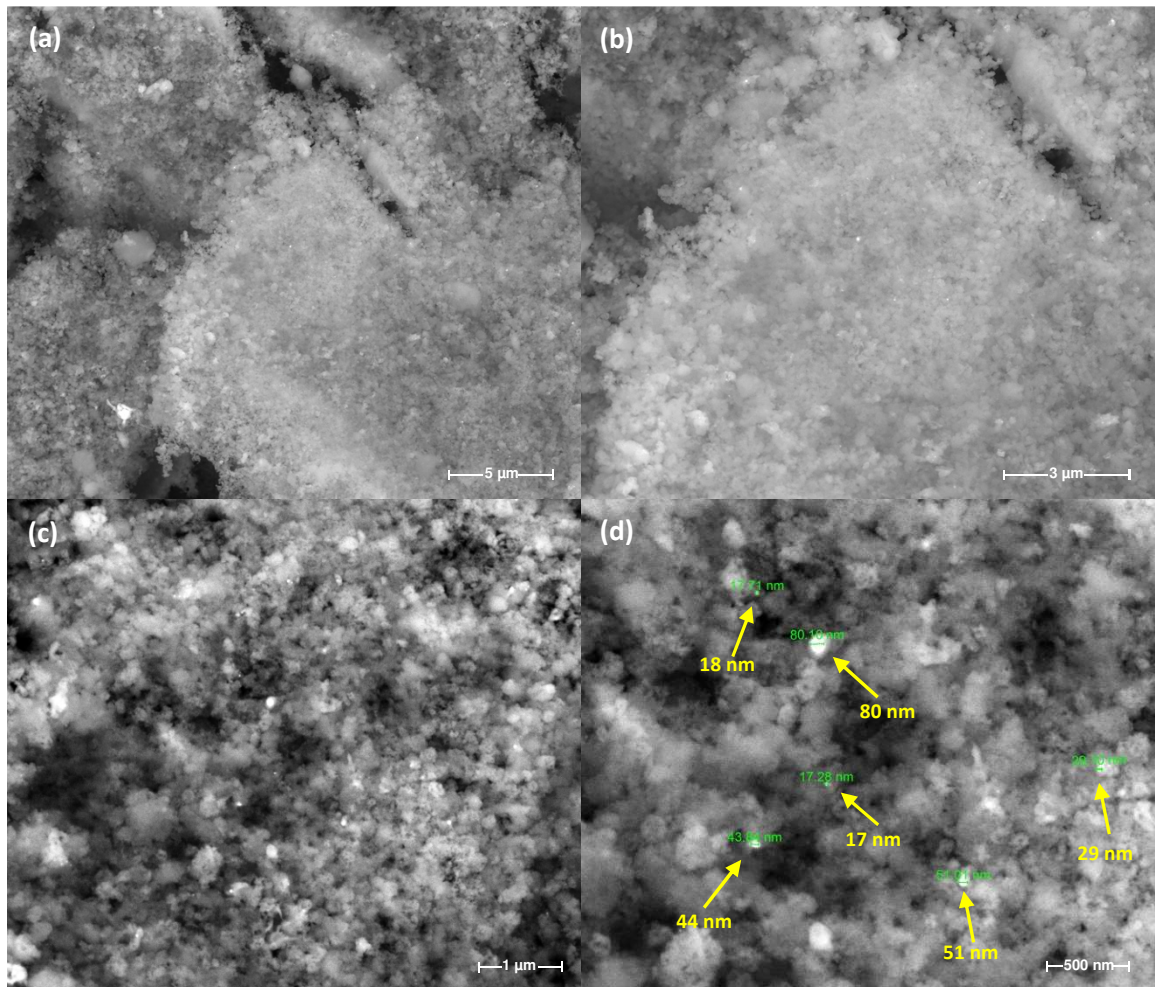
Fonte: O autor, 2020.

4.2 Caracterização e identificação

4.2.1 Caracterização e identificação de nanopartículas de prata presentes nos materiais plásticos

A calcinação da amostra AM-04 (PVC), à temperatura de 600° C por 4 horas, produziu um pó amarelado, fino, leve e parcialmente solúvel em etanol 99%, que foi colocado em uma fita de carbono e o excesso foi retirado soprando-se nitrogênio. O suporte de alumínio, contendo a fita de carbono, foi colocado no dessecador a vácuo, por duas horas, antes de introduzi-lo no microscópio. Nas imagens obtidas por MEV foi possível observar a presença de nanopartículas esféricas entre 17 e 80 nm (Figura 8d). As imagens foram adquiridas com detector de elétrons retro espalhados (CBS), voltagem de 10 kV e corrente 0,20 nA. A Figura 8 apresenta as imagens obtidas no MEV para a amostra AM-04.

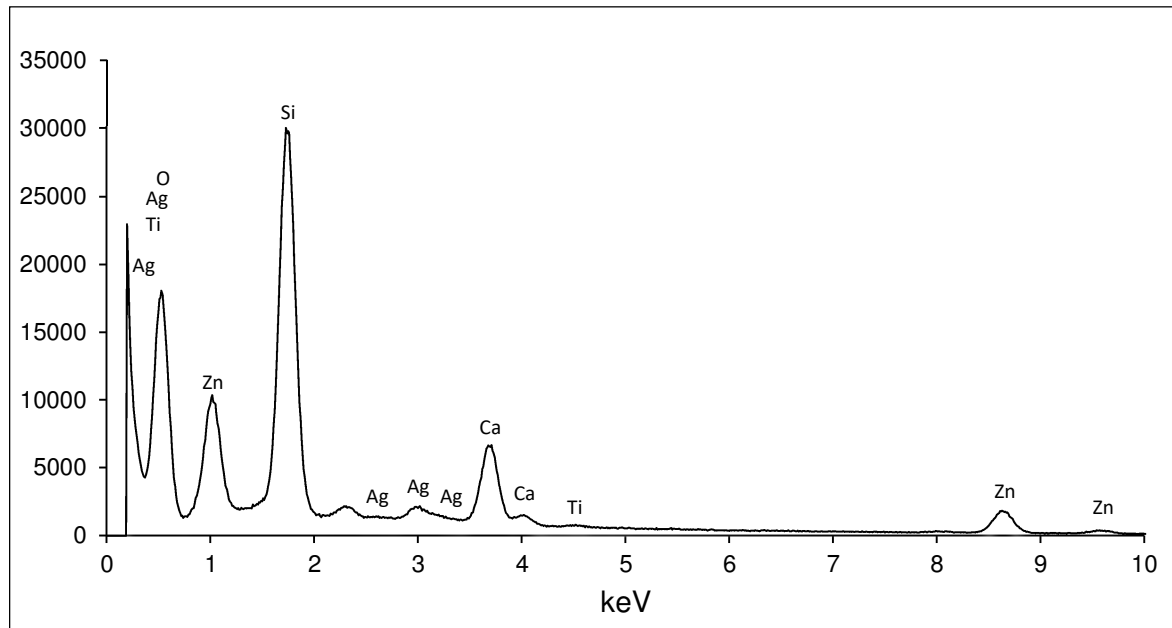
Figura 8 - Imagens adquiridas por MEV, para a amostra de PVC (AM-04) calcinada



Imagens (a) a (d) adquiridas para a amostra AM-04 calcinada, por microscopia eletrônica de Varredura (MEV), com detector de elétrons retro espalhados (CBS), voltagem de 10 kV e corrente 0,20 nA, nas escalas de 5 μm, 3 μm, 1 μm e 500 nm, respectivamente. A imagem (d) apresenta as partículas de prata encontradas, com tamanhos entre 17 e 80 nm. PVC: Poli (cloreto de vinila).
Fonte: O autor, 2020.

A presença das nanopartículas de prata, na amostra, foi confirmada por EDS. A baixa massa das nanopartículas de prata em relação à quantidade de matriz presente na amostra dificultou a sua identificação. Assim, para maximizar a relação entre a massa da partícula e a massa da matriz, o espectrograma foi obtido sobre a partícula (Figura 8d). A Figura 9 apresenta o espectrograma referente à partícula selecionada.

Figura 9 - Espectrograma da partícula observada na amostra de PVC (AM-04)

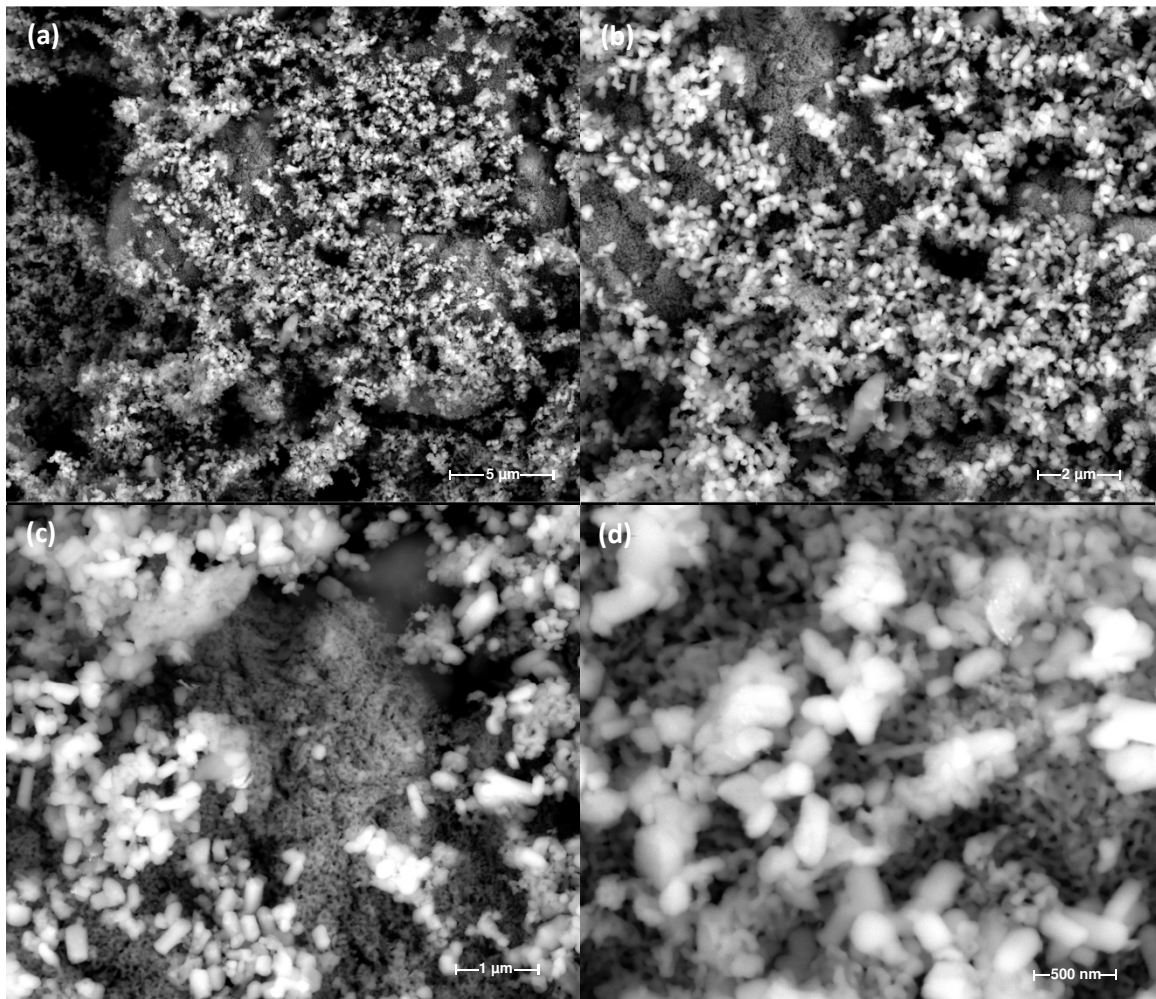


Espectrograma adquirido para a partícula de 80,1 nm (Figura 5d), para a amostra AM-04 calcinada, por espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS), no microscópio eletrônico de varredura modelo Helios Nanolab 650 (FEI Company, Oregon, EUA), equipado com espectrômetro de energia dispersiva por raios-X. PVC: Poli (cloreto de vinila).

Fonte: O autor, 2020.

A calcinação das amostras AM-02 (PEAD) e AM-03 (PEBD), à temperatura de 600° C por 4 horas, resultou em um pó branco e insolúvel em etanol 99 %, para os dois polímeros. As cinzas de cada polímero foram colocadas em uma fita de carbono, o excesso foi retirado soprando-se nitrogênio e o suporte de alumínio, contendo a fita de carbono, foi introduzido no microscópio. Nas imagens obtidas não foi possível observar a presença de nanopartículas de prata, possivelmente devido a grande quantidade de matriz presente nas cinzas. As imagens foram adquiridas com detector CBS, com voltagem de 10 kV e corrente 0,20 nA. As Figuras 10 e 11 apresentam as imagens obtidas no MEV para as amostras AM-02 e AM-03, respectivamente.

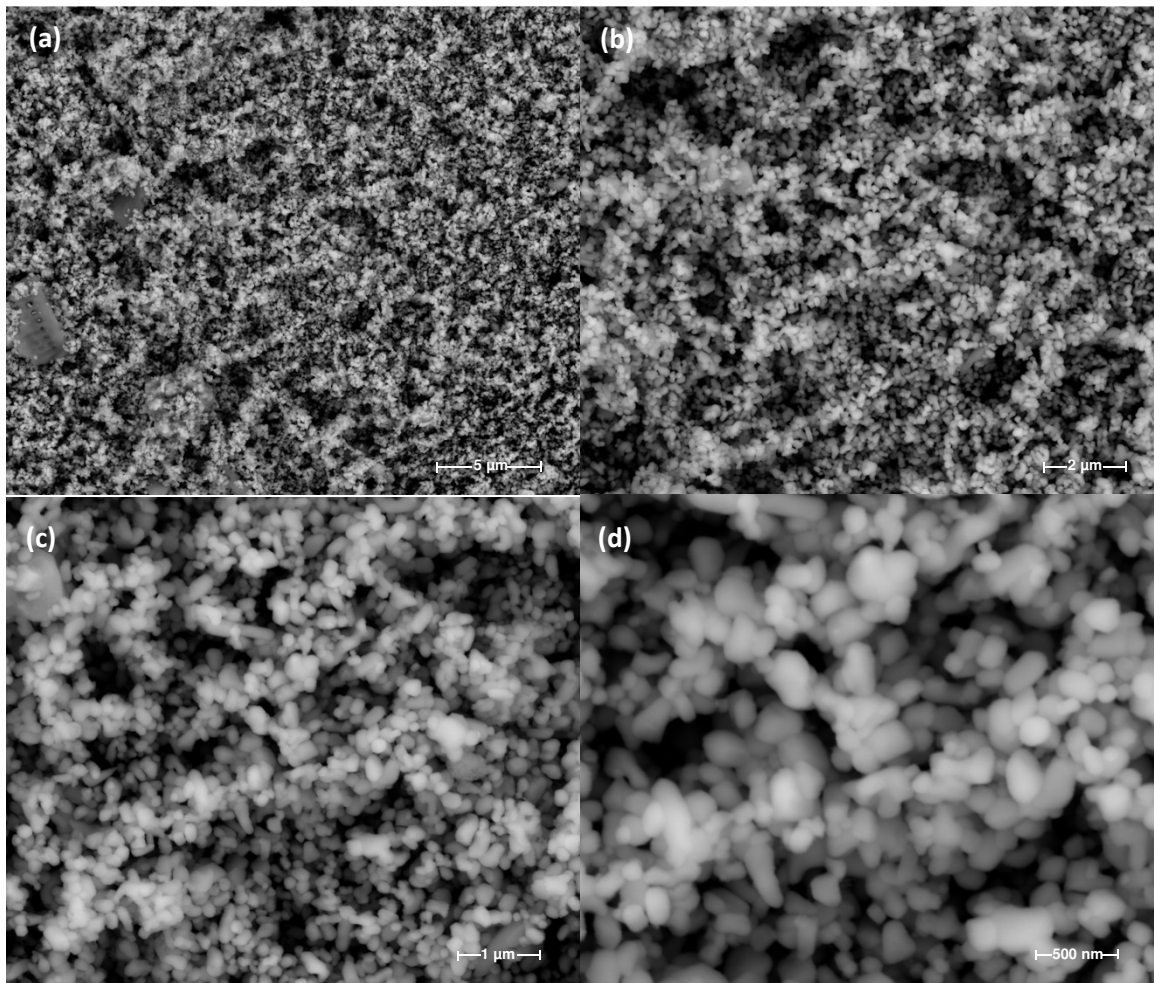
Figura 10 - Imagens adquiridas por MEV, para a amostra de PEAD (AM-02) calcinada



Imagens (a) a (d) adquiridas para a amostra AM-02 calcinada, por microscopia eletrônica de Varredura (MEV), com detector de elétrons retro espalhados (CBS), voltagem de 10 kV e corrente 0,20 nA, nas escalas de 5 μm, 2 μm, 1 μm e 500 nm, respectivamente. PEAD: Polietileno de alta densidade.

Fonte: O autor, 2020.

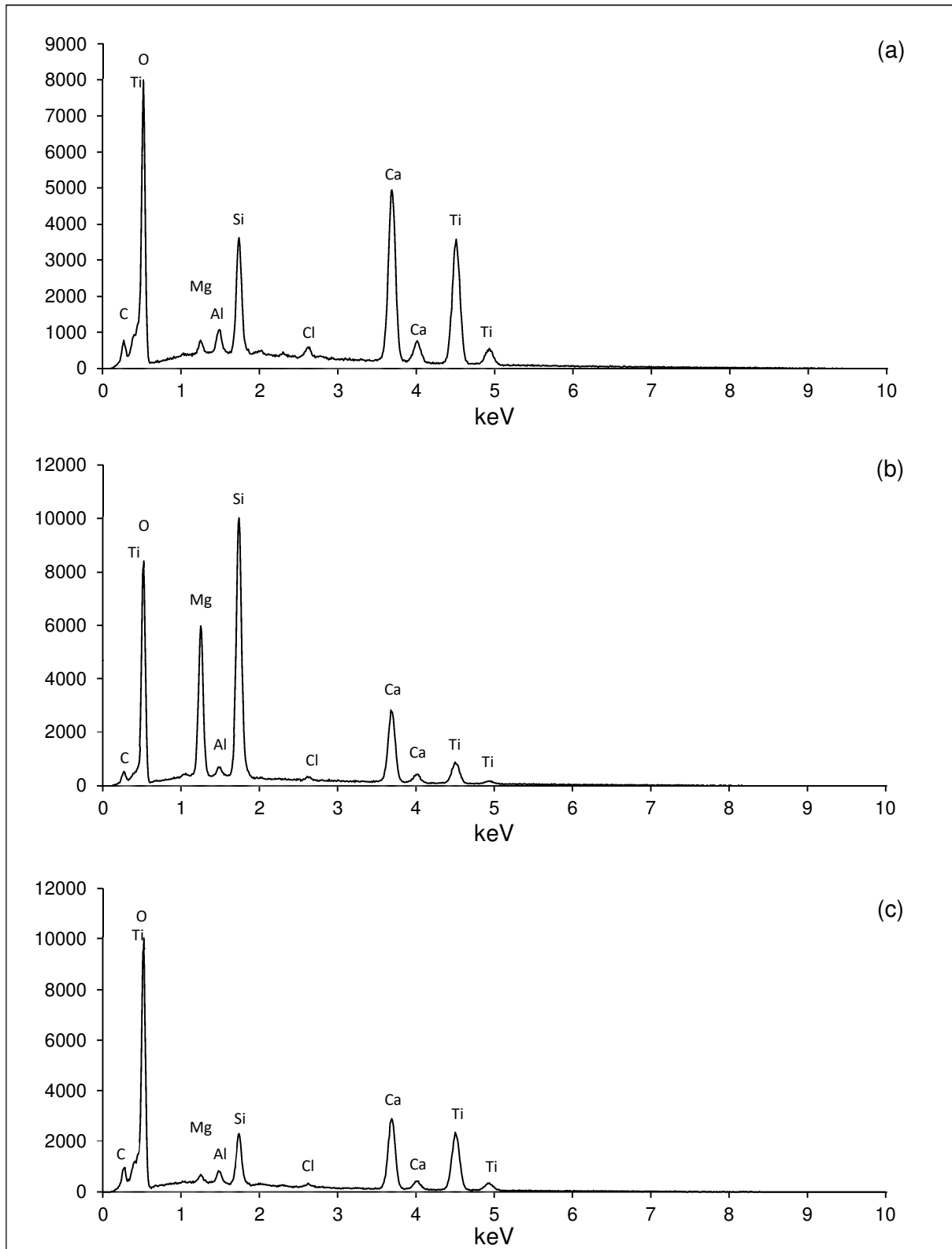
Figura 11 - Imagens adquiridas por MEV, para a amostra de PEBD (AM-03) calcinada



Imagens (a) a (d) adquiridas para a amostra AM-03 calcinada, por microscopia eletrônica de Varredura (MEV), com detector de elétrons retro espalhados (CBS), voltagem de 10 kV e corrente 0,20 nA, nas escalas de 5 µm, 2 µm, 1 µm e 500 nm, respectivamente. Helios Nanolab 650 (FEI Company, Oregon, EUA). PEBD: Polietileno de baixa densidade. Fonte: O autor, 2020.

Devido à baixa concentração de nanopartículas de prata na matriz, resultante da calcinação das amostras de PEAD e PEBD, não foi possível confirmar a presença da prata. Foram selecionadas três áreas para cada polímero e avaliadas através de EDS. Os espectros apresentados indicam uma alta concentração de titânio nas amostras. As Figuras 12 e 13 apresentam os espectrogramas obtidos para as amostras AM-02 e AM-03, respectivamente.

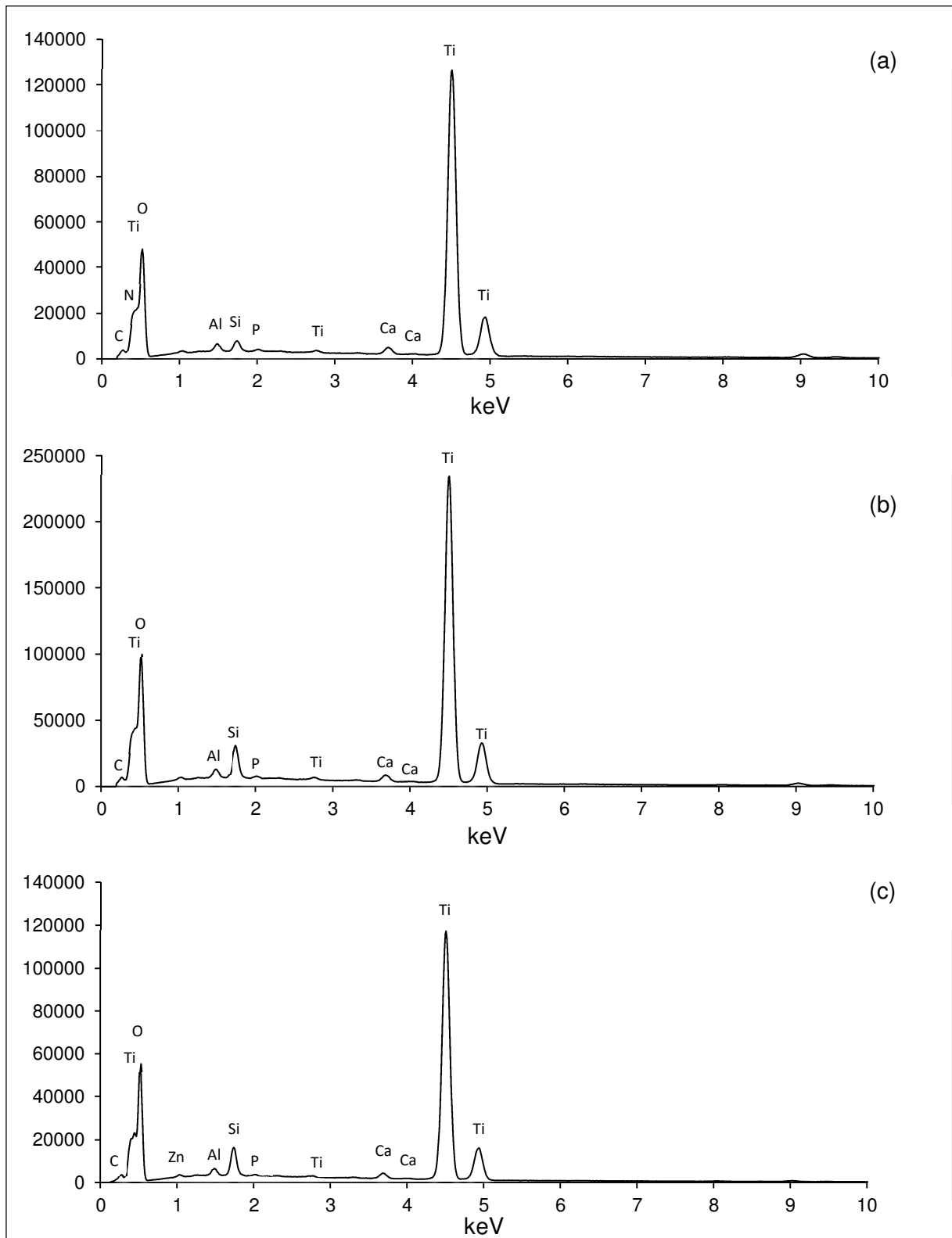
Figura 12 - Espectrograma das áreas (a) 1, (b) 2 e (c) 3 da amostra de PEAD (AM-02)



Espectrogramas adquiridos para as áreas 1 (a), 2 (b) e 3 (c), da amostra AM-02, por espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS), no microscópio eletrônico de varredura modelo Helios Nanolab 650 (FEI Company, Oregon, EUA), equipado com espectrômetro de energia dispersiva por raios-X. PEAD: Polietileno de alta densidade.

Fonte: O Autor (2020).

Figura 13 - Espectrograma EDS das áreas (a) 1, (b) 2 e (c) 3 da amostra de PEBD (AM-03)



Espectrogramas adquiridos para as áreas 1 (a), 2 (b) e 3 (c), da amostra AM-03, por espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS), no microscópio eletrônico de varredura modelo Helios Nanolab 650 (FEI Company, Oregon, EUA), equipado com espectrômetro de energia dispersiva por raios-X. PEBD: Polietileno de baixa densidade.

Fonte: O autor, 2020.

4.3 Validação da metodologia

4.3.1 Conversão da curva de prata dissolvida, preparada em água desionizada, em fluxo de massa

As concentrações dos padrões de prata dissolvida, preparados em água desionizada, foram convertidas em massa por evento (fluxo de massa). A tabela 4 apresenta os resultados obtidos. O fluxo de amostragem medido foi de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ e a *TE* calculada de 9,387 %.

Tabela 4 - Preparo das soluções de trabalho do ensaio de linearidade

Solução de Trabalho	Concentração da Solução de Trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Fluxo de Massa ($\mu\text{g evento}^{-1}$)
P1	1,50	$2,35 \times 10^{-11}$
P2	2,52	$3,95 \times 10^{-11}$
P3	5,09	$7,97 \times 10^{-11}$
P4	7,55	$1,18 \times 10^{-10}$
P5	10,07	$1,58 \times 10^{-10}$
P6	15,20	$2,38 \times 10^{-10}$
P7	20,03	$3,13 \times 10^{-10}$

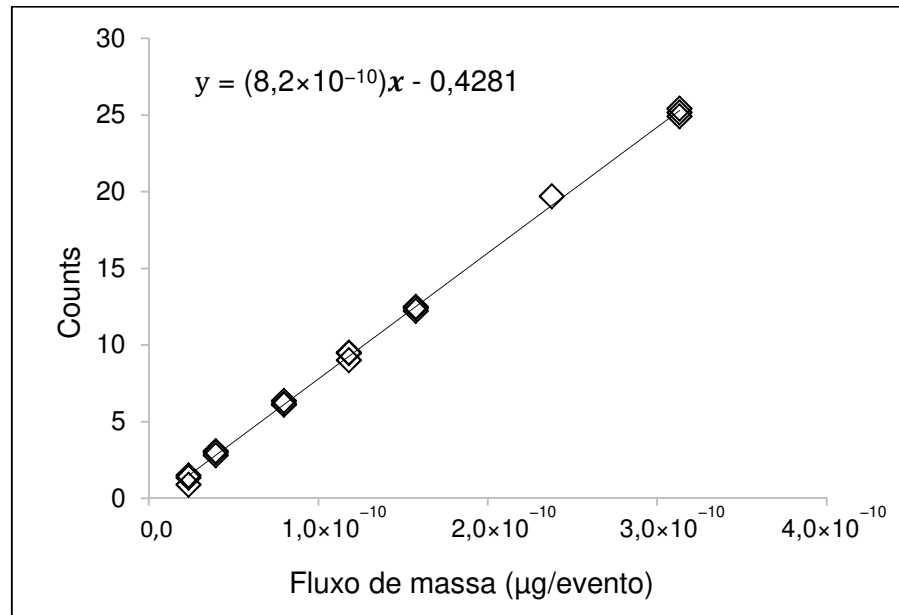
Fonte: O autor, 2020.

4.3.2 Avaliação da linearidade da curva de fluxo de massa preparada em solvente

4.3.2.1 Tratamento de valores extremos

A presença de valores extremos foi avaliada pelo método dos resíduos padronizados Jackknife. As replicatas $i = 17$ e 18 foram consideradas extremas e removidas do conjunto de dados. A Figura 14 apresenta a curva analítica final após a remoção dos valores extremos.

Figura 14 - Curva de fluxo de massas final em solvente



Fonte: O autor, 2020.

4.3.2.2 Teste de normalidade

A normalidade dos resíduos da regressão foi verificada pelo teste Ryan-Joiner. O coeficiente de correlação R_{eq} entre e_i e q_i e o valor de R_{crit} foram calculados e a Tabela 5 apresenta os resultados obtidos. O valor de R_{eq} encontrado, maior que o valor crítico R_{crit} ($\alpha=0,05$) indica que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal.

Tabela 5 - Normalidade dos resíduos da regressão (teste de Ryan-Joiner) - R_{eq} e R_{crit} calculados

R_{eq}	R_{crit} ($\alpha=0,05$)
0,98	0,95

R_{eq} , coeficiente de correlação entre e_i e q_i ; R_{crit} , R crítico.

Fonte: O autor, 2020.

4.3.2.3 Teste de homoscedasticidade

A homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi verificada através do teste de Levene (1960), modificado por Brown e Forsythe (1974). A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos. O valor encontrado para a estatística t_L , menor que

o valor crítico $t_{(1-a/2;n_1+n_2-2)}$ indica a homoscedasticidade dos resíduos, com um nível de confiança de 95%.

Tabela 6 - Homoscedasticidade dos resíduos da regressão (teste de Levene) - Resultados Obtidos

Estatística	Grupo 1	Grupo 2
n	12	7
Mediana	$3,32 \times 10^{-2}$	$-8,58 \times 10^{-2}$
dm	$1,84 \times 10^{-1}$	$2,11 \times 10^{-1}$
SQD	$3,14 \times 10^{-1}$	$3,16 \times 10^{-1}$
s_p^2	$3,70 \times 10^{-2}$	
t_L	0,287	
$t_{critico}$	2,110	

n , número de observações no grupo; dm , média das diferenças entre cada resíduo e a mediana do seu grupo; SQD , soma dos quadrados dos desvios; s_p^2 , variância combinada; t_L , estatística t calculada; $t_{critico}$, estatística t tabelada.

Fonte: O autor, 2020.

4.3.2.4 Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)

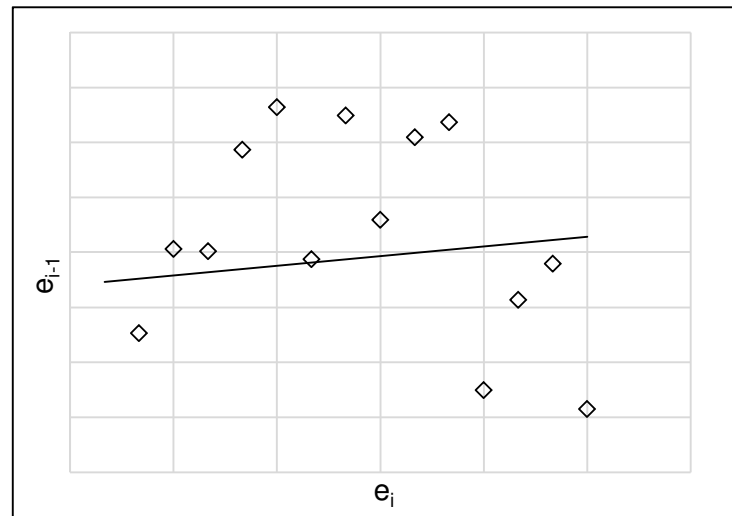
A autocorrelação dos resíduos foi verificada através do teste de Durbin-Watson. A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para os limites d_L (inferior) e d_U (superior) com um nível de significância de 0,05. O valor calculado para a estatística d do teste, maior que o limite superior, indica a independência dos resíduos. A Figura 15 apresenta graficamente a independência dos resíduos da regressão.

Tabela 7 - Independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin-Watson) - Limites d_L e d_U calculados

d	d_L	d_U
2,119	1,179	1,401

d , estatística d ; d_L , limite inferior; d_U , limite superior.

Fonte: O autor, 2020.

Figura 15 - Gráfico de Durbin-Watson ($e_i \times e_{i-1}$)

Fonte: O autor, 2020.

4.3.2.5 Teste de significância da regressão e desvio da linearidade

O teste de significância da regressão e desvio da linearidade foi realizado através da análise de variância - ANOVA. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 8 - Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p – valor</i>
Regressão	1	$1,22 \times 10^3$	$1,22 \times 10^3$	$1,56 \times 10^4$	$1,23 \times 10^{-26}$
Resíduos	17	1,33	$7,83 \times 10^{-2}$		
Desvio da Linearidade	5	$7,47 \times 10^{-1}$	$1,49 \times 10^{-1}$	3,07	$5,17 \times 10^{-2}$
Erro Puro	12	$5,84 \times 10^{-1}$	$4,87 \times 10^{-2}$		
Total	18	$1,22 \times 10^3$			

FV, fonte de variação; *SQ*, soma dos quadrados; *GL*, graus de liberdade; *QM*, média dos quadrados; *F*, estatística da análise de variância; *p – valor*, probabilidade da estatística calculada.

Fonte: O autor, 2020.

O *p – valor* observado para a regressão da curva foi inferior a 0,001 indicando que a regressão é significativa, com um nível de confiança de 99,9%. O *p – valor* observado para o desvio da linearidade da curva foi superior a 0,05 indicando que a falta de ajuste ao modelo linear não é significativa com um nível de confiança 95%. A linearidade das curvas preparadas confirma a utilização da faixa de trabalho adotada, sendo esta de $(2,3 \text{ a } 31,3) \times 10^{-11} \mu\text{g evento}^{-1}$, referente a 1,5 a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de prata dissolvida.

4.3.3 Efeito de matriz

4.3.3.1 Conversão da curva de prata dissolvida, preparada em matriz, em fluxo de massa

As concentrações dos padrões de prata dissolvida, preparada em matriz, foram convertidas em massa por evento (fluxo de massa). A tabela 9 apresenta os resultados obtidos. O fluxo de amostragem medido foi de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ e a *TE* calculada de 9,387 %.

Tabela 9 - Preparo das soluções de trabalho do ensaio de efeito matriz

Solução de Trabalho	Concentração da Solução de Trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Fluxo de Massa ($\mu\text{g evento}^{-1}$)
P1'	1,51	$2,36 \times 10^{-11}$
P2'	2,47	$3,87 \times 10^{-11}$
P3'	4,98	$7,79 \times 10^{-11}$
P4'	7,51	$1,17 \times 10^{-10}$
P5'	10,23	$1,60 \times 10^{-10}$
P6'	14,80	$2,31 \times 10^{-10}$
P7'	20,83	$3,26 \times 10^{-10}$

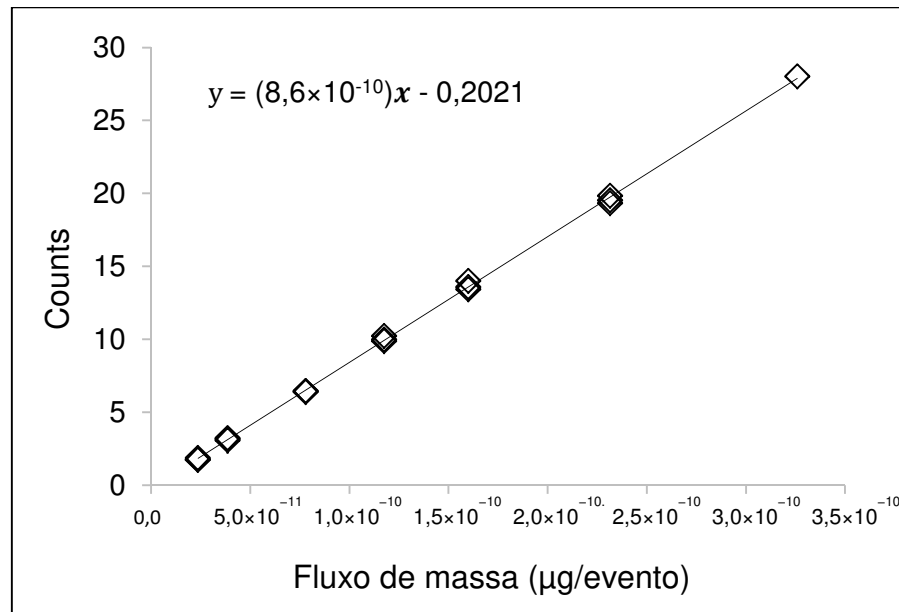
Fonte: O autor, 2020.

4.3.3.2 Avaliação da linearidade da curva preparada na presença da matriz

4.3.3.2.1 Tratamento de valores extremos

A presença de valores extremos foi avaliada pelo método dos resíduos padronizados Jackknife. Na curva analítica preparada na presença da matriz, as repetições $i= 19$ e 21 foram consideradas extremas e removidas do conjunto de dados. A Figura 16 apresenta a curva analítica final após a remoção dos valores extremos.

Figura 16 - Curva analítica final em matriz



Fonte: O autor, 2020.

4.3.3.2.2 Teste de normalidade

A normalidade dos resíduos da regressão foi verificada pelo teste Ryan-Joiner. O coeficiente de correlação R_{eq} entre e_i e q_i e o valor de R_{crit} foram calculados e a Tabela 10 apresenta os resultados obtidos. O valor de R_{eq} encontrado, maior que o valor crítico R_{crit} ($\alpha=0,05$) indica que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal.

Tabela 10 - Normalidade dos resíduos da regressão (teste de Ryan-Joiner) - R_{eq} e R_{crit} calculados

R_{eq}	$R_{crit} (\alpha=0,05)$
0,97	0,95

R_{eq} , coeficiente de correlação entre e_i e q_i ; R_{crit} , R crítico.

Fonte: O autor, 2020.

4.3.3.2.3 Teste de homoscedasticidade

A homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi verificada por meio do teste de Levene (1960), modificado por Brown e Forsythe (1974). A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos. O valor encontrado para a estatística t_L , menor que

o valor crítico $t_{(1-a/2;n_1+n_2-2)}$ indica a homoscedasticidade dos resíduos, com um nível de confiança de 95%.

Tabela 11 - Homoscedasticidade dos resíduos da regressão (teste de Levene) - Resultados Obtidos

Estatística	Grupo 1	Grupo 2
n	12	7
Mediana	$-4,74 \times 10^{-2}$	$2,01 \times 10^{-3}$
dm	$8,32 \times 10^{-2}$	$2,02 \times 10^{-1}$
SQD	$1,09 \times 10^{-1}$	$1,46 \times 10^{-1}$
s_p^2	$1,50 \times 10^{-2}$	
t_L	2,031	
$t_{crítico}$	2,110	

n , número de observações no grupo; dm , média das diferenças entre cada resíduo e a mediana do seu grupo; SQD , soma dos quadrados dos desvios; s_p^2 , variância combinada; t_L , estatística t calculada; $t_{crítico}$, estatística t tabelada.

Fonte: O autor, 2020.

4.3.3.2.4 Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)

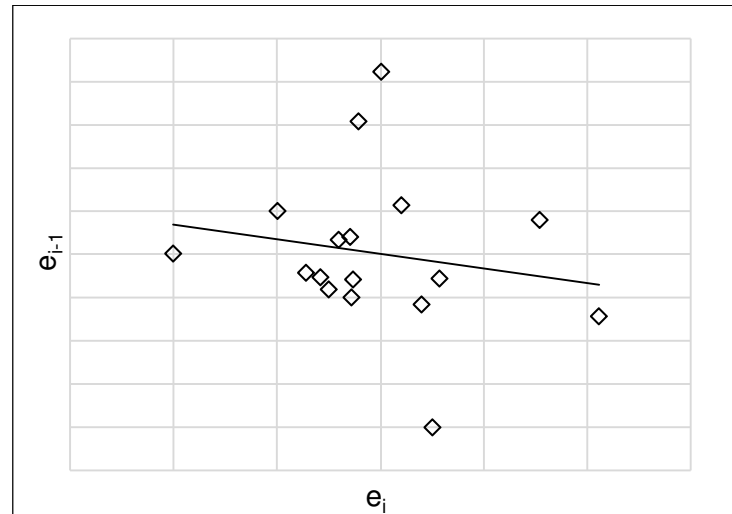
A autocorrelação dos resíduos foi verificada por meio do teste de Durbin-Watson. A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos para os limites d_L (inferior) e d_U (superior) com um nível de significância de 0,05. O valor calculado para a estatística d do teste, maior que o limite superior, indica a independência dos resíduos. A Figura 17 apresenta graficamente a independência dos resíduos da regressão.

Tabela 12 - Independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin-Watson) - Limites d_L e d_U calculados

d	d_L	d_U
2,388	1,179	1,401

d , estatística d ; d_L , limite inferior; d_U , limite superior

Fonte: O autor, 2020.

Figura 17 - Gráfico de Durbin-Watson ($e_i \times e_{i-1}$), curva em matriz

Fonte: O autor, 2020.

4.3.3.2.5 Teste de significância da regressão e desvio da linearidade

O teste de significância da regressão e desvio da linearidade foi realizado através da análise de variância - ANOVA. A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 13 - Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade (DEHP)

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p – valor</i>
Regressão	1	$1,02 \times 10^3$	$1,02 \times 10^3$	$2,95 \times 10^4$	$5,57 \times 10^{-29}$
Resíduos	17	$5,89 \times 10^{-1}$	$3,46 \times 10^{-2}$		
Desvio da Linearidade	5	$1,98 \times 10^{-1}$	$3,95 \times 10^{-2}$	1,21	$3,61 \times 10^{-1}$
Erro Puro	12	$3,91 \times 10^{-1}$	$3,26 \times 10^{-2}$		
Total	18	$1,02 \times 10^3$			

FV, fonte de variação; *SQ*, soma dos quadrados; *GL*, graus de liberdade; *QM*, média dos quadrados; *F*, estatística da análise de variância; *p – valor*, probabilidade da estatística calculada.
Fonte: O autor, 2020.

O *p – valor* observado para a regressão da curva foi inferior a 0,001, indicando que a regressão é significativa, com um nível de confiança de 99,9%. O *p – valor* observado para o desvio da linearidade da curva foi superior a 0,05, indicando que a falta de ajuste ao modelo linear não é significativa, com um nível de confiança de 95%.

4.3.3.3 Avaliação do efeito de matriz

A homoscedasticidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas foi verificada através do teste F (SNEDECOR; COCHRAN, 1989). A Tabela 14 apresenta as variâncias de cada curva (solvente e matriz), e as estatísticas F .

Tabela 14 - Avaliação da homoscedasticidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas

Teste F	
$S^2_{res\ Solvente}$	0,229
$S^2_{res\ Matriz}$	0,135
$n_{Solvente}$	21
n_{Matriz}	21
$F_{calculado}$	1,700
$p - valor$	0,128

S^2_{res} , variância dos resíduos da curva; n , número de pontos da curva analítica;

$p - valor$, probabilidade da estatística calculada.

Fonte: O autor, 2020.

Sendo as variâncias das curvas analíticas consideradas homoscedásticas, com um nível de confiança de 95%, as suas inclinações e interseções foram comparadas através do teste t com variâncias combinadas. A Tabela 15 apresenta os resultados das estatísticas t_b e t_a para as curvas analíticas. A Figura 18 apresenta a comparação entre as curvas analíticas preparadas na presença do solvente e da matriz.

Tabela 15 - Comparação das inclinações e interseções das curvas

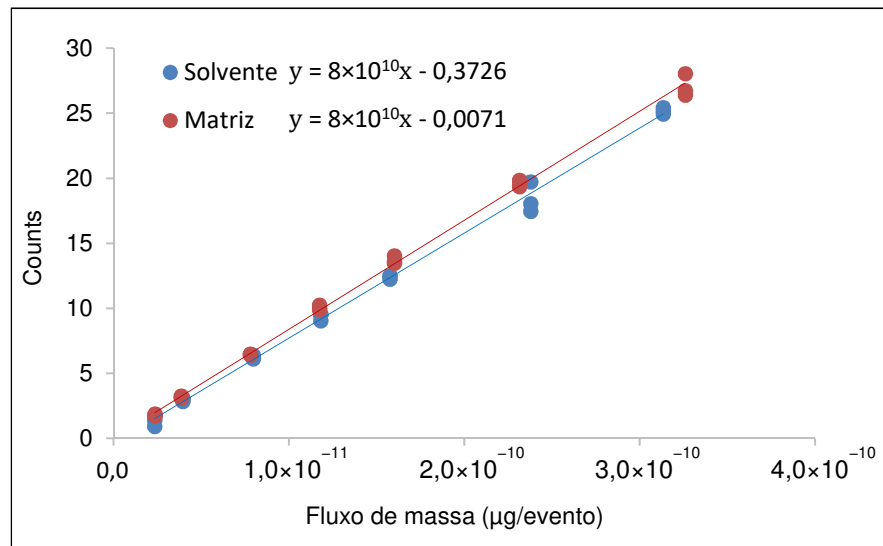
Teste t	
t_b	2,310
t_a	1,620
GL	38
$p - valor(t_b)$	0,026
$p - valor(t_a)$	0,113

t_b , valor de t calculado para a inclinação; t_a , valor de t calculado para a interseção;

GL , graus de liberdade; $p - valor$, probabilidade da estatística calculada.

Fonte: O autor, 2020.

Figura 18 - Comparação entre as curvas analíticas preparadas na presença do solvente (azul) e da matriz (vermelho)



Fonte: O autor, 2020.

Os resultados do teste permitem afirmar que o método não apresenta efeito de matriz, pois as curvas analíticas preparadas no solvente e na presença da matriz se equivalem, com um nível de confiança de 95%. Adicionalmente conclui-se que a matriz não apresenta interferência significativa na quantificação da prata dissolvida e na determinação do tamanho da partícula.

4.3.4 Determinação dos limites de detecção

4.3.4.1 Limites de detecção de tamanho e concentração de prata dissolvida

Os limites LOD_T e LOD_d foram obtidos por meio dos desvios padrão calculados para as quinze amostras brancas analisadas. A Tabela 16 apresenta as médias e os desvios padrão calculados e a Tabela 17 apresenta os limites obtidos.

Tabela 16 - Médias e desvios padrão calculados para o tamanho médio e para a concentração de prata dissolvida

Repetição	Tamanho médio (nm)	Concentração de prata dissolvida (ng kg ⁻¹)
1	22,7	45,0
2	18,2	43,4
3	18,2	43,1
4	18,3	43,4
5	18,2	43,4
6	18,2	43,3
7	18,5	43,6
8	18,3	43,2
9	18,3	43,2
10	18,3	43,1
11	18,3	43,1
12	18,2	43,1
13	18,3	43,0
14	18,3	43,0
15	18,3	43,0
Média	18,6	43,3
Desvio Padrão	1,1	0,5

Fonte: O autor, 2020.

Tabela 17 - Limites de detecção de tamanho (LOD_T) e de concentração de prata dissolvida (LOD_d)

	Tamanho médio (nm), LOD_T	Concentração de prata dissolvida (ng kg ⁻¹), LOD_d
Limite de Detecção	21	44

Fonte: O autor, 2020.

Os limites de detecção de tamanho e concentração de prata dissolvida, representam o menor tamanho de partícula e concentração de prata dissolvida, respectivamente, capazes de gerar um sinal superior ao ruído. Assim, nas condições dos ensaios realizados, o método de migração não é capaz de detectar, com precisão e exatidão adequadas, partículas menores que 21 nm e concentrações de prata dissolvida inferiores a 44 ng kg⁻¹ de alimento.

4.3.4.2 Limite de detecção de concentração de partículas

O LOD_p determinado durante a validação do método foi de 96 partículas mL^{-1} , equivalente a $5,7 \times 10^3$ partículas kg^{-1} de alimento, para um tamanho médio de partículas de 21 nm, fluxo de amostragem de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ e TE igual a 9,387 %.

4.3.5 Repetibilidade

Foram determinados os tamanhos médios das partículas, as concentrações de partículas, e as concentrações de prata dissolvida para as repetições analisadas. A Tabela 18 apresenta os valores calculados para o desvio padrão relativo DPR_r , $DPRP_r$ e o $HorRat_r$. Os resultados obtidos indicam que o método apresenta repetibilidade adequada para os três parâmetros.

Tabela 18 - Avaliação da Repetibilidade

	Tamanho Médio da Partícula	Concentração de Partículas	Concentração de prata dissolvida
DPR_r (%)	15,46	5,73	23,98
$DPRP_r$ (%)	14,67	14,67	14,67
$HorRat_r$	1,05	0,39	1,64

DPR_r : desvio padrão relativo (repetibilidade); $DPRP_r$: desvio padrão relativo previsto (repetibilidade); $HorRat_r$: razão de Horwitz (repetibilidade).

Fonte: O autor, 2020.

4.3.6 Precisão intermediária

Foram determinados os tamanhos médios de partículas, as concentrações de partículas, e as concentrações de prata dissolvida para as repetições analisadas nos dois dias de ensaio. As Tabelas 19, 20 e 21 apresentam os resultados obtidos para o tamanho médio de partícula, concentração de partículas, e concentração de prata dissolvida, respectivamente. Os resultados obtidos indicam precisão intermediária adequada para os três parâmetros.

Tabela 19 - Avaliação da Precisão Intermediária (Tamanho médio de partículas)

Amostras	Tamanho médio de partículas em massa da partícula (ng) kg ⁻¹	
	Dia 1	Dia 2
<i>Média</i>	1,37	1,08
<i>S_{i(tempo)}</i>	0,45	
<i>DPR_{precint}</i> (%)	36,81	
<i>DPRP_R</i> (%)	22	
<i>HorRat_r</i>	1,67	

DPR_{precint}: desvio padrão relativo (precisão intermediária); *DPRP_R*: desvio padrão relativo previsto (reprodutibilidade) *HorRat_r*: razão de Horwitz (reprodutibilidade).

Fonte: O autor, 2020.

Tabela 20 - Avaliação da Precisão Intermediária (Concentração de partículas)

Amostras	Concentração de partículas em ng de partículas kg ⁻¹	
	Dia 1	Dia 2
<i>Média</i>	2,38	2,28
<i>S_{i(tempo)}</i>	0,15	
<i>DPR_{precint}</i> (%)	6,07	
<i>DPRP_R</i> (%)	22	
<i>HorRat_r</i>	0,28	

DPR_{precint}, desvio padrão relativo (precisão intermediária); *DPRP_R*, desvio padrão relativo previsto (reprodutibilidade) *HorRat_r*, razão de Horwitz (reprodutibilidade).

Fonte: O autor, 2020.

Tabela 21 - Avaliação da Precisão Intermediária (Concentração de prata dissolvida)

Amostras	Concentração de prata dissolvida em ng kg ⁻¹	
	Dia 1	Dia 2
<i>Média</i>	0,05	0,05
<i>S_{i(tempo)}</i>	0,01	
<i>DPR_{precint}</i> (%)	19,02	
<i>DPRP_R</i> (%)	22	
<i>HorRat_r</i>	0,86	

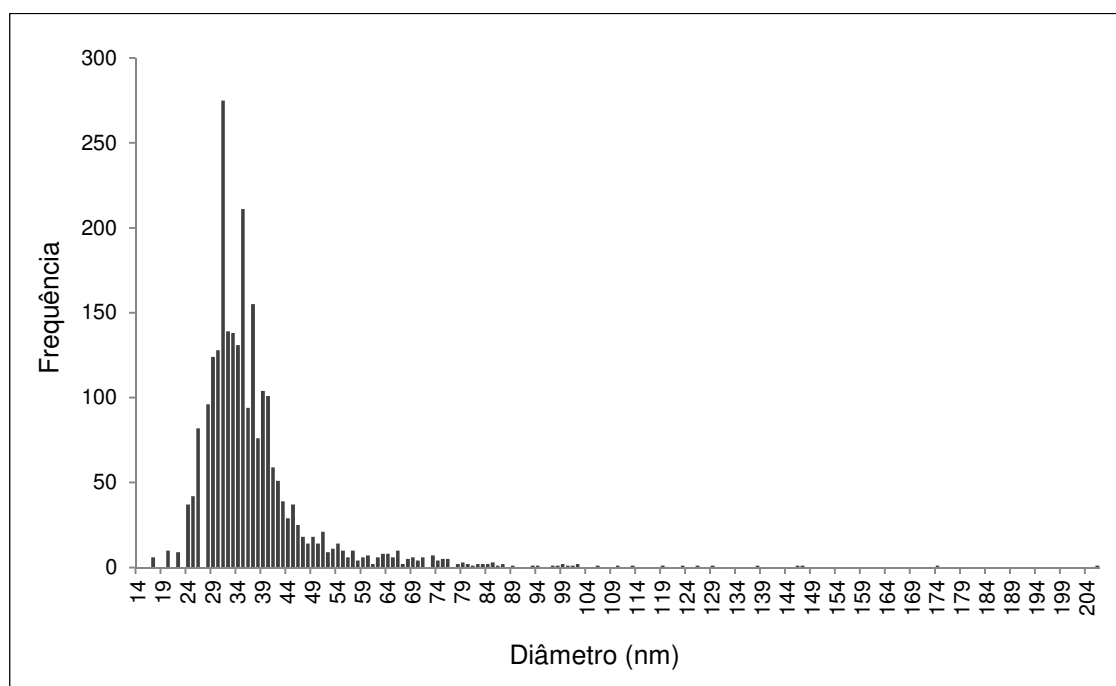
DPR_{precint}: desvio padrão relativo (precisão intermediária); *DPRP_R*: desvio padrão relativo previsto (reprodutibilidade) *HorRat_r*: razão de Horwitz (reprodutibilidade).

Fonte: O autor, 2020.

4.3.7 Seletividade

Nos histogramas de distribuição de tamanho das partículas de prata, apresentados para as soluções Ss_{40} e Ss_{80} , a distribuição observada indica a predominância de partículas de um tamanho em cada solução, com médias de 37,4 e 73,3 nm, respectivamente. Os tamanhos de partículas determinados experimentalmente são condizentes com os declarados pelo fabricante, sendo iguais a 93,5 e 91,6 % dos declarados para os padrões de 40 e 80 nm, respectivamente. Os resultados apresentados indicam a capacidade do método em determinar o tamanho das partículas mesmo na presença da matriz. As Figuras 19 e 20 apresentam os histogramas da distribuição de tamanho das soluções.

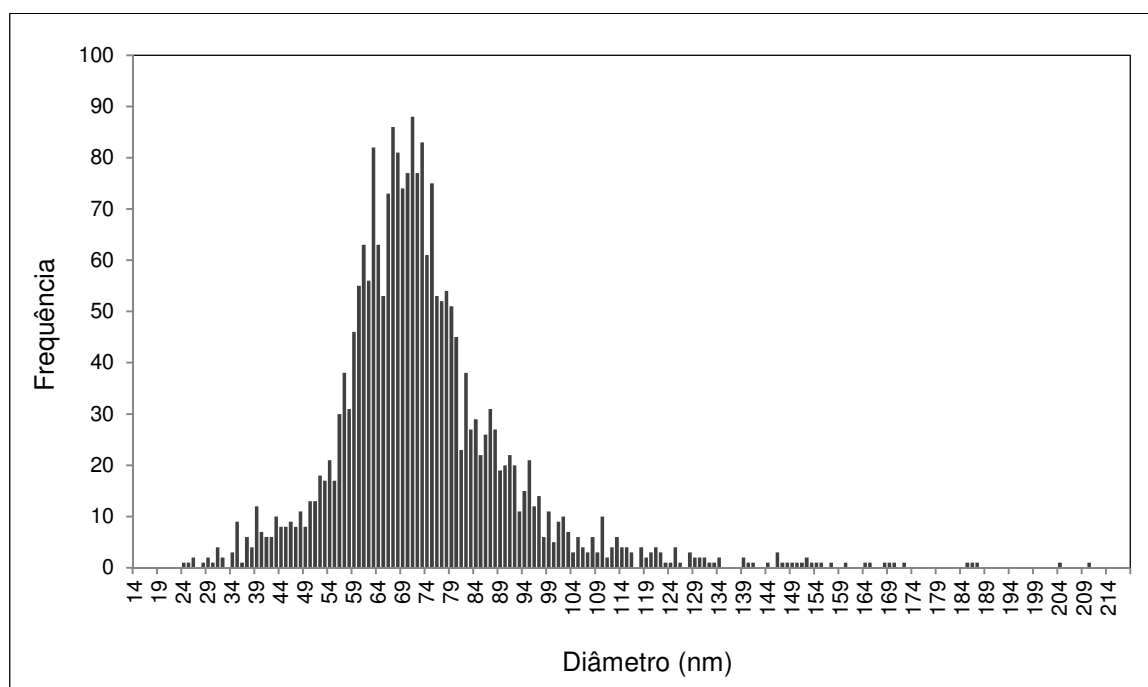
Figura 19 - Histograma da distribuição de tamanho das partículas de prata da solução Ss_{40}



Histograma da distribuição dos tamanhos das partículas de prata da solução Ss_{40} , determinados por spICP-MS (NexION 300D, Perkin Elmer, Massachusetts, EUA). Ss_{40} : Solução de nanopartículas de prata com tamanho de 40 nm, do ensaio de seletividade.

Fonte: O autor, 2020.

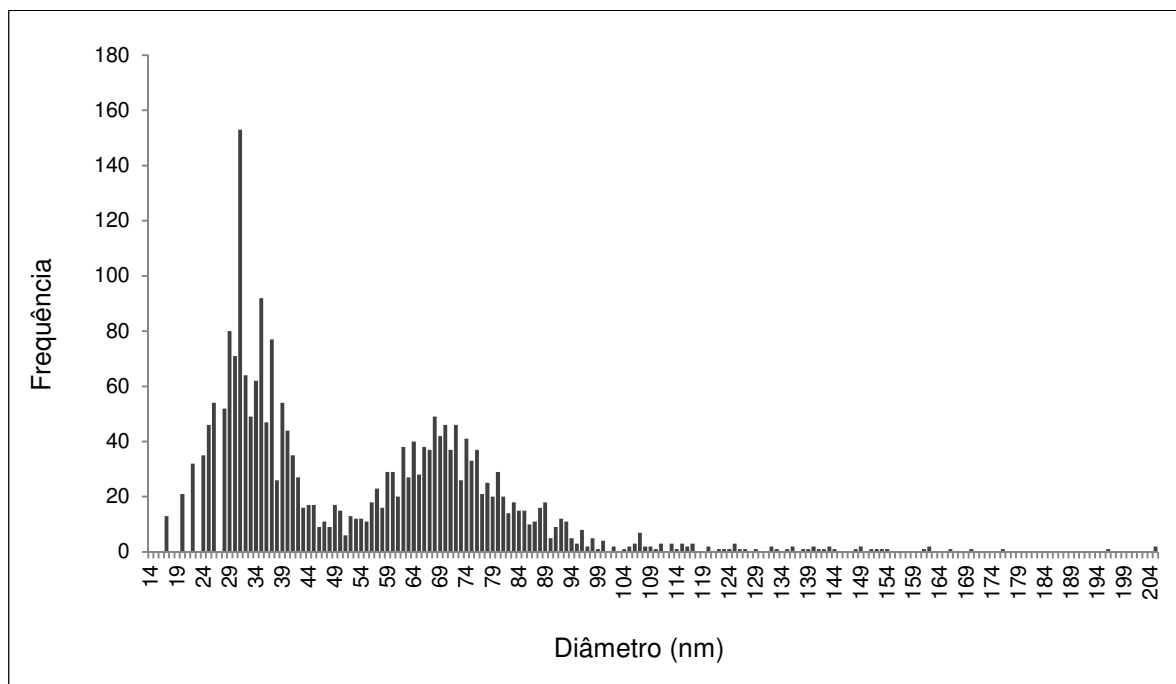
Figura 20 - Histograma da distribuição de tamanho das partículas de prata da solução Ss_{80}



Histograma da distribuição dos tamanhos das partículas de prata da solução Ss_{80} , determinados por spICP-MS (NexION 300D, Perkin Elmer, Massachusetts, EUA). Ss_{80} : Solução de nanopartículas de prata com tamanho de 80 nm, do ensaio de seletividade.
Fonte: O autor, 2020.

Para a solução Ss_{40+80} , preparada com nanopartículas de 40 e 80 nm, foram observadas duas distribuições normais, indicando a presença de dois tamanhos médios de partículas. A Figura 21 apresenta o histograma de distribuição de partículas para a solução. Os resultados apresentados demonstram a capacidade do método em diferenciar “populações” de partículas com diferentes tamanhos, indicando seletividade adequada com relação ao tamanho.

Figura 21 - Histograma da distribuição de tamanho das partículas de prata da solução Ss_{40+80}



Histograma da distribuição dos tamanhos das partículas de prata da solução Ss_{40+80} , determinados por spICP-MS (NexION 300D, Perkin Elmer, Massachusetts, EUA). Ss_{40+80} : Solução contendo nanopartículas de prata com tamanhos de 40 e 80 nm, do ensaio de seletividade.

Fonte: O autor, 2020.

4.3.8 Recuperação

Foram determinadas as concentrações médias de partículas nas replicatas das soluções. A solução Ss_{40} apresentou uma concentração experimental de 83.870 partículas mL^{-1} , correspondendo a uma recuperação de 83,7 %. Enquanto a solução Ss_{80} apresentou uma concentração experimental de 78.147 partículas mL^{-1} , correspondendo a uma recuperação de 77,6 %. A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos. Os resultados são compatíveis com os apresentados por Naasz e colaboradores (2018), onde foi obtida uma recuperação 83 % para uma solução de prata com 60 nm. Segundo os autores, são reportadas na literatura recuperações entre 14 e 73 %, quando analisadas matrizes complexas.

Tabela 22 - Recuperações calculadas para os tamanhos de partículas de prata de 40 e 80 nm

	Sr ₄₀	Sr ₈₀
Concentração experimental média (partículas mL ⁻¹)	83.870	78.232
Concentração esperada (partículas mL ⁻¹)	100.800	100.147
Recuperação (%)	83,7	77,6

Sr₄₀: Solução de nanopartículas de prata com tamanho de 40 nm, do ensaio de recuperação;

Sr₈₀: Solução de nanopartículas de prata com tamanho de 80 nm, do ensaio de recuperação.

Fonte: O autor, 2020.

4.4 Determinação da concentração de prata total nas amostras poliméricas

A Tabela 23 apresenta as concentrações de prata total dissolvida, determinadas por spICP-MS, para as amostras de polímeros. As concentrações foram reportadas em microgramas de prata por grama do polímero e em percentual m/m de prata no polímero. A Figura 22 apresenta graficamente os resultados das concentrações de prata total nas amostras poliméricas.

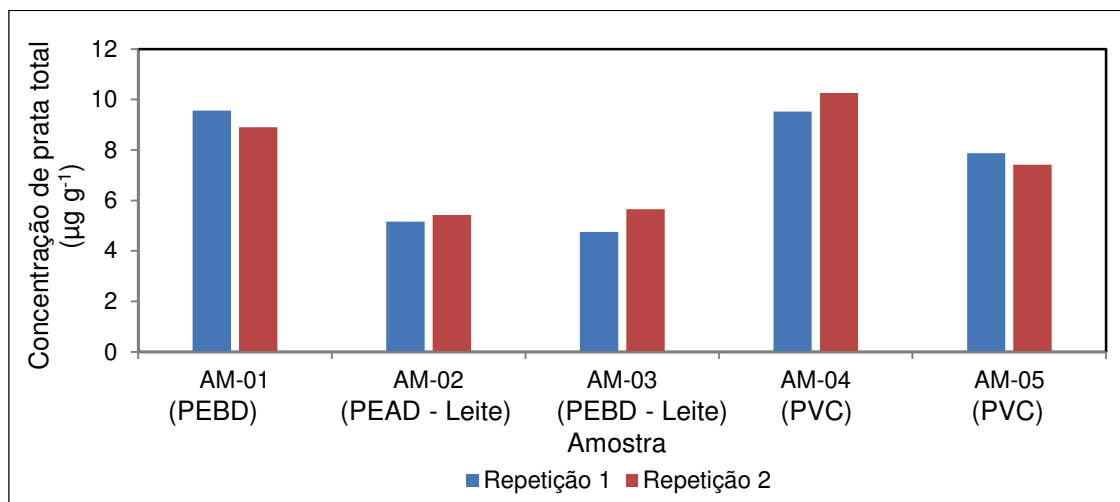
Tabela 23 - Concentrações de prata total nas amostras poliméricas determinadas por spICP-MS

Amostra	Polímero	Repetição	Concentração de prata no polímero	
			(µg g ⁻¹)	(% m/m)
AM-01	PEBD	1	9,55	9,55×10 ⁻⁴
		2	8,90	8,90×10 ⁻⁴
AM-02	PEAD	1	5,15	5,15×10 ⁻⁴
		2	5,42	5,42×10 ⁻⁴
AM-03	PEBD	1	4,75	4,75×10 ⁻⁴
		2	5,65	5,65×10 ⁻⁴
AM-04	PVC	1	9,52	9,52×10 ⁻⁴
		2	10,26	1,03×10 ⁻³
AM-05	PVC	1	7,87	7,87×10 ⁻⁴
		2	7,42	7,42×10 ⁻⁴

Concentrações de prata, determinadas por spICP-MS (NexION 300D, Perkin Elmer), para as amostras de polímeros. spICP-MS: espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, executado no Modo de Detecção Individual; AM-01 a AM-05: Códigos de identificação das amostras; PEBD: Polietileno de baixa densidade; PEAD: Polietileno de alta densidade; PVC: Poli(cloreto de vinila).

Fonte: O autor, 2020.

Figura 22 - Concentrações de prata total nas amostras poliméricas determinadas por spICP-MS



Apresentação gráfica das concentrações de prata, determinadas por spICP-MS (NexION 300D, Perkin Elmer), para as amostras de polímeros. spICP-MS: espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, executado no Modo de Detecção Individual, AM-01 a AM-05: Códigos de identificação das amostras. PEBD: Polietileno de baixa densidade; PEAD: Polietileno de alta densidade; PVC: Poli (cloreto de vinila).

Fonte: O autor, 2020.

As amostras AM-02 (PEAD) e AM-03 (PEBD), destinadas ao acondicionamento de leite, apresentaram concentrações de prata total semelhantes, com valores médios de 5,3 e 5,2 $\mu\text{g g}^{-1}$. As amostras AM-01 (PEBD), AM-04 (PVC) e AM-05 (PVC), apresentaram concentrações de prata médias de 9,2, 9,9 e 7,6 $\mu\text{g g}^{-1}$, sendo superiores às apresentadas para as amostras destinadas ao acondicionamento de leite.

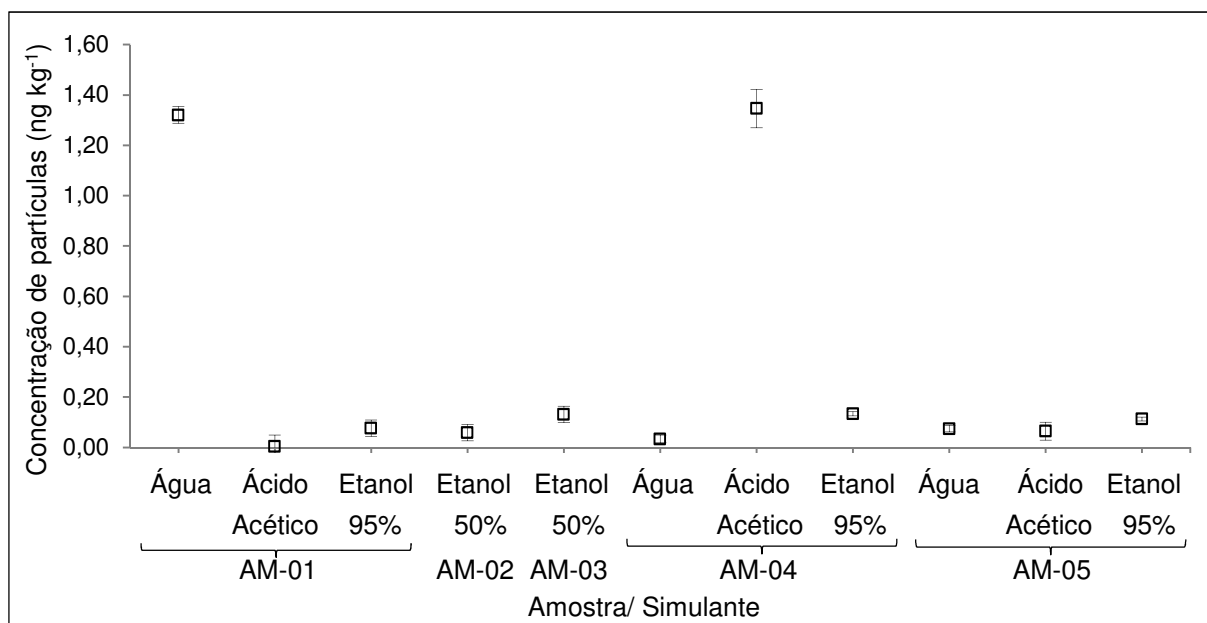
A RDC nº 326, de 3 de dezembro de 2019, da Anvisa, estabelece um limite máximo de composição para zeólitos de prata e zinco de 3 %m/m do material plástico, somente para ser utilizado como agente antimicrobiano (BRASIL, 2019). Os resultados obtidos indicam a presença de prata em todas as amostras analisadas, porém, em quantidade inferior ao limite máximo estabelecido pela legislação. Contudo, não é possível saber se a prata presente nos polímeros foi adicionada na forma de zeólitos de prata e zinco. Seria necessário um maior estudo da composição dos materiais. Além disso, apenas com a determinação da prata total não é possível indicar se a prata adicionada nas amostras está na forma nano. Segundo a resolução, as substâncias em nanoformas só podem ser utilizadas se tiverem sido expressamente autorizadas, porém, não é descrita na lista positiva, a utilização de nanopartículas de prata como um possível aditivo para materiais plásticos destinados ao contato com alimentos.

A determinação da prata total por spICP-MS, com digestão ácida em micro-ondas, apresentou para a amostra polimérica fortificada uma recuperação de 107 %. O resultado está dentro do esperado, conforme recomendação da AOAC INTERNATIONAL (AOAC INTERNATIONAL, 2016).

4.5 Determinação da concentração de migração

Para avaliação da migração de nanopartículas de prata provenientes de materiais plásticos em contato com alimentos, foram ensaiadas cinco amostras de diferentes polímeros, sendo duas de PEBD, uma de PEAD e duas de PVC. Foram determinados, para cada amostra, o tamanho médio e o número de partículas de prata migradas para o simulante alimentar, e a concentração de prata dissolvida. Foi estimada, através do método “*bottom-Up*”, as incertezas de medição relacionadas aos tamanhos médios de partículas de prata e às concentrações de migração de partículas de prata e de prata dissolvida de cada amostra. As Figuras 23 e 24 apresentam graficamente as concentrações de partículas de prata e prata dissolvida, respectivamente. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 24.

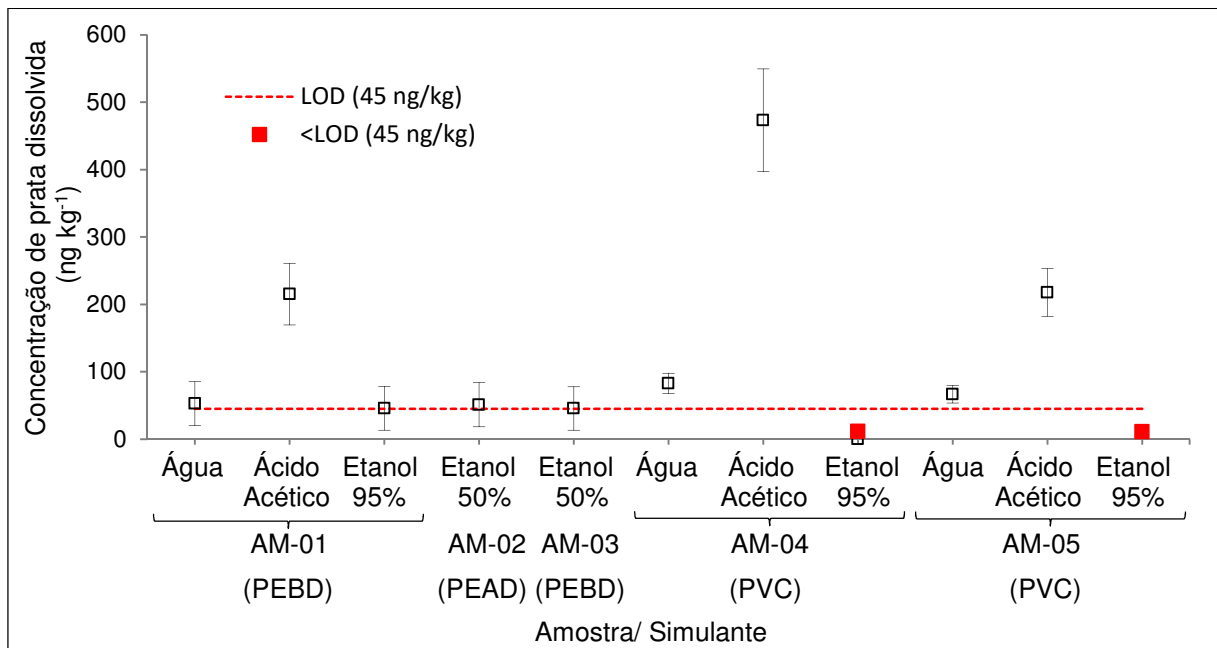
Figura 23 - Concentrações da migração de partículas de prata determinadas para as amostras AM-01 a AM-05, por spICP-MS



Apresentação gráfica das concentrações de partículas (ng kg⁻¹), determinadas por spICP-MS (NexION 300D, Perkin Elmer), nas soluções provenientes do ensaio de migração em simulante alimentar. spICP-MS: espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, executado no Modo de Detecção Individual, AM-01 a AM-05: Códigos de identificação das amostras; PEBD: Polietileno de baixa densidade; PEAD: Polietileno de alta densidade; PVC: Poli (cloreto de vinila).

Fonte: O autor, 2020.

Figura 24 - Concentrações da migração de prata dissolvida determinadas para as amostras AM-01 a AM-05, por spICP-MS



Apresentação gráfica das concentrações de prata dissolvida ($\mu\text{g kg}^{-1}$), determinadas por spICP-MS (NexION 300D, Perkin Elmer), nas soluções provenientes do ensaio de migração em simulante alimentar. spICP-MS: espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, executado no Modo de Detecção Individual, AM-01 a AM-05: Códigos de identificação das amostras, LOD: Limite de detecção; PEBD: Polietileno de baixa densidade; PEAD: Polietileno de alta densidade; PVC: Poli(cloreto de vinila).

Fonte: O autor, 2020.

Tabela 24 - Concentrações de partículas e de prata dissolvida determinadas, por spICP-MS, nas soluções provenientes do ensaio de migração em simulante alimentar

Amostra	Simulante	Concentração de partículas		Tamanho médio (nm)	Concentração de prata dissolvida (ng kg ⁻¹ alimento)	Concentração de prata total ⁽³⁾ (ng kg ⁻¹ alimento)	Taxa de migração de prata total da embalagem para o simulante ⁽⁴⁾ (%)
		(partículas kg ⁻¹ alimento)	(ng kg ⁻¹ alimento)				
AM-01 (PEBD)	Água	4,48×10 ⁶	1,32 ± 0,12	37,7 ± 1,7	53 ± 33	54	0,19
	Ácido Acético 3 %	3,25×10 ³	0,00433 ± 0,00038	62,3 ± 2,6	215 ± 46	215	0,75
	Etanol 95 %	8,15×10 ⁵	0,0766 ± 0,0089	25,8 ± 2,3	46 ± 32	46	0,16 (0,00027 ⁽¹⁾)
AM-02 (PEAD - Leite)	Etanol 50 %	2,75×10 ⁵	0,0589 ± 0,0054	33,9 ± 1,7	51 ± 33	51	0,027
AM-03 (PEBD - Leite)	Etanol 50 %	1,13×10 ⁶	0,131 ± 0,014	27,6 ± 2,0	46 ± 32	46	0,24
AM-04 (PVC)	Água	3,14×10 ⁴	0,0339 ± 0,0030	58,1 ± 2,4	83 ± 15	83	1,2
	Ácido Acético 3 %	2,90×10 ⁵	1,35 ± 0,12	94,5 ± 4,1	473 ± 76	474	7
	Etanol 95 %	7,75×10 ⁵	0,134 ± 0,013	31,6 ± 1,8	< LOD _d (44 ng kg ⁻¹)	0,134 ⁽²⁾	0,0020 ⁽²⁾
AM-05 (PVC)	Água	6,21×10 ⁴	0,0744 ± 0,0065	60,2 ± 2,5	66 ± 13	67	1,3
	Ácido Acético 3 %	1,76×10 ⁴	0,0650 ± 0,0057	87,6 ± 3,8	218 ± 35	218	4,1
	Etanol 95 %	7,98×10 ⁵	0,113 ± 0,011	29,5 ± 1,9	< LOD _d (44 ng kg ⁻¹)	0,113 ⁽²⁾	0,0022 ⁽²⁾

Resultados obtidos, por spICP-MS (NexION 300D, Perkin Elmer), para as soluções provenientes do ensaio de migração em simulante alimentar executado nas temperaturas de 20 °C (amostras AM-02 e AM-03) e 40 °C (Amostras AM-01, AM-04 e AM-05), por 10 dias. spICP-MS: espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, executado no Modo de Detecção Individual, AM-01 a AM-05: Códigos de identificação das amostras, LOD_d : Limite de detecção de prata dissolvida. AM-01 a AM-05: Códigos de identificação das amostras; PEBD: Polietileno de baixa densidade; PEAD: Polietileno de alta densidade; PVC: Poli (cloreto de vinila). (1) Taxa de migração considerando somente a migração de partículas de prata, (2) Somente foi considerada, para os cálculos da concentração total de prata e da taxa de migração, a concentração de partículas, (3) Concentração de prata total na solução de migração, determinada pela soma das concentrações de partículas e prata dissolvida, (4) Relação entre a concentração de prata total determinada no polímero, e a concentração de prata total determinada na solução de migração.

Fonte: O autor, 2020.

As amostras AM-02 e AM-03, destinadas ao acondicionamento de leite, apresentaram concentrações de migração de prata dissolvida, para o simulante etanol 50 %, estatisticamente semelhantes, com valores de (51 ± 33) e (46 ± 32) ng kg⁻¹ alimento, respectivamente (Figura 21). Contudo, a taxa de migração de prata em relação ao conteúdo de prata presente na amostra polimérica, foi aproximadamente nove vezes superior na amostra AM-03, com valores de 0,24 % para a amostra AM-03 (PEBD) e 0,027 % para a amostra AM-02 (PEAD). A taxa de migração de prata total, mais elevada na amostra AM-02, pode estar relacionada a uma maior dificuldade de migração da prata, em relação à amostra AM-03, relacionada à natureza do polímero. A migração de partículas de prata, em massa de partículas por kg de alimento, apresentada pela amostra AM-03 (PEBD) foi aproximadamente 2,2 vezes superior à apresentada pela amostra AM-02 (PEAD), com valores de $(0,0589 \pm 0,0054)$ e $(0,131 \pm 0,014)$ ng kg⁻¹, respectivamente (Figura 20). Os tamanhos médios de partículas apresentados para as amostras AM-02 e AM-03 foram de $(33,9 \pm 1,7)$ e $(27,6 \pm 2,0)$ nm, respectivamente.

As amostras AM-04 e AM-05 (PVC), destinadas ao contato com alimentos não especificados, apresentaram migrações de prata dissolvida abaixo do LOD do método (<44 ng kg⁻¹), para o simulante etanol 95 %. Enquanto a amostra AM-01 (PEBD) apresentou concentração de (46 ± 32) ng kg⁻¹, ligeiramente superior ao LOD. As concentrações de migração de partículas de prata, em massa de partículas por kg do alimento, foram de $(0,0766 \pm 0,0089)$, $(0,134 \pm 0,013)$ e $(0,113 \pm 0,011)$ ng kg⁻¹, para as amostras AM-01, AM-04 e AM-05, respectivamente, com tamanhos médios de partículas entre $(25,8 \pm 2,3)$ e $(31,6 \pm 1,8)$ nm. A taxa de migração de partículas de prata para o simulante, para as amostras AM-04 e AM-05 (PVC), foi de 0,0020 e 0,0022 %, respectivamente, e de 0,00027 % para a amostra AM-01 (PEBD). As taxas de migração para o simulante etanol 95 % foram determinadas em relação à concentração de partículas no simulante, e não à prata total, uma vez que, as amostras de PVC AM-04 e AM-05 apresentaram concentrações de prata dissolvida abaixo de LOD.

As amostras AM-01 (PEBD), AM-04 e AM-05 (PVC) apresentaram concentrações de migração, para o simulante água desionizada, iguais a (53 ± 33) , (83 ± 15) e (66 ± 13) ng kg⁻¹. As amostras de PVC, AM-04 e AM-05 apresentaram taxas de migração de prata para o simulante aproximadamente 6,3 e 6,8 vezes maiores, respectivamente, em relação à determinada para a amostra AM-01, de

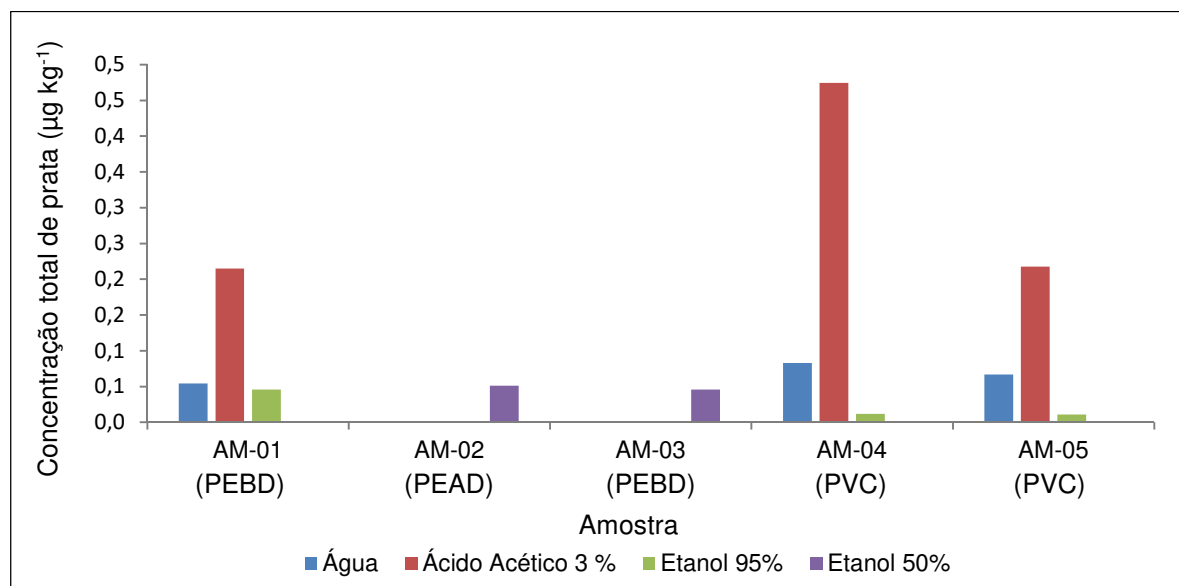
PEBD. As concentrações de migração de partículas de prata, em massa de partículas por kg do alimento, foram de $(1,32 \pm 0,12)$, $(0,0339 \pm 0,0030)$ e $(0,0744 \pm 0,0065)$ ng kg⁻¹, para as amostras AM-01, AM-04 e AM-05, respectivamente, com tamanhos médios de partículas entre $(37,7 \pm 1,7)$ e $(60,2 \pm 2,5)$ nm.

A amostra AM-04 apresentou, no ensaio de migração com determinação por spICP-MS, para os simulantes alimentares ácido acético, água desionizada e etanol 95 %, tamanhos médios de partícula entre $(31,6 \pm 1,8)$ e $(94,5 \pm 4,1)$ nm, com média de 61,4 nm. No ensaio de microscopia foi possível observar, para a amostra AM-04, partículas entre 17 e 80 nm. Apesar de os resultados serem consistentes, é necessário ressaltar que as nanopartículas observadas no ensaio de migração podem ter sofrido ação de ionização causada pela presença do simulante alimentar. Além disso, no ensaio por MEV, as nanopartículas foram observadas em uma pequena área da amostra e podem não representar estatisticamente o tamanho médio que seria observado na amostra.

Quando em contato com ácido acético 3%, as amostras AM-01, AM-04 e AM-05 apresentaram migrações de prata dissolvida de (215 ± 46) , (473 ± 76) e (217 ± 35) ng kg⁻¹, com taxas de migração de prata iguais a 0,75, 7,0 e 4,1 %, respectivamente. As concentrações de partículas de prata, em massa de prata por kg de alimento, determinadas no simulante alimentar, foram de $(0,00433 \pm 0,00038)$, $(1,35 \pm 0,12)$ e $(0,0650 \pm 0,0057)$ ng kg⁻¹, para as amostras AM-01, AM-04 e AM-05, respectivamente, com tamanhos médios de partículas entre $(62,3 \pm 2,6)$ e $(94,5 \pm 4,1)$ nm.

As taxas de migração determinadas para as amostras AM-01, AM-04 e AM-05 evidenciam uma maior migração de prata total para o simulante ácido acético, em comparação com as apresentadas para água desionizada e etanol 95%, como pode ser observado na Figura 25. Os resultados obtidos estão de acordo com o esperado e são consistentes com os observados na literatura. Segundo Mackevica, Olsson e Hansen (2016), a taxa migração de prata tende a aumentar com a redução do pH, ocasionando uma maior migração para a solução de ácido acético 3 %, se comparada à água desionizada ou etanol 95 %.

Figura 25 - Concentrações de prata total (prata dissolvida + partículas de prata) determinadas, por spICP-MS, para as soluções provenientes do ensaio de migração em simulante alimentar



spICP-MS: espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, executado no Modo de Detecção Individual, AM-01 a AM-05: Códigos de identificação das amostras; PEBD: Polietileno de baixa densidade; PEAD: Polietileno de alta densidade; PVC: Poli (cloreto de vinila).

Fonte: O autor, 2020.

Contudo, as concentrações de partículas de prata apresentadas para as amostras AM-01 e AM-05 (Figura 23), para o simulante ácido acético 3 %, foram inferiores às apresentadas para os simulantes água desionizada e etanol 95 %. A amostra AM-04 apresentou concentração de partículas de prata para o simulante ácido acético superior aos demais simulantes, porém 94 % das partículas apresentaram tamanho superior a 73 nm.

Tais resultados indicam que parte das partículas que migram para a solução de ácido acético 3 % são oxidadas em prata dissolvida. O tamanho médio das partículas determinados para o simulante ácido acético 3 % foi superior ao apresentado, para a mesma amostra, para a água desionizada, que foi superior ao apresentado para o etanol 95 %, com médias de 82 nm, 52 nm e 29 nm respectivamente. Tais diferenças podem estar relacionadas à acidez de cada simulante. Os resultados indicam aumento do tamanho médio de partículas com o aumento da acidez do simulante, e a prevalência da oxidação de partículas de menor diâmetro, e são consistentes com o apresentado na literatura.

Peretyazhko, Zhang e Colvin (2014) mostraram que o tamanho médio de partículas de prata em solução cresce após a dissolução. No estudo, soluções de

partículas com 6,2, 9,2, e 12,9 nm tiveram seu tamanho médio acrescido para 10,4, 13,3, e 16,0 nm, respectivamente, na presença de água. Não foi observado acréscimo estatisticamente significativo, no tamanho médio de partículas, na solução contendo partículas de 70,5 nm. Os resultados indicaram ainda que partículas menores possuem maior taxa de solubilização.

Ntim e colaboradores (2015) demonstraram que a concentração de nanopartículas de prata é reduzida, na presença de ácido acético 3 %, pela oxidação das partículas em prata dissolvida. O mesmo pode ocorrer com os simulantes etanol 50 % e etanol 95 %, como indicado por Echegoyen e Nerín (2013). Segundo os autores, nanopartículas de prata são instáveis à oxidação e liberam íons pela reação de oxidação gradual.

A liberação de íons a partir de nanopartículas de prata ocorre por oxidação, envolvendo efeitos combinados de O_2 e H^+ dissolvidos, e sob algumas condições, prossegue para a dissolução total (LIU; HURT, 2010). Segundo Ntim e colaboradores (2015), o sistema Ag^0 / Ag^+ é muito sensível à oxidação e redução e pode ser facilmente influenciado pela presença de outras espécies reativas.

Todas as amostras analisadas, no presente estudo, apresentaram migração de nanopartículas de prata e prata dissolvida em quantidades inferiores ao limite de migração específica de prata (total) de $50 \mu g kg^{-1}$, estabelecido pela legislação (UNIÃO EUROPÉIA, 2011; BRASIL, 2019). Contudo, os resultados obtidos indicaram a migração de nanopartículas de prata, em tamanhos entre 26 e 95 nm, em todos os materiais plásticos analisados, para todos os simulantes avaliados. Assim, todas as amostras avaliadas foram consideradas em desacordo com as legislações brasileira e europeia. As legislações estabelecem que substâncias em nanoformas só podem ser utilizadas se tiverem sido expressamente autorizadas. Contudo, não existe indicação do uso de nanopartículas de prata em materiais plásticos destinados ao contato com alimentos (UNIÃO EUROPÉIA, 2011; BRASIL, 2019).

Segundo o Regulamento n° 10/2011 da Comissão, de 14 de janeiro de 2011, da União Europeia, nanopartículas apresentam propriedades químicas e físicas significativamente diferentes das partículas de maior tamanho podendo resultar em propriedades toxicológicas diferentes. Assim, substâncias em nanoformas devem ser avaliadas caso a caso no que diz respeito aos riscos, até que sejam obtidas mais informações acerca da nova tecnologia. Diante deste cenário, as autorizações que

têm por base a avaliação dos riscos de uma substância com um tamanho convencional não devem abranger nanopartículas. A avaliação de risco na qual a legislação se baseia não contempla o risco associado às nanopartículas de prata.

Mesmo em materiais multicamadas, onde, uma camada de plástico que não se encontre em contato direto com os alimentos e esteja separada dos mesmos por uma barreira funcional pode ser fabricada com substâncias que não constem da lista positiva ou provisória, não é permitida a utilização de substâncias em nanoformas (UNIÃO EUROPÉIA, 2011; BRASIL, 2019).

Os dados toxicológicos apresentados na literatura indicam que a toxicidade das nanopartículas de prata está relacionada ao seu tamanho, sendo partículas menores capazes de penetrar com maior facilidade na célula. Contudo, Estudos mostram que mesmo partículas com tamanhos da ordem de 100 nm podem causar dano às células. Assim, as partículas observadas no presente estudo, com tamanhos entre 26 e 95 nm, representam potencial risco à saúde humana.

4.5.1 Estimativa da incerteza de medição

A metodologia apresentou incertezas de medição expandidas, associadas à concentração de partículas, entre 8,7 e 11,6 % do valor nominal da grandeza. As incertezas expandidas, associadas ao tamanho da partícula, foram entre 4,2 e 8,8 % do valor nominal. As incertezas expandidas, associadas à concentração de prata dissolvida, foram entre 16 e 21 % do valor nominal, crescendo para entre 62 a 71 %, para concentrações próximas ao limite de detecção. Os resultados encontrados e a metodologia empregada para o cálculo da incerteza se mostraram satisfatórios. As incertezas expandidas calculadas são compatíveis com a metodologia analítica adotada para o ensaio. A Comissão do Codex Alimentarius, criada em 1963 pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação - FAO e Organização Mundial de Saúde - OMS, e tem como principais objetivos proteger a saúde dos consumidores, assegurando justas práticas comerciais no comércio internacional de alimentos, estabelece no documento Guidelines on Measurement Uncertainty (CAC/GL 54-2004) valores de incerteza expandida esperados para ensaios químicos a serem reportados em ensaios colaborativos. Para concentrações menores que $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ são esperadas incertezas expandidas de aproximadamente 44% (FAO/WHO, 2004).

5 CONCLUSÃO

O ensaio de migração de nanopartículas de prata provenientes de materiais plásticos em contato com alimentos, com detecção, medição e quantificação por splCP-MS, foi considerado adequado ao propósito. Todos os parâmetros avaliados como linearidade, efeito de matriz, seletividade, repetibilidade e precisão intermediária apresentaram resultados satisfatórios para as faixas de concentração definidas na validação do método, segundo os critérios adotados. Os resultados obtidos demonstram a sua capacidade de estimar o tamanho de nanopartículas de prata e ainda determinar a sua concentração. Assim, os resultados obtidos indicam a possibilidade de utilização da técnica no controle sanitário de materiais plásticos, com atividade antimicrobiana pela adição de prata, destinados ao contato com alimentos.

As amostras analisadas apresentaram concentrações de prata total entre não detectável ($< 44 \text{ ng kg}^{-1}$) e 473 ng kg^{-1} do simulante. Todas as amostras apresentaram migração de nanopartículas de prata, sendo as concentrações encontradas entre $0,00433$ e $1,35 \text{ ng kg}^{-1}$. O estudo de migração indicou a presença de nanopartículas de prata em todos os simulantes alimentares, com tamanhos entre 26 e 95 nm. Apesar das concentrações de prata total, nas soluções de migração, estarem abaixo do limite estabelecido pela legislação, a utilização de nanopartículas de prata é proibida pelas legislações brasileira e europeia. Os resultados obtidos nos ensaios por MEV com EDS, são mais um indicativo da possível presença de nanopartículas de prata nas amostras. Nas imagens obtidas, para a amostra AM-04, foi possível observar a presença de nanopartículas de prata esféricas, entre 17 e 80 nm. Tais resultados confirmam a utilização de nanopartículas de prata na amostra.

Assim, os resultados obtidos evidenciam um problema relacionado à migração de nanopartículas de prata provenientes de materiais plásticos para alimentos. Tais resultados expõem a necessidade de um maior controle da produção de materiais com características antimicrobianas pela adição de nanopartículas de prata, e confirmam a importância da implementação de um método validado para direcionar ações de vigilância sanitária. Ainda são necessários maiores estudos sobre a segurança relacionada à exposição a substâncias em nanoformas e a legislação não permite até o momento o seu uso.

O método desenvolvido e validado será uma importante ferramenta de suporte para a fiscalização junto à vigilância sanitária. Os resultados obtidos auxiliarão a área de saúde na análise de risco à saúde humana, visando a regulação deste tipo de material sob o ponto de vista de segurança alimentar.

Será possível levantar dados com a finalidade de direcionar ações regulatórias para promover uma maior confiabilidade nos produtos disponíveis à população, diminuindo ou mesmo eliminando os riscos relativos à exposição às nanopartículas de prata presentes nos produtos e serviços de saúde.

Porém é necessário que as ações tomadas, com base nos ensaios laboratoriais, sejam eficazes, devendo ainda haver ações no sentido da prevenção, através da promoção da informação.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Cartilha de vigilância sanitária: cidadania e controle social**. 2. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2002. 55 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025/2017: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. 3. ed. Rio de Janeiro, 2017.
- ABRANTES, S. M. P. **Uso da eletroforese capilar para a determinação da migração química em alimentos em contato com embalagens**. 1998. 186 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, 1998.
- ALDOSSARI, A. A. *et al.* Influence of physicochemical properties of silver nanoparticles on mast cell activation and degranulation. **Toxicol In Vitro**, v. 29, n. 1, p. 195-203, 2015.
- AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F)**. Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 2016.
- ÁVILA, A. K. *et al.* Comparação da estimativa de incerteza de medição na determinação de cobre por espectrometria de absorção atômica com chama por diluição gravimétrica e volumétrica. **Analytica**, v. 11, p. 48-51, 2004.
- AZEREDO, H. M. C. DE. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1240-1253, 2009.
- BARBOSA-PEREIRA, L. *et al.* Development of new active packaging films containing bioactive nanocomposites. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 26, p. 310-318, 2014.
- BARROS, H. D. **Estudo da exposição do consumidor aos plastificantes ftalato e adipato de di-(2-etil-hexila) adicionados a filmes de PVC, utilizados para acondicionamento de alimentos Gordurosos**. 2010. 79 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2010.
- BAZILIO, F. S. **Determinação da migração específica dos plastificantes ftalato de di-(2-etil-hexila) e adipato de di-(2-etil-hexila) de filmes flexíveis de PVC para alimentos gordurosos: validação de método e controle sanitário do filme flexível de PVC**. 2014. 141 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2014.
- BAZILIO, F. S. *et al.* Estimativa da incerteza de medição: estudo de caso no ensaio de migração de ϵ -caprolactama com determinação por CG-DIC. **Química Nova**, v. 35, p. 1664-1667, 2012a.

BAZILIO, F. S. *et al.* Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Analytica**, v. 59, p. 60-67, 2012b.

BELSLEY, D. A.; KUH, E.; WELSCH, R. E. **Regression diagnostics**: identifying influential data and sources of colinearity. New York: Wiley, 1980.

BERGIN, I. L.; WITZMANN, F. A. Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. Int. **J. of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology**, v. 3, n. 1-2, p. 163-210, 2013.

Bolea-Fernandez, E. *et al.* On the effect of using collision/reaction cell (CRC) technology insingle-particle ICP-mass spectrometry (SP-ICP-MS). **Analytica Chimica Acta**, v. 1077, p. 95-106, 2019.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 326 de 3 de dezembro de 2019. Estabelece a lista positiva de aditivos destinados à elaboração de materiais plásticos e revestimentos poliméricos em contato com alimentos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 4 de dezembro de 2019. Disponível em: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-326-de-3-de-dezembro-de-2019-231272617>. Acesso em: 20 jul. 2020.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 51 de 26 de novembro de 2010. Dispõe sobre migração em materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 22 de dezembro de 2010. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_51_2010_COMP.pdf/1e3cd7f0-d50c-4693-9db4-0082132dfb6e. Acesso em: 20 jul. 2020.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 91 de 11 de maio de 2001. Aprovar o Regulamento Técnico - Critérios Gerais e Classificação de Materiais para Embalagens e Equipamentos em Contato com Alimentos constante do Anexo desta Resolução. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 15 de maio de 2001. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/\(1\)RDC_91_2001_COMP.pdf/fb132262-e0a1-4a05-8ff7-bc9334c18ad3](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/(1)RDC_91_2001_COMP.pdf/fb132262-e0a1-4a05-8ff7-bc9334c18ad3). Acesso em: 20 jul. 2020.

BRASIL. Resolução nº 105 de 19 de maio de 1999. Aprova os regulamentos técnicos e disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 20 de maio de 1999. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RES_105_1999_COMP.pdf/35bc8b0b-8efb-4a66-b852-0e2d60ccc455. Acesso em: 20 jul. 2020.

BRATINOVA, S.; RAFFAEL, B.; SIMONEAU, C. **Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials**: EUR 24105 EN. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2009. Disponível em: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/111111111/1326>. Acesso em: 20 jul. 2020.

BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust Tests for the Equality of Variances. **Journal of the American Statistical Association**, v. 69, n. 346, p. 364-367, 1974.

BUSTOS, A. R. M.; WINCHESTER, M. R. Single-particle-ICP-MS advances. **Anal Bioanal Chem**, v. 408, p. 5051–5052, 2016.

CAMPOS, M. A.; OLIVEIRA, J. C.; VENDRAMINI, A. L. A. Segurança alimentar: conceito, história e prospectiva. *In*: MARINS, B. R.; TANCREDI, R. C. P.; GEMAL, A. L. **Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária: reflexões e práticas**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2014. p. 37-68.

CAPELEZZO, A. P. *et al.* Polímero biodegradável antimicrobiano através da aditivação com compostos à base de zinco. **Quim. Nova**. v. 41, n. 4, p. 367-374, 2018.

COCKBURN, A. *et al.* Approaches to the safety assessment of engineered nanomaterials (ENM) in food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 2224-2242, 2012.

CORSO, M. P. **Embalagens**. Medianeira, 2007, 79 p. Apostila do Curso de Tecnologia em Alimentos – Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

COULTATE, T. P. **Alimentos: a química de seus componentes**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 368 p.

DE LA CRUZ, M. H. C. *et al.* Estimativa da incerteza de medição em análise cromatográfica: abordagem sobre a quantificação de carbamato de etila em cachaça. **Química Nova**, v. 33, p. 1578-1584, 2010.

DONOVAN, A.; SHI, H.; STEPHAN, C. The Benefits of SP-ICP-MS to Assess the Fate of Nanoparticles During the Coagulation of Drinking Water. **Spectroscopy**, v. 33, n. 9, p. 46-48, 2018.

DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York: Wiley, 1998. 706 p.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, n. 1, p. 1-24, 2011.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression. II. **Biometrika**, v. 38, n. 1/2, p. 159-177, 1951.

ECHEGOYEN, Y.; NERÍN, C. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, n. 0, p. 16-22, 2013.

EFSA supporting publication 2014: EN-621, 2014. 125 p. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2014.EN-621>. Acesso em: 20 jul. 2020.

ESTEVEES, A. A. *et al.* Validação em laboratório de método analítico para determinação do teor de adipato e ftalato de di-(2-etil-hexila) utilizados como plastificantes em filmes flexíveis de PVC. **Química Nova**, v. 30, p. 219-223, 2007.

EURACHEM/CITAC WORKING GROUP. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 3. ed. London: EURACHEM/CITAC WORKING GROUP, 2012.

EURACHEM/CITAC WORKING GROUP. **The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**. London: EURACHEM/CITAC WORKING GROUP, 1998.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. **FAO/WHO Expert meeting on the application of nanotechnologies in the food and agriculture sectors: potential food safety implications - Meeting report**. Roma, 2010. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/012/i1434e/i1434e00.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2020.

FIGUEIREDO, V. A.; RECINE, E.; MONTEIRO, R. Regulação dos riscos dos alimentos: as tensões da Vigilância Sanitária no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 7, p. 2353-2366, 2017.

FRANZE, B.; ENGELHARD, C. Fast Separation, Characterization, and Speciation of Gold and Silver Nanoparticles and Their Ionic Counterparts with Micellar Electrokinetic Chromatography Coupled to ICP-MS. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 12, p. 5713-5720, 2014.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001, 655 p.

GLIGA, A. R. *et al.* Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. **Part Fibre Toxicol**, v. 11, p. 11, 2014.

GOUVÊA, A. V. **Validação de metodologia de análise de resíduos de agrotóxicos em maçãs por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas sequencial**. 2011. 74 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2011.

HANNON, J. C. *et al.* Advances and challenges for the use of engineered nanoparticles in food contact materials. **Trends in Food Science & Technology**, v. 43, n. 1, p. 43-62, 2015.

HAYDER, M. *et al.* Analysis of cerium oxide and copper oxide nanoparticles bioaccessibility from radish using SP-ICP-MS. **J. Sci. Food Agric.**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.10558>. Acesso em: 20 jul. 2020.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure Applied Chemistry**. v. 67, p. 331-43, 1995.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 4, p. 1095-1109, 2006.

HUANG, Y. *et al.* Nanosilver Migrated into Food-Simulating Solutions from Commercially Available Food Fresh Containers. **Packag. Technol. Sci.**, v. 24, n. 5, p. 291-297, 2011.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, Feb, p. 96-105, 1998.

HUSSAIN, S. M. *et al.* In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. **Toxicology in Vitro**, v. 19, n. 7, p. 975-983, 2005.

INCQS/ FIOCRUZ. **POP nº 65.3120.126**: validação de metodologias com determinação através de curva analítica linear. Revisão 05. Rio de Janeiro, 2017.

INMETRO. **Avaliação de dados de medição**: guia para a Expressão da Incerteza de Medição. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2012a.

INMETRO. **Vocabulário Internacional de Metrologia**: Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados (VIM 2012). Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2012b.

INMETRO. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos DOQ-CGCRE-008**: normatização e qualidade industrial. Revisão 9. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2020.

Disponível em:

http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeracao=00774&num_documento=008. Acesso em: 20 jun. 2020.

INSTITUTO PORTUGUÊS DE ACREDITAÇÃO. **Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos**: OGC007. Caparica: INSTITUTO PORTUGUÊS DE ACREDITAÇÃO, 2007.

JACOB, S. C. Laboratório analítico, parte fundamental na avaliação de risco relativo ao consumo de alimentos. *In*: MARINS, B. R; TANCREDI, R. C. P.; GEMAL, A. L. **Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária: reflexões e práticas**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2014. p. 185-203.

JOKAR, M.; ABDUL RAHMAN, R. Study of silver ion migration from melt-blended and layered-deposited silver polyethylene nanocomposite into food simulants and apple juice. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v. 31, n. 4, p. 734-42, 2014.

KIM, Y. *et al.* Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 20, 2010.

KULTHONG, K. *et al.* Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 8, 2010.

KUORWEL, K. K. *et al.* Review of Mechanical Properties, Migration, and Potential Applications in Active Food Packaging Systems Containing Nanoclays and Nanosilver. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 4, p. 411-430, 2015.

LABORDA, F.; BOLEAA, E.; JIMÉNEZ-LAMANA, J. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 9, p. 15-23, 2016.

LABORDA, F. *et al.* Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: a review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. **Anal. Chim. Acta.**, v. 904, p. 10–32, 2016.

LEE, J. *et al.* Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 36, 2013.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. *In*: OLKIN, I. *et al.* (ed.). **Contributions to probability and statistics**. Stanford University Press, p. 278-292, 1960.

LIN, Q. B. *et al.* Determination of silver in nano-plastic food packaging by microwave digestion coupled with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry or inductively coupled plasma mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 8, p. 1123-1128, 2011.

LIU, F.-K. *et al.* Studying the size/shape separation and optical properties of silver nanoparticles by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1062, n. 1, p. 139-145, 2005.

LIU, J.; HURT, H.R. Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloid. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 6, p. 2169-2175, 2010.

LIU, J. *et al.* Migration and Characterization of Nano-zinc Oxide from Polypropylene Food Containers. **American Journal of Food Technology**, v. 11, p. 159-164, 2016.

LIU, J.-F. *et al.* Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 33, p. 95-106, 2012.

LIU, W. *et al.* Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. **Nanotoxicology**, v. 4, n. 3, p. 319-30, 2010.

MACKEVICA, A.; OLSSON, M. E.; HANSEN, S. F. Silver nanoparticle release from commercially available plastic food containers into food simulants. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 18, n. 1, p. 5, 2016.

MASOOD, N. et al. Silver nanoparticle impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes induced rabbits. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 559, p. 23-36, 2019.

MCSHAN, D.; RAY, P. C.; YU, H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 116-127, 2014.

MEERMANN, B.; NISCHWITZ, V. ICP-MS for the analysis at the nanoscale – a tutorial review. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 33, n. 9, p. 1432-1468, 2018.

MELO, N. R. **Migração de plastificantes e avaliação de propriedades mecânicas de filmes de poli(cloreto de vinila) para alimentos**. 2007. 138 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

METAK, A. M. Effects of Nanocomposite Based Nano-Silver and Nano-Titanium Dioxide on Food Packaging Materials. **International Journal of Applied Science and Technology**, v. 5, n. 2, p. 26-40, 2015.

METAK, A. M.; AJAAL, T. T. Investigation on Polymer Based Nano-Silver as Food Packaging Materials. **International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering**, v. 7, p. 767-774, 2013.

MOZHAYEVA, D.; ENGELHARD, C. J. A critical review of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry—A step towards an ideal method for nanomaterial characterization. **Anal. At. Spectrom**, v. 35, n. 9, p. 1740-1783, 2020.

NAASZ, S. *et al.* Multi-element analysis of single nanoparticles by ICP-MS using quadrupole and time-of-flight technologies. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 33, p. 835-845, 2018.

NIST. **Guidelines for evaluating and expressing the uncertainty of NIST measurement results: NIST Technical Note 1297**. 1994 Edition, Washington: U.S. Government Printing Office, 1994. Disponível em: <http://physics.nist.gov/Pubs/guidelines/TN1297/tn1297s.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2020.

NOONAN, G. O. *et al.* Measurement Methods to Evaluate Engineered Nanomaterial Release from Food Contact Materials. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 679-692, 2014.

NOGUEIRA, P. F. M.; PAINO, L. M. M.; ZUCOLOTTI, V. Nanosilver: propriedades, aplicações e impactos na saúde pública e meio ambiente. **Visa em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 1, n. 4, p. 59-71, 2013.

NTIM, S. A. *et al.* Characterisation and potential migration of silver nanoparticles from commercially available polymeric food contact materials. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 32, n. 6, p. 1003-1011, 2015.

NTIM, S. A. *et al.* Consumer use effects on nanoparticle release from commercially available ceramic cookware. **Food Control**. v. 87, p. 31-39, 2018.

OLIVEIRA, E. C. D.; AGUIAR, P. F. D. Comparação de diferentes abordagens para avaliação da incerteza na cromatografia gasosa do gás natural. **Química Nova**, v. 32, p. 1655-1660, 2009.

OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, P. V. L. Revisão: Principais Agentes Antimicrobianos Utilizados em Embalagens Plásticas. **Braz. J. Food. Tech.** v. 7, n. 2, p. 161-165, 2004.

PACE, H. E. *et al.* Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 24, p. 9361-9369, 2011.

PANYALA, N. R.; PEÑA-MÉNDEZ, E. M.; HAVEL, J. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health? **Journal of Applied Biomedicine**, v. 6, p. 117-129, 2008.

PEN - PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES. **Consumer Products Inventory**, 2013. Disponível em: <http://www.nanotechproject.tech/cpi/>. Acesso em: 20 jul. 2020.

PETERS, R. B. *et al.* Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 16, p. 3875-3885, 2014.

PODA, A. R. *et al.* Characterization of silver nanoparticles using flow-field flow fractionation interfaced to inductively coupled plasma mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1218, n. 27, p. 4219-25, 2011.

REALINI, C. E.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat Science**, v. 98, n. 3, p. 404-419, 2014.

RIBEIRO, F. A. D. L. *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008.

RISH, S. J. Migration of toxicants, flavours and odor active substances from flexible packaging materials to food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 9, p. 797-802, 1988.

RYAN, T.A.; JOINER, B.L. **Normal probability plots and tests for normality**. The States College: Pennsylvania State University, 15 p., 1976.

SHARMA, S. *et al.* Nanostructured Materials for Food Applications: Spectroscopy, Microscopy and Physical Properties. **Bioengineering**, v. 6, n. 26, 2019.

SHEPHERD, M. J. Trace contamination of foods by migration from plastics packaging: a review. **Food Chemistry**, v. 8, p. 129-145, 1982.

SILVESTRE, C.; DURACCIO, D.; CIMMINO, S. Food packaging based on polymer nanomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 12, p. 1766-1782, 2011.

SINGH, G. *et al.* Measurement Methods to Detect, Characterize, and Quantify Engineered Nanomaterials in Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 693-704, 2014.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University, 1989. 503 p.

SOBOLEVA, E.; AMBRUS, Á. Application of a system suitability test for quality assurance and performance optimisation of a gas chromatographic system for pesticide residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, n. 1-2, p. 55-65, 2004.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004.

SOUZA S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio**: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. 2007. 296 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.

STEPHAN, C.; HINEMAN, A. **Iron Nanoparticles by SP-ICP-MS**: Overcoming Spectral Interferences Using Universal Cell Technology. Perkin Elmer Application Brief, Waltham, 2014.

STEPHAN, C.; NEUBAUER, K. Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry : Understanding How and Why. **Perkin Elmer**, p. 1-5, 2014.

STRENGE, I.; ENGELHARD, C. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: Investigating nonlinear response observed in pulse counting mode and extending the linear dynamic range by compensating for dead time related count losses on a microsecond timescale. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 35, n. 1, p. 84-99, 2020.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for a single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**, v.74, p. 835-855, 2002.

TOMIĆ, T.; NASIPAK, U. N.; BABIĆ, S. Estimating measurement uncertainty in highperformance liquid chromatography methods. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 17, n. 3, p. 291-300, 2012.

UNIÃO EUROPÉIA. Regulamento N^o 10/2011, 14 de janeiro de 2011. Relativo aos materiais e objectos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos. **Jornal Oficial da União Europeia**, L. 12/1, 2011. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:012:0001:0089:PT:PDF>. Acesso em: 20 jul. 2020.

VAN DER ZANDE, M. *et al.* Distribution, Elimination, and Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Rats after 28-Day Oral Exposure. **ACS Nano**, v. 6, n. 8, p. 7427-7442, 2012.

VANDERROOST, M. *et al.* Intelligent food packaging: The next generation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 39, n. 1, p. 47-62, 2014.

WALCZAK, A. P. *et al.* Behaviour of silver nanoparticles and silver ions in an in vitro human gastrointestinal digestion model. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 7, p. 1198-1210, 2012.

YU, S.; ZHOU, X.; LIU, J. Separation and Determination of Silver Nanoparticles. *In*: LIU, J.; JIANG, G. (ed.). **Silver Nanoparticles in the Environment**. Heidelberg: Springer, 2015. cap. 2, p.9-42.