

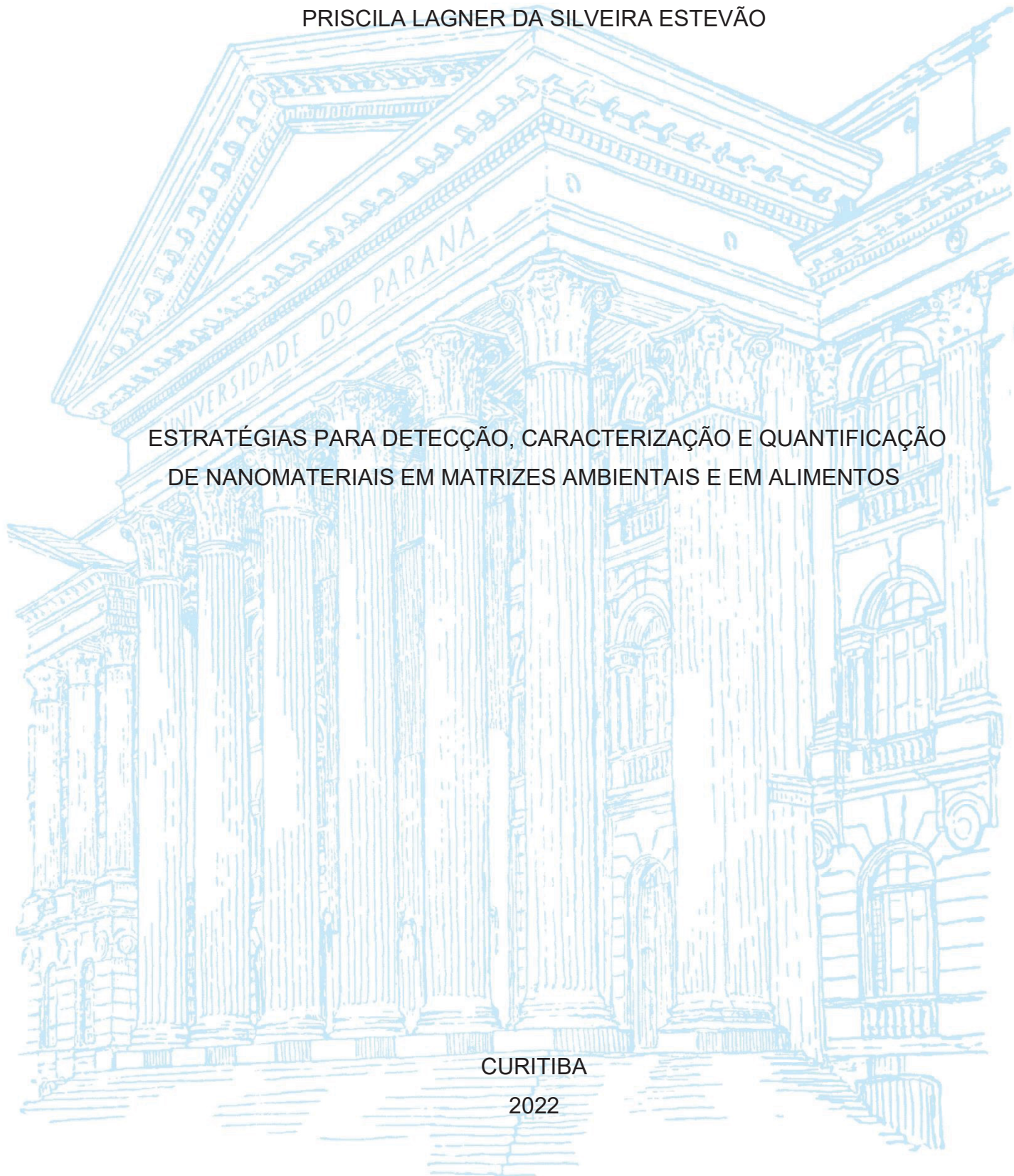
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILA LAGNER DA SILVEIRA ESTEVÃO

ESTRATÉGIAS PARA DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO
DE NANOMATERIAIS EM MATRIZES AMBIENTAIS E EM ALIMENTOS

CURITIBA

2022



PRISCILA LAGNER DA SILVEIRA ESTEVÃO

ESTRATÉGIAS PARA DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO
DE NANOMATERIAIS EM MATRIZES AMBIENTAIS E EM ALIMENTOS

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Química Analítica, no Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Noemi Nagata
Co-orientador: Prof. Dr. Frederico Luis Felipe Soares

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Estevão, Priscila Lagner da Silveira.

Estratégias para detecção, caracterização e quantificação de nanomateriais em matrizes ambientais e em alimentos. / Priscila Lagner da Silveira Estevão. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Noemi Nagata.

Coorientador: Prof. Dr. Frederico Luis Felipe.

1. Química. 2. Alimentos. 3. Nanomateriais. 4. Poluição ambiental. I. Nagata, Noemi. II. Felipe, Frederico Luis. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **PRISCILA LAGNER DA SILVEIRA ESTEVÃO** intitulada: **ESTRATÉGIAS PARA DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE NANOMATERIAIS EM MATRIZES AMBIENTAIS E EM ALIMENTOS**, sob orientação da Profa. Dra. NOEMI NAGATA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Novembro de 2022.

Assinatura Eletrônica
28/11/2022 10:09:58.0
NOEMI NAGATA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
28/11/2022 15:03:16.0
JOSÉ AUGUSTO DA COL
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
29/11/2022 10:36:54.0
CLARICE DIAS BRITTO DO AMARAL
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
28/11/2022 16:14:35.0
ALEXANDRE TADEU PAULINO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
28/11/2022 10:30:50.0
ANDREA PINTO DE OLIVEIRA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais e a todos os amigos que conquistei ao longo desta jornada, por todo apoio e motivação. Aos amigos do GAQQ, Tecnotrater e LABQAM, por tornarem esta etapa mais leve. Obrigada!

Agradeço imensamente a minha amada mãe Arlete, uma mulher guerreira e inspiradora. Está sendo difícil seguir sem você, mas levo você comigo no coração e certamente tudo que você me ensinou tornará a vida mais fácil com o tempo.

Ao meu amado marido Leandro por estar sempre por perto, me incentivando, apoiando e segurando as pontas quando eu já não era mais capaz de segurar sozinha. Obrigada por estar sempre comigo.

A minha querida orientadora Prof.^a Dr.^a Noemi Nagata, minha mãe científica, que fez meus olhos brilharem pela analítica já nos primeiros anos da graduação e que tornou minha vida acadêmica mais afetuosa e agradável. Vai ser difícil encontrar alguém a sua altura nas próximas etapas da minha vida. Muito obrigada “Profa”.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Frederico Luis Felipe Soares por toda a paciência e dedicação, por tudo que aprendi de novidade em quimiometria nos últimos anos, você é uma inspiração para mim e para todos ao seu redor. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Patricio Peralta-Zamora por ser o professor mais fofo desse programa de pós-graduação, por todo apoio e carinho durante todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Gilberto Abate pela inestimável contribuição ao longo de toda minha pós-graduação. Toda sua ajuda e aconselhamento me ajudaram a evoluir acadêmica e pessoalmente.

Às professoras Dr.^a Clarice Amaral e Dr.^a Andrea P. de Oliveira por todo o conhecimento transmitido e ajuda durante as disciplinas e orientações ao longo de meu doutorado. Obrigada ainda por se disporem a participar de meu exame de qualificação e por mais uma vez participarem desta etapa de defesa. Suas contribuições foram e serão muito valiosas.

Ao Prof. Dr. José Augusto da Col e ao Prof. Dr. Alexandre Tadeu Paulino por aceitarem participar da Banca de Defesa de Tese.

Ao CNPQ e à CAPES pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada!

“O Ego personaliza tudo pra que a gente se considere um caso especial, mas ninguém é... A verdade, é que a gente faz parte do todo, e esse todo está em constante transformação”

The Midnight Gospel

RESUMO

O uso crescente e indiscriminado de nanomateriais decorrentes da vasta aplicabilidade industrial tem desencadeado, ainda que sem intenção, a chegada desses materiais ao ambiente, surgindo assim uma nova fonte de poluição ambiental e dos recursos aquáticos comumente destinados ao consumo humano. Apesar dos efeitos associados a essa exposição serem cada vez mais conhecidos o monitoramento ambiental de nanomateriais ainda é bastante escasso, devido não só à grande dificuldade na determinação de baixas concentrações, mas também na diferenciação entre as nanopartículas de seus íons, como é o caso dos nanomateriais metálicos. Devido a sua elevada ação antimicrobiana, as nanopartículas de prata têm sido vastamente utilizadas para um grande conjunto de aplicações industriais no Brasil e no mundo, e seu aporte ambiental já vem sendo relatado por diversas entidades. Alguns estudos tem demonstrado a capacidade do processo de coagulação, empregado em estações de tratamento de águas e efluentes, na remoção desses poluentes, ainda que parcial. Com isso em vista, o presente trabalho busca avaliar a potencialidade do emprego do processo de coagulação para o estabelecimento de um novo tipo de preparo de amostra, simples e de baixo custo, visando a extração e a pré-concentração de nanomateriais a base de prata em matrizes aquosas naturais e de consumo. Após a otimização foi possível estabelecer um método empregando um agente coagulante orgânico (Tanfloc SG) para extração e pré-concentração de Ag^+ e nanomateriais a base de prata para determinação por GFAAS. Foi alcançada elevada eficiência de extração (71,4%), adequada linearidade ($r=0,99998$) e baixos limites de detecção ($10,1 \text{ ng L}^{-1}$) e quantificação ($37,7 \text{ ng L}^{-1}$) para a determinação de nanopartículas de prata a partir de amostras aquosas. Na análise de amostras reais, adequada exatidão (40-120%) foi alcançada na determinação das nanopartículas, sendo, contudo, observado um efeito de matriz que suprimiu significativamente a eficiência de extração da prata iônica das amostras analisadas. Tal supressão possivelmente decorre a partir da presença de ácido húmico, sendo que este efeito é minimizado quanto maior a dureza da matriz aquosa. De acordo com resultados preliminares seria possível ativar/desativar este efeito de matriz pela adição de ácido húmico e Ca^{2+} nas amostras reais, o que garantiria ao método proposto grande potencial de atuar não apenas na quantificação, mas também na desejável diferenciação entre a prata iônica e as nanopartículas. O TiO_2 é um aditivo alimentar comumente utilizado como corante branco em produtos de panificação, doces, balas, etc., e seu uso já vem sendo proibido em diversos países da Europa devido às crescentes evidências de toxicidade por ingestão. Estudos tem demonstrado que os riscos à saúde estão associados a distribuição nanométrica de tamanho das partículas encontradas neste pigmento, o que facilita a penetração através das membranas e o consequente dano celular. Tendo em vista a necessidade do monitoramento deste corante em alimentos, e à medida que a proibição deve se expandir para outros países, é importante estabelecer técnicas para a determinação do TiO_2 em diferentes produtos alimentícios. Assim, paralelamente ao enfoque ambiental, o presente trabalho busca avaliar o uso de métodos espectroscópicos associados à calibração multivariada para a determinação de TiO_2 em alimentos. Neste contexto, foi estabelecido um método de mapeamento via microscopia Raman associado à MCR-ALS, para quantificação deste corante em amostras alimentícias sólidas com diferentes composições, sem a necessidade de um preparo de amostra específico para cada tipo de matriz avaliada. Nas condições otimizadas foi alcançada elevada sensibilidade, baixos limites de detecção ($0,0111\% \text{ m/m}$) e quantificação ($0,0370\% \text{ m/m}$) e adequada linearidade ($r=0,9990$) pelo método proposto, que foi devidamente aplicado na análise de amostras comerciais.

Palavras-chave: Nanomateriais de Prata. Águas de consumo. GFAAS. TiO_2 . Alimentos. Microscopia Raman. MCR-ALS.

ABSTRACT

The growing and indiscriminate use of nanomaterials resulting from their wide industrial applicability has triggered, albeit unintentionally, the arrival of these compounds in the environment, thus creating a new source of environmental pollution and of aquatic resources commonly destined for human consumption. Although the effects associated with this exposure are increasingly known, environmental monitoring of nanomaterials is still quite scarce, due not only to the great difficulty in determining low concentrations, but also in differentiating between the nanoparticles of their ions, as in the case with metallic nanomaterials. Due to its high antimicrobial activity, silver nanoparticles have been widely used for a large set of industrial applications in Brazil and in the world, and their environmental contribution has already been reported by several entities. Some studies have demonstrated the ability of the coagulation process, used in water and effluent treatment plants, to remove, even if only partially, these pollutants. With this in mind, the present work seeks to evaluate the potential of the use of the coagulation process for the establishment of a new type of sample preparation, simple and low cost, aiming at the extraction and pre-concentration of silver-based nanomaterials in natural and consumption water matrices. After the optimization, it was possible to establish a method using an organic coagulating agent (Tanfloc SG) for extraction and pre-concentration of Ag^+ and silver-based nanomaterials for determination by GFAAS. High extraction efficiency (71.4%), adequate linearity ($r=0.99998$) and low detection limits (10.1 ng L^{-1}) and quantification (37.7 ng L^{-1}) were achieved for the determination of silver nanoparticles from aqueous samples. In the analysis of real samples, adequate accuracy (40-120%) was achieved in the determination of nanoparticles, however, a matrix effect was observed that significantly suppressed the efficiency of ionic silver extraction from the analyzed samples. Such suppression possibly stems from the presence of humic acid, and this effect is minimized as the greater the hardness of the aqueous matrix. According to preliminary results, it would be possible to activate/deactivate this matrix effect by adding humic acid and Ca^{2+} to the real samples, which would guarantee the proposed method great potential to act not only in quantification, but also in the desirable differentiation between ionic silver and the nanoparticles. TiO_2 is a food additive commonly used as a white coloring (E171) in bakery products, sweets, candies, etc., and its use has already been banned in several European countries due to increasing evidence of toxicity by ingestion. Studies have shown that health risks are associated with the nanometric size distribution of particles found in this pigment, which facilitates penetration through membranes and consequent cell damage. In view of the need to monitor the E171 in foods, and as the ban is expected to expand to other countries, it is important to establish techniques for the determination of TiO_2 in different food products. Thus, in parallel with the environmental focus, the present work seeks to evaluate the use of spectroscopic methods associated with multivariate calibration for the determination of TiO_2 in foods. In this context, a mapping method via Raman microscopy associated with MCR-ALS was established to quantify this food dye in solid food samples with different compositions, without the need to use a specific sample preparation for each type of matrix evaluated. Under the optimized conditions, high sensitivity, low detection limits ($0.0111\% \text{ m/m}$) and quantification ($0.0370\% \text{ m/m}$) and adequate linearity ($r=0.9990$) were achieved by the proposed method, which was properly applied in the analysis of commercial samples.

Keywords: Silver Nanomaterials. Drinking water. GFAAS. TiO_2 . Foods. Raman microscopy. MCR-ALS.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ALGUMAS ESTRUTURAS COMUNS DE NANOMATERIAIS.	27
FIGURA 2. PRINCIPAIS ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS E EFLUENTES.	36
FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DO AGENTE COAGULANTE TANFLOC.	37
FIGURA 4. PREPARO DE AMOSTRA EMPREGANDO TANFLOC SG COMO AGENTE EXTRATOR PARA A DETERMINAÇÃO DE PRATA EM AMOSTRAS AQUOSAS POR GFAAS.	47
FIGURA 5. ESPECTROS UV-VIS PARA AS RÉPLICAS DA SÍNTESE DE Ag-CITRATO NÃO DIALISADA (—) E PURIFICADAS (—) E (—).	49
FIGURA 6. ESPECTROS UV-VIS PARA AS AMOSTRAS DE Ag-CITRATO PURIFICADAS COM MEMBRANA NOVA E MEMBRANA REUTILIZADA.	50
FIGURA 7. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS POR DLS PARA AS AMOSTRAS DA RÉPLICA (A) DA SÍNTESE DE Ag-CITRATO ANTES (PRETO) E APÓS A DIÁLISE COM UMA MEMBRANA NOVA (AZUL) E UMA MEMBRANA REUTILIZADA (VERDE).	51
FIGURA 8. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR SEM PARA NP DE Ag-CITRATO APÓS A DIÁLISE COM: A) MEMBRANA NOVA, B) MEMBRANA REUTILIZADA. AMPLIAÇÃO DE 100 kX.	52
FIGURA 9. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR SEM PARA AS SÍNTESES DE Ag-CITRATO (A) PURIFICADA AMPLIADA EM 100 kX, (B) PURIFICADA AMPLIADA EM 50 kX E (C) NÃO DIALISADA (AMPLIAÇÃO DE 5 kX).	53
FIGURA 10. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR TEM PARA A AMOSTRA DE Ag-CITRATO.	54
FIGURA 11. HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DO DIÂMETRO DE PARTICULAS DE Ag-CITRATO ESTIMADO POR TEM.	54
FIGURA 12. PADRÃO SAED OBTIDOS PARA: A) AMOSTRA DE Ag-CITRATO, B) PADRÃO DE OURO.	55

FIGURA 13. ESPECTROS UV-VIS PARA AS AMOSTRAS PURIFICADAS DE Ag-PVP SINTETIZADAS.....	57
FIGURA 14. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR SEM PARA AS RÉPLICAS DA SÍNTESE DE Ag-PVP AMPLIADAS EM 100kX. A) RÉPLICA (a), B) RÉPLICA (b), C) RÉPLICA (c), D) RÉPLICA (d).....	58
FIGURA 15. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR TEM PARA A AMOSTRA DE Ag-PVP (RÉPLICA d).....	59
FIGURA 16. HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DO DIÂMETRO DE PARTICULAS DE Ag-PVP ESTIMADO POR TEM.....	60
FIGURA 17. PADRÃO SAED OBTIDO PARA A AMOSTRA DE Ag-PVP.	60
FIGURA 18. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR TEM PARA AS AMOSTRAS DE A) Ag-CITRATO 3 kX, B) Ag-CITRATO 8 kX, C) Ag-PVP 60 kX, D) HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DO DIÂMETRO DAS PARTÍCULAS DE Ag-CITRATO COMERCIAL.	61
FIGURA 19. PRINCIPAIS ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO POR COAGULAÇÃO.....	65
FIGURA 20. CRESCIMENTO DOS FLOCOS, SEDIMENTAÇÃO E ADERÊNCIA DO EXTRATO DE TANFLOC SG AO TUBO APÓS A CENTRIFUGAÇÃO.....	67
FIGURA 21. ESPECTROS UV-VIS OBTIDOS PARA EXTRATOS DE TANFLOC SG DIGERIDOS POR MICROONDAS E COM DIFERENTES TEORES DE H ₂ O ₂	71
FIGURA 22. ESPECTROS UV-Vis OBTIDOS PARA OS EXTRATOS DIGERIDOS À A) DISTÂNCIAS DE 5 E 7,5 cm DO CENTRO DO FORNO MICRO-ONDAS; B) A 7,5 cm DO CENTRO APÓS 1 E 24 h.....	73
FIGURA 23. ESTIMATIVAS DOS EFEITOS DO PLANEJAMENTO 2 ³ PARA OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO.....	75
FIGURA 24. A) CURVAS DE PIRÓLISE E B) ATOMIZAÇÃO OBTIDAS PARA Ag-CITRATO. C) SINAIS TRANSIENTES PARA Ag-CITRATO 1,00 µg L ⁻¹ EM ÁGUA ULTRAPURA E NOS EXTRATOS DIGERIDOS, OBTIDOS A	

PARTIR DE AMOSTRAS FORTIFICADAS COM 1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ ANTES DA EXTRAÇÃO EMPREGANDO AS CONDIÇÕES OTIMIZADAS.....	78
FIGURA 25. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE Ag-CITRATO POR GFAAS.....	
FIGURA 26. AVALIAÇÃO DO USO DO AGENTE MODIFICADOR Pd+Mg.	81
FIGURA 27. A) CURVAS DE Ag-CITRATO OBTIDAS POR MATRIX MATCHED E EM HNO ₃ 1% (v/v); B) COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE Ag-CITRATO EM HNO ₃ 1% (v/v) E POR MATRIX MATCHED CORRIGIDO PELO FATOR DE ENRIQUECIMENTO REAL.....	84
FIGURA 28. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CENTRIFUGAÇÃO NOS SINAIS OBTIDOS POR GFAAS PARA AS AMOSTRAS FORTIFICADAS COM Ag-CITRATO ANTES DA EXTRAÇÃO.	86
FIGURA 29. VALORES DE RECUPERAÇÃO ESTIMADOS POR GFAAS A PARTIR DOS ENSAIOS DE EXATIDÃO PARA Ag ⁺ , Ag-CITRATO E Ag-PVP EM ÁGUA MINERAL (CINZA) E EM ÁGUA DE TORNEIRA (AZUL).....	90
FIGURA 30. RESPOSTAS OBTIDAS POR ICP OES PARA AMOSTRAS FORTIFICADAS COM A) Ag ⁺ E B) Ag-PVP NA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO AH E DO Ca ²⁺ NA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DO MÉTODO.	92
FIGURA 31. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR TEM PARA A AMOSTRA BRANCO A) EXTRATO BRUTO (6 kX), B) EXTRATO DIGERIDO (6 kX).....	94
FIGURA 32. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR TEM PARA A AMOSTRA Ag-PVP A) EXTRATO BRUTO (4 kX), B) EXTRATO BRUTO (20 kX), C) EXTRATO BRUTO (40 kX), D) EXTRATO DIGERIDO (4kX), E) EXTRATO DIGERIDO (20Kx), F) EXTRATO DIGERIDO (40 kX).	95
FIGURA 33. PADRÃO SAED OBTIDO PARA AS Ag-PVP NO EXTRATO BRUTO.	96
FIGURA 34. PADRÃO SAED OBTIDO PARA A ESTRUTURA TIPO OURIÇO.	97
FIGURA 35. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR TEM PARA A AMOSTRA Ag-CITRATO A) EXTRATO BRUTO (4 kX), B) EXTRATO BRUTO (20 kX), C) EXTRATO BRUTO (40 kX), D) EXTRATO DIGERIDO (4kX), E) EXTRATO DIGERIDO (20Kx), F) EXTRATO DIGERIDO (40 kX).	97

FIGURA 36. ESQUEMA DO IMAGEAMENTO VIA HSI	103
FIGURA 37. DIMENSÕES DO MOLDE DE AÇO INOX DESENVOLVIDO PARA A CONFECÇÃO DOS COMPRIMIDOS PARA ANÁLISE VIA MAPEAMENTO RAMAN.	108
FIGURA 38. PREPARO DOS COMPRIMIDOS PARA MAPEAMENTO RAMAN.	109
FIGURA 39. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR SEM PARA A AMOSTRA DE TiO_2 ANATASE A) COM AMPLIAÇÃO DE 50,1 kX, B) 74,8 kX.	110
FIGURA 40. DIFRATOGRAMA DE RAIOS X OBTIDO PARA A AMOSTRA COMERCIAL DO CORANTE E171.	111
FIGURA 41. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR TEM PARA O CORANTE E171 COM AMPLIAÇÃO DE A) 6 kX, B) 10 kX, C)50 kX. D) DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO ($n = 500$).	112
FIGURA 42. MAPAS DE DISTRIBUIÇÃO OBTIDOS EM 143 cm^{-1} PARA OS PADRÕES DE E171 DILUÍDOS EM Al_2O_3	114
FIGURA 43. ESPECTROS MÉDIOS PARA OS PADRÕES DE TiO_2 ANATASE OBTIDOS A PARTIR DO MAPEAMENTO RAMAN.	115
FIGURA 44. ESPECTROS MÉDIOS OBTIDOS PARA OS PADRÕES FORTIFICADOS DE E171 A PARTIR DO MAPEAMENTO RAMAN. ESPECTROS BRUTOS (LINHAS CONTÍNUAS) E PRÉ-PROCESSADOS COM INTENSIDADE EM 143 cm^{-1} SUPERIOR A 1000 CONTAGENS (LINHAS PONTILHADAS).	116
FIGURA 45. NÚMERO DE CONTAGENS EM 143 cm^{-1} EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO (% m/m), OBTIDAS A PARTIR DOS ESPECTROS MÉDIOS.	117
FIGURA 46. CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS POR MCR-ALS PARA O TiO_2 PARA AS AMOSTRAS PREPARADAS EMPREGANDO A PRENSA DE IR.	119
FIGURA 47. ESPECTROS MÉDIOS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS COMERCIAIS DE SUCO EM PÓ, CHICLETE E RELAXANTE MUSCULAR.	120
FIGURA 48. A) ESPECTROS MÉDIOS E RECUPERADOS PELO MCR-ALS PARA A AMOSTRA DE SUCO DE LIMÃO E PARA O PADRÃO DE 0,05% m/m,	

DESTACANDO OS MAPAS DE DISTRIBUIÇÃO A 143 cm^{-1} E RECONSTRUÍDO A PARTIR DO MCR-ALS DA AMOSTRA REAL.....	121
FIGURA 49. MAPAS DE CONCENTRAÇÃO UNIVARIADO EXTRAÍDO A 143 cm^{-1} PARA AS AMOSTRAS BRANCO EMPREGANDO O A) MOLDE DE IR E B) OS COMPRIMIDOS OBTIDOS COM O MOLDE NOVO C) ESPECTROS OBTIDOS PARA O COMPRIMIDO BRANCO.	122
FIGURA 50. A) MAPA DE CONCENTRAÇÃO UNIVARIADO EXTRAÍDO A 143 cm^{-1} , B) ESPECTRO RECUPERADO POR MCR-ALS E C) MAPA RECONSTRUÍDO POR MCR-ALS, QUE CONTÉM TODA A FAIXA ESPECTRAL DE INTERESSE PARA O COMPRIMIDO DE $0,05\text{ \% m/m}$ DE TiO_2 OBTIDO COM O MOLDE NOVO.....	123
FIGURA 51. ESPECTROS RAMAN BRUTOS OBTIDOS NO MAPEAMENTO E MAPAS RECUPERADOS POR MCR-ALS PARA AS RÉPLICAS (A) (B) E (C) DE TiO_2 $1,00\text{ \% (m/m)}$	124
FIGURA 52. MAPAS RECONSTRUÍDOS POR MCR-ALS PARA AS AMOSTRAS DO ÓXIDO A: A) PROVA EM BRANCO, B) $1,00\text{ \% (m/m)}$ E171 MACERADO, C) $1,00\text{ \% (m/m)}$ AGITAÇÃO EM VÓRTEX; E DO ÓXIDO B: D) PROVA EM BRANCO, E) $1,00\text{ \% (m/m)}$ MACERADO, F) $1,00\text{ \% (m/m)}$ AGITAÇÃO EM VÓRTEX.....	126
FIGURA 53. ESPECTROS RAMAN MÉDIOS OBTIDOS A PARTIR DOS MAPAS COLETADOS PARA AS AMOSTRAS COMERCIAIS.	128
FIGURA 54. ESPECTROS MÉDIOS OBTIDOS A PARTIR DOS MAPAS DA AMOSTRAS COMERCIAL DE SUCO DE TANGERINA E DO PADRÃO DE $1,40\text{ \% (m/m)}$ DE E171 COM E SEM CORREÇÃO DA LINHA DE BASE POR AsLS.....	130
FIGURA 55. EVOLUÇÃO DO A) $\% \text{ LOF}$ DA PCA E DO B) $\% \text{ R}^2$ OBTIDOS POR MCR-ALS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS.	131
FIGURA 56. ESPECTROS RECUPERADOS POR MCR-ALS PARA AS 8 COMPONENTES.	132
FIGURA 57. COMPARAÇÃO ENTRE O ESPECTRO RECUPERADO PELO MCR-ALS (AZUL) E O DO PADRÃO DE E171 $1,40\text{ \% (m/m)}$ APENAS PRÉ-PROCESSADO POR AsLS.	133

FIGURA 58. CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS POR MCR-ALS PARA O TiO_2 ANATASE.	134
FIGURA 59. MAPAS DE CONCENTRAÇÃO RECUPERADOS POR MCR-ALS PELA COMPONENTE 7 (TiO_2) PARA AS AMOSTRAS REAIS.	136
FIGURA 60. MAPAS DE CONCENTRAÇÃO RECUPERADOS POR MCR-ALS PELA COMPONENTE 7 (TiO_2) PARA AS RÉPLICAS DAS AMOSTRAS A) DOCE DE LEITE E B) SOPA DE CEBOLA.....	137
FIGURA 61. TEORES ESTIMADOS POR MCR-ALS PARA AS RÉPLICAS DAS AMOSTRAS DE DOCE DE LEITE E SOPA DE CEBOLA.	138
FIGURA 62. MAPAS RECUPERADOS POR MCR-ALS PARA O SUCO EM PÓ SABOR GUARANÁ: A) PROVA BRANCO E B) FORTIFICADO COM 0,500% (m/m).138	

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CONDIÇÕES EMPREGADAS NA ANÁLISE DE Ag POR ICP OES.....	44
TABELA 2. CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO GFAAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE NP DE PRATA EMPREGANDO O AGENTE COAGULANTE TANFLOC SG.	45
TABELA 3. FATORES E NÍVEIS DO PLANEJAMENTO 2 ³ PARA A OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE POR GFAAS.....	46
TABELA 4. PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO NA DETERMINAÇÃO DE Ag POR ICP OES.....	62
TABELA 5. RECUPERAÇÕES DETERMINADAS POR ICP OES PARA OS EXTRATOS E SOBRENADANTES OBTIDOS NO PREPARO DE AMOSTRA COM TANFLOC SG.....	66
TABELA 6. RESPOSTAS OBTIDAS POR GFAAS PARA CADA NÍVEL AVALIADO NO PLANEJAMENTO 2 ³	74
TABELA 7. PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO PARA A DETERMINAÇÃO DE Ag-CITRATO POR GFAAS POR PADRONIZAÇÃO EXTERNA.....	82
TABELA 8. PRINCIPAIS PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE Ag-CITRATO POR GFAAS VIA MATRIX MATCHED.	83
TABELA 9. ENSAIOS DE EXATIDÃO ($n = 3$) E PRECISÃO INTRA E INTER-DIA PARA Ag-CITRATO, Ag-PVP E Ag ⁺ OBTIDOS COM BASE NA CURVA POR MATRIX MATCHED.....	87
TABELA 10. ENSAIOS DE EXATIDÃO ($n = 3$) PARA Ag-CITRATO, Ag-PVP e Ag ⁺ COM BASE NA CURVA DE Ag-CITRATO EM HNO ₃ 1% (v/v).....	88
TABELA 11. ENSAIOS DE EXATIDÃO ($n = 3$) E PRECISÃO PARA Ag-CITRATO, Ag-PVP E Ag ⁺ OBTIDOS COM BASE NA CURVA POR MATRIX MATCHED PARA AS AMOSTRAS DE ÁGUA DE TORNEIRA.	89
TABELA 12. PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO PARA A DETERMINAÇÃO DO CORANTE E171 VIA MAPEAMENTO RAMAN ASSOCIADO A MCR-ALS.	134

TABELA 13. TEORES DE TiO ₂ ESTIMADOS PARA AS AMOSTRAS REAIS POR MAPEAMENTO RAMAN ASSOCIADO A MCR-ALS.	135
TABELA A 1. VALORES PARA O TESTE DE GRUBBS ESTIMADOS PARA A CURVA ANALÍTICA DE Ag-CITRATO OBTIDA POR PADRONIZAÇÃO EXTERNA.	153
TABELA A 2. VALORES PARA O TESTE DE GRUBBS ESTIMADOS PARA A CURVA ANALÍTICA DE Ag-CITRATO OBTIDA POR MATRIZ MATCHED.	153
TABELA A 3. VALORES PARA O TESTE DE COCHRAN ESTIMADOS PARA A CURVA ANALÍTICA DE Ag-CITRATO OBTIDA POR PADRONIZAÇÃO EXTERNA.	154
TABELA A 4. VALORES PARA O TESTE DE COCHRAN ESTIMADOS PARA A CURVA ANALÍTICA DE Ag-CITRATO OBTIDA POR MATRIX MATCHED.	154

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Coeficiente linear
Abs	Absorbância
AFM	Microscopia de força atômica (AFM, do inglês “ <i>Atomic Force Microscopy</i> ”)
Ag-Citrato	Nanopartículas de prata recobertas com citrato
Ag-NP	Nanopartículas de prata
Ag-PVP	Nanopartículas de prata recobertas com polivinilpirrolidona
AH	Ácido Húmico
ANSES	Agência Francesa de Saúde e Segurança Alimentar, Ambiental e Ocupacional (ANSES, do francês “ <i>Agence Nationale de Sécurité Sanitaire</i> ”)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, do inglês “ <i>Association of Official Analytical Chemists</i> ”)
AsLS	Mínimos quadrados assimétricos (AsLS, do inglês “ <i>Asymmetric Least-Squares</i> ”)
b	coeficiente angular
CME	Centro de Microscopia eletrônica
DLS	Espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês “ <i>Dynamic Light Scattering</i> ”)
DPR	Desvio Padrão Relativo
E171	Nome comercial do corante alimentício dióxido de titânio
EDS	Espectroscopia de Raios X por energia dispersiva (EDS, do inglês “ <i>Energy-Dispersive X-ray</i> ”)

ENM	Nanomateriais artificiais (ENM, do inglês " <i>Engineered Nanomaterials</i> ")
ESFA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (ESFA, do inglês " <i>European Safety Food Authority</i> ")
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (FDA, do inglês " <i>Food and Drug Administration</i> ")
FE	Fator de Enriquecimento
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier, (FTIR, do inglês " <i>Fourier Transform Infrared</i> ")
GAQQ	Grupo de Análise Química e Quimiometria
GFAAS	Absorção atômica em forno de grafite (GFAAS, do inglês " <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> ")
HSI	Imageamento hiperespectral (HSI, do inglês " <i>Hyperspectral imaging</i> ")
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês " <i>Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry</i> ")
ICP OES	Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, do inglês " <i>Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry</i> ")
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IR	Espectroscopia na região do infravermelho, (IR, do inglês " <i>Infrared</i> ")
LC	Cromatografia em fase líquida (LC, do inglês " <i>Liquid Chromatography</i> ")
LLE	Extração líquido-líquido (LLE, do inglês " <i>Liquid-liquid Extraction</i> ")
LOD	Limite de Detecção (LOD, do inglês " <i>Limit of Detection</i> ")

LOF	Falta de ajuste (LOF, do inglês " <i>Lack of Fit</i> ")
LOQ	Limite de Quantificação (LOQ, do inglês " <i>Limit of Quantification</i> ")
MCR-ALS	Resolução multivariada de curvas por mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS, do inglês " <i>Multivariate Curve Resolution with Alternating Least Squares</i> ")
MON	Matéria Orgânica Natural
MS	Espectrometria de massas (MS, do inglês " <i>Mass Spectrometry</i> ")
NNM	Nanomateriais naturais (NNM, do inglês " <i>Natural Nanomaterials</i> "),
NM	Nanomateriais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pureza Analítica
PC	Ponto central
PCA	Análise de componentes principais (PCA, do inglês " <i>Principal Component Analysis</i> ")
PL	Projeto de Lei
PVP	Polivinilpirrolidona
r	Coefficiente de correlação linear
SAED	Difração de elétrons em área selecionada (SAED, do inglês " <i>Selected Area Electron Diffraction</i> ")
SEM	Microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês " <i>Scanning Electron Microscopy</i> ")
SIMPLISMA	Análise de mistura auto-modelável interativa simples de usar (SIMPLISMA, do inglês " <i>Simple-to-use Interactive Self-Modelling Mixture Analysis</i> ")

SP-ICP-MS	Espectrometria de massas de partícula única com plasma indutivamente acoplado (SP-ICP-MS, do inglês “ <i>Single Particle Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry</i> ”)
SVD	Decomposição em valores singulares (SVD, do inglês “ <i>Singular Value Decomposition</i> ”)
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM, do inglês “ <i>Transmission Electron Microscopy</i> ”)
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio (TMAH, do inglês “ <i>Tetramethylammonium Hydroxide</i> ”)
UE	União Europeia
USEPA	Agência de Proteção Ambiental Americana (US EPA, do inglês “ <i>United States Environmental Protection Agency</i> ”)
UV-Vis	Espectroscopia na região do do ultravioleta/visível
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS, do inglês “ <i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i> ”)
XRD	Difração de raios X (XRD, do inglês “ <i>X-Ray Diffraction</i> ”)

SUMÁRIO

PREFÁCIO	24
1. INTRODUÇÃO GERAL	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL	26
2.1. NANOMATERIAIS.....	26
2.1.1. TIPOS DE NANOMATERIAIS.....	26
CAPÍTULO I. ESTRATÉGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE NANOMATERIAIS A BASE DE PRATA EM MATRIZES AQUOSAS	29
I.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
I.1.1. CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E TOXICIDADE DOS ENM.....	29
I.1.2. MONITORAMENTO DE ENM EM MATRIZES AMBIENTAIS.....	32
I.2. OBJETIVOS	39
I.2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	39
I.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
I.3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
I.3.1. REAGENTES E INSUMOS.....	40
I.3.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA-CITRAT.....	40
I.3.3. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA RECOBERTAS COM POLIVINILPIRROLIDONA.....	41
I.3.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....	42
I.3.4.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	42
I.3.4.2. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL.....	43
I.3.4.3. ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO.....	43
I.3.5. DETERMINAÇÕES POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO.....	43
I.3.6. DETERMINAÇÕES POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM FORNO DE GRAFITE.....	44
I.3.6.1. AVALIAÇÃO DO USO DO AGENTE COAGULANTE TANFLOC SG NO PREPARO DE AMOSTRAS AQUOSAS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	45
I.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
I.4.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	49
I.4.1.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE Ag-CITRATO.....	49
I.4.1.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE Ag-PVP.....	56
I.4.1.3. QUANTIFICAÇÃO DOS PADRÕES DE Ag-NP POR ICP OES.....	62

I.4.2.	AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE DO USO DE AGENTES COAGULANTES NO PREPARO DE AMOSTRAS AQUOSAS PARA DETERMINAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS A BASE DE PRATA.....	62
I.4.2.1.	AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE DO COAGULANTE TANFLOC SG NO PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	63
I.4.2.1.1.	ENSAIOS PRELIMINARES POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO	63
I.4.2.1.2.	ADAPTAÇÃO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO VISANDO A ANÁLISE DOS EXTRATOS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE.....	66
I.4.2.1.3.	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM TANFLOC SG	67
I.4.2.1.4.	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DIGESTÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM TANFLOC SG	68
I.4.2.1.5.	PARÂMETROS INSTRUMENTAIS PARA AS DETERMINAÇÕES POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE.....	76
I.4.2.1.6.	AVALIAÇÃO DO USO DE AGENTE MODIFICADOR.....	81
I.4.2.1.7.	CURVA ANALÍTICA DE Ag-CITRATO POR PADRONIZAÇÃO EXTERNA	82
I.4.2.1.8.	CURVA ANALÍTICA DE Ag-CITRATO POR <i>MATRIX MATCHED</i> E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR COAGULAÇÃO	83
I.4.2.1.9.	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO MÉTODO EM AMOSTRAS AQUOSAS REAIS.....	88
I.4.2.1.10.	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PREPARO DE AMOSTRA NAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR MICROSCOPIA ELETRONICA DE TRANSMISSÃO.....	94
I.5.	CONCLUSÕES DO CAPÍTULO I	99
	CAPÍTULO II. ESTRATÉGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE TiO₂ EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS	100
II.1.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	100
II.1.1.	NANOMATERIAIS EM ALIMENTOS	100
II.2.	OBJETIVOS	105
II.2.1.	OBJETIVOS GERAIS	105
II.2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	105
II.3.	MATERIAIS E MÉTODOS	106
II.3.1.	REAGENTES E INSUMOS.....	106
II.3.2.	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	106

II.3.2.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	106
II.3.2.2. DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	106
II.3.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA DETERMINAÇÃO DE E171 EM ALIMENTOS.....	107
II.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	110
II.4.1. DETERMINAÇÃO DE E171 EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS POR ESPECTROSCOPIA ASSOCIADA À QUIMIOMETRIA	110
II.4.1.1. CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO COMERCIAL DE E171	110
II.4.1.2. AVALIAÇÃO DO EMPREGO DE ESPECTROSCOPIA RAMAN NA DETERMINAÇÃO DE TiO ₂ EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS	112
II.4.1.2.1. AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES PRELIMINARES DE PREPARO E ANÁLISE POR MAPEAMENTO RAMAN.....	113
II.4.1.2.2. PREPARO DE AMOSTRA EMPREGANDO O MOLDE DE AÇO INOX DESENVOLVIDO	122
II.4.1.2.3. AVALIAÇÃO DAS FIGURAS DE MÉRITO E DA EFICIÊNCIA DO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO DE E171 EM AMOSTRAS COMERCIAIS.....	127
II.5. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO II	140
3. CONCLUSÃO GERAL.....	143
REFERÊNCIAS	142
ANEXO 1	153
ANEXO 2.....	156

PREFÁCIO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver métodos para a determinação de nanomateriais a base de prata em matrizes aquosas naturais e de TiO_2 em amostras de alimentos.

É apresentada inicialmente uma introdução geral, seguida de uma revisão bibliográfica que trata dos principais aspectos relacionados aos nanomateriais.

Em seguida o presente trabalho foi dividido em dois capítulos para facilitar o entendimento, contendo revisão bibliográfica, materiais e métodos e os respectivos resultados e discussões pertinentes.

Capítulo I: Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados relacionados a determinação de nanopartículas de prata em amostras de água de consumo humano.

Capítulo II: Neste capítulo são apresentados os resultados referentes à determinação de TiO_2 em alimentos sólidos.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso de nanomateriais (NM) tem alcançado grandes proporções nos mais diversos ramos da indústria, de tal maneira que atualmente é possível encontrá-los tanto em produtos cotidianos, como cosméticos e embalagens, quanto em aplicações envolvendo alta tecnologia, como estruturas leves empregadas na construção de naves espaciais.

Por definição, de acordo com a União Europeia, os nanomateriais são constituídos por partículas que possuem em sua estrutura ao menos uma dimensão em escala nanométrica com tamanho inferior a 100 nm. Esse tamanho diminuto garante uma elevada área superficial e pode proporcionar características únicas, geralmente não observadas nos materiais em escala macro, principalmente em suas propriedades mecânicas, óticas e elétricas, garantindo assim uma vasta aplicabilidade industrial.

Devido à elevada produção, o aporte desses materiais no ambiente acaba sendo inevitável. Isso é preocupante, pois as mesmas características que garantem aos NM o interesse comercial os tornam potencialmente tóxicos à biota e aos seres humanos.

Atualmente, a disponibilidade de diversas técnicas de preparo de amostra, bem como de técnicas de quantificação cada vez mais sensíveis, viabilizam o monitoramento ambiental em concentrações bastante baixas, não raro atingindo limites de quantificação da ordem de ng L^{-1} para diversas classes de compostos orgânicos e inorgânicos. Contudo, o estabelecimento de rotinas para a determinação de NM com a mesma detectabilidade e adequada seletividade é ainda um enorme desafio para a química analítica moderna.

Assim, no presente trabalho tem-se como objetivo desenvolver métodos para a determinação de nanopoluentes a base de prata em matrizes ambientais (principalmente em águas naturais e de consumo) e a investigação do emprego de métodos espectroscópicos associados à calibração multivariada para a determinação de TiO_2 em alimentos.

Nanomateriais à base de prata apresentam elevado consumo em nível mundial e seu aporte ambiental já vem sendo relatado na literatura. Já o TiO_2 é comumente utilizado como corante branco, e seu uso já vem sendo proibido em países da Europa devido às crescentes evidências de toxicidade.

Os riscos à saúde estão intimamente relacionados ao fato de que parte das partículas encontradas neste pigmento estão em escala nanométrica, o que facilita a entrada nas células e o conseqüente dano celular. Tendo em vista a necessidade do monitoramento deste corante em alimentos, à medida que a proibição deve se expandir da Europa para demais países, é importante estabelecer técnicas viáveis para a detecção e quantificação do TiO_2 em diferentes produtos alimentícios.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

2.1. NANOMATERIAIS

De acordo com a União Europeia, nanomateriais são “*materiais naturais, obtidos incidentalmente, ou ainda fabricados, que contém partículas não ligadas, agregadas ou aglomeradas em que no mínimo 50% destas apresentam uma ou mais dimensões externas entre 1 e 100 nm*”. Ainda são considerados nanomateriais os “*fulerenos, os flocos de grafeno e os nanotubos de carbono de parede única com uma ou mais dimensões externas inferiores a 1 nm*” (POTOCNIK, 2011).

Por conta do tamanho diminuto, os NM tendem a apresentar propriedades físico-químicas distintas do material original (*bulk*), apresentando elevada área superficial em função de seu volume, o que pode propiciar características únicas não encontradas na escala macro, tais como, ação catalítica, propriedades magnéticas, elétricas, térmicas e mecânicas (ASSIS et al., 2012), possibilitando assim as mais diversas aplicações.

2.1.1. TIPOS DE NANOMATERIAIS

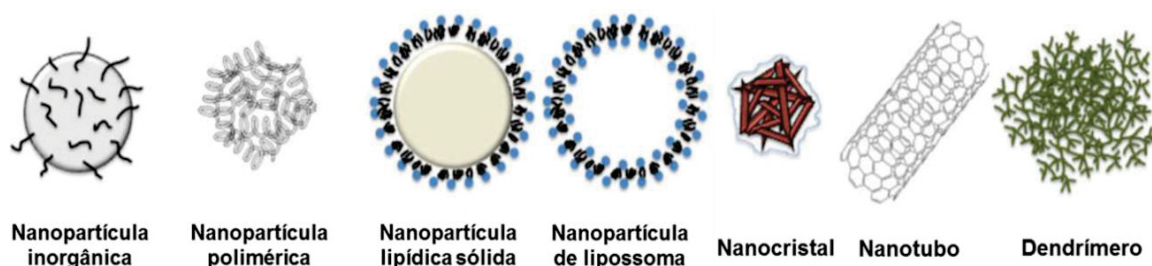
Os NM são comumente divididos entre naturais (NNM, do inglês “*Natural Nanomaterials*”), como proteínas, anticorpos, argilas e minerais; e artificiais (ENM, do inglês “*Engineered Nanomaterials*”), que são obtidos por um processo de fabricação. A obtenção dos ENM pode se dar basicamente via dois processos de manufatura: *top-down* e *bottom-up*. No primeiro, os ENM são gerados a partir de um material *bulk* que é miniaturizado até a escala nanométrica, como é o caso da esfoliação mecânica da grafita para obtenção de folhas de grafeno com espessura nanométrica. Já no *bottom-up* são sintetizados a partir de átomos ou moléculas, como no caso de nanopartículas de prata, comumente obtidas a partir de soluções de nitrato de prata na presença de uma agente redutor como o borohidreto ou até mesmo o citrato de sódio (ALAGARASI, 2011).

Além disso, os NM podem ser classificados de acordo com a quantidade de dimensões em escala nanométrica: uma dimensão (1D) como filmes finos com espessura <100 nm; duas dimensões (2D) como fios, tubos e fibras; e ainda três dimensões (3D), a exemplo das nanopartículas (NP) de carbono e fulerenos (BHATIA, 2016).

Os NM podem, ainda, serem subdivididos de acordo com sua composição e estrutura (FIGURA 1), a exemplo dos NM inorgânicos (ex.: nanopartículas metálicas como as de ouro, prata, ferro, e óxidos metálicos como o TiO_2 e ZnO); à base de carbono (ex.: nanotubos de parede única ou de múltiplas camadas, nanopartículas de carbono, fulerenos); poliméricos (ex.: dendrímeros, quitosana); nanocristais ou pontos quânticos,

que são semicondutores fluorescentes e resistentes à degradação; nanopartículas lipídicas sólidas e lipossomas, que são vesículas fosfolipídicas anfifílicas passíveis de funcionalização e encapsulamento de ativos cosméticos e farmacêuticos (ALAGARASI, 2011; BHATIA, 2016; ERENO, 2008; FARAJI; WIPF, 2009).

FIGURA 1. ALGUMAS ESTRUTURAS COMUNS DE NANOMATERIAIS.



Adaptado de Faraji e Wipf (2009).

Em virtude da variedade de estruturas e composições, que proporcionam propriedades físico-químicas singulares, o uso de ENM tem se destacado nas mais diversas áreas da indústria.

No setor de cosméticos o uso de ENM permite, por exemplo, a liberação localizada e prolongada de compostos ativos, tecnologia que pode ser utilizada em hidratantes, perfumes, pigmentos, etc. Nanopartículas metálicas como as de TiO_2 e ZnO são vastamente empregadas em protetores solares, pois absorvem a radiação ultravioleta, garantindo a proteção da pele. Além disso, possibilitam a obtenção de emulsões transparentes devido às suas dimensões nanométricas (14 nm TiO_2 e 30-200 nm ZnO) (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010) evitando, assim, a formação de uma camada esbranquiçada sobre a pele, como ocorre com os protetores convencionais, o que garante uma maior aceitação pelo mercado consumidor (ERENO, 2008).

O TiO_2 é também um dos ENM mais utilizados em tratamentos de efluentes baseados na fotodegradação de compostos orgânicos (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010). Além disso, é muito usado como corante branco em alimentos e em tintas brancas garantindo resistência e atividade biocida (KAEGI et al., 2008). Devido à vasta aplicação, estima-se que cerca de 3000 ton/ano de nanopartículas de TiO_2 (nano- TiO_2) sejam produzidas mundialmente, e sua demanda mundial, em 2018, foi de 5,6 mi de ton (CHANG, 2019; PART et al., 2015; PICCINNO et al., 2012).

Outra aplicação interessante dos ENM consiste no desenvolvimento de embalagens ditas inteligentes. Com o uso de nanopartículas é possível desenvolver embalagens de alimentos com propriedades antimicrobianas, além de obter materiais mais estáveis a

variações da umidade e temperatura ambiente, garantindo assim a preservação do alimento por mais tempo (ASSIS et al., 2012). Nanopartículas à base de prata (Ag-NP), por exemplo, possuem atividade antimicrobiana podendo ser empregados em embalagens, desodorantes, cosméticos, roupas, tintas e suprimentos hospitalares (MCGILLICUDDY et al., 2017; PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010). A infinidade de aplicações das NP de prata as torna um dos ENM mais produzidos mundialmente, sendo que, em 2020, a estimativa era de que sua comercialização poderia movimentar cerca de 1,9 bilhões de dólares, com a expectativa de que esse mercado chegue a 5,9 bilhões de dólares até 2027 (DURÁN et al., 2019; NARUNE; MOHITE; PRASAD, 2020).

Na indústria farmacêutica o uso de ENM permite, por exemplo, melhorar a solubilidade, a estabilidade e a biodisponibilidade de medicamentos (BHATIA, 2016). Além disso, ENM podem atuar como agentes transportadores de ativos até local de ação (*drug delivery*). Dendrímeros, fulerenos e lipossomas são vastamente empregados para este fim por terem estruturas facilmente modificadas para atingir um receptor específico, além de serem capazes de encapsular os ativos. Ainda, nanopartículas de ouro e prata apresentam elevada área superficial passível de funcionalização, permitindo *drug delivery* e o aprimoramento de terapias e técnicas de diagnóstico (BHATIA, 2016).

Dada a infinidade de aplicações já conhecidas dos ENM, a crescente pesquisa em busca de novos materiais e novos usos, e o elevado consumo mundial de ENM, a contaminação ambiental por este tipo de material acaba sendo inevitável.

CAPÍTULO I. ESTRATÉGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE NANOMATERIAIS A BASE DE PRATA EM MATRIZES AQUOSAS

I.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.1.1. CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E TOXICIDADE DOS ENM

Os ENM podem atingir o ambiente desde seu processo de fabricação, transporte e armazenamento até a sua vida final, atingindo o solo, a atmosfera e os ambientes aquáticos (BUNDSCHUH et al., 2018). De maneira geral, os ENM apresentam baixa solubilidade e alta estabilidade no ambiente, como consequência acabam se bioacumulando na cadeia alimentar (BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA; GOLIMOWSKI; URBAN, 2009; EDUOK et al., 2013; SCENIHR; EU, 2006).

As mesmas características que garantem aos ENM elevado interesse comercial são justamente as que os tornam perigosos aos organismos aquáticos e terrestres. A elevada área superficial, por exemplo, pode facilitar reações e processos de adsorção e lixiviação (FIORATI et al., 2020), enquanto o seu tamanho diminuto pode favorecer a absorção cutânea e a interação com as membranas celulares (DURÁN et al., 2019). Estudos de toxicidade de nanotubos de carbono demonstram que a exposição destes pode levar ao rompimento ou degeneração e consequente necrose celular (BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA; GOLIMOWSKI; URBAN 2009; KIRCHNER et al., 2005). A toxicidade destes materiais está ainda ligada à sua composição, sendo que os ENM inorgânicos podem sofrer degradação no ambiente liberando íons metálicos de alta toxicidade (BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA; GOLIMOWSKI; URBAN, 2009). A atividade microbiana conhecida das Ag-NP, por exemplo, se dá basicamente devido a lixiviação de Ag^+ , um dos íons de maior toxicidade presente em ambientes aquáticos (FIORATI et al., 2020; MCGILLICUDDY et al., 2017). Apesar da liberação em baixas concentrações, esta capacidade de liberar Ag^+ de maneira lenta e prolongada faz com que as Ag-NP sejam até mais danosas do que a exposição aguda a sais, como $AgNO_3$, em sua ação antimicrobiana, devido à sua capacidade de bioacumulação e consequente efeito de longo prazo (DONG et al., 2017; FIORATI et al., 2020; ZHANG; HU; DENG, 2016).

As principais rotas de contaminação humana por nanomateriais são via inalação, ingestão e absorção cutânea. A ingestão de nanomateriais se dá principalmente devido à água contaminada, seja por processos de tratamentos ineficientes ou mesmo pelo uso de sistemas de purificação que empregam filtros ou desinfetantes nanoparticulados (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010). Nos EUA, por exemplo, o teor de derivados de prata (prata iônica, nanomateriais, etc.) em águas de consumo pode chegar a $80 \mu g L^{-1}$

¹, apesar da Agência de Proteção Ambiental Americana (US EPA, do inglês “*United States Environmental Protection Agency*”) recomendar um limite de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para água potável (DURÁN et al., 2019). Já no Brasil, o limite total de prata permitido para água potável, estabelecido pela Conama nº 357/05, é bem mais restritivo, de apenas 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2005). Contudo, esses limites em águas de consumo são bastante altos se comparados aos níveis ambientais de Ag-NP (ng L^{-1}) (CHADHA et al., 2016; MCGILLICUDDY et al., 2017), sendo que, com a crescente poluição e os cada vez mais conhecidos riscos ambientais associados a essa contaminação, mesmo em baixas concentrações, esses níveis admitidos pela legislação em breve deverão ser atualizados pelas agências reguladoras nacionais e internacionais

Apesar do uso de Ag-NP em processos de desinfecção de água ter ganhado espaço no mercado nos últimos anos, como por exemplo no emprego em filtros de uso doméstico para obtenção de água potável, a própria Organização Mundial da Saúde (OMS) não recomenda esse tipo de aplicação, devido ao risco de contaminação por ingestão de prata. Tendo em vista que os dados toxicológicos disponíveis são ainda bastante escassos, a OMS reconhece que não é capaz, até o momento, de estabelecer um limite formal para os teores de prata e nanopartículas de prata em águas de consumo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Ainda, a ingestão de NM pode se dar pelo consumo de alimentos contendo nano-aditivos, seja pela contaminação por migração destes a partir das embalagens, ou até mesmo devido ao consumo de carne e peixes contaminados (BERGIN; WITZMANN, 2013; GUO et al., 2017; MCGILLICUDDY et al., 2017; PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010).

Apesar das concentrações de Ag-NP a nível ambiental em corpos aquáticos geralmente estarem próximas a frações de ng L^{-1} (CHADHA et al., 2016; MCGILLICUDDY et al., 2017), em um estudo relativamente recente realizado na Malásia, empregando quantificação por ICP OES, (SYAFIUDDIN et al., 2018) foram encontradas concentrações bastante elevadas de Ag-NP em rios e estações de tratamento de esgoto, que variaram entre 0,13 a 10,16 mg L^{-1} e 0,13 a 20,02 mg L^{-1} , respectivamente, evidenciando a crescente contaminação de águas superficiais decorrentes do aumento da produção e consumo, o que consequentemente eleva o risco de contaminação por ingestão de água e alimentos contaminados, além dos impactos ambientais associados.

A ingestão prolongada de Ag-NP pode desencadear uma doença rara conhecida como argíria, que em casos extremos pode levar à morte (DURÁN et al., 2019). Ainda, as Ag-NP podem se bioacumular no cérebro quando inaladas e afetar as mitocôndrias (organelas fundamentais para a respiração celular) quando absorvidas pela pele (CHEN; SCHLUESENER, 2008; PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010). Além disso, o

indiscriminado uso de Ag-NP devido a sua atividade biocida, seja na medicina ou em embalagens de alimentos, tem elevado a resistência bacteriana a antibióticos (MÜHLING et al., 2009).

Processos de tratamento de efluentes industriais ineficientes, bem como o desgaste de pinturas externas pela chuva podem favorecer o aporte de TiO_2 em ambientes aquáticos (GOTTSCHALK; NOWACK, 2011; KAEGI et al., 2008), originando uma contaminação potencial de águas para consumo humano. O TiO_2 é vastamente utilizado na indústria alimentícia, empregado, por exemplo, como clareador em doces e balas (BERGIN; WITZMANN, 2013; GUO et al., 2017). Isso é preocupante, pois a ingestão de TiO_2 a longo prazo pode levar à redução na absorção de nutrientes como ferro, zinco e ácidos graxos pelo intestino delgado (GUO et al., 2017). Ademais, a ingestão de nano- TiO_2 por peixes pode provocar erosão do epitélio intestinal, e a exposição prolongada pode afetar o funcionamento das brânquias, além da possibilidade de bioacumulação (FEDERICI; SHAW; HANDY, 2007).

Na Europa e nos EUA o lodo gerado em estações de tratamento de águas e efluentes pode ser encaminhado para aterro ou ainda ser aplicado como adubo na agricultura. Em ambos os casos o lodo eventualmente contaminado com nanomateriais pode transferir estes contaminantes não apenas para os alimentos cultivados, mas também para os sistemas aquáticos (BLASER et al., 2008; MCGILLICUDDY et al., 2017). Estima-se que 36% da contaminação ambiental por TiO_2 , por exemplo, seja proveniente deste tipo de prática (BUNDSCHUH et al., 2018).

Apesar da toxicidade dos ENM ao ambiente, a legislação ainda é bastante escassa. Atualmente, agências reguladoras internacionais como a US EPA, a organização internacional de padronização (ISO, do inglês "*International Organization for Standardization*") e a união europeia (EU, do inglês "*Europe Union*") vêm impondo regras para que os fabricantes garantam a segurança dos ENM para os seres humanos e para o ambiente. Contudo, ainda não existem normas que estipulem limites destes compostos em matrizes ambientais, especialmente devido às dificuldades associadas à detecção e quantificação nos níveis ambientais e à avaliação da toxicidade (HJORTH et al., 2017).

De acordo com a Comissão Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2012), apesar da disponibilidade de estudos na literatura sobre a determinação de ENM no ambiente, são poucos os que apresentam validação adequada (BUNDSCHUH et al., 2018). Tiwari et al. (2015) desenvolveram uma metodologia para a extração de NTC, nitretos de boro, grafeno, e nanofios de ZnO de amostras aquosas empregando óleo semi-sintético de hidrocarbonetos. As amostras foram caracterizadas via espectroscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês "*Scanning Electron Microscopy*") e,

apesar dos autores não demonstrarem nenhuma análise quantitativa, afirmam que a remoção dos analitos foi muito próxima de 100%.

Assim, considerando os efeitos adversos à biota e aos seres humanos, e a baixa abrangência da legislação ambiental, é essencial estabelecer rotinas validadas que permitam monitorar nanopoluentes no ambiente.

1.1.2. MONITORAMENTO DE ENM EM MATRIZES AMBIENTAIS

Apesar da vasta aplicabilidade dos ENM os estudos sobre a determinação em matrizes ambientais são ainda bastante escassos (GOTTSCHALK; NOWACK, 2011; PART et al., 2015; PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010; SALEH, 2020; JIANG et al., 2022). Isso se deve especialmente a diversas dificuldades enfrentadas no processo de quantificação. A heterogeneidade das amostras ambientais, por exemplo, pode tornar a amostragem a principal fonte de erro (FERRARI et al., 2006; PART et al., 2015).

Os NM raramente são encontrados livres no ambiente, podendo se aglomerar dependendo de suas propriedades como tamanho, concentração e composição, e das condições de pH, força iônica e teor de matéria orgânica do meio (BUNDSCHUH et al., 2018; FIORATI et al., 2020; GOTTSCHALK; NOWACK, 2011; MCGILLICUDDY et al., 2017; SELCK et al., 2016). Recobrimentos orgânicos que conferem maior impedimento estérico, como a polivinilpirrolidona, por exemplo, tendem a aumentar a estabilidade e minimizar a agregação e a coalescência das partículas. Ainda, no caso de NP metálicas, a dissolução de íons é desfavorecida com recobrimentos mais estáveis, e favorecida para partículas menores e em baixas concentrações (MCGILLICUDDY et al., 2017). Adicionalmente, elevados valores de pH desfavorecem a dissolução de NP de prata, por exemplo (ZHANG; HU; DENG, 2016), e a presença de matéria orgânica pode inibir a agregação (MCGILLICUDDY et al., 2017; YIN et al., 2015). Tais alterações afetam significativamente a toxicidade dos ENM e, portanto, o conhecimento do estado de agregação dos analitos nas matrizes de interesse é mais um obstáculo a ser contornado na determinação dos ENM (CHADHA et al., 2016).

Além disso, o preparo de amostra adequado é primordial para garantir a caracterização e quantificação eficiente. Esta etapa deve permitir a remoção de interferentes, o isolamento da matriz, bem como, atingir um elevado fator de enriquecimento (FE), dada as baixas concentrações dos ENM no ambiente (ng m^{-3} até pg m^{-3} no ar, e no caso das matrizes aquosas de $\mu\text{g L}^{-1}$ até ng L^{-1}) (CHADHA et al., 2016; MCGILLICUDDY et al., 2017).

Assim, além das análises quantitativas a avaliação da composição, estrutura, estado de agregação e estabilidade dos agregados nas matrizes ambientais se faz necessária. Tais informações podem ser obtidas por associação de técnicas instrumentais, tais como:

microscopias eletrônica de varredura (SEM), transmissão (TEM, do inglês “*Transmission Electron Microscopy*”) e de força atômica (AFM, do inglês “*Atomic Force Microscopy*”), eletroforese capilar, espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês “*Dynamic Light Scattering*”) e técnicas espectroscópicas como a de raios X por energia dispersiva (EDS, do inglês “*Energy-Dispersive X-ray*”), a difração de elétrons em área selecionada (SAED, do inglês “*Selected Area Electron Diffraction*”), a de fotoelétrons excitados por raios X (XPS, do inglês “*X-ray Photoelectron Spectroscopy*”), bem como, via espectroscopia na região do infravermelho, (FTIR, do inglês “*Fourier Transform Infrared*”), do ultravioleta/visível (UV-Vis), de fluorescência molecular, e Raman (BODDOLLA; THODETI, 2018; CHADHA et al., 2016; DENDISOVÁ et al., 2018; EDUOK et al., 2013; TAGG et al., 2015).

A técnica de DLS é baseada no espalhamento Rayleigh, um espalhamento inelástico decorrente da interação entre a radiação com partículas/moléculas cujo tamanho é relativamente menor que o comprimento de onda incidente (<250 nm) (KIM et al., 2014; ZHANG, 2009). As variações da intensidade de um laser incidente, coerente e monocromático, em função do tempo permitem estimar a velocidade do movimento Browniano, intimamente associada ao tamanho hidrodinâmico das partículas, que se movem mais lentamente quanto maior o seu tamanho (INGHAM, 2015). Assumindo que as partículas são esféricas é possível estimar o raio hidrodinâmico com base na equação de Stokes-Einstein (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016). Assim, a técnica permite determinar o diâmetro de NM dispersos em um líquido, além de permitir avaliar o tamanho de agregados e de moléculas de elevada massa molecular (RÓZ et al., 2015; ZHANG, 2009). O tamanho estimado inclui, além da camada de hidratação, a solvatação por surfactantes e o recobrimento por agentes passivantes (INGHAM, 2015). Assim, o DLS é bastante útil para o estudo da estabilidade de NP em solução, permitindo investigar a agregação em função do tempo, bem como o efeito de variações do pH, da força iônica e da matéria orgânica natural no meio (KIM et al., 2014). Tais qualidades são importantes na análise do comportamento de NP em amostras aquosas naturais, por exemplo. Contudo, a baixa sensibilidade da técnica (mg L^{-1}) é uma limitação, uma vez que os níveis ambientais são da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ (ZHANG, 2009).

A espectrometria na região do ultravioleta/visível (UV-Vis) é interessante para a quantificação de NP metálicas como as de ouro e prata, graças à ressonância de plásmom de superfície, que ocorre devido à oscilação coletiva de elétrons livres promovida pela interação com a radiação, o que garante a absorção das dispersões aquosas na região do visível (LÓPEZ-LORENTE; SIMONET; VALCÁRCEL, 2011; OTUBO, 2005; ZUBER et al., 2016). Ainda, a agregação de NP pode provocar alterações na posição e na intensidade da banda dos espectros UV-Vis (CHADHA et al., 2016) o que pode ser interessante do

ponto de vista da quantificação de aglomerados. Contudo a técnica apresenta baixa sensibilidade, o que dificulta seu emprego na análise ambiental.

Dentre as técnicas de preparo de amostras aquosas para a determinação de ENM algumas merecem destaque como a extração líquido-líquido (LLE, do inglês “*Liquid-liquid Extraction*”), precipitação seletiva por tamanho, ultrafiltração por membrana, diálise (remoção de sais e pequenas moléculas), ultracentrifugação e centrifugação por fluxo gradiente (pré-fractionamento de acordo com a massa molar) e a extração em ponto nuvem (CHADHA et al., 2016; GONDIKAS et al., 2018; GOTTSCHALK; NOWACK, 2011; MCGILLICUDDY et al., 2017; PART et al., 2015; PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010). Vale ressaltar que a ultrafiltração pode levar a uma remoção indevida de NM devido à formação da torta de filtração, que acaba por reduzir o tamanho efetivo dos poros (BOLEA; LABORDA; CASTILLO, 2010; PART et al., 2015).

Dentre as técnicas comumente utilizadas na caracterização dos NM algumas se apresentam mais adequadas para a quantificação, como as técnicas cromatográficas a líquido (LC, do inglês “*Liquid Chromatography*”) ou a gás (GC, do inglês “*Gas Chromatography*”), que podem ser acopladas a diversos sistemas de detecção como massas (MS, do inglês “*Mass Spectrometry*”), UV-Vis e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês “*Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*”) (PART et al., 2015). Ainda, técnicas espectroscópicas como UV-Vis, FTIR, fluorescência molecular e Raman tem grande potencial para a quantificação de ENM no ambiente, dada as singulares propriedades óticas desses materiais (CHADHA et al., 2016; PART et al., 2015; PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010).

Técnicas elemento seletivas, baseadas em absorção e/ou emissão atômica como o ICP OES (do inglês “*Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry*”) e a absorção atômica em forno de grafite (GFAAS, do inglês “*Graphite Furnace Atomic Absorption*”), são poderosas ferramentas para a quantificação e determinação da composição elementar de nanopartículas em diferentes matrizes. No caso de amostras sólidas é comum a obtenção de um lixiviado aquoso para triagem de frações solúveis (PART et al., 2015).

As técnicas de plasma como o ICP apresentam adequada precisão e ampla faixa linear, e tem sido empregada na determinação de NM, especialmente quando associada à detecção por OES (BOLYARD; REINHART; SANTRA, 2013; MUDUNKOTUWA et al., 2016). Quando necessária uma detectabilidade mais rigorosa, a detecção por MS se mostra mais adequada (KHOSRAVI et al., 2012; VEJERANO et al., 2014). Ainda, vale destacar a detecção por MS associada à técnica de *single particle* (SP-ICP-MS), que possibilita a diferenciação das NP dos seus íons dissolvidos (MCGILLICUDDY et al., 2017; MOZHAYEVA; ENGELHARD, 2020; WITZLER; KÜLLMER; GÜNTHER, 2018).

A SP-ICP-MS tem sido utilizada com sucesso na determinação de diversos NM, nas mais diferentes matrizes, abrangendo análises desde biológicas a ambientais (MEERMANN; LABORDA, 2015; MONTAÑO et al., 2016; MOZHAYEVA; ENGELHARD, 2020; WITZLER; KÜLLMER; GÜNTHER, 2018). Este tipo de determinação possibilita atingir limites de quantificação bastante baixos ($< \text{ng L}^{-1}$), além de garantir a diferenciação de materiais particulados inferiores a 20 nm da matéria dissolvida na amostra (MCGILLICUDDY et al., 2017), o que a torna potencialmente a mais poderosa ferramenta na determinação de NM disponível atualmente. A técnica garante a aquisição do espectro de massas de apenas uma partícula por vez, o que exige que as amostras estejam em concentrações altamente diluídas. Como a quantidade de íons gerados a partir de uma única partícula é diminuta, o analisador necessita de um tempo de integração bastante curto em comparação aos analisadores de massa convencionalmente empregados para análise por ICP-MS. Com isso, o custo de aquisição acaba sendo bastante elevado o que ainda limita a disseminação da técnica no Brasil e no mundo.

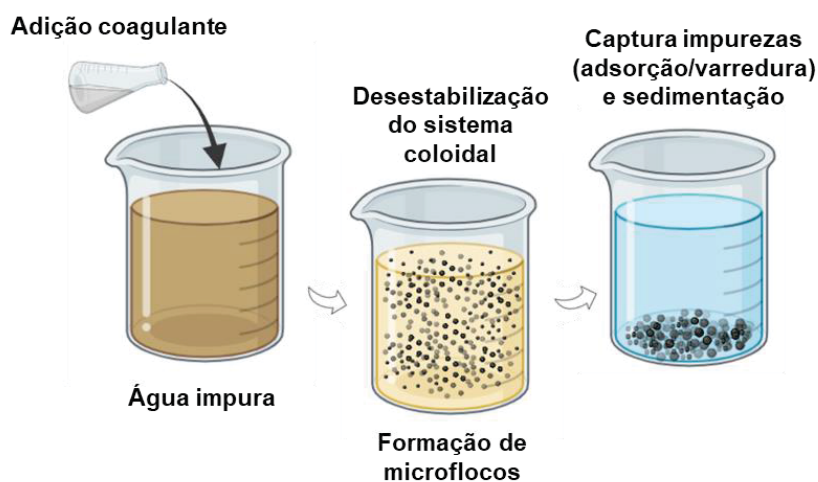
A GFAAS é uma técnica de determinação elementar por espectroscopia de absorção atômica bastante sensível, que emprega um tubo de grafite para promover o aquecimento da amostra. Devido às propriedades térmicas inerentes ao grafite, é possível realizar o aquecimento da amostra de forma bem controlada. As etapas de aquecimento do tubo garantem a secagem da amostra, em temperaturas mais brandas, seguida da pirólise, em temperatura intermediária, que permite a remoção dos concomitantes da matriz. Após a pirólise vem a etapa de atomização, que ocorre em temperaturas elevadas, capazes de vaporizar, atomizar e ionizar o analito, etapa esta em que o sinal analítico é coletado. Após a atomização é empregada uma temperatura alta o suficiente para a remoção de qualquer elemento residual, garantindo a limpeza do tubo e evitando o efeito de memória. A técnica apresenta elevada sensibilidade (poucos $\mu\text{g L}^{-1}$), além de permitir a análise de suspensões, o que muitas vezes é inviável por técnicas de ICP devido às dificuldades encontradas, especialmente na etapa de nebulização. Ainda, exige pequenos volumes de amostra, tipicamente entre 5 e 100 μL , o que pode ser muito interessante do ponto de vista do desenvolvimento de métodos de microextração e de pré-concentração, nos quais os volumes finais das amostras são tipicamente diminutos (na ordem de μL). Contudo, a técnica convencionalmente não permite a desejável diferenciação entre íons e nanopartículas metálicas, assim como a maioria das demais ferramentas analíticas disponíveis atualmente, de maneira que o estabelecimento de um preparo de amostra que permitisse alcançar esse objetivo seria de grande valia para a química analítica moderna.

Diversos estudos têm demonstrado a eficiência do processo de coagulação na remoção de nanomateriais de Ag e TiO_2 durante o tratamento de águas naturais e residuais (CHOI et al., 2017; DONOVAN et al., 2016, 2018; HONDA et al., 2014; SUN et al., 2013;

WEINBERG; GALYEAN; LEOPOLD, 2011). Assim, tem potencial em ser utilizado no processo de extração e pré-concentração de NM no estabelecimento de metodologias analíticas, auxiliando as determinações por técnicas instrumentais com baixa sensibilidade.

A coagulação é um processo físico-químico e é parte integrante da maioria dos sistemas de tratamento de águas, sendo comumente empregada na remoção de matéria orgânica e de material particulado finamente distribuído. Este processo além de utilizar agentes coagulantes de baixo custo e fácil aquisição envolve etapas bastante simples, conforme o esquema simplificado apresentado na Figura 2.

FIGURA 2. PRINCIPAIS ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS E EFLUENTES.



Criado com Biorender

Inicialmente é realizada a adição do agente coagulante nas concentrações ideais ao tipo de efluente a receber o tratamento. Em seguida o ajuste do pH promove a desestabilização do sistema coloidal, neutralizando as forças eletrostáticas de repulsão, que mantém as partículas em suspensão. As partículas desestabilizadas passam a colidir umas com as outras levando assim à formação de pequenos agregados, também chamados de microflocos, cujo tamanho varia entre 20 e 50 μm (CIABATTIA et al., 2009). A aglomeração dos microflocos leva a formação de agregados visivelmente maiores, que tendem a se separar facilmente da água, geralmente por sedimentação ou flutuação, processo este conhecido como floculação.

Os flocos/microflocos podem então interagir e capturar as impurezas do resíduo em tratamento por diferentes mecanismos, tais como a adsorção e a varredura, na qual as impurezas são arrastadas pelos flocos durante a precipitação. Após a coagulação/floculação, os flocos podem ser fisicamente separados do efluente por sedimentação, filtração ou flotação, a depender das características do agente coagulante

e do tipo de sistema mais viável à estação de tratamento de águas e efluentes, que dará então ao resíduo sólido obtido a destinação adequada.

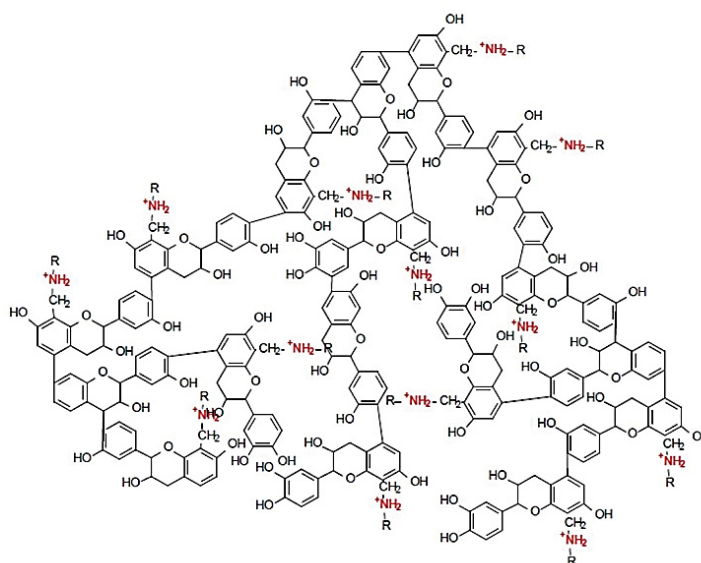
Diversos são os tipos de agentes coagulantes disponíveis comercialmente, sendo os inorgânicos à base de sais de ferro e alumínio, como o FeCl_3 e o $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, os mais comumente utilizados. Ainda, existem os coagulantes orgânicos que são obtidos a partir de recursos naturais, a exemplo dos biopolímeros do tipo taninos, pectinas e ligninas. Estes agentes permitem uma destinação mais sustentável dos resíduos gerados na coagulação, uma vez que podem ser incinerados para produção de energia ou ainda empregados na produção de fertilizantes para solos (MANGRICH et al., 2014), enquanto que o lodo obtido com o emprego de coagulantes inorgânicos muitas vezes acaba sendo destinado a aterros sanitários.

Apesar da variedade de técnicas analíticas disponíveis para a análise de NM, o monitoramento ambiental de NM ainda é bastante escasso no Brasil e no mundo, de maneira que o estabelecimento de métodos simples e economicamente acessíveis para este fim é essencial.

Com isso em vista, buscou-se neste trabalho investigar a potencialidade do uso de agentes coagulantes no estabelecimento de um novo tipo de preparo de amostras para a determinação de NM em águas naturais e de consumo, visando alcançar um procedimento simples, rápido e de baixo custo.

O Tanfloc SG é um polímero orgânico catiônico de baixo peso molecular obtido a partir da acácia negra, e sua estrutura está apresentada na Figura 3.

FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DO AGENTE COAGULANTE TANFLOC.



Este composto é empregado como agente coagulante de amplo espectro no tratamento de águas para abastecimento e de efluentes industriais, atuando em sistemas coloidais de maneira a neutralizar as cargas e formar pontes entre as partículas, desestabilizando o sistema coloidal e, assim, levando à formação de microflocos e subsequente sedimentação (MANGRICH et al., 2014; TANAC, [s.d.]).

O Tanfloc SG tem grande potencial no estabelecimento de um preparo de amostra para a determinação de NM em amostras aquosas, especialmente pela possibilidade de remoção dos concomitantes da matriz, após o processo de extração, por meio da introdução de uma etapa de digestão da matéria orgânica dos extratos, o que possibilitaria a obtenção de uma amostra compatível para análise por GFAAS.

Com o uso do Tanfloc como agente extrator a expectativa é de se alcançar uma elevada eficiência de extração, uma vez que a formação *in situ* da fase extratora garantiria uma elevada área de contato com os analitos, o que pode vir a favorecer sua remoção seja por adsorção ou por varredura.

Por seu crescente uso comercial e facilidade em aquisição e síntese os NM à base de prata foram selecionados como compostos modelo para a elaboração deste estudo, buscando possibilitar seu monitoramento em águas de consumo humano por meio de determinações por GFAAS.

I.2. OBJETIVOS

I.2.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objetivo estabelecer rotinas simples e preferencialmente de baixo custo para a extração e pré-concentração de nanomateriais artificiais a base de prata em matrizes ambientais, principalmente em águas naturais e para consumo. Neste contexto, visa-se avaliar a potencialidade do emprego de agentes coagulantes, comumente utilizados em processos de tratamento de águas e efluentes, como agentes extratores no desenvolvimento de um novo tipo de preparo das amostras visando a extração e pré-concentração de Ag-NP. A determinação dos analitos será realizada por GFAAS e ICP OES, respeitando sempre as características de cada técnica.

I.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Meta 1: Aquisição de nanomateriais comerciais bem como síntese, purificação e caracterização de nanomateriais a base de prata, para serem empregados como padrões nas etapas de desenvolvimento de método de preparo de amostra visando análise de amostras aquosas naturais.

Meta 2: Estudos preliminares objetivando avaliar a potencialidade das técnicas microscópicas e espectroscópicas para detecção e caracterização dos nanomateriais propostos no estudo.

Meta 3: Estabelecimento de protocolos de detecção, caracterização e quantificação dos nanomateriais pelas técnicas selecionadas.

Meta 4: Investigar a potencialidade do uso de agentes coagulantes no estabelecimento de um preparo de amostras para a determinação de NM à base de prata por GFAAS.

Meta 5: Validação e aplicação do método de extração/separação de nanomateriais de prata em matrizes aquosas reais.

I.3. MATERIAIS E MÉTODOS

I.3.1. REAGENTES E INSUMOS

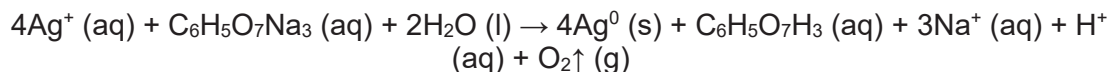
Nanopartículas de prata com diferentes recobrimentos foram preparadas a partir de soluções de AgNO_3 (PA) em água ultrapura, utilizando métodos descritos pela literatura (ŠILEIKAITE et al., 2009; ZHAO et al., 2018). Foram ainda utilizados padrões comerciais de Ag-NP recobertas com citrato (dispersão aquosa, $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ em HNO_3 2% (v/v), 50 nm, Sigma Aldrich), e uma solução padrão de Ag^+ ($998 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$ solução padrão para ICP, TraceCert®, Sigma Aldrich). As soluções trabalho de Ag^+ e Ag-NP empregadas na otimização e validação do procedimento de extração foram preferencialmente preparadas utilizando materiais de polipropileno, a fim de minimizar perdas por adsorção observada em materiais de vidro.

A água ultrapura foi obtida em um sistema de purificação Millipore-Simplicity UV, Bedford, MA, USA ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Os demais reagentes eventualmente necessários (ácidos, bases, sais e solventes) foram de grau analítico PA.

Todos os materiais e vidrarias foram previamente calibrados e descontaminados em banho de extran 5% (v/v) por 24 h, devidamente enxaguados 10 vezes com água destilada e deionizada, seguido de banho em ácido nítrico 10% (v/v) por 24 h e enxague com água destilada e ultrapura por 10 vezes cada.

I.3.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA-CITRATO

Dispersões aquosas de nanopartículas de prata recobertas com citrato (Ag-Citrato) foram obtidas por redução com citrato de sódio (ŠILEIKAITE et al., 2009) empregando reagentes com pureza analítica e soluções aquosas preparadas em água ultrapura, a fim de obter dispersões a serem empregadas como padrões para a otimização de um procedimento de extração a partir de amostras aquosas naturais e de consumo. As sínteses foram realizadas em duplicata, sendo que $0,500 \text{ L}$ de uma solução aquosa $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AgNO_3 foram aquecidos em um béquer de 600 mL tampado com vidro de relógio até ebulição em placa de aquecimento, seguida da adição gota a gota (cerca de 3 gotas por segundo utilizando uma seringa adaptada com torneira) de $5,00 \text{ mL}$ de uma solução de citrato de sódio 1% (m/v), mantendo agitação vigorosa. O meio foi mantido sob aquecimento e agitação por 2 h. Posteriormente, retirou-se a fonte de calor e manteve-se a agitação até atingir a temperatura ambiente, obtendo-se uma dispersão leitosa indicando o fim da reação. A reação pode ser descrita conforme a equação abaixo e o mecanismo está disponível em Šileikaite et al (2006).

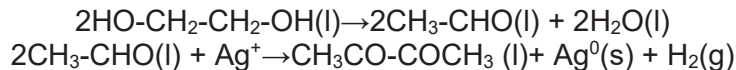


A fim de remover íons Ag^+ residuais não consumidos na reação e demais subprodutos de maneira a garantir a presença apenas das nanopartículas de Ag-Citrato nas amostras sintetizadas, as dispersões foram dialisadas em água ultrapura por 24 h em tubo de acetato de celulose de 3,5 kDa e 22 mm (SnakeSkin, Thermo Scientific), previamente lavadas com água destilada e ultrapura por 10 vezes. A água da diálise foi trocada após 6 h e 12 h.

As amostras, antes e após a diálise, foram caracterizadas e armazenadas em frascos de vidro âmbar à temperatura ambiente e ao abrigo de luz e calor.

I.3.3. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA RECOBERTAS COM POLIVINILPIRROLIDONA

Nanopartículas de prata passivadas com polivinilpirrolidona (PVP) com massa molar média de 40 kDa (Sigma-Aldrich) foram sintetizadas pelo método poli-ol de acordo com o proposto por Zhao et al. (2018), no qual o etilenoglicol atua como solvente e agente redutor conforme as reações:



As sínteses foram realizadas em triplicata (réplicas (a), (b) e (c)). Para tanto, 0,6 g de PVP e 100 mg de AgNO_3 foram dissolvidos sob agitação a temperatura ambiente em 40,0 mL de etilenoglicol em um balão de fundo redondo, seguido de aquecimento a 160 °C e mantido sob agitação em sistema semi-aberto por 1,5 h em manta de aquecimento. Após este período, as dispersões foram mantidas sob agitação até atingirem a temperatura ambiente, sendo então purificadas por lavagens sucessivas da fase decantada com acetona, etanol e água ultrapura, nesta ordem. Primeiramente a síntese bruta foi transferida para tubo Falcon de polipropileno de 50 mL e centrifugada por 20 min a 5000 rpm em centrífuga Fanem (modelo Excelsa II 206 MP), e o sobrenadante foi descartado. Em seguida foram adicionados 40,0 mL de acetona seguido de agitação em vortex Capp (modelo CRV-45X) até completa ressuspensão do precipitado, e centrifugado novamente por 5 min a 5000 rpm, descartando-se o sobrenadante. Este procedimento foi realizado duas vezes com cada solvente, e por fim as nanopartículas foram redispersas em água ultrapura e armazenadas em frascos de vidro âmbar à temperatura ambiente.

Uma quarta replicata (réplica (d)) foi preparada empregando o dobro das quantidades de reagentes indicadas pela literatura, mantendo-se o volume final de 40 mL, a fim de obter um produto final mais concentrado, e seguindo com a purificação da mesma forma descrita

anteriormente. Todas os padrões obtidos foram devidamente caracterizadas após a purificação.

I.3.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

A caracterização das amostras de Ag-citrato e Ag-PVP sintetizadas foi realizada por UV-Vis, DLS, SEM-EDS e TEM-SAED.

I.3.4.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A morfologia das partículas das dispersões de Ag-Citrato e Ag-PVP, foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM).

As análises por SEM-EDS foram realizadas no equipamento SEM VEGA3 LMU (Tescan), disponível no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR. As amostras em pó foram diretamente colocadas sob a fita (de Cu ou C), já as dispersões de Ag-Citrato e Ag-PVP foram gotejadas (10 μ L) sob a fita de Cu, cuja cola foi previamente removida com acetona PA, e deixadas em dessecador para completa secagem por no mínimo 24 h.

As análises de TEM-SAED foram realizadas em equipamento JEOL JEM 1200EX-II, também disponível no CME da UFPR. Foram preparadas dispersões diluídas a partir dos padrões de Ag-Citrato e Ag-PVP em água ultrapura. Em seguida, 10 μ L foram gotejados sob o *grid* de cobre, que foi então armazenado em recipiente fechado e em temperatura ambiente por 24 h até completa secagem e a realização das análises.

A TEM-SAED também foi empregada para avaliação do efeito do preparo de amostra (empregando o Tanfloc SG) sob as nanopartículas de prata. Os extratos foram obtidos nas condições otimizadas de extração e digestão, a partir de amostras fortificadas com Ag-PVP e Ag-Citrato antes da realização da extração. Foram então analisados os extratos obtidos antes e depois da digestão da amostra, sendo realizadas diluições quando necessário. Os extratos foram então gotejados sobre o grid de cobre e armazenados em vácuo até a completa secagem para posterior análise por TEM. Para fins de comparação, foram analisados os extratos obtidos a partir de uma amostra branco, sem fortificação, nas mesmas condições anteriormente descritas.

I.3.4.2. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

As análises por espectroscopia UV-Vis foram realizadas no laboratório do Grupo de Análise Química e Quimiometria (GAQQ) em espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio, com varredura em velocidade média (600 nm min^{-1}), resolução de 1 nm e faixa espectral de 200 a 800 nm. Utilizou-se cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm, para análise qualitativa das dispersões de Ag-NP sintetizadas.

Ensaio preliminares visando a otimização do método de digestão dos extratos obtidos no preparo de amostra por coagulação, empregando o Tanfloc SG também foram realizados por UV-Vis. As condições avaliadas visavam a obtenção de um extrato límpido, sem a presença de coágulos residuais, de maneira a garantir a adequada coleta pelo amostrador automático nas análises posteriores por GFAAS, evitando assim problemas como o entupimento do injetor e a baixa repetibilidade das análises. Foram avaliados parâmetros como a concentração de HNO_3 e H_2O_2 , o tempo de exposição à radiação micro-ondas, a distância dos tubos com relação ao centro do equipamento e a estabilidade dos extratos. Devido ao volume final diminuto obtido nas condições avaliadas, foi utilizada uma cubeta de vidro de 0,5 cm de caminho ótico para garantir a análise das amostras sem a necessidade de diluição.

I.3.4.3. ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

As análises das dispersões de Ag-Citrato e Ag-PVP por DLS foram realizadas em equipamento Nanotracs 150 (Microtracs), equipado com laser vermelho, sendo utilizada água ultrapura como branco de espalhamento. O equipamento foi disponibilizado pelo Professor Dr. Aldo Zarbin no Grupo de Química de Materiais da UFPR. As amostras foram analisadas ao final de cada uma das etapas de obtenção das NP (síntese e processos de diálise) realizando-se diluições quando necessário.

I.3.5. DETERMINAÇÕES POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO

As determinações do teor de prata nas amostras de Ag-PVP e Ag-Citrato sintetizadas foram realizadas por ICP OES, em equipamento Thermo Scientific modelo ICAP 6000, no laboratório de Análises Ambientais do Departamento de Química da UFPR, cedido pelo Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi. Foram avaliadas curvas analíticas ($n = 3$) em HNO_3 1% (v/v) em sete níveis de concentração ($0,50$ a $100 \mu\text{g L}^{-1}$) preparados a partir da diluição de uma solução padrão de Ag(I) 998 mg L^{-1} (padrão para ICP, TraceCert, Sigma Aldrich). As

condições empregadas nas análises foram otimizadas a partir de dados da literatura (ANEKTHIRAKUN; IMYIM, 2019), e estão apresentadas na Tabela 1. As amostras purificadas foram devidamente diluídas e analisadas nas mesmas condições que os padrões de Ag(I).

TABELA 1. CONDIÇÕES EMPREGADAS NA ANÁLISE DE Ag POR ICP OES.

Parâmetro	Valor
Potência RF (W)	1150
Vazão do Ar principal (L min ⁻¹)	12
Vazão do Ar auxiliar (L min ⁻¹)	0,5
Câmara de nebulização	Ciclônica
Vazão do Ar de nebulização (L min ⁻¹)	0,7
Visão plasma	Axial
Nebulizador	Concêntrico Meinhard ®
Velocidade de amostragem (rpm)	50
Leituras por replicatas	2
Replicatas	3
Sistema óptico	Policromador Littrow, rede de difração Echelle
Linha analítica monitorada Ag (nm)	(I) 328,068

I.3.6. DETERMINAÇÕES POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM FORNO DE GRAFITE

As determinações por GFAAS foram realizadas em equipamento Shimadzu modelo AA-6800, equipado com corretor de fundo com lâmpada de deutério, com modo de aquecimento longitudinal do atomizador. Foi utilizada uma lâmpada de cátodo oco de Ag (λ : 328,1 nm, Analítica), aplicando-se uma corrente de 4 mA, e empregando um programa de aquecimento otimizado com base na literatura (SONGSILAWAT; SHIOWATANA; SIRIPINYANOND, 2011). Para as análises foram utilizados tubos de grafite pirolítico tratado termicamente (Part nº 206-50588-11, Shimadzu).

Foram analisados 20 μ L por amostra, sendo cada amostra injetada pelo menos duas vezes, até que fosse atingido um DPR <10%. As condições de operação empregadas para a determinação de prata empregando o agente coagulante Tanfloc SG foram avaliadas empregando-se os extratos obtidos após a extração e digestão, sendo otimizadas as condições de secagem por meio de testes preliminares buscando evitar a formação de respingos durante esta etapa, bem como foram avaliadas as melhores condições de aquecimento por meio de construção de curvas de pirólise e atomização. As condições otimizadas empregadas em GFAAS estão resumidas na Tabela 2.

TABELA 2. CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO GFAAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE NP DE PRATA EMPREGANDO O AGENTE COAGULANTE TANFLOC SG.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Modo de aquecimento	Vazão do gás Argônio (L min ⁻¹)
Secagem	80	10	Rampa	1,00
Secagem	100	30	Rampa	1,00
Secagem	120	20	Rampa	1,00
Secagem	120	10	Hold	1,00
Pirólise	750	10	Rampa	1,00
Pirólise	750	10	Hold	1,00
Atomização	1800	2	Hold	0
Limpeza	2500	2	Hold	1,00

Após a otimização do programa de aquecimento para os extratos obtidos com Tanfloc SG, foram avaliadas curvas analíticas ($n = 3$) por padronização externa em HNO₃ 1% (v/v) em sete níveis de concentração (entre 1,00 e 60,0 µg L⁻¹) preparados a partir da diluição da dispersão padrão de Ag-Citrato comercial 0,02 mg L⁻¹ (50 nm, Sigma Aldrich). Também foram avaliadas curvas analíticas em cinco níveis ($n = 3$) por *matrix matched* a partir de amostras fortificadas também com Ag-Citrato entre 0,05 e 1,00 µg L⁻¹ antes da extração com Tanfloc SG, empregando as condições otimizadas de preparo de amostra.

Foram ainda realizados ensaios preliminares utilizando o modificador universal Pd (5 µg) + Mg (3 µg) a fim de avaliar o efeito na separação térmica entre analito e matriz nos extratos digeridos obtidos com Tanfloc SG. Foram preparados quatro extratos digeridos a partir de amostras de água ultrapura sem fortificação empregando as condições de preparo anteriormente otimizadas. A partir desses extratos digeridos foram preparados dois *pools* de amostra, sendo um empregado como branco e o outro fortificado com 60,0 µg L⁻¹ de Ag-Citrato (Sigma Aldrich, 50 nm). Os extratos obtidos com e sem fortificação foram analisados por GFAAS nas condições previamente otimizadas. Foram analisados 20,0 µL de amostra na ausência e na presença de 5 µL de modificador Pd+Mg. Para a adição do modificador foi utilizada uma solução em meio a HNO₃ 1% (v/v) contendo 1,00 µg L⁻¹ de Pd(NO₃)₂ e 0,6 µg L⁻¹ de Mg(NO₃)₂, preparadas a partir de um padrão de 10 µg L⁻¹ de Pd(NO₃)₂ (Palladium Matrix Modifier, Sigma Aldrich) e 10 µg L⁻¹ de Mg(NO₃)₂ (Magnesium Matrix Modifier, Sigma Aldrich).

I.3.6.1. AVALIAÇÃO DO USO DO AGENTE COAGULANTE TANFLOC SG NO PREPARO DE AMOSTRAS AQUOSAS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A eficiência do preparo de amostra empregando o coagulante Tanfloc SG líquido (Tanac S.A) visando a extração e a pré-concentração de Ag-NP foi avaliada preliminarmente por ICP OES (condições diferentes estão destacadas entre parênteses) e por GFAAS. Na condição otimizada de extração, os ensaios foram realizados em tubos Falcon de

polipropileno de 50 mL, empregando 45 mL de amostra aquosa, fortificadas isoladamente com Ag^+ , Ag-PVP e Ag-Citrato. Nas amostras foram adicionados 75 μL de Tanfloc SG 33,3% em água (100 μL Tanfloc SG 100% para ICP OES) e o pH foi ajustado para 6 com uma solução aquosa de hidróxido de tetrametilamônio 1,67% m/v (TMAH, do inglês “*Tetramethylammonium Hydroxide*”) preparado a partir de uma solução estoque 25% m/v (Sigma-Aldrich). Esta foi a condição mínima de pH em que foi observada a turvação, indicando a formação dos coágulos. As amostras foram agitadas manualmente e então centrifugadas por 10 min a 6000 rpm em centrífuga Solab (modelo SL-700) ou por 5 min a 5000 rpm em centrífuga Fanem (modelo Excelsa II 206 MP).

As condições de digestão dos extratos para análise por GFAAS foram estabelecidas preliminarmente via UV-Vis, buscando estabelecer condições de aquecimento que proporcionassem um extrato límpido, sem corpo de fundo, e que não levasse a total vaporização das amostras, o que levava a explosões e perdas de reprodutibilidade. Foram avaliados fatores como tempo e potência de exposição à radiação, e posição dos tubos em relação ao centro do reator.

Em seguida, foram avaliadas variações dos principais fatores envolvidos na digestão por meio de um planejamento fatorial 2^3 e as amostras obtidas foram analisadas por GFAAS. As amostras de água ultrapura foram fortificadas com 1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Ag-Citrato antes da extração, sendo avaliada a concentração de H_2O_2 , a concentração de HNO_3 e o tempo de aquecimento de cada ciclo de exposição à radiação micro-ondas, sendo os níveis investigados apresentados na Tabela 3. O mesmo planejamento foi realizado para amostras em branco (45,0 mL de água ultrapura), uma vez que as diferentes condições de digestão afetam significativamente o teor final de matéria orgânica nos extratos e o sinal de absorvância observado. Assim, a resposta avaliada foi o sinal da amostra fortificada descontando-se o sinal da respectiva amostra branco.

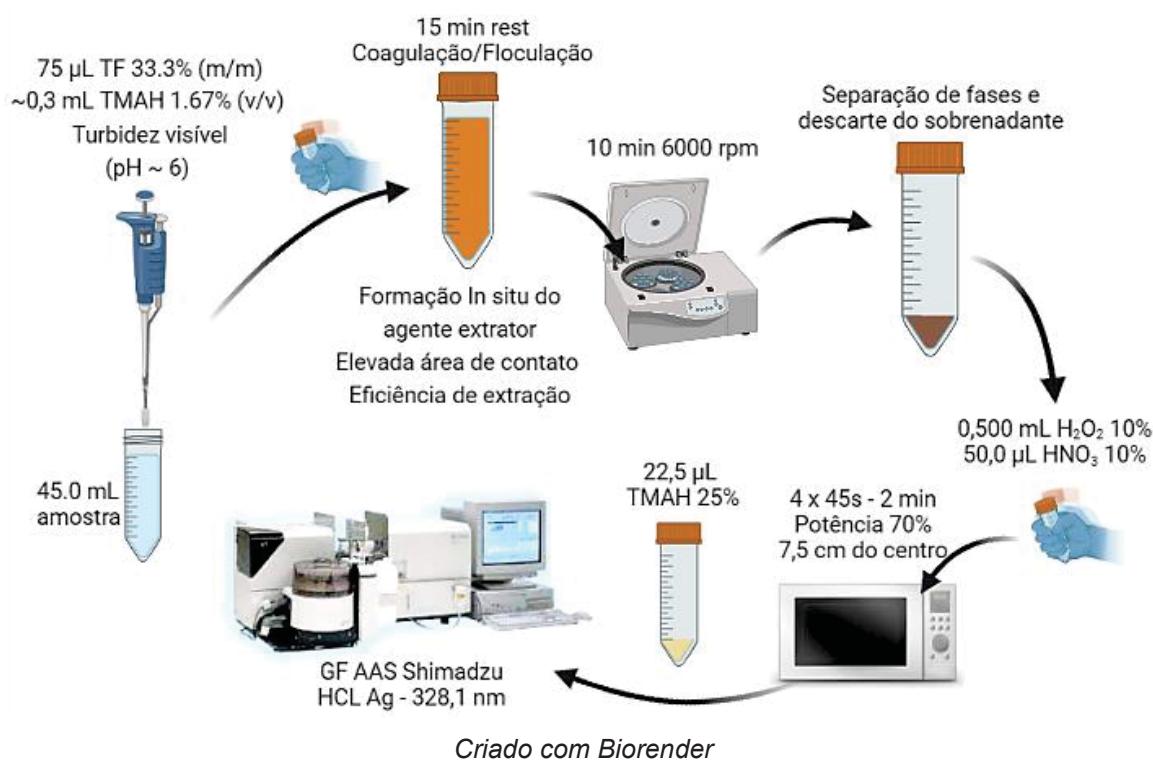
TABELA 3. FATORES E NÍVEIS DO PLANEJAMENTO 2^3 PARA A OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE POR GFAAS.

Variáveis	Níveis		
	(-)	(0)	(+)
HNO_3 % (v/v)	0,500	1,00	1,50
H_2O_2 % (v/v)	7,50	10,0	12,5
Tempo de exposição à radiação micro-ondas por ciclo (s)	35	45	55

Na condição otimizada, os sobrenadantes obtidos na etapa de extração foram decantados e os extratos obtidos foram digeridos pela adição de 0,500 mL H_2O_2 10% (v/v) e em meio a 1,00% (v/v) HNO_3 , seguido de agitação manual, a fim de garantir que todo o precipitado, antes aderido às paredes, ficasse no fundo do tubo, garantindo melhor contato

com a solução de digestão. As amostras foram então aquecidas em microondas doméstico Eletrolux (ME850), aplicando-se quatro ciclos de aquecimento de 45 s a 70% de potência, com intervalos de 2 min entre os ciclos. Os extratos digeridos foram armazenados a temperatura ambiente, adicionados de 22,5 μL de TMAH 25% (m/v) para correção do pH final (de pH 0 para pH \sim 2) e então analisados por UV-Vis ou por GFAAS. Um esquema global do procedimento otimizado está apresentado na Figura 4.

FIGURA 4. PREPARO DE AMOSTRA EMPREGANDO TANFLOC SG COMO AGENTE EXTRATOR PARA A DETERMINAÇÃO DE PRATA EM AMOSTRAS AQUOSAS POR GFAAS.



No caso da digestão das amostras que foram levadas para análise por ICP OES, nos testes realizados em condições preliminares, os extratos foram digeridos pela adição de 5,00 mL de H_2O_2 35% (v/v) em meio de HNO_3 1,00% (v/v), seguido de agitação manual a temperatura ambiente e análise espectrométrica após 24 horas.

O desempenho do método proposto também foi avaliado, em termos de exatidão e precisão, na determinação das formas de prata em amostras reais, empregando amostras de água coletadas diretamente da rede de distribuição na região do bairro Lindoia em Curitiba-PR, seguindo a recomendação da literatura (MUSAFIR et al., 2017).

Resumidamente, após a desinfecção da torneira com água corrente, etanol e água deionizada, nesta ordem, a torneira foi aberta de maneira a garantir a saída de uma baixa vazão de água em fluxo laminar por pelo menos 2 minutos. A coleta foi realizada em frasco âmbar de polipropileno de 2 L, sendo inicialmente coletados 200 mL de amostra para

ambientação, seguido pelo descarte da água após a lavagem de todas as paredes internas. Finalmente, o frasco foi preenchido até a marcação de 2 L, evitando-se sempre tocar o frasco na torneira.

As amostras reais foram levadas para o laboratório e armazenadas em geladeira por no máximo 24h antes das análises. Também foi analisada uma amostra de água mineral comercial. As amostras foram fortificadas isoladamente com as diferentes formas de prata e em diferentes níveis de concentração, e então submetidas ao preparo de amostra previamente otimizado, visando a extração/pré concentração com Tanfloc SG, seguido de digestão e análise por GFAAS.

Os valores de recuperação foram estimados de acordo com a equação 1:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C1-C2}{C3} \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

Em que $C1$ é a concentração determinada na amostra fortificada, $C2$ a concentração determinada na amostra sem fortificação (branco) e $C3$ a concentração adicionada.

A precisão também foi investigada, e os resultados foram avaliados por meio do desvio padrão relativo (DPR, equação 4) estimado em % de acordo com a equação 2:

$$\text{DPR (\%)} = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{concentração média determinada}} \times 100 \quad (\text{equação 2})$$

A fim de avaliar as possíveis causas de um efeito de matriz observado em amostras reais, foram realizados ensaios a fim de avaliar o efeito da presença de potenciais interferentes na eficiência de extração de Ag^+ e Ag-NP: o ácido húmico (AH) e o Ca^{2+} . Para tanto, foram realizados ensaios de extração preliminares na presença e na ausência de $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ de AH (Sigma Aldrich), empregando as mesmas condições de preparo de amostra otimizadas para extração e digestão com Tanfloc SG. Também foram realizados ensaios com amostras preparadas com $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ de Ca^{2+} e $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ de AH. Assim, os ensaios foram conduzidos em água ultrapura ($n = 3$), AH $5,00 \text{ mg L}^{-1}$, e AH $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ com $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ de Ca^{2+} . Devido a um problema com o funcionamento do GFAAS, os extratos obtidos nestes ensaios foram analisados por ICP OES. Assim, após a digestão, as amostras foram diluídas pela adição de $2,500 \text{ mL}$ de água ultrapura, a fim de garantir um volume suficiente para análise por ICP OES. As análises por ICP OES foram efetuadas nas mesmas condições empregadas na dosagem das Ag-NP, conforme descrito na seção 4.5, sendo também monitorado a linha principal do Ca (I) em $393,3 \text{ nm}$ nos extratos obtidos para as amostras fortificadas com Ag^+ . Foram também preparados extratos branco ($n = 3$) nas três condições avaliadas para fins comparativos.

I.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

I.4.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Nanopartículas de Ag-Citrato e Ag-PVP foram sintetizadas a fim de serem empregadas como padrão nas etapas de desenvolvimento de métodos analíticos para detecção e determinação destas em matrizes aquosas naturais.

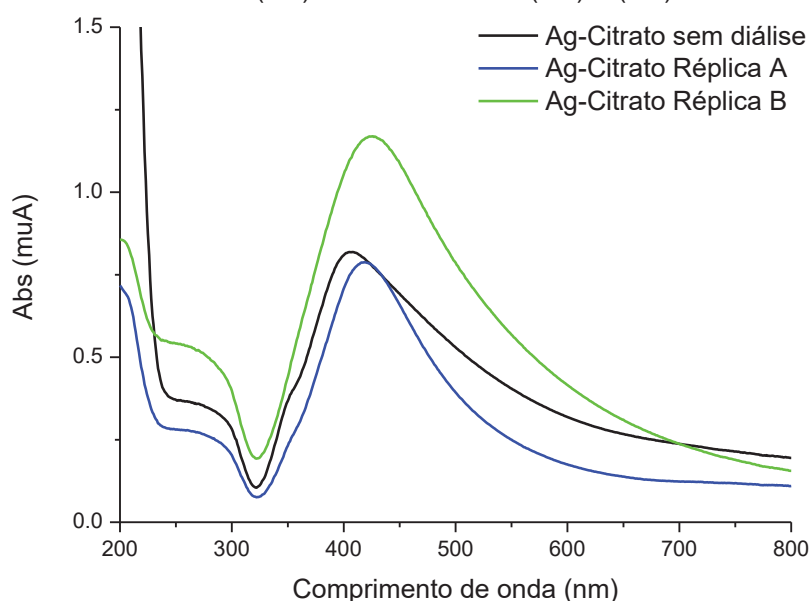
I.4.1.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE Ag-CITRATO

Dispersões aquosas de Ag-Citrato foram obtidas por redução com citrato de sódio como proposto por Šileikaite et al. (2009). Embora tenha sido testada a purificação das amostras por ultracentrifugação de acordo com o proposto por Huiyn e Chen (2011) e por Yin et al. (2015) melhores resultados foram alcançados por meio da diálise, com menores perdas de material na purificação. Assim, a fim de remover íons como Ag^+ (não reagente), as amostras obtidas pelas duas rotas foram dialisadas em água ultrapura por 24 h em tubo de acetato de celulose de 3,5 kDa e 22 mm (SnakeSkin, Thermo Scientific).

As amostras antes e após a diálise foram devidamente caracterizadas por UV-Vis, DLS, SEM-EDS e TEM-SAED.

As nanopartículas de Ag-Citrato, sintetizadas em duplicata (Replicata A e Replicata B), foram devidamente purificadas e caracterizadas por UV-Vis, e os espectros obtidos estão apresentados na Figura 5.

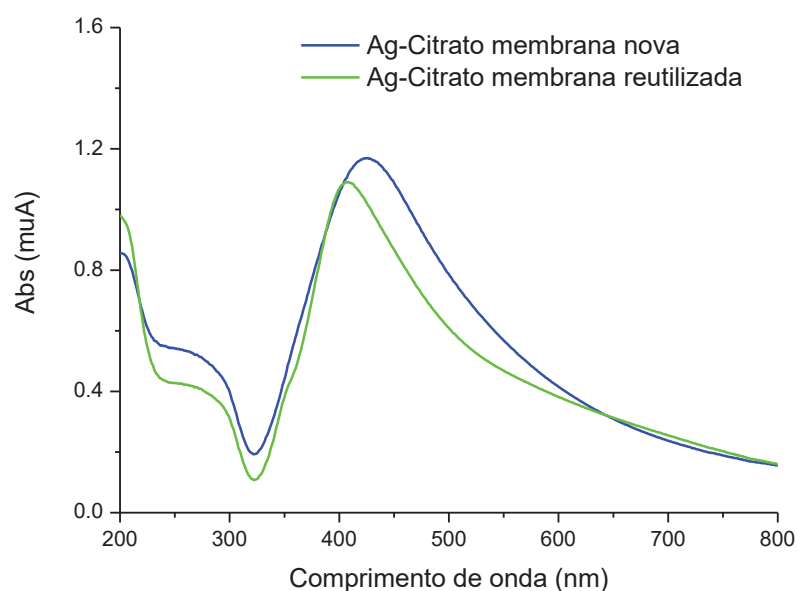
FIGURA 5. ESPECTROS UV-VIS PARA AS RÉPLICAS DA SÍNTESE DE Ag-CITRATO NÃO DIALISADA (—) E PURIFICADAS (—) E (—).



A diferença nas intensidades observadas entre as réplicas purificadas reflete uma certa falta de reprodutibilidade em manter a concentração final das dispersões, mesmo mantendo o sistema reacional semi-aberto com a utilização de um vidro de relógio. Contudo, é possível observar grande similaridade no perfil dos espectros obtidos. Ainda, antes e após a diálise é possível verificar alterações significativas no espectro apenas para comprimentos de onda inferiores a 250 nm, com redução da intensidade da banda em torno de 200 nm, eventualmente decorrente da eliminação dos subprodutos da reação.

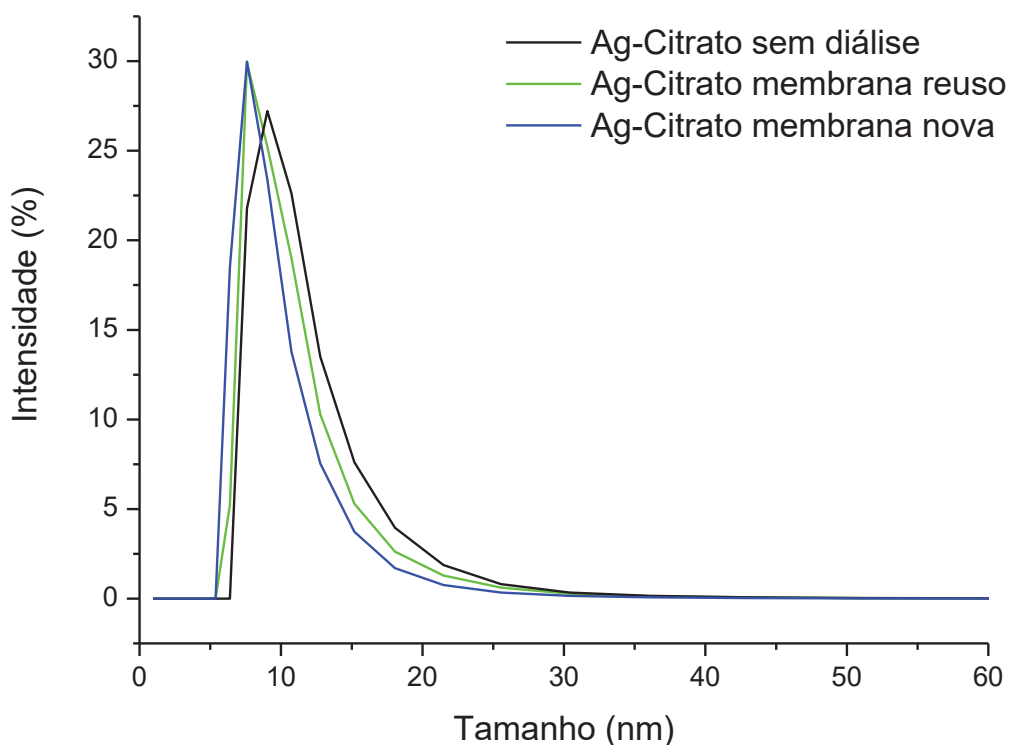
A avaliação do reuso das membranas de diálise foi realizada com a réplica (A) da síntese de Ag-Citrato, e os espectros UV-Vis, obtidos para as amostras purificadas empregando uma membrana nova e uma reutilizada, estão apresentados na Figura 6.

FIGURA 6. ESPECTROS UV-VIS PARA AS AMOSTRAS DE Ag-CITRATO PURIFICADAS COM MEMBRANA NOVA E MEMBRANA REUTILIZADA.



É possível verificar um deslocamento na banda de máxima absorção do espectro ao empregar a membrana reutilizada, indicando que a distribuição de tamanho de partículas do produto purificado pode ser afetada com o reuso da membrana, uma vez que o tamanho dos poros da membrana pode sofrer pequenas alterações ao longo do tempo devido à hidratação. Contudo, nas análises por DLS apenas uma pequena diferença foi observada no perfil de distribuição de tamanho das partículas, conforme evidenciado na Figura 7.

FIGURA 7. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS POR DLS PARA AS AMOSTRAS DA RÉPLICA (A) DA SÍNTESE DE Ag-CITRATO ANTES (PRETO) E APÓS A DIÁLISE COM UMA MEMBRANA NOVA (AZUL) E UMA MEMBRANA REUTILIZADA (VERDE).

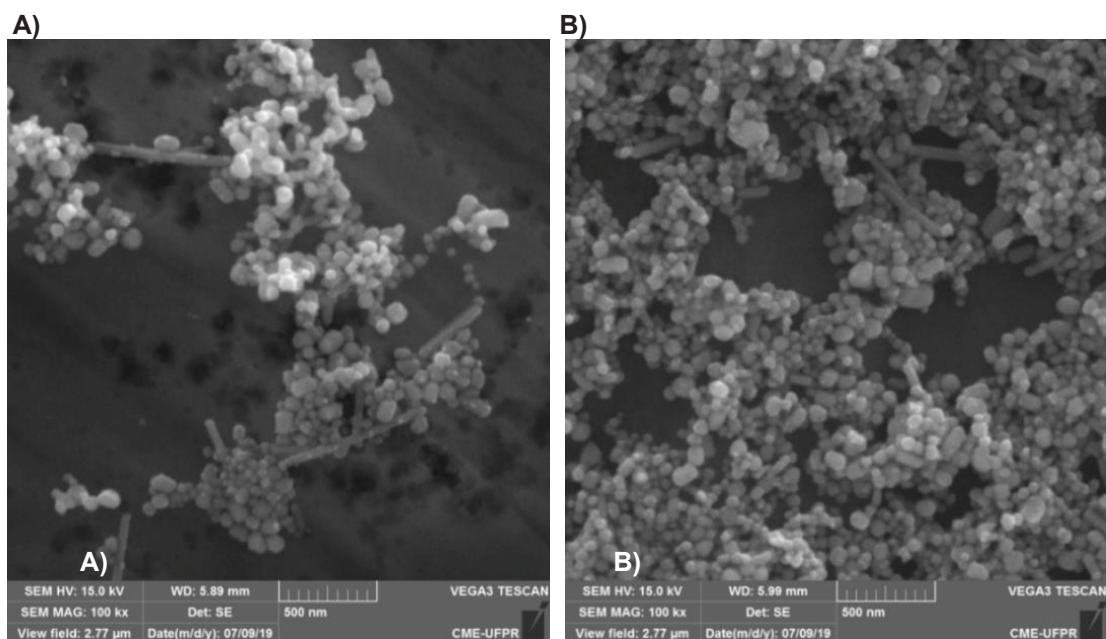


Ainda, com base nos dados obtidos por DLS, é possível verificar que após a purificação houve uma redução na distribuição das partículas de maiores tamanhos, o que pode não necessariamente indicar a eliminação destas partículas, mas sim a remoção de excessos de reagentes, especialmente de sais que favorecem a agregação das partículas, como já descrito pela literatura (LI; LENHART; WALKER, 2012). Logo, após a diálise, o tamanho médio da distribuição diminuiu e os picos ficaram mais afinados, uma vez que a agregação passa a ser desfavorecida. É possível, ainda, verificar um maior deslocamento para menores tamanhos do perfil de distribuição do DLS com o uso da membrana nova, possivelmente indicando uma maior eficiência na remoção de excessos de reagentes, promovendo um maior efeito de desagregação com relação ao uso da membrana reutilizada. Contudo, não houve alteração no pico máximo da distribuição empregando membrana nova e reutilizada, que foi igual a 7,6 nm para ambas as amostras. Como a diferença observada é relativamente pequena, o reuso da membrana de diálise pode ser realizado na etapa de purificação, desde que o produto final seja devidamente caracterizado.

Na análise comparativa das amostras dialisadas com membrana nova e reutilizada por SEM não foram observadas diferenças significativas no tamanho e na morfologia das partículas, sendo possível verificar a presença de partículas majoritariamente esféricas e

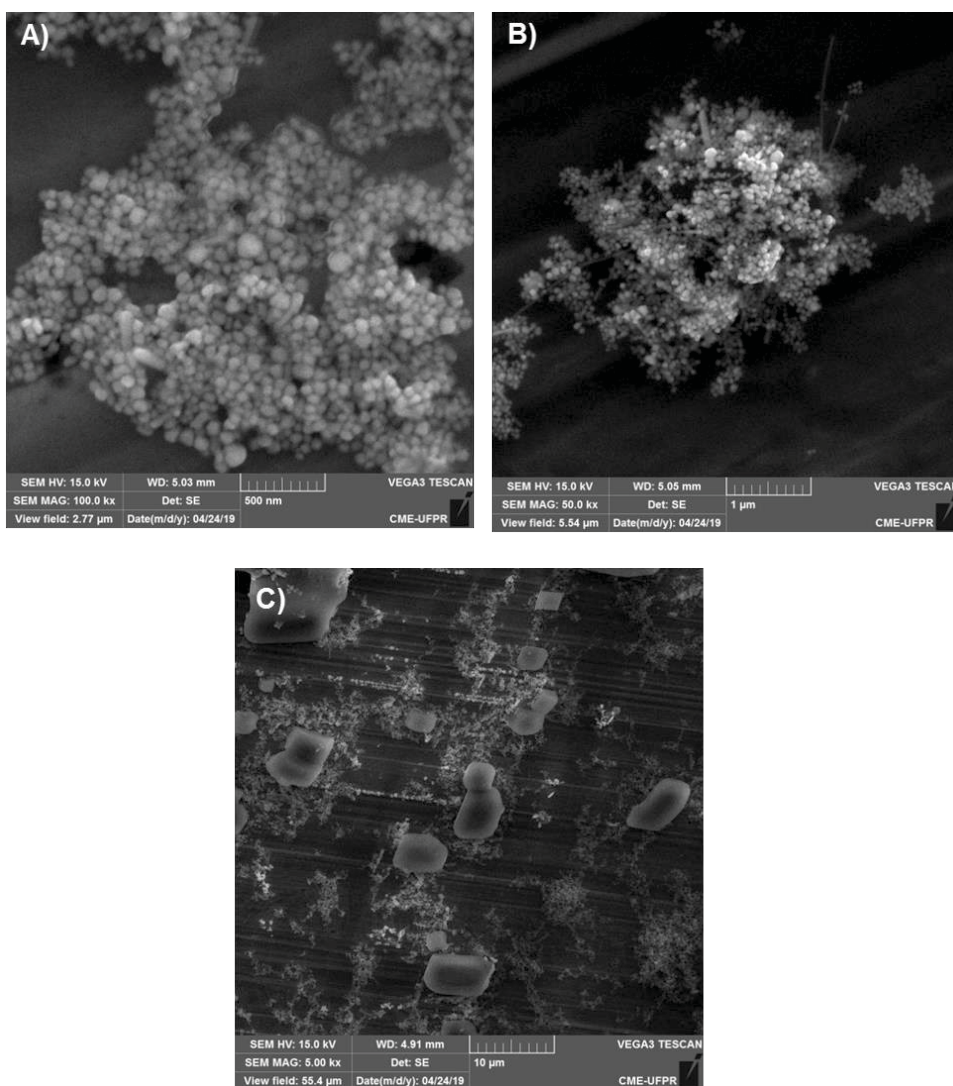
a presença de alguns poucos bastões, conforme Figura 8, indicando mais uma vez a possibilidade de armazenar as membranas de diálise, que apresentam alto custo, para posterior reutilização.

FIGURA 8. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR SEM PARA NP DE Ag-CITRATO APÓS A DIÁLISE COM: A) MEMBRANA NOVA, B) MEMBRANA REUTILIZADA. AMPLIAÇÃO DE 100 kX.



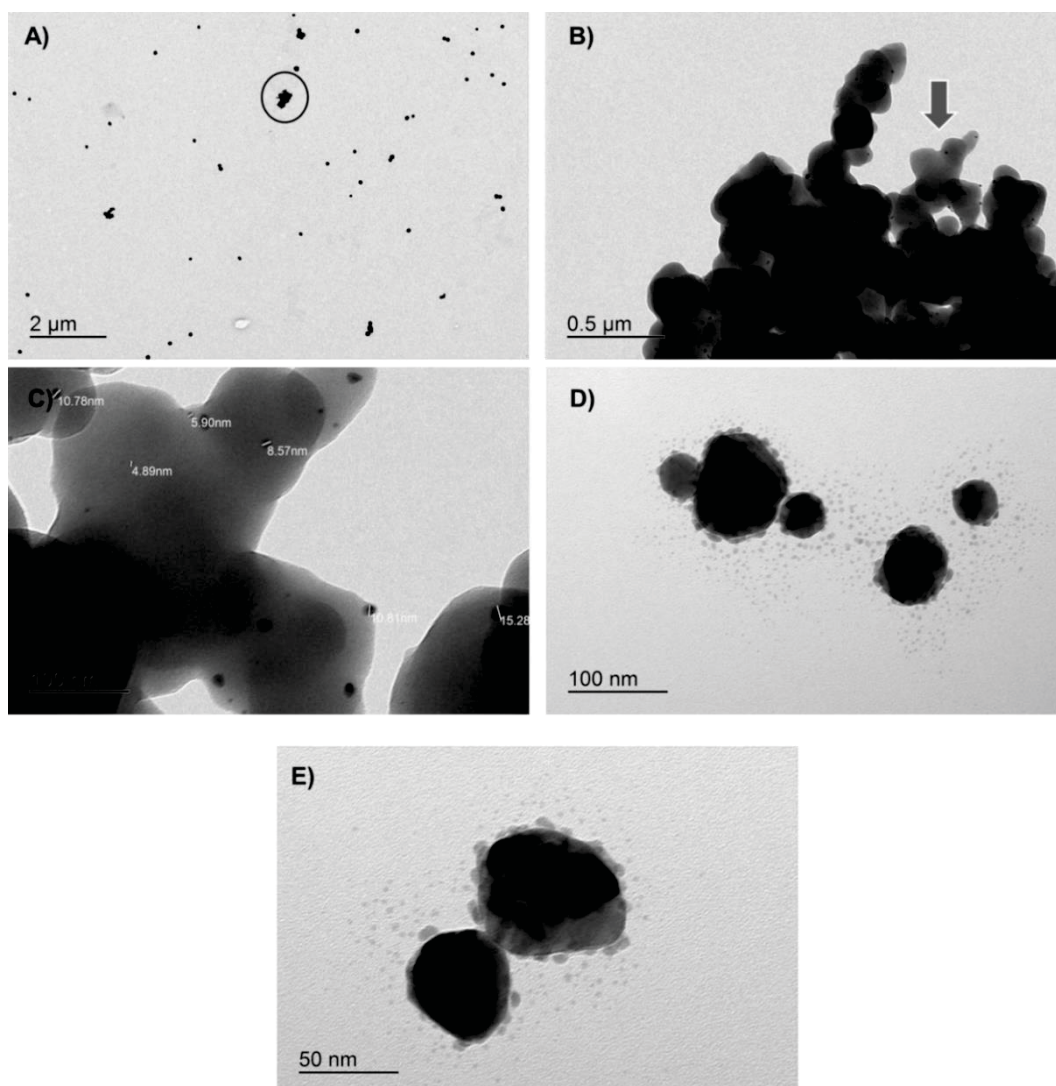
A análise via SEM da amostra da réplica (A) da síntese de Ag-Citrato, purificada por diálise (Figura 9 A e B) e não purificada (Figura 9 C), revelou a presença de grande quantidade de sal na amostra não dialisada, o que já havia sido observado em sínteses preliminares.

FIGURA 9. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR SEM PARA AS SÍNTESES DE Ag-CITRATO (A) PURIFICADA AMPLIADA EM 100 kX, (B) PURIFICADA AMPLIADA EM 50 kX E (C) NÃO DIALISADA (AMPLIAÇÃO DE 5 kX).



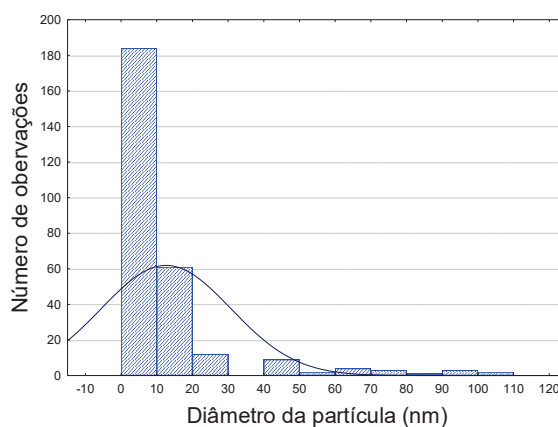
A amostra da réplica (A) da síntese de Ag-Citrato foi selecionada para análise por TEM e as micrografias obtidas estão apresentadas na Figura 10. Foi possível verificar a presença de agregados orgânicos envolvendo partículas muito pequenas, conforme Figura 10 (A), (B) e (C). As partículas de prata obtidas apresentaram forma majoritariamente esférica e alta cristalinidade, sendo possível verificar a presença de planos cristalinos, bem como evidenciar o recobrimento orgânico na Figura 10 (D) e (E).

FIGURA 10. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR TEM PARA A AMOSTRA DE Ag-CITRATO.



A partir das imagens obtidas por TEM foi estimado, com o auxílio do software ImageJ, o diâmetro de 280 partículas, e a distribuição obtida está representada na Figura 11.

FIGURA 11. HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DO DIÂMETRO DE PARTICULAS DE Ag-CITRATO ESTIMADO POR TEM.

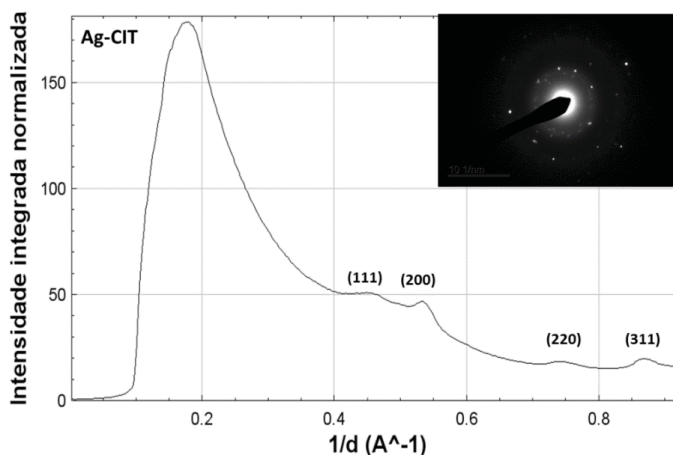


Devido à resolução das imagens não foi possível estimar o diâmetro das partículas de Ag-Citrato menores que 0,9 nm, apesar de ser possível notar a presença destas nas micrografias obtidas. Isso fez com que a distribuição de tamanho se afastasse da distribuição normal. Foram observadas partículas variando entre 0,9 e 105,5 nm, e obtido um diâmetro médio igual a $4,2 \pm 17,3$ nm. Ainda, a média obtida por TEM foi inferior à fornecida pelos dados de DLS, cujo tamanho médio estimado foi de 7,6 nm, o que era esperado uma vez que o DLS estima o raio hidrodinâmico e não o tamanho real da partícula.

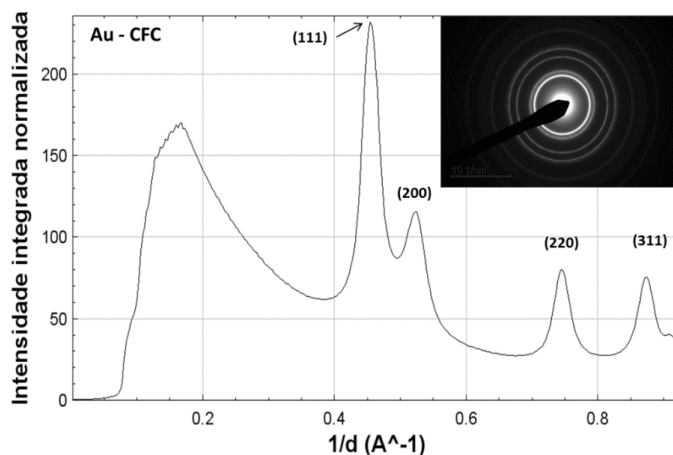
De acordo com o padrão obtido por difração de elétrons em área selecionada (SAED, do inglês “*Selected Area Electron Diffraction*”) para a amostra de Ag-Citrato (Figura 12 A) é possível inferir uma alta cristalinidade da amostra, sendo que os pontos luminosos apresentam o padrão de difração nas condições em que esta é satisfeita. Com o auxílio do software ImageJ foi possível obter as intensidades dos picos de difração em função do inverso da distância interplanar ($1/d$, em \AA^{-1}), conforme também representado na Figura 12.

FIGURA 12. PADRÃO SAED OBTIDOS PARA: A) AMOSTRA DE Ag-CITRATO, B) PADRÃO DE OURO.

A)



B)



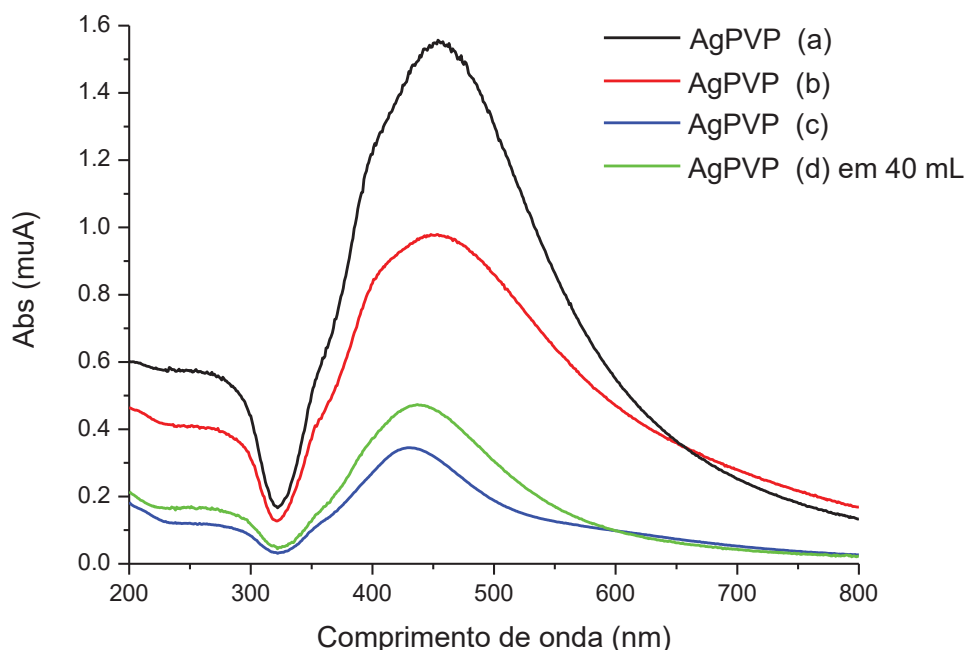
A fim de deduzir o erro instrumental, também foi analisado o padrão de ouro, cujo padrão de difração (Figura 12 B) é bem conhecido e o sistema cristalino, cúbico de face centrada, é o mesmo que o da prata. O erro obtido entre as distâncias interplanares estimadas instrumentalmente e as teóricas do padrão de ouro foi de 7,7%. Esse valor foi utilizado para corrigir os valores das distâncias interplanares obtidos para as partículas de Ag-Citrato. Assim, a partir do difratograma obtido para a amostra de Ag-Citrato foi possível inferir que a esta apresenta um sistema cristalino do tipo cúbico de face centrada, com distâncias interplanares iguais a 2,369 Å (plano 111), 2,003 Å (plano 200), 1,438 Å (plano 220) e 1,231 Å plano (311), valores bastante próximos aos descritos pela literatura para nanopartículas de prata (2,336, 1,955, 1,436 e 1,224 Å para os planos 111, 200, 220 e 311, respectivamente) (JYOTI; BAUNTHIYAL; SINGH, 2016), confirmando assim mais uma vez a sua obtenção pela rota sintética proposta.

14.1.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE Ag-PVP

O recobrimento com PVP é conhecidamente mais estável que o citrato e vastamente empregado na síntese de NP de prata, o que justifica seu monitoramento no ambiente. As Ag-PVP foram sintetizadas de acordo com o descrito por Zhao et al. (2018), e purificadas com sucessivas lavagens com acetona, etanol e água ultrapura. As amostras purificadas também foram caracterizadas por UV-Vis, SEM-EDS e TEM-SAED.

Na Figura 13 estão apresentados os espectros UV-Vis para as diferentes sínteses realizadas (sínteses a-d). Os espectros foram obtidos a partir das amostras diluídas sendo que 0,500 mL de cada síntese após a purificação foram adicionados a 2,000 mL de água ultrapura. As réplicas (a), (b) e (c) foram obtidas empregando-se as mesmas condições de síntese, e apenas para a amostra (d) - cuja síntese foi realizada com o dobro das quantidades de reagentes indicadas pela literatura, mantendo-se o volume final de 40 mL - uma maior diluição foi necessária para possibilitar a análise por UV-Vis, sendo que 0,200 mL foram diluídos em 1,500 mL de água ultrapura.

FIGURA 13. ESPECTROS UV-VIS PARA AS AMOSTRAS PURIFICADAS DE Ag-PVP SINTETIZADAS.

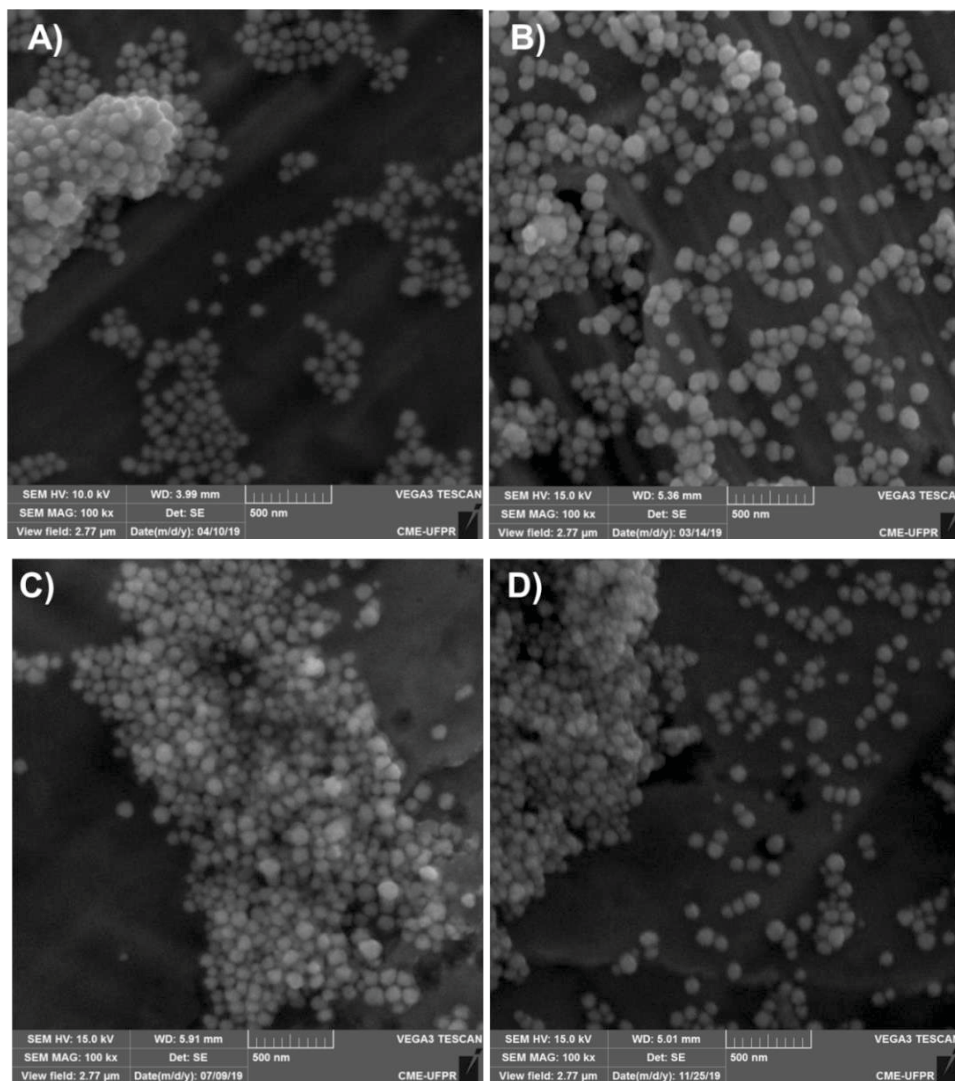


É possível observar grande semelhança nos perfis espectrais obtidos para todas as amostras, indicando a obtenção de NP semelhantes tanto na composição quanto na distribuição de tamanhos. A diferença nas intensidades dos espectros entre as amostras (a), (b) e (c) se deve especialmente a grande dificuldade em reproduzir a etapa de purificação, cujas sucessivas lavagens do precipitado levaram a perdas do material na porção sobrenadante de maneira irreprodutível, o que afetou significativamente a concentração final das dispersões. A dificuldade na reprodução da etapa de purificação, contudo, parece não afetar a distribuição de tamanho das amostras purificadas que, como já evidenciado, apresentaram espectros de absorção UV-Vis semelhantes.

O maior alargamento da banda de absorção UV-Vis obtido para as amostras de Ag-PVP com relação às de Ag-Citrato (anteriormente apresentados), indica a possibilidade de uma maior dispersão no tamanho das partículas, bem como o deslocamento da banda plásmon para menores energias revela maiores tamanhos de partícula para as amostras de Ag-PVP, conforme pode ser evidenciado comparando-se os espectros apresentados nas Figuras 6 e 13, o que corrobora com os resultados obtidos por TEM, que serão apresentados mais adiante nesta seção.

Uma vez que a etapa de purificação leva a grandes perdas de produto no sobrenadante, foi realizada a síntese (d) a fim de garantir uma maior concentração final da dispersão. O perfil espectral (Figura 13) é bastante semelhante às demais réplicas, assim como, as micrografias obtidas por SEM (Figura 14).

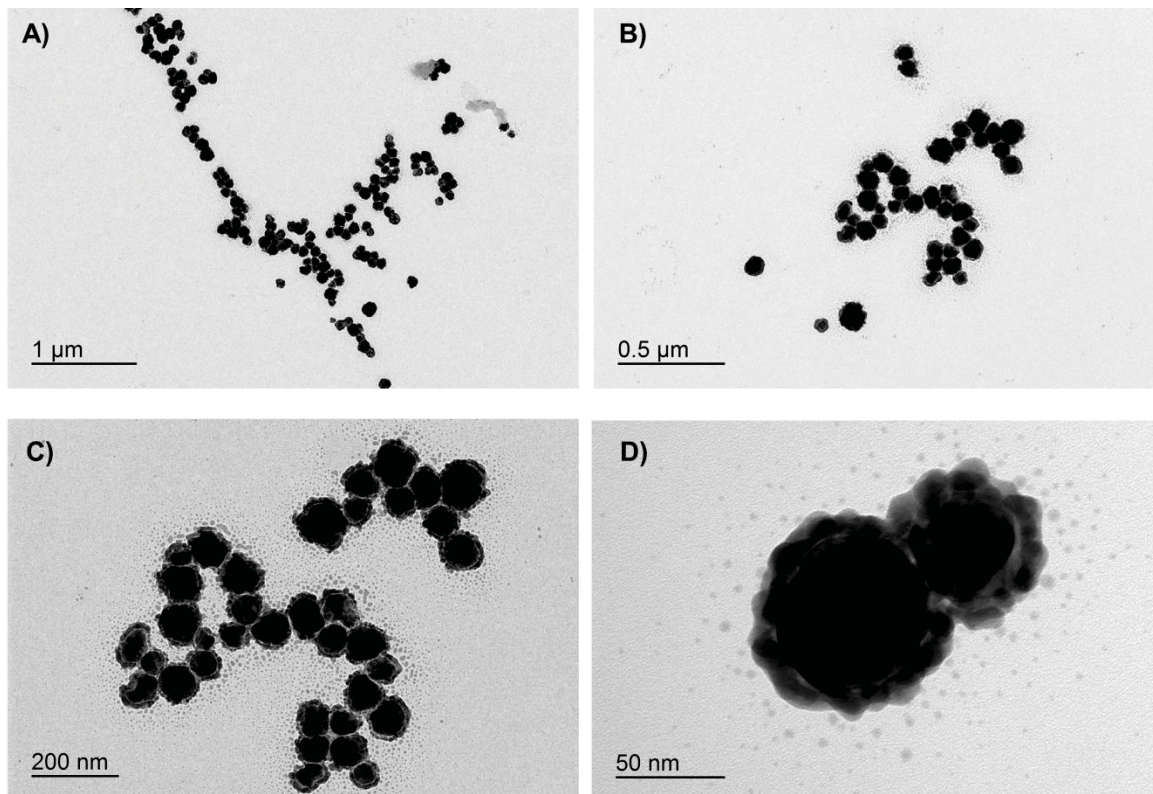
FIGURA 14. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR SEM PARA AS RÉPLICAS DA SÍNTESE DE Ag-PVP AMPLIADAS EM 100KX. A) RÉPLICA (a), B) RÉPLICA (b), C) RÉPLICA (c), D) RÉPLICA (d).



A partir das micrografias é possível observar que as partículas de Ag-PVP são predominantemente esféricas e que não existem grandes diferenças na morfologia e tamanho das partículas entre as réplicas analisadas. Ainda, é possível verificar a presença do recobrimento, melhor evidenciado nas micrografias das amostras nas réplicas (a) e (c) devido a melhor qualidade das imagens. A análise via EDS por área selecionada confirmou a presença de prata nas amostras, não sendo evidenciada a presença de impurezas em nenhuma das amostras analisadas.

A amostra da réplica (d) da síntese de Ag-PVP foi escolhida para caracterização por TEM-SAED por permitir a obtenção de uma dispersão mais concentrada, a ser empregada como padrão nas etapas futuras do presente trabalho, e algumas das micrografias obtidas estão apresentadas na Figura 15.

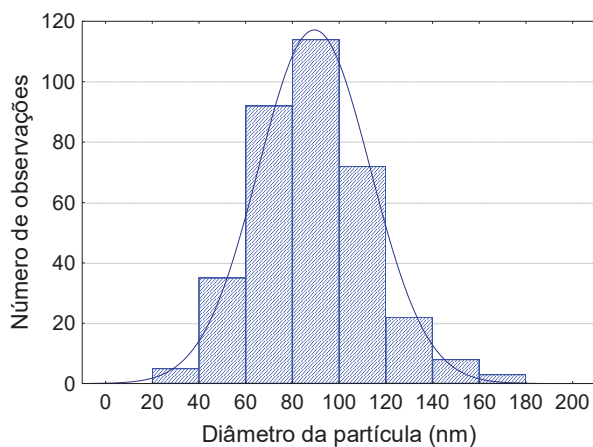
FIGURA 15. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR TEM PARA A AMOSTRA DE Ag-PVP (RÉPLICA d).



É possível perceber que as partículas são predominantemente esféricas, bem como verificar a presença do recobrimento de PVP, que está bem evidente na Figura 15 (D). Medidas da espessura da camada de PVP, com o auxílio do software ImageJ, permitiram encontrar recobrimentos de até 14 nm, valor bem superior ao estimado para as NP de Ag-Citrato, cujo recobrimento raramente supera 4 nm de espessura, evidenciando o maior impedimento estérico conferido pelo estabilizante PVP. Além disso, a estabilização por citrato se dá primordialmente por repulsões eletrostáticas, o que confere menor estabilidade relativa às NP.

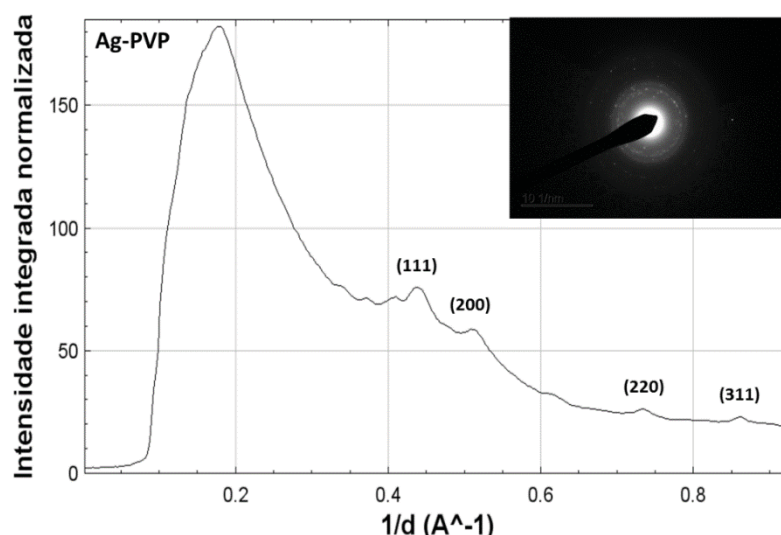
Com o auxílio do software ImageJ, foi estimado o diâmetro de 350 partículas e o histograma obtido está representado na Figura 16, sendo o diâmetro médio estimado igual a $88,9 \pm 23,9$ nm, com partículas variando entre 33,3 nm e 166,7 nm.

FIGURA 16. HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DO DIÂMETRO DE PARTICULAS DE Ag-PVP ESTIMADO POR TEM.



O padrão de difração das NP de Ag-PVP foi obtido por TEM-SAED com o auxílio do software ImageJ e está apresentado na Figura 17. Da mesma forma que para as NP de Ag-Citrato os valores das distâncias interplanares foram corrigidos com o padrão de ouro (erro de 1,4 %), sendo iguais a 2,308 Å (plano 111), 1,984 Å (plano 200), 1,380 Å (plano 220) e 1,176 Å (plano 311). As distâncias estimadas são semelhantes as obtidas para Ag-Citrato e também estão próximas às descritas pela literatura (JYOTI; BAUNTHIYAL; SINGH, 2016), confirmando a obtenção de NP de prata.

FIGURA 17. PADRÃO SAED OBTIDO PARA A AMOSTRA DE Ag-PVP.



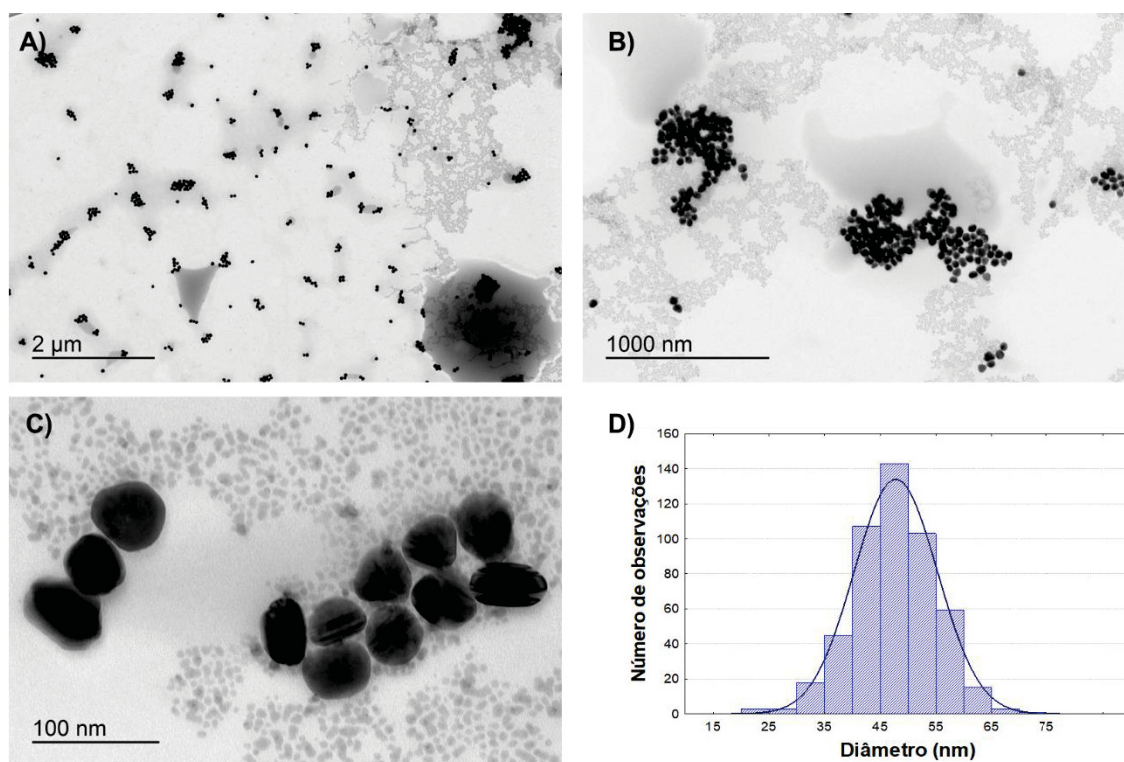
Com base no que foi apresentado até então, foi possível obter NP de prata com diferentes recobrimentos por meio das rotas sintéticas investigadas. Apesar da dificuldade em reproduzir a purificação das NP de Ag-PVP, aparentemente não foram observadas grandes discrepâncias nos produtos obtidos, sendo as diferenças restritas apenas à

concentração final das partículas. As dispersões devidamente caracterizadas foram quantificadas por GFAAS e ICP OES para serem posteriormente empregadas como padrões nas etapas seguintes deste trabalho. Tais ensaios de quantificação das dispersões obtidas serão apresentados mais adiante.

Adicionalmente, foi adquirido um padrão comercial de nanopartículas de Ag-Citrato (Sigma Aldrich, 0,02 g L⁻¹, 50 nm). Este padrão foi empregado nas etapas finais de otimização da extração com Tanfloc SG, bem como na validação do método desenvolvido.

A fim de verificar as informações do fabricante de tamanho e forma e avaliar também os possíveis efeitos do procedimento de extração nas partículas do padrão comercial de Ag-Citrato, este foi devidamente caracterizado por TEM-SAED e algumas das micrografias obtidas estão apresentadas na Figura 18.

FIGURA 18. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR TEM PARA AS AMOSTRAS DE A) Ag-CITRATO 3 kX, B) Ag-CITRATO 8 kX, C) Ag-PVP 60 kX, D) HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DO DIÂMETRO DAS PARTÍCULAS DE Ag-CITRATO COMERCIAL.



A partir das micrografias é possível verificar a presença de nanopartículas predominantemente esféricas e com uma distribuição bastante homogênea de diâmetro. Isso pode ser observado tanto visualmente nas imagens quanto a partir da distribuição obtida para 500 partículas com o auxílio do software ImageJ (Figura 18 D), sendo estimado um diâmetro médio de $47,6 \pm 7,4$ nm e observados diâmetros entre 23,2 e 70,1 nm, estando assim em conformidade com as especificações de tamanho fornecidas pelo fabricante.

14.1.3. QUANTIFICAÇÃO DOS PADRÕES DE Ag-NP POR ICP OES

Os principais parâmetros de validação estimados para a curva analítica ($n = 3$) obtida por ICP OES estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4. PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO NA DETERMINAÇÃO DE Ag POR ICP OES.

Parâmetros	Ag (328,068 nm)
Coefficiente Linear (a)	26,84
Coefficiente Angular (b/ s $\mu\text{g}^{-1}\text{L}$)	16,99
Coefficiente de correlação linear (r)	0,9998
Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,50-100,0
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,6
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,48

Devido a maior sensibilidade, o comprimento de onda de 328,068 nm (Ag (I)) foi selecionado para a determinação de prata nas amostras. De acordo com os parâmetros apresentados, foi observada adequada linearidade na faixa de concentração estudada, sendo o coeficiente de correlação superior a 0,990 como é recomendado pela ANVISA (2017). Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estimados por meio da relação entre o desvio do intercepto e o coeficiente angular da curva analítica, de acordo com recomendações do INMETRO (2020).

As dispersões de Ag-NP anteriormente sintetizadas, purificadas e caracterizadas (Ag-Citrato réplica A e Ag-PVP réplica D) foram devidamente diluídas ($n = 3$) e quantificadas por ICP OES com base na curva analítica apresentada. As concentrações estimadas, já corrigidas pelo fator de diluição utilizado, foram iguais a $104,1 \pm 1,6 \text{ mg L}^{-1}$ para Ag-Citrato e de $68,5 \pm 1,4 \text{ mg L}^{-1}$ para Ag-PVP. Estas amostras foram então empregadas como padrões na investigação da remoção de NP de prata de amostras aquosas pelos agentes coagulantes Tanfloc SG e sulfato de alumínio.

14.2. AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE DO USO DE AGENTES COAGULANTES NO PREPARO DE AMOSTRAS AQUOSAS PARA DETERMINAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS A BASE DE PRATA

Considerando o comportamento anfótero do Al^{3+} , bem como a capacidade de formar compostos com diferentes solubilidades de acordo com o pH do meio, optou-se por avaliar preliminarmente o emprego do agente coagulante $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ para a extração e pré-concentração de Ag-NP em amostras aquosas, seguida de determinação por GFAAS. As condições de coagulação testadas foram escolhidas a partir do diagrama de coagulação típico para o sulfato de alumínio (AMITHARAJAH, 1989; PAVANELLI, 2001), na tentativa

de obter uma quantidade de precipitado reduzida para a pré-concentração de no máximo 50 mL de amostra.

Contudo, apesar de ter sido possível extrair e pré-concentrar tanto Ag-Citrato quanto Ag-PVP nos ensaios preliminares, o que possibilitaria reduzir os limites de quantificação do GFAAS para frações de ng L^{-1} , foram observados diversos problemas instrumentais durante a análise dos extratos obtidos. Apesar do alumínio não absorver no mesmo comprimento de onda que a Ag ($\lambda(l)$: 328,1 nm), com comprimento de onda primário igual a 396,2 nm, e alternativos iguais a 308,2 e 309,3 nm, e mesmo com a aparente sensibilidade do método para a determinação de prata, a absorbância das amostras branco observada em GFAAS foram muito elevadas, devido à presença de um grande excesso deste elemento na amostra.

Ainda, foi observada a formação de fumaça na etapa de pirólise, levando a perdas do analito antes da atomização, o que pode ter levado às baixas taxas de recuperação observadas para as Ag-NP, que foram sempre inferiores a 50% nos testes preliminares. Assim, optou-se por avaliar a potencialidade de um coagulante orgânico, o Tanfloc SG, tendo em vista a possibilidade de introduzir uma etapa de digestão capaz de reduzir uma possível influência da matriz decorrente da presença do agente extrator.

14.2.1. AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE DO COAGULANTE TANFLOC SG NO PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

14.2.1.1. ENSAIOS PRELIMINARES POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO

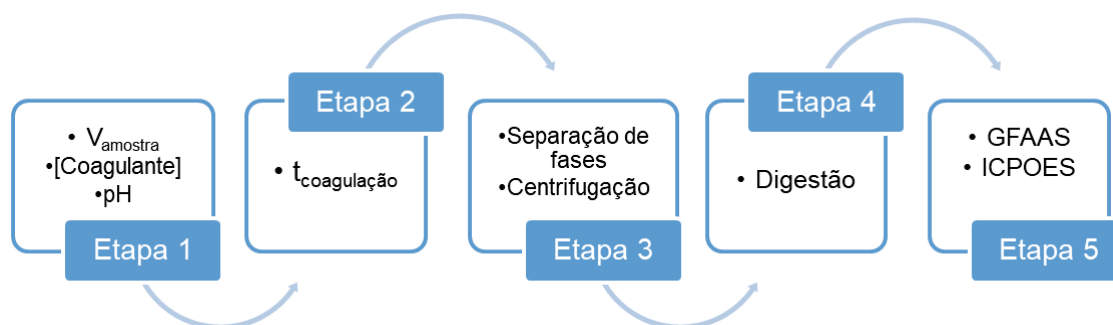
Visando estabelecer um procedimento de preparo de amostra a fim de empregar o Tanfloc SG como agente extrator para extração e pré-concentração das Ag-NP foram realizados ensaios preliminares e os extratos obtidos foram analisados por ICP OES. De maneira simplificada o processo de coagulação consiste na adição de um agente coagulante seguido de ajuste de pH e repouso, para adequado crescimento dos microflocos e consequente separação das fases, seja por sedimentação ou por flotação. Com isso em vista, a fim de estabelecer um protocolo de preparo de amostra, alguns parâmetros principais necessitaram de otimização e estão listados abaixo juntamente com suas influências no processo:

- 1) Concentração de agente coagulante – afeta a eficiência da extração, a velocidade de crescimento dos flocos, a quantidade final de precipitado e consequentemente o fator de enriquecimento, pensando no estabelecimento de um método de pré-concentração.

- 2) pH – atua na desestabilização do sistema coloidal, afetando a agregação do precipitado e a velocidade de crescimento dos flocos. De acordo com o fabricante, o Tanfloc SG coagula entre pH 4,5 a 8 a depender de fatores como a concentração do agente coagulante.
- 3) Volume de amostra – afeta a pré-concentração de um método de extração/pré-concentração, sendo que maiores volumes com menores quantidades de fase extratora levam a maiores fatores de enriquecimento, a depender, obviamente, da eficiência de extração.
- 4) Tempo de coagulação – tempo de repouso entre o ajuste de pH e coleta da fase extratora. Intimamente relacionado ao crescimento dos flocos, sendo que maiores tempos garantem flocos maiores e conseqüente melhor eficiência de extração pelo mecanismo de arraste, bem como maior facilidade na separação adequada entre as fases.
- 5) Separação de fases – o precipitado coloidal formado pelo Tanfloc SG tende naturalmente a sedimentar com o passar do tempo. A fim de acelerar e facilitar este processo uma etapa de centrifugação foi incluída.
- 6) Solubilização/Digestão dos extratos obtidos – afeta a significativamente a análise instrumental, sendo ideal a obtenção de uma amostra líquida homogênea, sem a presença de material particulado grosseiramente distribuído, a fim de evitar possíveis entupimentos na entrada do amostrador em GFAAS ou afetar a nebulização em ICP OES, por exemplo. A remoção, ainda que parcial, da matéria orgânica pode favorecer um menor efeito de interferência de matriz.
- 7) Análise instrumental – otimização das condições de análise por ICP OES nos ensaios preliminares e por GFAAS no estabelecimento do método final, a fim de garantir a adequada separação térmica analito/ matriz, visando alcançar adequadas figuras de mérito de validação analítica.

Um esquema simplificado representando a investigação destas principais etapas, a serem otimizadas durante o desenvolvimento do processo de extração por coagulação, está apresentado na Figura 19, a fim de facilitar a discussão a seguir.

FIGURA 19. PRINCIPAIS ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO POR COAGULAÇÃO.



No estabelecimento preliminar das condições inerentes à etapa 1 foram conduzidos ensaios preliminares em tubos tipo Falcon de polipropileno de 50 mL, empregando 45,0 mL de amostra. Visando a obtenção de um menor volume de fase sedimentada, a fim de garantir um maior fator de enriquecimento, foram testadas concentrações decrescentes do coagulante até que não fosse mais observada a formação de coágulos na faixa de pH em que ocorre a coagulação: pH 4,5 a 8,0, sendo esta faixa avaliada nos testes iniciais. A fim de evitar possíveis danos ao eletrodo de pH pela adsorção do coagulante, as medidas foram realizadas empregando fitas de pH (Machery-Nagel, D-52384).

Foram então adicionados volumes entre 10 e 300 μL de Tanfloc em 45 mL de água destilada, seguido de ajuste do pH com TMAH (25% m/v) até a verificação visual da turvação da solução, sendo o pH medido neste momento. Nestas condições preliminares, o volume mínimo necessário do coagulante foi de 100 μL e a coagulação foi observada em pH 6, condição mínima de pH em que foi observada a turvação, indicando a formação dos coágulos. As amostras foram agitadas manualmente, deixadas em repouso por pelo menos 20 min (etapa 2) e então centrifugadas (etapa 3) por 5 min a 5000 rpm em centrífuga Fanem, condição em que ocorreu a adequada separação de fases, sem perdas significativas da fase sedimentada durante o descarte do sobrenadante.

Esta condição preliminar foi então empregada no preparo das amostras de água destilada fortificadas isoladamente com $90 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$, Ag-PVP e Ag-Citrato.

Uma vez que o extrato obtido se apresentava na forma sólida optou-se por proceder uma digestão (etapa 4) antes da análise preliminar por ICP OES a fim de evitar possíveis danos ao equipamento. Nestes ensaios preliminares, os extratos obtidos foram digeridos com 5,00 mL de H_2O_2 (35%) em meio a 1% de HNO_3 , seguido de vigorosa agitação manual, armazenados a temperatura ambiente e então analisados por ICP OES após 24 h. Nesta condição, foi possível obter uma amostra límpida, amarelada, sem a presença de precipitado e com volume adequado para análise por ICP OES. O sobrenadante foi separado e armazenado em tubo Falcon para também ser analisado.

As recuperações obtidas com base na curva por padronização externa apresentada anteriormente (seção 5.1.3) e já descontando o sinal médio do branco, estão contidas na Tabela 5.

TABELA 5. RECUPERAÇÕES DETERMINADAS POR ICP OES PARA OS EXTRATOS E SOBRENADANTES OBTIDOS NO PREPARO DE AMOSTRA COM TANFLOC SG.

Amostra	Recuperação (%)
Ag ⁺ Extrato	97 ± 2
Ag-Citrato Extrato	82 ± 4
Ag-PVP Extrato	84 ± 2

Não foi detectada prata acima do LOQ em nenhum dos sobrenadantes analisados, indicando a elevada eficiência do coagulante na remoção tanto da prata iônica quanto das Ag-NP nas condições investigadas. Ainda, foram observadas recuperações superiores a 80%, com baixos valores de desvio padrão, mesmo empregando uma etapa de digestão dos extratos. Dada a elevada eficiência na recuperação dos analitos e considerando o volume final (V_f) das amostras (5 mL), foram obtidos fatores de pré-concentração entre 8,2 e 9,7 vezes, estimado a partir da razão entre os valores de concentração final encontrada para as amostras e a respectiva concentração inicial de acordo com o nível de fortificação. Uma vez que o volume final da amostra é bastante elevado, os fatores de pré-concentração obtidos podem ser significativamente melhorados, empregando-se menores volumes de H_2O_2 na etapa de digestão. Contudo, devido à vazão da amostra necessária para análise por ICP OES, um V_f de pelo menos 3 mL se faz necessário, a fim de possibilitar a análise das réplicas instrumentais. Este fato acaba limitando o emprego deste método de extração para análise por ICP OES de nanopartículas de Ag em amostras de interesse ambiental.

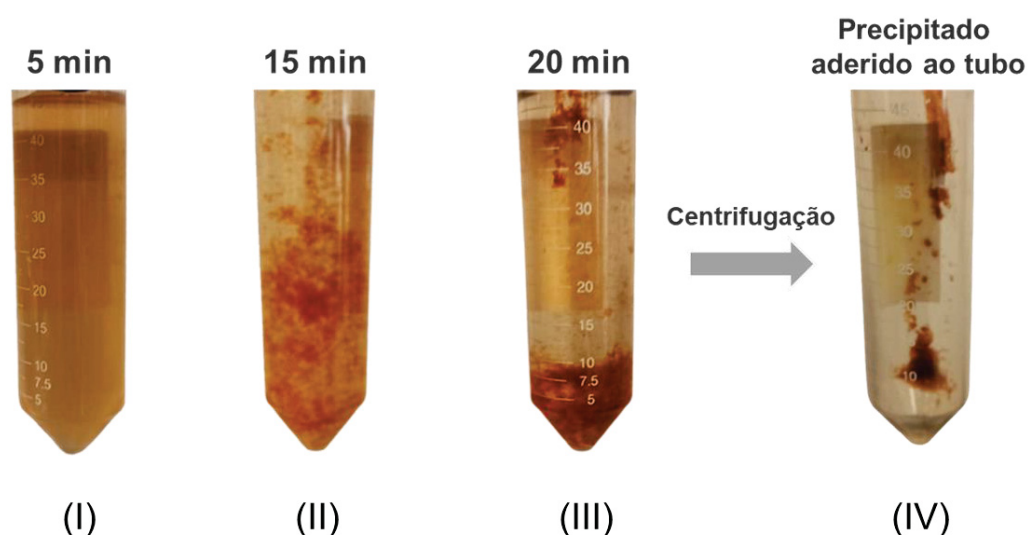
A fim de garantir maiores fatores de enriquecimento por meio de menores volumes finais dos extratos e, assim, permitir a análise dos teores de NP de prata em níveis ambientais ($ng L^{-1}$), foi investigada a potencialidade da análise dos extratos por GFAAS, cujo volume de amostra necessário é bastante reduzido comparado ao ICP OES, tipicamente igual a 20 μL .

14.2.1.2. ADAPTAÇÃO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO VISANDO A ANÁLISE DOS EXTRATOS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE

Apesar da técnica de GFAAS permitir a análise direta de suspensões, não foi possível analisar diretamente os extratos de Tanfloc SG, uma vez que o gel obtido apresentava elevada viscosidade e ficava aderido às paredes do tubo após a centrifugação, conforme

evidenciado na Figura 20. Tal aderência facilita a separação do sobrenadante, mas dificulta a coleta do extrato final. Ainda, com base na Figura 20, é possível verificar a evolução da coagulação em função do tempo de repouso após o ajuste do pH das amostras, sendo observado um adequado crescimento dos microflocos e uma sedimentação inicial com 15 min de repouso, sendo este o tempo empregado nos ensaios preliminares de otimização. A adequada otimização do tempo de coagulação foi realizada por GFAAS após o estabelecimento das condições de digestão e análise instrumental e será apresentada mais adiante neste trabalho.

FIGURA 20. CRESCIMENTO DOS FLOCOS, SEDIMENTAÇÃO E ADERÊNCIA DO EXTRATO DE TANFLOC SG AO TUBO APÓS A CENTRIFUGAÇÃO.



Assim, foram testadas diferentes diluições do extrato em água ultrapura e em meio a HNO_3 1 % (v/v). Contudo, a solubilização incompleta e a presença de sólido suspenso entopem a entrada do amostrador, afetando a repetibilidade das análises. Além disso, a absorbância integrada observada para as amostras branco sem digestão foi bastante elevada, bem como foram observadas grandes perdas do analito durante a secagem e a pirólise devido a formação de fumaça nestas etapas. Logo, uma etapa de digestão também precisou ser incluída e foi otimizada com base na digestão inicial empregada nas amostras para análise por ICP OES.

14.2.1.3. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM TANFLOC SG

Visando adaptar o método para análise por GFAAS, o procedimento de extração foi modificado, de maneira a minimizar quantidade de Tanfloc SG utilizada e,

consequentemente, de matéria orgânica no extrato final, visando minimizar o volume necessário para a digestão da amostra e possibilitando, assim, elevar os FE.

Com base nas etapas envolvidas no procedimento, descritas anteriormente na Figura 19, na etapa 1 o volume de amostra foi mantido em 45,0 mL, limitado pelo volume dos tubos Falcon empregados (50 mL). Passou a ser utilizada uma solução de Tanfloc 33,3 % (m/m), diluído em água ultrapura, a fim de minimizar erros na coleta das alíquotas com a micropipeta, devido à alta viscosidade da dispersão pura deste reagente.

Testes preliminares visando minimizar a quantidade de extrator adicionada, empregando 50, 75 e 100 μL de coagulante, revelaram que 75 μL Tanfloc SG 33,3 % (m/m) possibilitam uma coagulação relativamente rápida (cerca de 15 min, conforme apresentado anteriormente na Figura 20). O emprego de menores quantidades de Tanfloc dificultou a observação da turvação da amostra durante o ajuste do pH devido a elevada diluição, alteração esta essencial para o monitoramento da etapa de coagulação, sendo o tempo de repouso das amostras estimado a partir desta observação visual. Ainda, para volumes iguais ou inferiores a 50 μL uma floculação eficiente só foi observada após 30 a 40 min, o que elevaria significativamente o tempo de preparo das amostras.

O pH das amostras passou a ser ajustado para 6 com cerca de 280 μL de uma solução de TMAH 1,67% (m/v) uma vez que a adição de pequenas quantidades de TMAH em concentrações mais elevadas promoviam grandes mudanças no pH, afetando a velocidade e a eficiência da etapa de coagulação. O volume de TMAH 1,67% (m/v) adicionado no ajuste do pH é variável pois depende do pH inicial da amostra, que por sua vez é afetado, por exemplo, pela fortificação das amostras, tendo em vista que os padrões das diferentes formas de prata são preparados em HNO_3 1 % (v/v), a fim de evitar perdas por adsorção. Contudo, essa variação é de poucos microlitros e não afeta a pré-concentração do método, uma vez que os volumes inicial e final das amostras se mantiveram aproximadamente constantes.

14.2.1.4. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DIGESTÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM TANFLOC SG

Visando a prévia otimização da etapa de digestão (Etapa 4, Figura 19), para posterior avaliação da eficiência da extração por GFAAS, foram realizados ensaios empregando 45,0 mL de água ultrapura. As amostras foram então fortificadas diretamente no tubo de extração, a fim de minimizar as significativas perdas por adsorção, observadas ao se empregar materiais de vidro nos ensaios preliminares para as menores concentrações de Ag-NP avaliadas. Foram então adicionados 75,0 μL de Tanfloc SG 33,3 % (m/m) e o pH foi ajustado com cerca de 280 μL TMAH 1,67% (m/v) (adicionado até a observação da

turvação), seguida de agitação manual e repouso por 15 min. As amostras foram então centrifugadas por 5 min a 5000 rpm em centrífuga Fanem, sendo o sobrenadante descartado e as condições de digestão investigadas.

Devido à disponibilidade limitada de acesso ao GFAAS decorrente das medidas de distanciamento social durante a pandemia, os ensaios preliminares para a otimização da digestão foram realizados por UV-Vis. Foi utilizada uma cubeta de vidro de 0,5 cm de caminho ótico a fim de permitir a análise direta dos extratos digeridos, sem a necessidade de diluição, devido ao pequeno volume final das amostras, que foram avaliados visando elevar a pré-concentração dos analitos. Vale ressaltar que a condição de digestão foi previamente investigada a fim de garantir que as variações observadas durante a otimização do procedimento de extração/coagulação foram, de fato, decorrentes deste processo e não devido à falta de reprodutibilidade da etapa de digestão.

As amostras digeridas com volumes de H₂O₂ 35% inferiores a 5,00 mL e à temperatura ambiente, conforme realizado para as análises por ICP OES, ainda apresentavam certa quantidade de sólidos suspensos, mesmo após 24 h de repouso. Assim, a fim de diminuir o volume de peróxido mas ainda alcançar uma solubilização eficiente das amostras na etapa digestão, foram testados diferentes tempos e velocidades de agitação, bem como temperaturas de até 40 °C em shaker (Tecnal, TE 420), além da imersão dos tubos contendo os extratos e os agentes oxidantes em banho em ultrassom por até 1 h. Contudo, mesmo após 24 h de repouso, foi observada a presença de corpo de fundo nos extratos digeridos, sendo que apenas o aquecimento promovido pelo uso de radiação micro-ondas possibilitou a solubilização das amostras em um curto período de tempo.

A digestão assistida por micro-ondas é uma técnica vastamente empregada para o preparo de amostras visando a análise por técnicas espectroscópicas, como a espectrometria atômica, nos mais variados tipos de matrizes, devido a sua elevada eficiência na digestão de componentes orgânicos da matriz. Além disso, a exposição à radiação micro-ondas diminui significativamente o tempo necessário para o preparo das amostras por possibilitar uma alta taxa de aquecimento, favorecendo uma rápida degradação. Contudo, sistemas laboratoriais de digestão apresentam um elevado custo instrumental, o que encareceria significativamente a execução do método proposto neste trabalho, cujo custo acessível é uma das principais vantagens. Assim, foram realizados ensaios visando otimizar a digestão das amostras utilizando um micro-ondas doméstico (Eletrolux, ME850), a fim de minimizar o tempo de digestão, mas sem encarecer significativamente o preparo de amostra proposto. Foram avaliadas condições como potência e tempo de exposição à radiação, concentração e volume dos reagentes e distancia com relação ao centro do reator, conforme será discutido a diante.

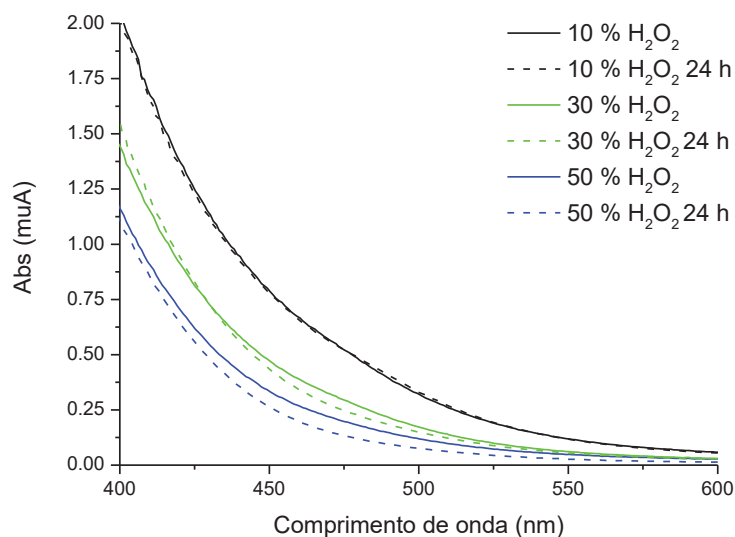
A acidificação com HNO_3 foi essencial para solubilizar os extratos, uma vez que a coagulação do Tanfloc SG é desfavorecida em meio ácido, especialmente em $\text{pH} < 6$. Além disso, somente na presença de HNO_3 foi possível obter uma solubilização/digestão eficiente, sendo observada a presença de grande quantidade de sólidos suspensos na digestão realizada apenas com H_2O_2 . Teores de ácido acima de 2% (v/v) foram avaliados em ensaios preliminares, contudo a elevada acidez residual após a digestão levava à formação de respingos durante a etapa de secagem, afetando a repetibilidade instrumental, bem como reduzindo a vida útil do tubo de grafite. Assim, a quantidade de HNO_3 empregada foi de 1 % (v/v), de maneira que o teor de ácido nos extratos, ao fim da digestão, fosse mais compatível para análise por GFAAS sem a necessidade de grandes diluições, o que levaria a uma redução no fator de pré-concentração do método.

Visando alcançar um elevado o fator de enriquecimento no método, foram testadas diferentes concentrações (10%, 30% e 50%) e volumes de H_2O_2 na etapa de digestão. Ao material coagulado obtido no processo de extração investigou-se a adição de volumes entre 0,250 mL e 2,00 de H_2O_2 em meio a 1% (v/v) de HNO_3 aos tubos Falcon contendo os extratos. Os tubos foram devidamente fechados e colocados no forno micro-ondas. Adicionalmente, diferentes potências e tempos de exposição à radiação micro-ondas foram avaliados de maneira univariada. Buscou-se uma condição capaz de evitar a ebulição e completa volatilização das amostras, o que elevava muito a pressão do sistema e provocava desde vazamentos pela tampa, até pequenas explosões dos tubos, que não são adequados para suportarem altas pressões. Além disso, no caso de maiores vazamentos do vapor, além da alteração do volume final das amostras, o que afeta os FE, ocorria também a carbonização dos extratos, mesmo em curtos intervalos de exposição. Assim, a condição capaz de promover uma digestão eficiente e reproduzível, sem perdas significativas da solução de digestão, foi: quatro ciclos de 45 s de tempo de exposição a uma potência de 70% da capacidade do equipamento. A fim de evitar o superaquecimento das amostras, e as conseqüentes perdas por vazamentos, um intervalo previamente otimizado de 2 min foi introduzido a cada ciclo de 45 s de exposição à radiação. Ainda, foi observado que o volume mínimo de H_2O_2 capaz de garantir a solubilização dos extratos sem a ocorrência de perdas significativas e eventuais carbonizações foi de 0,500 mL.

A Figura 21 contém os espectros UV-Vis obtidos no dia (após 1h de repouso para arrefecimento até temperatura ambiente) e após 24h para os extratos brancos digeridos com 0,500 mL de H_2O_2 em diferentes teores (50, 30 e 10% (v/v) de H_2O_2 em água) em meio a 1% (v/v) de HNO_3 . Uma vez que foi utilizada cubeta de vidro e não foram realizadas diluições, a fim de avaliar a estabilidade dos extratos brutos, os espectros estão apresentados apenas para comprimentos de onda acima de 400 nm, em que não foi observada saturação do sinal em função da alta absorção da amostra. Vale ressaltar que

não foi observada uma efetiva solubilização das amostras ao empregar concentrações de H_2O_2 inferiores a 10% (v/v), sendo observada a presença de corpo de fundo.

FIGURA 21. ESPECTROS UV-VIS OBTIDOS PARA EXTRATOS DE TANFLOC SG DIGERIDOS POR MICROONDAS E COM DIFERENTES TEORES DE H_2O_2 .



Uma maior eficiência na decomposição da matéria orgânica foi observada empregando H_2O_2 30 e 50% (v/v), evidenciada pela maior clarificação dos extratos e conforme o deslocamento hipsocrômico (para o azul) da banda de absorção no UV-Vis, o que pode estar associado à quebra dos grupos cromóforos do polímero e à formação de compostos orgânicos de cadeia menor que absorvem na região UV.

Contudo, foi observada menor estabilidade destes extratos ao armazenamento, uma vez que o excesso de reagente continuava promovendo a degradação das amostras mesmo após cessar a interação com a radiação, de maneira que maiores diferenças foram percebidas visualmente nas amostras, que se apresentavam bem mais clarificadas após 24 h de armazenamento a temperatura ambiente (Figura 21).

Ainda, após uma semana, estas amostras (empregando H_2O_2 30 e 50% v/v) apresentaram-se completamente límpidas e incolores, indicando a continuidade da reação de digestão por um longo período de tempo. Tal instabilidade poderia afetar a reprodutibilidade do método. Além disso, o excesso de agentes oxidantes promoveu altos sinais transientes para as amostras branco, sem fortificação, e maior desgaste do tubo de grafite nas análises preliminares por GFAAS, diminuindo a vida útil e encarecendo assim o custo das análises.

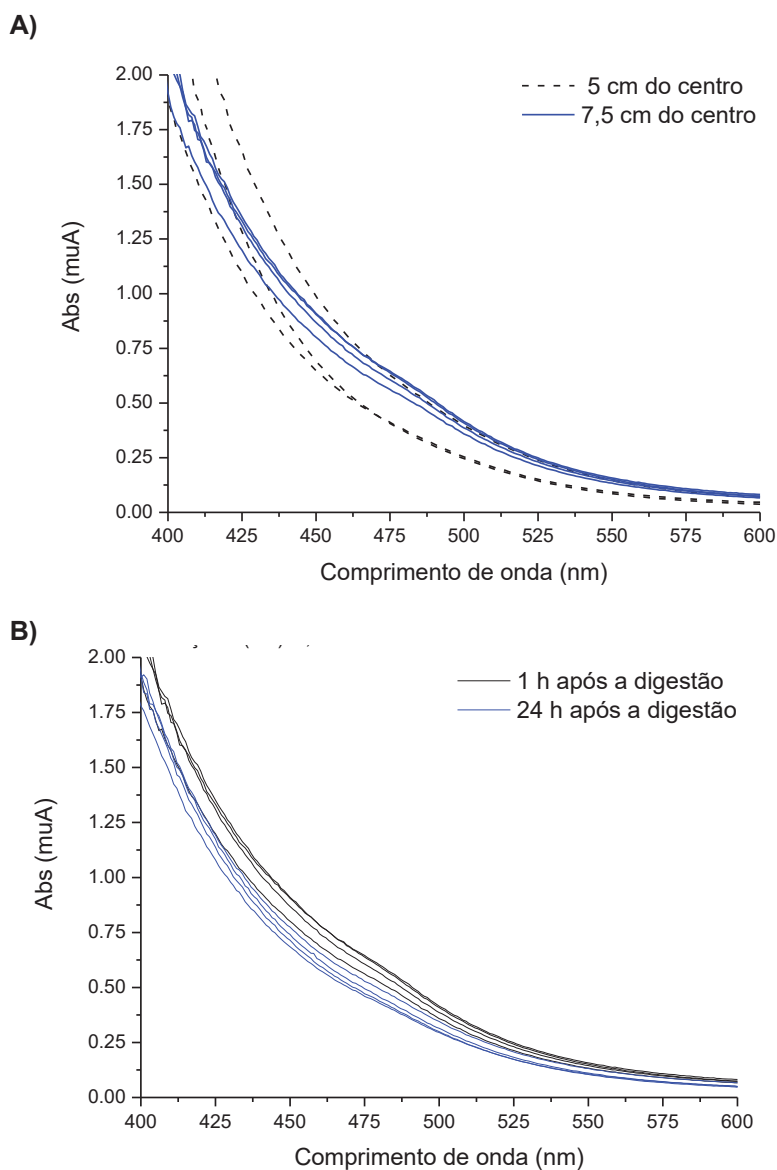
Logo, optou-se por realizar a digestão com soluções aquosas de H_2O_2 10% (v/v) em meio a HNO_3 1% (v/v), uma vez que maior estabilidade ao armazenamento foi observada após 24h, conforme espectros da Figura 21, indicando o consumo efetivo dos reagentes durante o aquecimento por micro-ondas. Nesta condição foi possível obter extratos

límpidos, sem corpo de fundo, principal objetivo desta etapa de digestão, a fim de evitar entupimentos durante a amostragem em GFAAS. Apesar desta condição não garantir a completa clarificação das amostras, os extratos obtidos não apresentaram precipitado residual, bem como o sinal do branco em GFAAS não se mostrou muito elevado.

A posição das amostras com relação ao centro do micro-ondas também foi investigada, a fim de garantir um aquecimento homogêneo e a consequente repetibilidade dos resultados. Os ensaios foram realizados em quadruplicata para duas distâncias diferentes do centro do forno (5 e 7,5 cm), conforme permitido pela estante de polipropileno para tubos Falcon disponível no laboratório. No próprio tubo utilizado para a extração foram adicionados aos extratos 0,500 mL de H_2O_2 10% (v/v) em meio a 1% de HNO_3 10% (v/v), com o auxílio de micropipetas volumétricas. Os tubos foram devidamente tampados e agitados manualmente, a fim de que todo o extrato presente nas paredes fosse levado ao fundo para melhor contato com a solução de digestão. Os extratos foram então submetidos a quatro ciclos de aquecimento, empregando potência de 70% por 45 s, além de 2 minutos de intervalo entre cada ciclo, totalizando 3 min de exposição à radiação, e 9 minutos para toda a etapa de digestão. Na Figura 22 (A) estão apresentados os espectros UV-Vis obtidos para as diferentes réplicas analisadas.

A partir dos espectros apresentados na Figura 22 A, é possível verificar uma maior repetibilidade dos resultados entre as amostras digeridas a 7,5 cm do centro. Isso se deve a um superaquecimento das amostras posicionadas a 5 cm, o que promoveu a completa vaporização, mesmo com a introdução dos intervalos de 2 minutos visando a redução da pressão de vapor no interior dos tubos antes de um novo ciclo de aquecimento.

FIGURA 22. ESPECTROS UV-Vis OBTIDOS PARA OS EXTRATOS DIGERIDOS À A) DISTÂNCIAS DE 5 E 7,5 cm DO CENTRO DO FORNO MICRO-ONDAS; B) A 7,5 cm DO CENTRO APÓS 1 E 24 h.



Assim, foram observados vazamentos, bem como a carbonização de uma das amostras digeridas a 5 cm do centro, impossibilitando a coleta de seu espectro. A princípio, menores temperaturas foram alcançadas na maior distância do centro, o que evitou a ebulição das amostras, bem como perdas por volatilização. Além disso, o manuseio dos tubos submetidos à digestão a 7,5 cm do centro ao fim do processo foi mais fácil, devido à menor temperatura final alcançada.

Ainda, não foram observadas grandes diferenças espectrais após o resfriamento das amostras (1h) e após 24h da digestão, conforme Figura 22 B. Assim, optou-se por realizar a digestão a 7,5 cm do centro do forno, tendo sido desenvolvida uma estante circular de polipropileno com capacidade para suportar até 10 tubos por vez no reator (posicionados

a 7,5 cm do centro) a fim de elevar a frequência analítica ao garantir a digestão simultânea de um maior número de amostras.

Vale ressaltar que, apesar da menor temperatura atingida a 7,5 cm do centro do reator, o aquecimento promovido foi suficiente para garantir a superação da barreira energética da reação de digestão, garantindo uma eficaz remoção da matéria orgânica bem como desejável a obtenção de um extrato clarificado sem a presença de corpo de fundo.

Os extratos digeridos foram transferidos para microtubos de polipropileno de 2 mL para posterior análise por GFAAS, e o volume final obtido, medido com micro seringa, foi de $0,75 \pm 0,05$ mL ($n = 10$).

Após o estabelecimento preliminar das condições de digestão por espectroscopia UV-Vis, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 empregando as mesmas condições de extração até então utilizadas, sendo as amostras digeridas posteriormente analisadas por GFAAS. A resposta avaliada no presente planejamento foi a absorbância integrada da amostra fortificada descontando-se o sinal do respectivo branco, obtido nas mesmas condições e os valores estimados para cada experimento estão apresentados na Tabela 6.

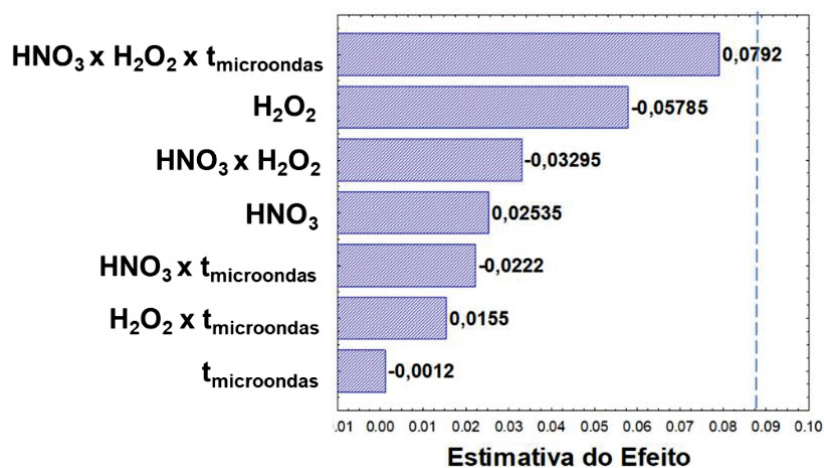
TABELA 6. RESPOSTAS OBTIDAS POR GFAAS PARA CADA NÍVEL AVALIADO NO PLANEJAMENTO 2^3 .

Ensaio	Variáveis			$Abs_{amostra} - Abs_{branco}$	DPR instrumental (%)
	%HNO ₃ (v/v)	%H ₂ O ₂ (v/v)	Tempo de exposição à radiação micro-ondas (s)		
1	-	-	-	0,7081	23
2	+	-	-	0,8678	12
3	-	+	-	0,7469	11
4*	+	+	-	0,6823	8
5	-	-	+	0,7928	9
6	+	-	+	0,7497	8
7	-	+	+	0,7042	8
8*	+	+	+	0,7536	8
PC*	0	0	0	0,6740	7
PC*	0	0	0	0,7151	7
PC*	0	0	0	0,6946	7
<i>Média do PC</i>				0,6947	-
<i>Estimativa do desvio padrão (s) do PC</i>				0,02055	-
<i>s*t (gl=2, 95%)</i>				0,0884	-

* Condições que possibilitaram a obtenção de extratos digeridos límpidos, sem a presença visível de precipitado residual.

Com base na resposta obtida ($Abs_{amostra} - Abs_{branco}$) foram estimados os efeitos principais e de interação do planejamento, e os valores obtidos estão apresentados na Figura 23.

FIGURA 23. ESTIMATIVAS DOS EFEITOS DO PLANEJAMENTO 2^3 PARA OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO.



Considerando a estimativa do desvio do ponto central (s) associada ao $t_{student}$ para 2 graus de liberdade com 95% de confiança (valor indicado pela linha tracejada na Figura 23), nenhum dos efeitos foi significativo. Assim, é possível realizar a interpretação dos resultados de maneira individual.

Apenas as condições empregadas no ponto central e nos ensaios 4 e 8 (destacadas com * na Tabela 6) permitiram a obtenção de extratos digeridos límpidos, sem a presença visível de precipitado residual.

Devido a maior quantidade de reagentes e maior tempo de microondas as condições empregadas nos ensaios 4 e 8 levaram ao superaquecimento das amostras e consequentes vazamentos durante a exposição à radiação. Ainda, foram observados espirros de amostra durante a etapa de secagem dos extratos na análise por GFAAS, decorrentes da baixa viscosidade e do elevado teor de ácido e H_2O_2 residuais presentes nas amostras obtidas nestas condições.

Assim, optou-se por manter as condições previamente estabelecidas nos ensaios por UV-Vis, ou seja, àquelas empregadas no PC, que se apresentam mais brandas e permitem a digestão dos extratos sem riscos de superaquecimento/vazamentos, nem grandes excessos de reagente capazes de agredirem o tubo de grafite e minimizar sua vida útil. Ainda, nesta condição foi possível solubilizar adequadamente os extratos, que se apresentaram mais homogêneos, minimizando assim erros na amostragem, bem como garantiram etapas de pirólise e atomização mais reprodutíveis. Com isso, foram alcançados os menores valores de DPR instrumental entre as diferentes injeções de uma

mesma amostra (conforme Tabela 6) bem como observados baixos sinais para as amostras branco e para os sinais de fundo, indicando uma adequada eliminação da matriz pela associação entre a digestão e a etapa de pirólise em GFAAS, ainda que o procedimento de digestão/solubilização proposto permita apenas a remoção parcial da matéria orgânica das amostras.

Otimizada a digestão, de maneira a garantir a confiabilidade das medidas instrumentais, foram realizados ensaios para aperfeiçoar o método em GFAAS visando a análise dos extratos digeridos, bem como otimizar as demais condições da etapa de extração, a exemplo do tempo de coagulação.

1.4.2.1.5. PARÂMETROS INSTRUMENTAIS PARA AS DETERMINAÇÕES POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE

O método GFAAS foi otimizado com base na literatura (SONGSILAWAT; SHIOWATANA; SIRIPINYANOND, 2011). Devido à viscosidade da amostra digerida foi necessária a introdução de uma etapa de secagem mais longa, a fim de evitar perdas da amostra devido à formação de respingos durante a secagem da matriz.

O uso do TMAH é conhecido por garantir a adequada sensibilidade instrumental e por promover menor agressão ao tubo de grafite, garantindo maior durabilidade, frente a condições de preparo em meio ácido (NÓBREGA et al., 2006). Com isso em vista, foram adicionados 22,5 µL de TMAH 25% (m/v) aos extratos finais (após processo de digestão) antes da análise por GFAAS, a fim de diminuir a acidez das amostras, que aparentemente estava corroendo as paredes do tubo de grafite, bem como dificultava a secagem devido à formação de respingos. O volume de TMAH adicionado foi o mínimo necessário para promover um leve aumento de pH da amostra sem que ocorresse a formação de material particulado, uma vez que o Tanfloc não foi completamente mineralizado na etapa de digestão. Esta etapa de correção do pH do meio permitiu uma condição adequada de análise por GFAAS sem a necessidade de diluição dos extratos para minimizar a acidez, o que afetaria significativamente o fator de pré-concentração do método proposto.

Nesta condição o pH das amostras passou de zero para 2 (determinado com fita de pH), e não foi mais observado o desgaste do tubo nem a formação de respingos nas análises, o que aumentou significativamente a vida útil do tubo de grafite, permitindo a realização de 650-700 queimas por tubo.

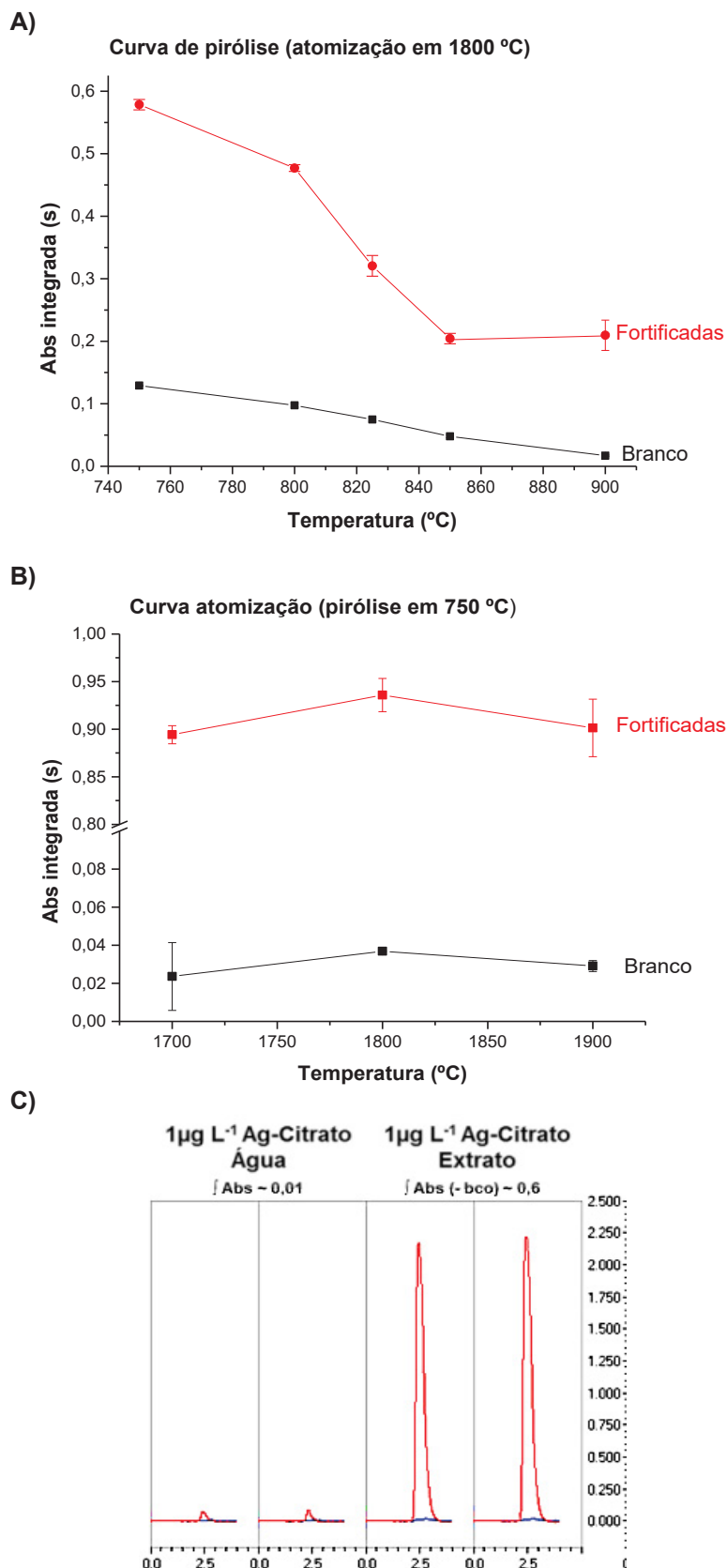
Para esta etapa de otimização do método, soluções trabalho foram preparadas pela diluição em HNO₃ 1% (v/v) de nanopartículas de Ag-Citrato comerciais de concentração e tamanho conhecido (dispersão de 0,02 mg L⁻¹ em HNO₃ 2% (v/v), 50 nm, Sigma Aldrich).

Estas soluções trabalho foram então empregadas como padrões na fortificação das amostras aquosas e dos extratos digeridos.

Foram então preparados extratos em quadruplicata a partir de amostras aquosas branco, sem fortificação, empregando as condições estabelecidas na seção anterior. Os extratos digeridos foram então utilizados para o preparo de dois *pools* de amostra: um empregado como amostra branco e o outro fortificado com Ag-Citrato. A curva de atomização foi obtida a partir da fortificação dos extratos com $60,0 \mu\text{g L}^{-1}$, e a de pirólise com $40,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Nestes ensaios, a fortificação foi realizada após a digestão, a fim de garantir a presença de uma quantidade conhecida de prata nas amostras, tendo em vista que a exatidão e a precisão do método global ainda não eram bem conhecidas. Ainda, as amostras para GFAAS foram sempre preparadas com um dia de antecedência, a fim de maximizar o tempo de trabalho instrumental. Estes extratos foram então utilizados na otimização das temperaturas de pirólise e atomização em GFAAS.

A Figura 24 A contém as curvas de pirólise e atomização obtidas para os extratos digeridos com e sem a fortificação com Ag-Citrato.

FIGURA 24. A) CURVAS DE PIRÓLISE E B) ATOMIZAÇÃO OBTIDAS PARA Ag-CITRATO. C) SINAIS TRANSIENTES PARA Ag-CITRATO $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ EM ÁGUA ULTRAPURA E NOS EXTRATOS DIGERIDOS, OBTIDOS A PARTIR DE AMOSTRAS FORTIFICADAS COM $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ ANTES DA EXTRAÇÃO EMPREGANDO AS CONDIÇÕES OTIMIZADAS



É possível verificar na Figura 24 (A) que há uma menor intensidade do sinal da amostra sem fortificação (em preto) com o aumento da temperatura de pirólise, evidenciando uma maior eficiência de remoção da matéria orgânica residual, não eliminada na etapa digestão, em maiores temperaturas, conforme o esperado. Contudo, elevadas temperaturas de pirólise também promoveram a perda da prata nas amostras fortificadas (curva em vermelho), evidenciando uma inadequada separação térmica entre o analito e a matriz. Assim, dentre as condições avaliadas, o emprego da pirólise a 750°C garantiu os melhores resultados, sendo observados baixos desvios, bem como a maior diferença entre as absorvâncias médias integradas entre as amostras com e sem fortificação.

Já na análise da curva de atomização, avaliada fixando-se a pirólise em 750°C, é possível observar que o máximo sinal analítico foi obtido para a amostra fortificada ao empregar 1800°C, não sendo observadas grandes diferenças na atomização da amostra branco para nenhuma das temperaturas avaliadas, indicando mais uma vez a eficiência adequada da remoção dos concomitantes da matriz durante a etapa de pirólise à 750°C. Ainda, maiores temperaturas de atomização levaram a um aumento no desvio padrão nas amostras fortificadas, possivelmente devido a perdas do analito por volatilização decorrente da temperatura mais elevada, o que contribuiu também para uma queda na média do sinal analítico. Assim, foram escolhidas a pirólise a 750°C e a atomização a 1800°C como as melhores condições de análise por GFAAS, a fim de garantir uma maior sensibilidade do método.

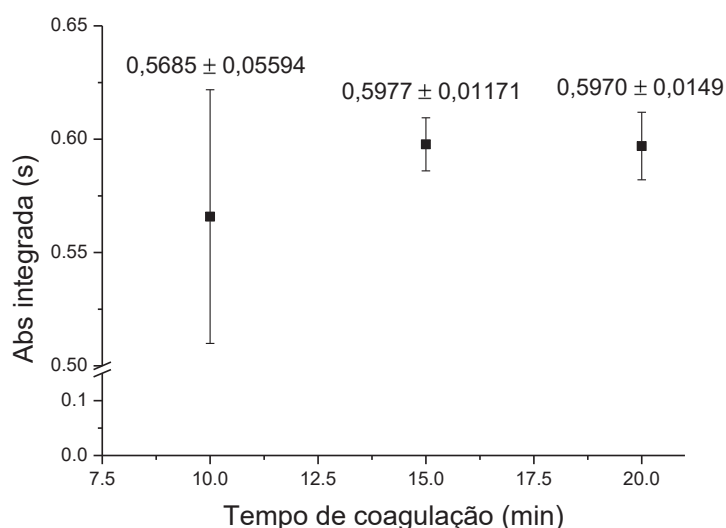
Na Figura 24 C estão apresentados os sinais transientes obtidos antes e após o procedimento de extração/digestão para as amostras aquosas de Ag-Citrato fortificadas com 1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ antes da extração. Os extratos foram analisados por GFAAS nas condições de pirólise e atomização estabelecidas anteriormente. É possível observar um ganho expressivo no sinal analítico após a extração, próximo a 60 vezes, já descontando o sinal do extrato branco, sendo que a absorvância integrada passou de 0,01 para 0,60 após a pré-concentração. Ainda, é possível verificar o baixo sinal de fundo e sinais transientes simétricos e bem definidos, indicando uma adequada decomposição da matriz durante a pirólise e uma etapa de atomização bem sucedida.

Estabelecida a condição de digestão e de análise por GFAAS, foram então otimizadas as demais condições de extração. Ensaios preliminares demonstraram que o tempo de centrifugação e a força g do equipamento são importantes para a adequada recuperação da prata. Em função disto, duas centrífugas foram utilizadas, sendo elas: a centrífuga Fanem (modelo Excelsa II 206 MP, força g a 5000 rpm estimada em cerca de 5000 x g) e a centrífuga Solab (modelo SL-700, força g em 6000 rpm estimada em cerca de 4677 x g). Dessa forma, o tempo necessário para a centrifugação das amostras na centrífuga Fanem foi de 5 min a 5000 rpm, e para a centrífuga Solab foi de 10 min a 6000 rpm. Nestas

condições foi possível garantir a adequada sedimentação dos coágulos, de maneira a possibilitar a decantação sem perda significativa do precipitado coloidal.

Três diferentes tempos de coagulação (10, 15 e 20 min) foram avaliados no preparo de amostras aquosas fortificadas com $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ag-Citrato antes da extração (Sigma Aldrich, 50 nm). As amostras foram submetidas à extração e à digestão anteriormente otimizadas, sendo os ensaios realizados em triplicata. A Figura 25 contém as absorvâncias integradas médias, já descontadas do sinal do respectivo branco ($n = 3$), obtidas para cada condição.

FIGURA 25. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE Ag-CITRATO POR GFAAS.



A partir desses ensaios é possível verificar que uma menor eficiência média de extração e baixa precisão foram obtidas com 10 min de coagulação. Ainda, foi observado um ganho em precisão com o aumento do tempo de coagulação, decorrente do crescimento adequado dos flocos, o que facilita a precipitação durante a centrifugação e consequentemente, garante a eficiência de extração e a repetibilidade do método. A fim de minimizar o tempo de extração, foi escolhida a coagulação por 15 min como condição ideal, por apresentar elevado sinal analítico e baixo desvio padrão. Tempos de coagulação superiores a 15 min não apresentaram grandes variações no sinal analítico para as amostras fortificadas, o que pode indicar o estabelecimento do equilíbrio na distribuição do analito entre as fases extratora e sobrenadante.

Após as otimizações apresentadas, foi possível estabelecer um método de preparo de amostra, esquematizado anteriormente na Figura 4, que foi então empregado nas etapas subsequentes de validação por GFAAS. Nestas condições de preparo e análise a durabilidade do tubo de grafite foi de cerca de 700 queimas.

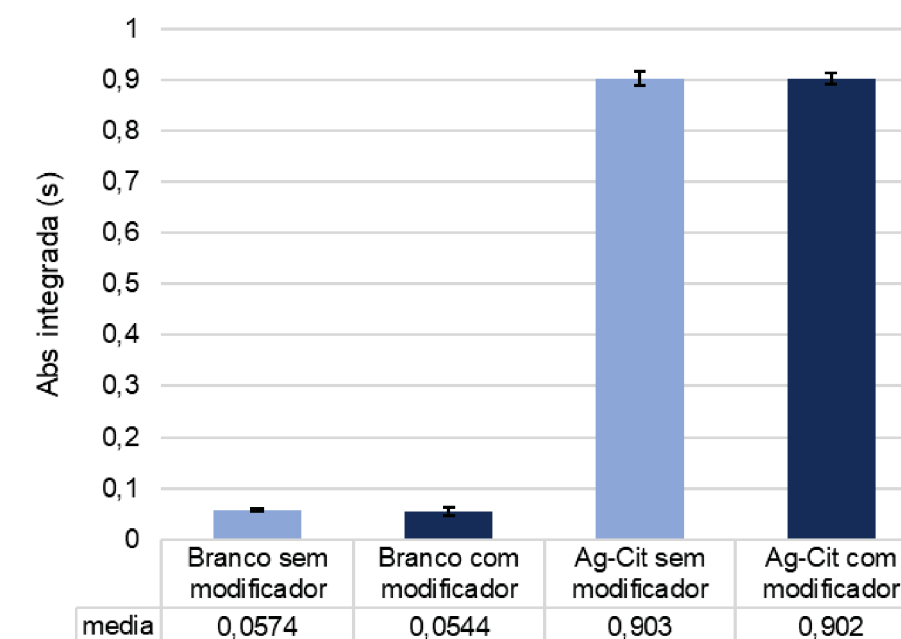
I.4.2.1.6. AVALIAÇÃO DO USO DE AGENTE MODIFICADOR

Modificadores químicos em GFAAS são vastamente utilizados para alterar a volatilidade do analito ou da matriz, de maneira a garantir a adequada remoção dos concomitantes da matriz durante a pirólise, evitando perdas significativas do analito nesta etapa. Eles podem ser introduzidos durante as análises, no caso de modificadores convencionais, ou ainda depositados nas paredes do tubo de grafite (permanentes), atuando de maneira prolongada. O modificador universal, composto pela mistura de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, apresenta elevada capacidade em atuar na melhoria da qualidade das separação térmica analito/matriz para diversos elementos.

A fim de avaliar a influência do uso de modificador de matriz na análise de prata por GFAAS nos extratos obtidos com Tanfloc SG, foram realizados ensaios preliminares utilizando o modificador universal Pd (5 μg) + Mg (3 μg). Foram então preparados dois *pools* de amostra, a partir de extratos digeridos obtidos a partir de quatro amostras de água ultrapura sem fortificação, sendo um dos *pools* empregado como branco e o outro fortificado com 60,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Ag-Citrato (Sigma Aldrich, 50 nm).

Os extratos obtidos, com e sem fortificação, foram analisados por GFAAS nas mesmas condições estabelecidas anteriormente, na presença e na ausência de 5 μL de modificador Pd+Mg, e a comparação entre as absorvâncias integradas obtidas estão apresentadas na Figura 26.

FIGURA 26. AVALIAÇÃO DO USO DO AGENTE MODIFICADOR Pd+Mg.



De acordo com o teste t de student considerando variâncias equivalentes, com 95% de confiança, não foram observadas diferenças significativas tanto entre as amostras branco com e sem modificador ($t_{\text{calculado}}=0,595 < t_{\text{tabelado (4 gl, 95\%)}} = 2,78$; $F_{\text{calculado}} = 3,84 < F_{\text{tabelado, fgl 2,2}} = 19$), quanto entre as amostras fortificadas com Ag-Citrato ($t_{\text{calculado}} = 0,944 < t_{\text{tabelado (4 gl, 95\%)}} = 2,78$; $F_{\text{calculado}} = 1,33 < F_{\text{tabelado, fgl 2,2}} = 19$) (SKOOG et al., 2009).

Assim, é possível concluir que a presença do modificador parece não promover ganho significativo ao sinal analítico. Ainda, mesmo na sua ausência foram observados resultados similares indicando que a separação termoquímica entre o analito e a matriz na etapa de pirólise se dá de forma efetiva, sem perdas significativas do analito (AMAIS; ROCHA; NOBREGA, 2016).

Além disso, na ausência do modificador o background observado foi bastante baixo ($<0,0015$), não tendo sido observadas grandes alterações quando o modificador foi adicionado.

Logo, como a presença do modificador não trouxe ganhos significativos no sinal analítico e sua adição poderia adicionar uma etapa desnecessária, podendo incluir novas fontes de erro experimental, bem como encarecer as análises, foi dada sequência aos ensaios de validação do método sem a adição deste agente.

1.4.2.1.7. CURVA ANALÍTICA DE Ag-CITRATO POR PADRONIZAÇÃO EXTERNA

Nanopartículas de Ag-Citrato comerciais (Sigma Aldrich, 50 nm) foram escolhidas como modelo na avaliação da eficiência do método proposto. Para tanto, uma curva analítica foi preparada em HNO₃ 1% (v/v) em sete níveis ($n = 3$) entre 1,00 e 60,0 µg L⁻¹, e analisada por GFAAS nas condições instrumentais anteriormente otimizadas, e os principais parâmetros analíticos obtidos estão apresentados na Tabela 7.

TABELA 7. PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO PARA A DETERMINAÇÃO DE Ag-CITRATO POR GFAAS POR PADRONIZAÇÃO EXTERNA.

Parâmetros	Ag (328,1 nm)
Coefficiente Linear (a)	0,00573
Coefficiente Angular (b / s µg ⁻¹ L)	0,0153
Coefficiente de correlação linear (r)	0,99987
LOD (µg L ⁻¹)	0,465
LOQ (µg L ⁻¹)	1,54

De acordo com os parâmetros avaliados, é possível verificar uma adequada linearidade para a determinação de prata, com o coeficiente de correlação linear superior a 0,990 (ANVISA, 2017). Ainda, os valores de LOD e LOQ estimados foram inferiores aos alcançados por Songsilawat et al (2011), que obtiveram valores instrumentais de LOD igual

a 2,6 e LOQ de 8,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ na determinação de prata iônica, reforçando que até então nenhuma etapa de pré-concentração foi realizada.

1.4.2.1.8. CURVA ANALÍTICA DE Ag-CITRATO POR *MATRIX MATCHED* E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR COAGULAÇÃO

Uma curva analítica de Ag-Citrato (Sigma Aldrich, 50 nm) foi preparada por *matrix matched* em cinco níveis de fortificação em triplicata, sendo as amostras fortificadas entre 0,05 e 1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ antes da realização da extração e então passando por todo o procedimento de preparo e análise previamente otimizados. Os extratos digeridos foram analisados por GFAAS nas condições anteriormente otimizadas e os principais parâmetros de desempenho analítico obtidos, já descontado o valor da média dos extratos branco ($n = 3$), estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8. PRINCIPAIS PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE Ag-CITRATO POR GFAAS VIA *MATRIX MATCHED*.

Parâmetros	Ag (328,1 nm)
Coefficiente Linear (a)	0,02515
Coefficiente Angular (b / s $\mu\text{g}^{-1} \text{L}$)	0,6345
Coefficiente de correlação linear (r)	0,99998
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,0101
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,0337

Comparando-se os coeficientes angulares obtidos para a curva em HNO_3 1% (v/v) ($b=0,0153$) com os obtidos pelo método global ($b=0,6345$), é possível evidenciar um aumento de sensibilidade de 41,5 vezes. Esse valor corresponde ao fator de enriquecimento real do método, estimado a partir da razão entre os coeficientes angulares das curvas obtidas com e sem pré-concentração. O FE esperado era de cerca de 60 vezes, levando em consideração os volumes iniciais (45,0 mL) e finais das amostras (0,750 mL). Isso corresponde a uma eficiência média de extração de 70%, considerando as concentrações de prata dos extratos da curva de *matrix matched* estimadas a partir da curva analítica obtida em HNO_3 1% (v/v).

Essa eficiência de extração próxima a 70% é ligeiramente inferior à obtida por ICP OES (Tabela 5) possivelmente devido a perdas na etapa adicional de digestão por micro-ondas, uma vez que os tubos Falcon não são completamente vedados. Além disso, o volume final dos extratos, bem como os níveis de fortificação avaliados são bastante inferiores aos investigados por ICP OES, de maneira que perdas por adsorção de prata nos materiais utilizados no decorrer do preparo das amostras podem ter mais influência nestas menores concentrações. Contudo, o método apresenta LOQ muito inferior ao obtido no estudo por

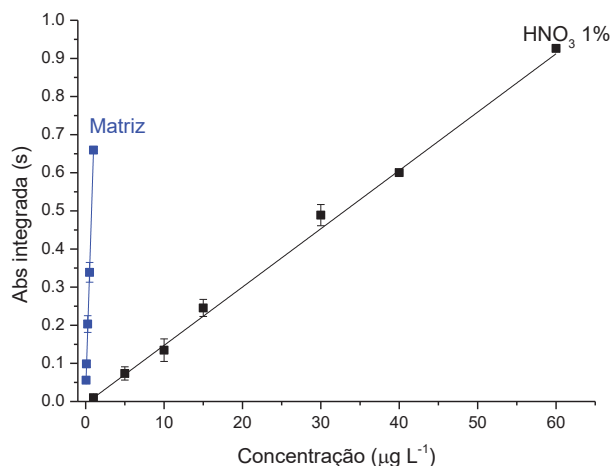
ICP OES ($0,48 \mu\text{g L}^{-1}$), bem como por GFAAS sem a aplicação do método de pré-concentração proposto ($1,54 \mu\text{g L}^{-1}$), conforme os resultados obtidos para as curvas de padronização externa.

Vale ressaltar que o valor de LOQ alcançado ainda poderia ser melhorado com o uso de instrumentação mais sensível, a exemplo de equipamentos de GFAAS equipados com corretor de fundo por efeito Zeeman e com o uso de tubos de grafite com plataforma de L'vov, que garantem uma atomização mais reprodutível.

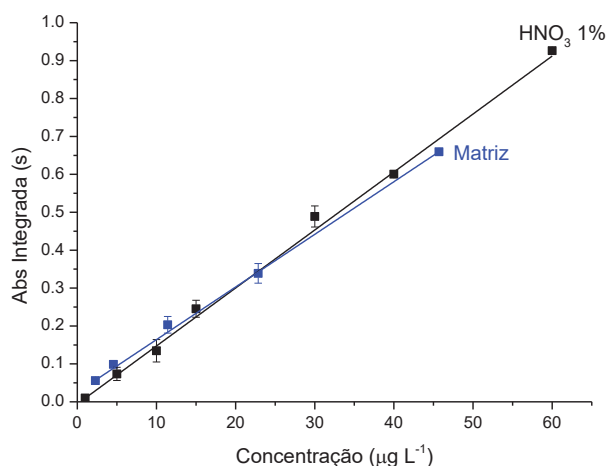
Comparando-se as curvas obtidas via GFAAS (Figura 27 A), é possível evidenciar o ganho significativo em sensibilidade ao empregar o método de pré-concentração. Ainda, corrigindo as concentrações nominais da curva de *matrix matched* pelo fator de enriquecimento real (Figura 27 B) ($C_{fortificação} \times FE_{real}$), é possível verificar a ausência de um efeito de matriz significativo, evidenciado pelo paralelismo das retas, de acordo com a recomendação da (ANVISA, 2017).

FIGURA 27. A) CURVAS DE Ag-CITRATO OBTIDAS POR MATRIX MATCHED E EM HNO₃ 1% (v/v); B) COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE Ag-CITRATO EM HNO₃ 1% (v/v) E POR MATRIX MATCHED CORRIGIDO PELO FATOR DE ENRIQUECIMENTO REAL.

A)



B)



Logo, é possível inferir que a curva por padronização externa em HNO₃ 1% (v/v), obtida para Ag-Citrato, pode ser empregada para a quantificação dos extratos por GFAAS, desde que descontada a média do branco e considerada a pré-concentração e a eficiência de extração do método global.

De acordo com o teste de Grubbs não foram observadas amostras anômalas em nenhum dos pontos das curvas avaliadas por padronização externa (Tabela A 1, anexo 1) e por *matrix matched* (Tabela A 2, anexo 1), com valores de $G_{\text{calculado}}$ (equação 3) inferiores ao $G_{\text{crítico}}$ (1,115, $n = 3$) com 95% de confiança.

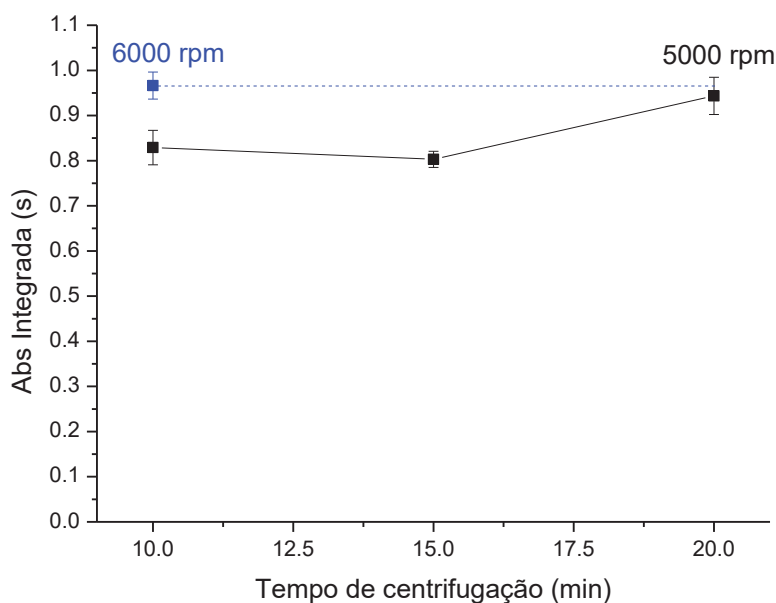
$$G = \frac{\text{valor suspeito} - \text{média}}{\text{desvio}} \quad (\text{equação 3})$$

Ainda, os resíduos se mostraram visualmente aleatórios e homocedásticos de acordo com o teste de Cochran, com valores de $C_{\text{calculado}}$ (equação 4) inferiores ao respectivo $C_{\text{crítico}}$ com 95% de confiança, que foram iguais a 0,3046 ($C_{\text{crítico}}=0,5612$; $n = 3$ e $k = 7$. Tabela A 3, anexo 1) para a padronização externa e 0,6694 ($C_{\text{crítico}}=0,6838$; $n = 3$ e $k = 5$. Tabela A 4, anexo 1) para a curva obtida por *matrix matched*.

$$C = \frac{S^2_{\text{máx}}}{\sum_i^n S_i^2} = \frac{\text{maior variância em } y}{\text{soma das variâncias em } y} \quad (\text{equação 4})$$

Devido a um erro no *cooler* observado com frequência na centrífuga Solab, foi necessário reduzir a velocidade máxima para 5000 rpm. Em função desta modificação, foram realizados ensaios a fim de avaliar o tempo necessário para a centrifugação nesta nova velocidade. As amostras foram fortificadas com 1,00 µg L⁻¹ de Ag-Citrato antes da extração, passando pelas mesmas condições de coagulação e digestão previamente otimizadas e empregadas na construção da curva por *matrix matched*, variando apenas a velocidade e o tempo de centrifugação. Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores de absorbância integrada obtidos estão apresentados na Figura 28.

FIGURA 28. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CENTRIFUGAÇÃO NOS SINAIS OBTIDOS POR GFAAS PARA AS AMOSTRAS FORTIFICADAS COM Ag-CITRATO ANTES DA EXTRAÇÃO.



É possível verificar que com 20 min de centrifugação a 5000 rpm (3248 g) foi possível alcançar resultados semelhantes aos obtidos ao empregar a velocidade de 6000 rpm (4677 x g) por 10 min para as amostras fortificadas, o que foi confirmado por meio do teste F ($F_{calculado} = 1,89 < F_{tabelado, fgl\ 2,2} = 19$) e pelo teste $t_{student}$ ($t_{calculado} = 0,774 < t_{tabelado, gl\ 4} = 2,78$), indicando que não há diferença significativa entre as duas variâncias e médias com 95% de confiança (SKOOG et al., 2009).

É possível perceber, ainda, que com a menor velocidade de rotação maiores alterações na eficiência de extração foram observadas para as amostras. Isso se deve a perda de material particulado finamente distribuído durante a decantação do sobrenadante, especialmente em tempos inferiores a 20 min. Esse material torna o sobrenadante levemente amarelado, e parece ser importante na recuperação das diferentes formas de prata, conforme observado em ensaios preliminares. Assim, optou-se por continuar a validação do método empregando-se a centrifugação por 20 min a 5000 rpm. Vale ressaltar que com o emprego de centrífugas mais potentes esse tempo de centrifugação pode ser reduzido a poucos minutos. Contudo, deve-se atentar à resistência dos tubos de polipropileno a elevadas forças g, estando estes propensos a rupturas durante a centrifugação dependendo da especificação do fabricante.

Foram então realizados ensaios de adição e recuperação visando avaliar a exatidão do método proposto. Os ensaios foram realizados por meio da extração de triplicatas independentes em amostras de água ultrapura fortificadas em três níveis de concentração (baixa, média e alta) a fim de avaliar a exatidão ao longo da faixa linear obtida por *matrix*

matched para Ag-Citrato, conforme recomendação da (ANVISA, 2017). Neste primeiro momento os ensaios foram realizados na ausência de interferentes, sendo que a avaliação destes parâmetros em amostras aquosas reais, para fins comparativos, será apresentada mais adiante neste trabalho.

A exatidão do método foi avaliada em termos de recuperação e a precisão foi investigada em por meio dos valores de desvio padrão relativo (DPR em %) obtidos nos ensaios de repetibilidade, realizados no mesmo dia (intra-dia) e de precisão intermediária, com ensaios realizados em dois dias diferentes (inter-dia), conforme recomendação da (ANVISA, 2017). Os valores de exatidão e precisão obtidos estão apresentados na Tabela 9.

TABELA 9. ENSAIOS DE EXATIDÃO ($n = 3$) E PRECISÃO INTRA E INTER-DIA PARA Ag-CITRATO, Ag-PVP E Ag⁺ OBTIDOS COM BASE NA CURVA POR MATRIX MATCHED.

Analito	Concentração Esperada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração Obtida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%) ($n=3$)	DPR (%)	
				Intra-dia ($n=3$)	Inter-dia ($n=6$)
Ag-Citrato	1,00	$1,01 \pm 0,0309$	101 ± 3	2	2
	0,500	$0,437 \pm 0,0498$	87 ± 1	1	6
	0,250	$0,279 \pm 0,0226$	112 ± 9	8	11
Ag-PVP	1,00	$1,03 \pm 0,0770$	103 ± 8	8	-
	0,514	$0,566 \pm 0,0162$	110 ± 3	3	-
	0,274	$0,321 \pm 0,0364$	117 ± 13	11	-
Ag ⁺	1,00	$0,996 \pm 0,0229$	101 ± 2	2	-
	0,500	$0,516 \pm 0,0444$	103 ± 9	9	-
	0,270	$0,297 \pm 0,0270$	111 ± 10	0	-

É possível verificar a adequada precisão intra-dia em todos os ensaios, com DPR inferiores a 20% (Tabela 9), conforme recomendado pela diretiva da Comunidade Europeia 2002/657/EC para concentrações entre 10 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (EC, 2002). Ainda, foram alcançados valores de DPR bem abaixo de 30% e recuperações dentro da faixa de aceitação (40-120%) para concentrações da ordem de 1 ppb, conforme os requisitos de desempenho de método padrão recomendado pela Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, do inglês “*Association of Official Analytical Chemists*”) (AOAC, 2012) e pelo INMETRO (2020). Futuramente deverão ser conduzidos ensaios para avaliação da precisão inter-dia para Ag⁺ e Ag-PVP, não tendo sido realizados até o momento devido a um defeito no funcionamento do GFAAS que o deixou inoperante desde o mês de maio deste ano.

A fim de avaliar também a exatidão da curva de Ag-Citrato obtida por padronização externa para a determinação das diferentes formas de prata, foi realizado um ensaio preliminar de adição e recuperação com padrões de Ag⁺, Ag-Citrato e Ag-PVP preparados em HNO₃ 1% (v/v), e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10.

TABELA 10. ENSAIOS DE EXATIDÃO ($n=3$) PARA Ag-CITRATO, Ag-PVP e Ag⁺ COM BASE NA CURVA DE Ag-CITRATO EM HNO₃ 1% (v/v).

Analito	Concentração Esperada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração Obtida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Ag-Citrato	60,0	58,5 \pm 0,255	97 \pm 1
Ag-PVP	60,0	58,0 \pm 0,595	97 \pm 1
Ag ⁺	60,0	59,7 \pm 1,24	99 \pm 2

Foram observadas taxas de recuperação semelhantes para todas as formas de prata, indicando a capacidade da curva obtida por padronização externa com Ag-Citrato na adequada quantificação de Ag-PVP e Ag⁺, da mesma forma como observado anteriormente para as curvas obtidas por *matrix-matched*.

14.2.1.9. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO MÉTODO EM AMOSTRAS AQUOSAS REAIS

Visando averiguar o desempenho do método proposto na determinação das formas de prata em amostras reais, foram realizados ensaios empregando amostras de água coletadas diretamente da rede de distribuição na região do bairro Lindoia, em Curitiba-PR.

Uma vez desconhecida ainda a estabilidade das amostras, foram realizadas coletas distintas para avaliação da eficiência do método para as três diferentes formas de prata, sendo o procedimento de extração e digestão realizado sempre no mesmo dia da coleta. Todas as amostras apresentaram valores de pH variando entre 6,05 e 6,10 e condutividade da ordem de 110 $\mu\text{S cm}^{-1}$.

A fim de avaliar a precisão e a exatidão do método, as amostras de água de torneira foram fortificadas isoladamente com Ag-Citrato, Ag-PVP e Ag⁺, e os resultados obtidos para os diferentes níveis avaliados estão apresentados na Tabela 11. Até o momento foi avaliada a precisão inter-dia apenas para as amostras fortificadas com Ag-Citrato. Apenas um nível de fortificação foi avaliado para Ag⁺ (1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$) nestas amostras, tendo sido realizadas duas coletas distintas realizadas no mesmo ponto, com intervalo de 15 dias entre elas, a fim de investigar um possível efeito de matriz, conforme será discutido a seguir.

TABELA 11. ENSAIOS DE EXATIDÃO ($n = 3$) E PRECISÃO PARA Ag-CITRATO, Ag-PVP E Ag⁺ OBTIDOS COM BASE NA CURVA POR MATRIX MATCHED PARA AS AMOSTRAS DE ÁGUA DE TORNEIRA.

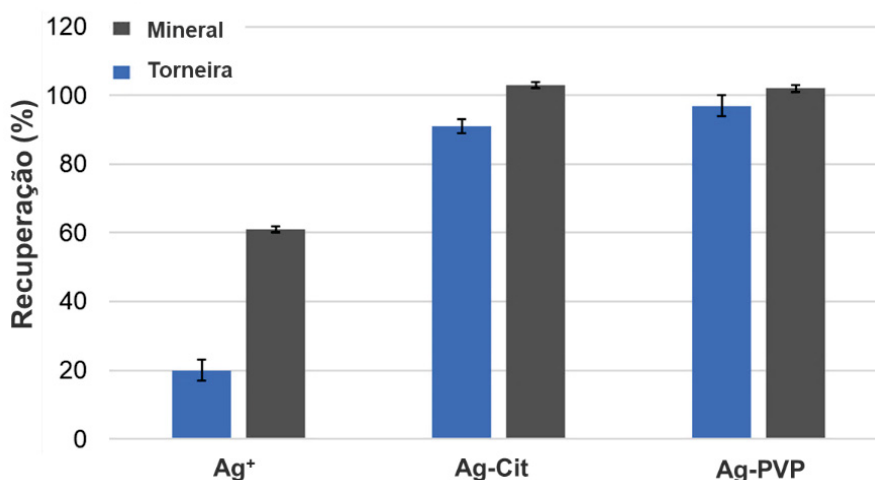
Analito	Concentração Esperada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração Obtida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%) (n=3)	DPR (%)	
				Intra-dia (n=3)	Inter-dia (n=6)
Ag-Citrato	0,250	0,272 \pm 0.022	109 \pm 9	2	8
	0,500	0,541 \pm 0.077	103 \pm 14	9	14
	1,00	0,844 \pm 0.039	84 \pm 4	4	5
Ag-PVP	0,300	0,357 \pm 0.00433	118 \pm 2	2	-
	0,520	0,536 \pm 0.0500	102 \pm 10	9	-
	1,00	0,800 \pm 0.0470	80 \pm 5	4	-
Ag ⁺	1,00 (coleta 1)	0,199 \pm 0.031	22 \pm 9	40	-
	1,00 (coleta 2)	0,219 \pm 0.088	20 \pm 3	16	-

É possível verificar adequada exatidão (40-120%) e precisão (DPR<15%) para as amostras de água de torneira fortificadas com Ag-Citrato e com Ag-PVP, indicando a capacidade do método proposto em apresentar resultados adequados para as Ag-NPs mesmo na presença de interferentes.

Contudo, baixas eficiências de extração implicaram em valores de recuperação bastante abaixo do aceitável para as amostras fortificadas com Ag⁺, sendo alcançados valores similares de exatidão mesmo a partir de amostras independentes, coletadas e preparadas em dias distintos (coletas 1 e 2), indicando a presença de um efeito de matriz significativo para esta forma de prata. Ainda, é possível observar valores de DPR bastante elevados, o que também pode estar relacionado ao efeito de matriz observado.

A fim de avaliar a persistência do efeito de matriz para Ag⁺ em outro tipo de amostra aquosa, foram realizados ensaios de adição/recuperação em uma amostra de água mineral comercial. Os ensaios foram realizados por meio da fortificação com as três formas de prata de maneira isolada, na concentração de 0,500 $\mu\text{g L}^{-1}$ antes da extração/digestão. Os valores de recuperação, estimados com base na curva de *matrix-matched* obtida em GFAAS, foram apresentados em gráficos de barra juntamente com os resultados obtidos para o mesmo nível de concentração para as Ag-NP nas amostras de água de torneira, para fins comparativos (Figura 29). A comparação entre a recuperação para Ag⁺ em água de torneira e água mineral foi realizada entre os níveis de fortificação de 1,00 e 0,500 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, uma vez que, até o momento, não foi possível avaliar mais de um nível de fortificação para Ag⁺ em águas de abastecimento público, conforme já discutido.

FIGURA 29. VALORES DE RECUPERAÇÃO ESTIMADOS POR GFAAS A PARTIR DOS ENSAIOS DE EXATIDÃO PARA Ag^+ , Ag-CITRATO E Ag-PVP EM ÁGUA MINERAL (CINZA) E EM ÁGUA DE TORNEIRA (AZUL).



Valores similares de recuperação foram obtidos entre água de abastecimento público e água mineral para as amostras fortificadas com Ag-PVP e Ag-Citrato, estando dentro da faixa aceitável de 40-120%, estimados com base na curva obtida por *matrix matched*. Já para as amostras de Ag^+ é possível verificar um decréscimo significativo nas taxas de recuperação em ambas as matrizes, sendo esse efeito bem menos pronunciado na amostra de água mineral, mesmo esta tendo sido fortificada com um nível de concentração inferior ao empregado na água de torneira.

Tal evidência permitiu inferir que, possivelmente, o efeito de matriz observado para a Ag^+ pode estar associado a presença de matéria orgânica nas amostras, mais especificamente a um efeito decorrente da interação da prata iônica com ácidos húmicos (AH).

Ácidos húmicos são definidos como um conjunto de substâncias orgânicas de alta massa molecular gerados por ação microbiana na transformação da matéria orgânica e dos nutrientes presentes em ambientes naturais, como solos e recursos hídricos (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014). Estes compostos são o principal componente da matéria orgânica natural (MON) em corpos aquáticos e ocorrem naturalmente em concentrações de até 80 mg L⁻¹ em águas superficiais (FERGUSON, 2011).

Devido a presença de um grande número de grupos carboxila e amino, que são classificados como bases duras de acordo com Pearson, os AH tem grande afinidade por íons como Ca^{2+} e Mg^{2+} , considerados ácidos duros (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014; DE SOUZA CORDEIRO; MARCONDES SILVA, 2018; FERGUSON, 2011). Assim, apesar da ampla capacidade dos AH em formar complexos estáveis com diversos cátions metálicos em matrizes aquáticas naturais, a estabilidade desses complexos é altamente afetada pela

dureza da amostra, ou seja, pelos teores de cálcio e magnésio. A dureza, por exemplo, é capaz de afetar a capacidade da Ag^+ em complexar com diferentes ânions, sendo conhecido que quanto maior a dureza maior a competição pelos ligantes potenciais (FERGUSON, 2011).

A fim de estimar a biodisponibilidade da prata iônica em estudos de toxicidade em amostras de águas naturais, Ferguson (2011) avaliou a adsorção de Ag^+ em algas na presença e na ausência de AH em diferentes condições de dureza. Neste estudo, foi observado um acréscimo significativo na sorção da prata iônica pelas algas com o aumento da dureza das amostras de água, indicando o favorecimento da complexação entre AH Ca^{2+} e Mg^{2+} frente à Ag^+ , aumentando assim sua biodisponibilidade.

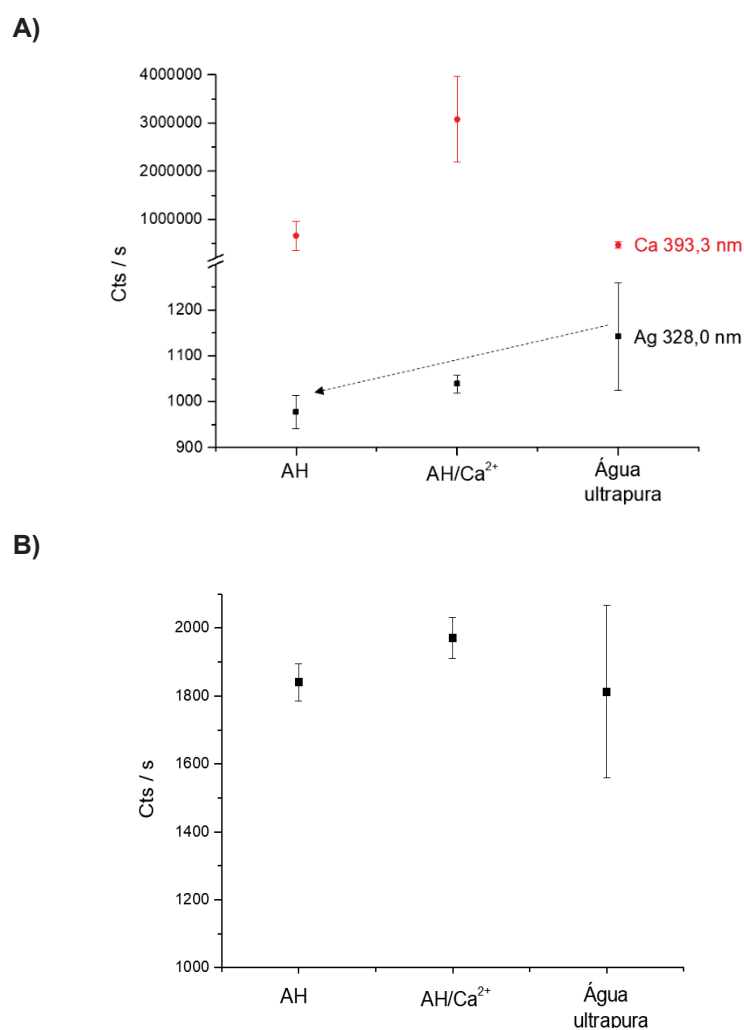
Tendo em vista a ocorrência natural do AH em águas superficiais e subterrâneas, é possível que este venha a complexar com a prata iônica nas amostras fortificadas nos ensaios de adição e recuperação realizados em água mineral e água de torneira, cujos resultados foram apresentados na Figura 29. Sabe-se que tipicamente o processo de coagulação é capaz de remover apenas parcialmente a MON durante o tratamento de águas para consumo, geralmente reduzindo seu teor entre 50 e 80% (DE SOUZA CORDEIRO; MARCONDES SILVA, 2018). Assim, é possível inferir que parte do AH presente nas amostras permanece dissolvido mesmo após a extração com o Tanfloc, mantendo o complexo Ag-AH em solução e reduzindo assim a eficiência de extração da Ag^+ . Como os teores esperados de AH nas amostras reais (da ordem de $mg L^{-1}$) são bastante superiores aos de Ag^+ ($ng L^{-1}$ - $\mu g L^{-1}$), a complexação tende a ser favorecida. Contudo, na presença de maiores durezas, como é o esperado no caso da água mineral, a complexação entre AH e íons Ca/Mg tende a ser mais favorável, deixando os íons Ag^+ mais livres para interagirem com o agente extrator (Tanfloc SG), garantindo assim um acréscimo na eficiência de extração da Ag^+ com relação às amostras de água de abastecimento público.

Este efeito também parece ocorrer com as Ag-NP, conforme é possível observar na Figura 29, contudo, de maneira muito menos pronunciada, possivelmente devido à solubilização, ainda que parcial, das Ag-NP durante o procedimento de extração, de maneira a disponibilizar íons Ag^+ no meio, capazes de complexarem com o AH. Ainda, é possível que ocorra uma estabilização das partículas menores em solução pelo próprio AH, o que também é descrito na literatura (IGLESIAS; TORRENT, 2021), levando a uma redução na eficiência de extração. Contudo, tal efeito é bem menos pronunciado nas Ag-NP em relação a Ag^+ , uma vez que a remoção de material particulado finamente distribuído pelo agente coagulante parece ter maior relevância na extração das nanopartículas, de maneira que os valores de recuperação alcançados estão dentro dos limites de 40-120% estabelecidos pela AOAC (2012) e pelo INMETRO (2020).

A fim de verificar esta hipótese, visando avaliar o efeito da presença de AH na eficiência de extração do método, foram realizados ensaios de extração preliminares para as três formas de prata isoladamente ($n = 3$) na presença e na ausência de $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ de AH, e de $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ de Ca^{2+} com $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ de AH. Devido ao problema com o GFAAS, os extratos obtidos nestes ensaios foram analisados por ICP OES, empregando as mesmas condições operacionais utilizadas nos testes preliminares de extração com Tanfloc SG. Ainda, devido a menor sensibilidade instrumental e à necessidade de diluição dos extratos, as amostras foram fortificadas isoladamente com uma elevada concentração de Ag^+ e Ag-PVP antes da extração ($10,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), de maneira a garantir um teor final de Ag detectável por ICP OES.

Os resultados obtidos, em termos de contagens por segundo, para as amostras fortificadas com as diferentes formas de prata, já descontando-se o sinal do respectivo branco, estão apresentados na Figura 30.

FIGURA 30. RESPOSTAS OBTIDAS POR ICP OES PARA AMOSTRAS FORTIFICADAS COM A) Ag^+ E B) Ag-PVP NA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO AH E DO Ca^{2+} NA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DO MÉTODO.



É possível verificar uma tendência de redução no sinal de Ag para as amostras fortificadas com Ag⁺ na presença de AH/Ca²⁺ (indicada pela seta pontilhada na Figura 30 A) sendo a queda no número de cts/s mais significativa na presença apenas de AH. Já para as amostras de Ag-PVP (Figura 30 B) não foi observada grande diferença entre os sinais obtidos na ausência e na presença dos interferentes, o que corrobora para hipótese anteriormente apresentada.

Analisando os dados obtidos para o cálcio, é possível inferir que este íon é co-extratido pelo Tanfloc SG, o que pode ser evidenciado pelo aumento do sinal de Ca nas amostras contendo AH/Ca (Figura 30 A). Uma investigação mais adequada da influência do Ca²⁺ na extração de Ag⁺ de maneira isolada, na ausência de ácido húmico deveria ser realizada por GFAAS.

Ensaio com amostras fortificadas com Ag-Citrato também foram conduzidos nas mesmas condições apresentadas, porém os resultados foram inconclusivos. Possivelmente isso se deve ao fato de o método proposto - especialmente a etapa de digestão - não ter sido otimizado para análises por ICP OES, sendo o alto teor de matéria orgânica residual presente uma possível fonte de erro nas análises, o que pode ser também evidenciado pelos elevados valores de desvio observados na Figura 30. Além disso, o nível avaliado na fortificação das amostras é bastante elevado em relação ao esperado para Ag-NP em amostras de águas naturais e de consumo (da ordem de ng L⁻¹), o que pode levar a conclusões equivocadas sobre os efeitos observados.

A avaliação do efeito do AH e do Ca²⁺ na extração de Ag⁺ e Ag-NP por GF AAS, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados, deve ser feita pelo grupo de pesquisa, uma vez que os principais parâmetros de validação já foram investigados e os níveis de fortificação poderão ser avaliados em condições mais próximas à realidade ambiental. Ainda, recomendase a investigação da possibilidade de ativar/desativar o efeito de matriz pela adição de Ca²⁺ ou AH em amostras reais, o que em tese possibilitaria a desejável diferenciação entre a prata iônica e as nanopartículas de prata, o que não é possível de se alcançar apenas por GFAAS nas condições empregadas neste trabalho.

Com base no exposto até o momento é possível concluir que a metodologia desenvolvida se mostra eficiente para a determinação de traços de prata em amostras aquosas, tendo ainda grande potencial para a diferenciação entre as Ag-NP e a Ag⁺. Além disso, o LOQ alcançado está bem abaixo do limite de 10 µg L⁻¹ para águas doces estabelecido pela Conama nº 357/05 (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2005). Ainda, tendo em vista que os níveis ambientais de Ag-NP (ng L⁻¹) têm se mostrado cada vez mais capazes de promover danos à biota e à saúde humana, é possível que em breve os teores de prata admitidos em águas naturais e de consumo sejam atualizados

pelas agências reguladoras nacionais e internacionais, de maneira que a disponibilidade de métodos analíticos sensíveis e acessíveis se faz essencial.

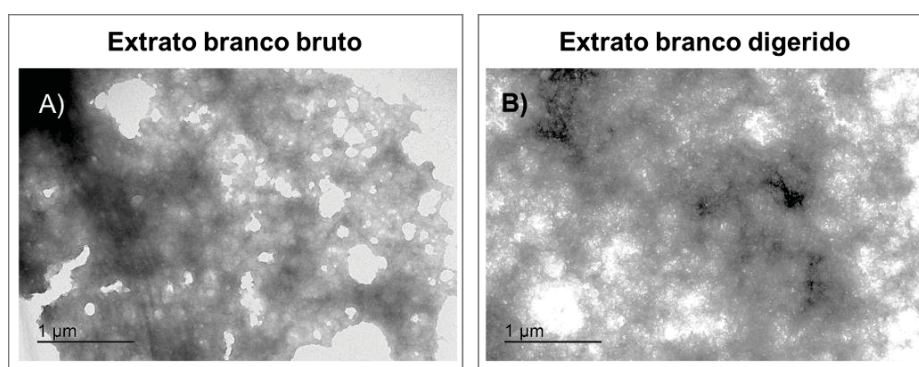
Vale também ressaltar que a formação *in situ* do agente extrator garante ao método proposto grande potencial para a extração e consequente determinação de outros metais a partir de amostras aquosas, o que poderá ser futuramente investigado pelo grupo de pesquisa.

14.2.1.10. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PREPARO DE AMOSTRA NAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR MICROSCOPIA ELETRONICA DE TRANSMISSÃO

A fim de avaliar os efeitos do procedimento de extração e digestão nas nanopartículas, foram realizados ensaios partindo-se de amostras de água ultrapura fortificadas isoladamente com $1,500 \text{ mg L}^{-1}$ Ag-PVP e Ag-Citrato antes da extração. Foi empregada uma concentração elevada de Ag-NP de maneira a atingir uma concentração adequada para análise por TEM. Para análise dos extratos antes da digestão foram coletados alíquotas de 0,5 mL da fase sedimentada após 15 min de coagulação, antes da etapa de centrifugação, pois a resuspensão do gel após a centrifugação não possibilitou um preparo adequado para análise por TEM, uma vez que a técnica exige que as amostras estejam bastante diluídas. Para estas amostras, alíquotas de cerca de 20 μL foram diretamente depositadas no porta amostra. Devido a elevada acidez residual dos extratos digeridos, foi necessária a diluição destas amostras em água ultrapura em cerca de 10 vezes a fim de evitar danos ao grid de cobre.

As amostras foram gotejadas e armazenadas em vácuo até a completa secagem para posterior análise por TEM-SAED. O mesmo procedimento foi realizado para uma amostra branco para fins comparativos e as micrografias obtidas para a amostra sem fortificação podem ser observadas na Figura 31.

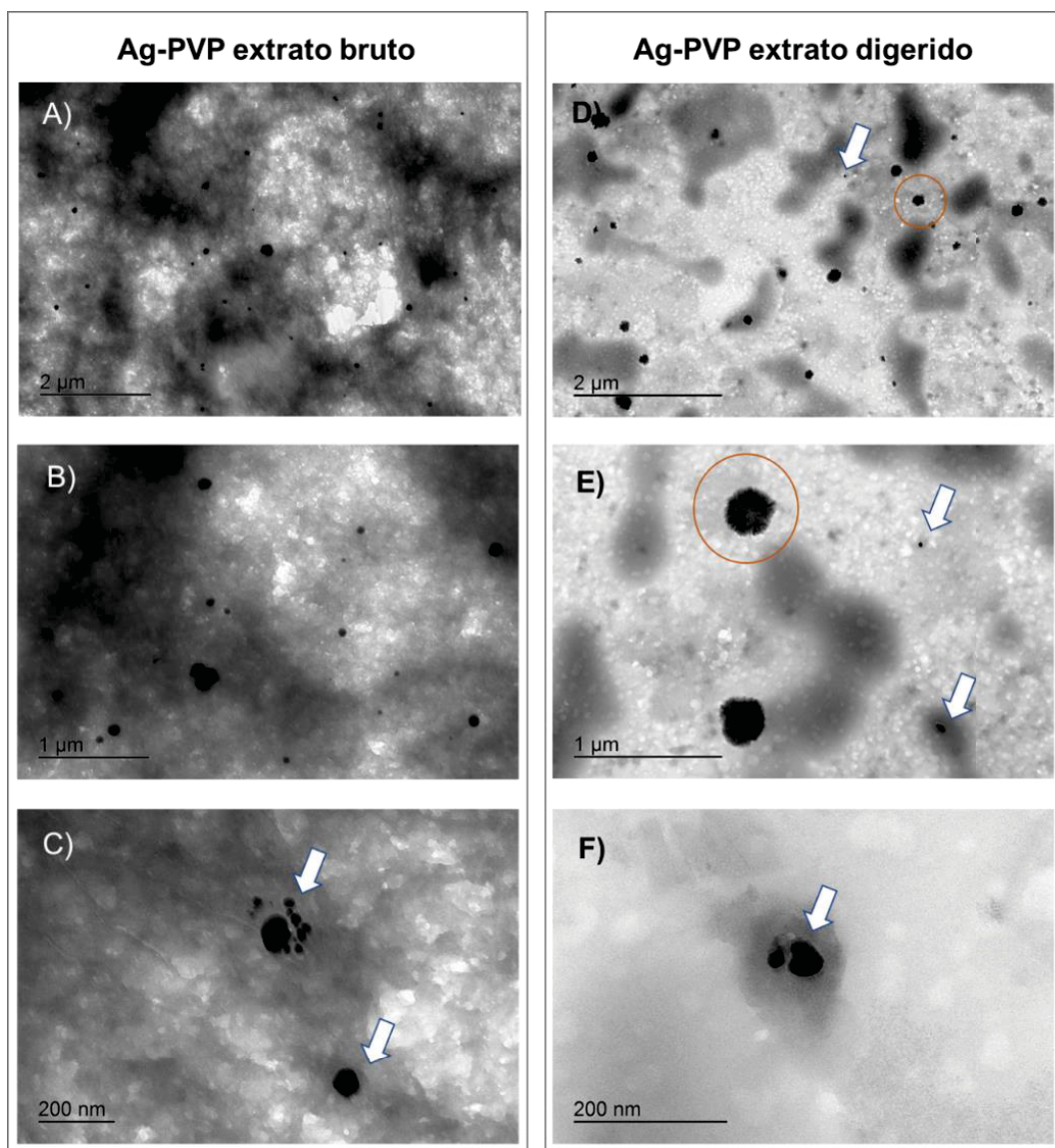
FIGURA 31. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR TEM PARA A AMOSTRA BRANCO A) EXTRATO BRUTO (6 kX), B) EXTRATO DIGERIDO (6 kX).



Conforme a Figura 31, não foi observada a presença de nenhuma partícula nos extratos brancos com e sem digestão. Ainda é possível verificar a presença de uma grande quantidade de matéria orgânica, proveniente do agente coagulante, mesmo nas amostras digeridas, indicando que, conforme já esperado devido a presença de uma coloração amarelada observada nestas amostras, o procedimento de digestão promove apenas degradação parcial do Tanfloc SG, o que é capaz de garantir sua solubilização mas não sua completa mineralização.

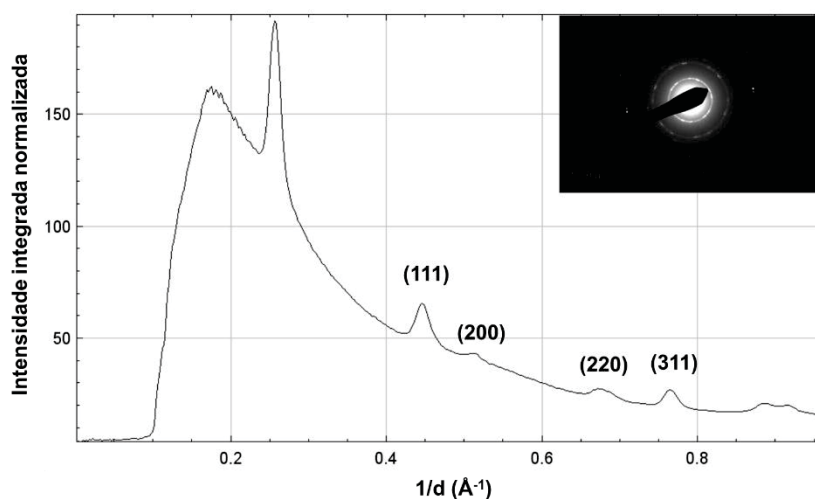
Na Figura 32 estão apresentadas as micrografias com diferentes magnificações para os extratos bruto e digerido obtidos a partir da amostra fortificada inicialmente com Ag-PVP.

FIGURA 32. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR TEM PARA A AMOSTRA Ag-PVP A) EXTRATO BRUTO (4 kX), B) EXTRATO BRUTO (20 kX), C) EXTRATO BRUTO (40 kX), D) EXTRATO DIGERIDO (4kX), E) EXTRATO DIGERIDO (20Kx), F) EXTRATO DIGERIDO (40 kX).



É possível verificar nas micrografias obtidas a presença predominante das Ag-PVP antes da digestão (Figura 32 A, B e C), nas quais foram observadas partículas com tamanhos entre 30 e 180 nm, valores próximos aos encontrados na análise do padrão sintetizado (33,3 nm e 166,7 nm). Devido ao número reduzido de partículas encontradas não foram estimadas as médias de tamanho em nenhum dos extratos analisados. A presença das Ag-PVP nos extratos bruto e digerido foi confirmada por SAED (Figura 33), tendo sido observadas distâncias interplanares corrigidas pelo padrão de ouro (2,347 Å - plano 111, 1,972 Å - plano 200, 1,389 Å - plano 220 e 1,197 Å plano- 311) semelhantes às obtidas para o padrão de Ag-PVP (2,369 Å - plano 111, 2,003 Å - plano 200, 1,438 Å - plano 220 e 1,231 Å plano- 311).

FIGURA 33. PADRÃO SAED OBTIDO PARA AS Ag-PVP NO EXTRATO BRUTO.



Após a digestão é possível verificar uma aparente redução da matéria orgânica presente nas amostras, permitindo a obtenção de um background mais claro (conforme Figura 32 D, E e F). Ainda, é possível verificar certa diminuição da quantidade das Ag-PVP (destacadas pelas setas), o que pode indicar a solubilização parcial das NP durante o processo. Contudo, vale ressaltar que essa redução na concentração também está associada à necessidade de diluição dos extratos digeridos para o preparo dos grids na análise por TEM.

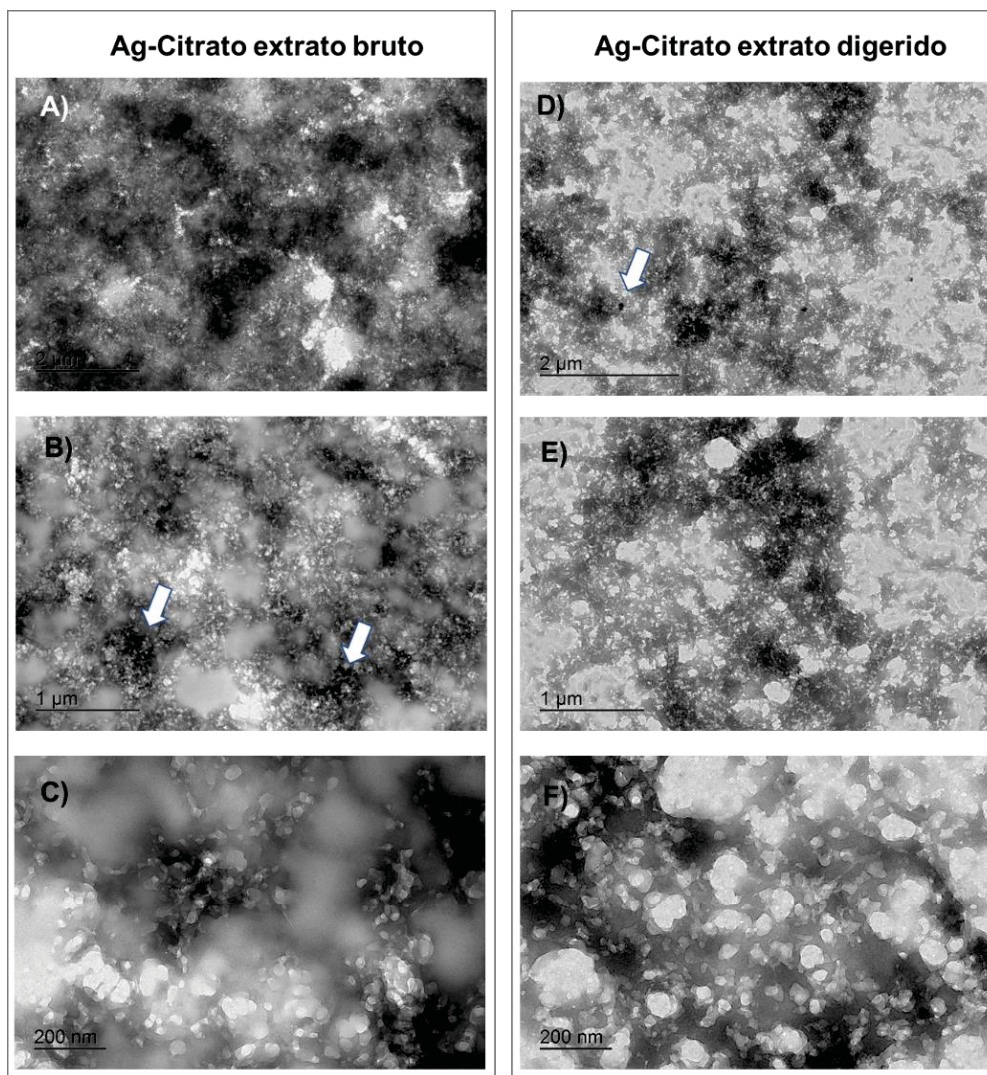
Nos extratos digeridos das amostras de Ag-PVP também é possível observar o surgimento de partículas do tipo ouriço (destacadas pelo círculo em laranja na Figura 32 (D) e (E), que não apresentaram nenhum padrão de difração por SAED (Figura 34), indicando a ausência de uma estrutura cristalina e uma possível composição de origem apenas orgânica.

FIGURA 34. PADRÃO SAED OBTIDO PARA A ESTRUTURA TIPO OURIÇO.



Essas partículas, que variaram entre 25 e 300 nm, podem ser provenientes do recobrimento de PVP das Ag-NP, que não foi totalmente digerido nas condições utilizadas, uma vez que essas estruturas não foram observadas nos extratos das amostras branco, bem como nas amostras fortificadas com Ag-Citrato (Figura 35).

FIGURA 35. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR TEM PARA A AMOSTRA Ag-CITRATO A) EXTRATO BRUTO (4 kX), B) EXTRATO BRUTO (20 kX), C) EXTRATO BRUTO (40 kX), D) EXTRATO DIGERIDO (4kX), E) EXTRATO DIGERIDO (20Kx), F) EXTRATO DIGERIDO (40 kX).



Devido à grande quantidade de matéria orgânica presente nas amostras bem, como ao tamanho diminuto das partículas observadas (indicadas pelas setas na Figura 35 B e D), não foi possível obter um padrão de difração por SAED a fim de confirmar a presença das Ag-Citrato em nenhuma das micrografias obtidas por TEM para os extratos fortificados. Por possuírem um recobrimento menos estável, é possível que as partículas tenham sido solubilizadas ainda que parcialmente, já durante a extração, e quase que completamente solubilizadas na etapa de digestão.

Logo é possível concluir que o procedimento de digestão proposto digere parcialmente a matéria orgânica presente nos extratos, bem como é capaz de promover a solubilização, ainda que parcial das Ag-NP avaliadas, sendo as Ag-PVP mais estáveis que as de Ag-Citrato, mesmo frente às drásticas condições de acidez e oxidação empregadas nesta etapa.

I.5. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO I

Foi possível sintetizar, purificar, caracterizar e quantificar as NP de Ag-Citrato e Ag-PVP, que foram empregadas como dispersões padrões, juntamente com a dispersão comercial de Ag-Citrato (Sigma Aldrich), nas etapas de desenvolvimento e validação do método de extração por coagulação proposto neste trabalho.

Os ensaios realizados empregando o Tanfloc SG permitiram o estabelecimento de uma nova técnica de preparo de amostra, simples e de baixo custo, para a determinação de prata e Ag-NP partir de amostras aquosas. Foram alcançados baixos limites de detecção (10 ng L^{-1}) e quantificação (34 ng L^{-1}), próximos os níveis ambientalmente relevantes de Ag-NP em matrizes aquosas (ng L^{-1}). Ainda, foram alcançadas adequadas exatidão (recuperação $>87\%$) e precisão (DPR $<11\%$) para a determinação de Ag-Citrato na ausência de interferentes.

Na avaliação da eficiência do método de extração em amostras reais foram também observados adequados valores de precisão e exatidão em todas as amostras analisadas para a determinação de Ag-PVP e Ag-Citrato. Contudo, para as amostras fortificadas com prata iônica foi observado um efeito de matriz significativo, que levou a baixas eficiências de extração para esta forma de prata. Apesar da presença deste efeito de matriz aparentar, num primeiro momento, ser uma desvantagem do método proposto, ele possibilitou a desejável diferenciação entre as Ag-NP e a Ag^+ , o que não era possível de se alcançar apenas por GFAAS nas condições investigadas neste trabalho.

Ensaio realizado por ICP OES, na presença e na ausência de ácido húmico, indicaram que o efeito de matriz observado pode ser decorrente da presença deste interferente nas amostras reais de água de torneira e água mineral analisadas. Ainda, nestes ensaios foi observado que a presença de Ca^{2+} permitiu elevar o sinal analítico da Ag^+ nas amostras mesmo na presença de AH, o que pode ser utilizado futuramente de maneira intencional a fim de ativar/desativar o efeito de matriz e garantir, assim, a especificação entre as nanopartículas de prata e seu íon em amostras aquosas.

Vale ressaltar, ainda, que o método desenvolvido propõe o emprego de reagentes acessíveis e de baixo custo, bem como o procedimento experimental proposto necessita de poucos recursos instrumentais e laboratoriais.

CAPÍTULO II. ESTRATÉGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE TiO₂ EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS

II.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1.1. NANOMATERIAIS EM ALIMENTOS

O TiO₂ anatase, comercialmente disponibilizado no Brasil e no mundo como corante E171, é comumente utilizado como pigmento branco nos mais diversos tipos de alimentos como balas, chicletes, sucos, chocolates e produtos de panificação.

A exposição ao TiO₂ tem revelado alterações na função mitocondrial e dos macrófagos, afetando o sistema imunológico humano e levando a respostas inflamatórias, além de induzir câncer de cólon em ratos (BETTINI et al., 2017; CHEN et al., 2018). Mohamed (2015) demonstrou que a administração de nano-TiO₂ em ratos, mesmo em doses baixas (5 mg por kg corporal), pode desencadear inflamação persistente, apoptose e estresse oxidativo, induzindo à gastrite crônica (MOHAMED, 2015). Isso torna a exposição, especialmente de crianças, bastante alarmante pois, estas tendem a consumir de 2 a 4 vezes mais TiO₂ que um adulto, sendo que menores de 10 anos consomem por dia entre 2 e 3 mg de TiO₂ por kg corporal (WEIR et al., 2012). O mesmo estudo demonstra que as partículas em matrizes de alimentos podem assumir tamanhos entre 37 e 300 nm, sendo assim uma fonte de TiO₂ em nanoescala com potencial para contaminação por ingestão direta.

Com base nos riscos associados à exposição ao TiO₂, algumas indústrias têm retirado este ingrediente de seus produtos, como as norte-americanas *Dunkin Donuts* e *So Delicious*, que pararam de adicionar o corante E171 em cobertura de donuts e de cremes para café livre de laticínios, respectivamente (HELLO NATURAL LIVING, 2018).

Ainda, dadas as crescentes evidências a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (ESFA, do inglês “*European Safety Food Authority*”) concluiu que a preocupação com a genotoxicidade das partículas de TiO₂ não pode ser descartada, indicando a impossibilidade de estabelecer limites diários de ingestão (ESFA, 2021). Já a Agência Francesa de Saúde e Segurança Alimentar, Ambiental e Ocupacional (ANSES, do francês “*Agence Nationale de Sécurité Sanitaire*”) decidiu suspender desde 2020 a comercialização de alimentos que contenham E171 como aditivo (ANSES, 2021).

Recentemente a EFSA estabeleceu um período de transição para proibir definitivamente o uso do TiO₂ em alimentos em toda a União Europeia. O regulamento 2022/63 da União Europeia (UNIÃO EUROPEIRA, 2022) garantiu a colocação de produtos contendo este corante no mercado apenas até o mês de agosto de 2022, sendo o comércio permitido

apenas até sua data de expiração. Atualmente, novos produtos alimentícios pigmentados com o TiO_2 já não podem mais ser disponibilizados nas prateleiras do continente europeu.

Nos EUA a Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (FDA, do inglês “*Food and Drug Administration*”) estipula um limite de 1% (m/m) para o E171 em alimentos (FDA, 2020). No Brasil um Projeto de Lei (PL 1370/11) já foi apresentado para proibir o emprego do TiO_2 em alimentos e cosméticos, a fim de evitar a poluição dos recursos aquáticos por meio do despejo de esgoto doméstico, mas este foi arquivado em 2019 (THAME, 2011). Além disso, não há ainda nenhuma legislação brasileira vigente quanto ao teor de E171 permitido em alimentos, sendo tipicamente adotados os padrões estabelecidos internacionalmente.

Tendo em vista que futuras alterações na legislação podem ser realizadas em relação ao uso deste corante, baseados principalmente nos efeitos toxicológicos que a exposição às nanopartículas de TiO_2 podem provocar no organismo, é importante estabelecer métodos de monitoramento deste NM também em alimentos.

De maneira geral, assim como na análise de amostras ambientais, a determinação de TiO_2 em alimentos se mostra bastante trabalhosa, dada a necessidade em se obter tanto informações quantitativas quanto de propriedades físicas como tamanho, forma e estado de agregação (PICÓ, 2016). Como consequência, estes estudos demandam tempo e geralmente necessitam de diversos equipamentos de alto custo (DE LA CALLE et al., 2018). Assim, é importante desenvolver rotinas práticas, rápidas e eficientes para investigar a presença de TiO_2 em alimentos, sendo este mais um dos objetivos do presente trabalho.

A quantificação de TiO_2 em alimentos por Raman já vem sendo proposta por pesquisadores nos últimos anos (LIM; BAE; FONG, 2018; TAN et al., 2016; ZHAO et al., 2017). Por ser uma técnica não destrutiva e assim e cada vez mais acessível devido aos avanços tecnológicos, a espectroscopia Raman tem ganhado força em análises quantitativas, especialmente por possibilitar de maneira simultânea uma caracterização das amostras, uma vez que o perfil de espalhamento do TiO_2 é bem conhecido na literatura, e por evitar a introdução de morosos preparos de amostra. Tan et al. (2016) desenvolveram uma metodologia acessível para determinação de TiO_2 em tabletes de açúcar via Raman, alcançando limites de detecção de $0,073 \text{ mg kg}^{-1}$, o que está bem abaixo de $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ (1% m/m) de TiO_2 permitido até então pelo FDA em alimentos (FDA, 2020). Assim, além de permitir verificar se os alimentos atendem o teor máximo permitido pela legislação, a espectroscopia Raman tem potencial para a verificação de adulteração em produtos cujo uso deste corante não é permitido. O método proposto pelos autores consistia em sucessivas lavagens da amostra a fim de remover o açúcar, atingindo elevadas eficiências de recuperação do analito (97%). Contudo, este procedimento pode ser trabalhoso e até mesmo inviável para a determinação do E171 em outras matrizes, como amostras de goma

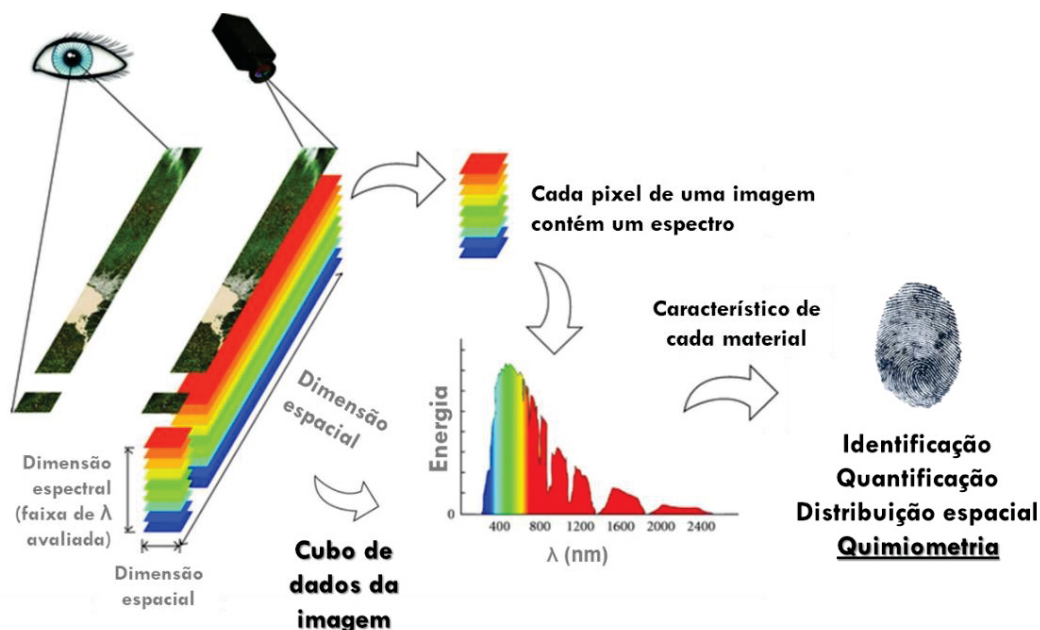
de mascar, balas e produtos de panificação, por exemplo, sendo necessário o estabelecimento de um protocolo de preparo de amostra para cada tipo de matriz alimentícia analisada.

Outros métodos comumente propostos para a determinação de TiO_2 são desenvolvidos para um único tipo de matriz e/ou por meio da calibração univariada considerando a intensidade da banda Raman em 143 cm^{-1} obtida a partir de um pequeno número de medidas, o que dificulta a análise direta de amostras com composições distintas sem um preparo adequado e introduz, por exemplo, a necessidade de digestão para remoção de interferentes. Lim, Bae e Fong (2018), propuseram a determinação de E171 em 11 tipos diferentes de alimentos, realizando a coleta de espectros em 15 pontos diferentes de uma mesma amostra para obtenção de um espectro médio. Em todas as amostras analisadas o TiO_2 foi encontrado na forma anatase e em concentrações que variaram entre 0,015 e 0,462% (m/m), tendo obtido resultados comparáveis ao ICP-MS. Para tanto, os autores propuseram uma digestão das amostras antes da dispersão em Al_2O_3 para análise por Raman, alcançando um limite de detecção de 60 mg kg^{-1} (0,006%), valor bastante superior ao alcançado por Tan et al. (2016). Logo, fica evidente que a introdução de uma etapa de digestão pode, apesar da eliminação de interferentes, afetar significativamente a sensibilidade do método, além de necessitar de um estudo prévio de otimização para cada diferente matriz analisada.

A obtenção de imagens hiperespectrais (HSI, do inglês "*Hyperspectral imaging*") pode ser útil no estabelecimento de um método de determinação sem a necessidade de morosos preparos de amostra e tem possibilitado a detecção, a caracterização, a diferenciação, e a localização de compostos de interesse nos mais diversos tipos de matrizes, desde insumos industriais até os mais diversos tipos de alimentos.

A técnica consiste na combinação de espectroscopia e imageamento para a obtenção de um espectro, como de absorção UV-Vis, infravermelho ou até mesmo de espalhamento Raman, em cada pixel de uma imagem obtida. Assim, uma imagem hiperespectral ganha uma terceira dimensão e passa a ser representada por um cubo de dados, conforme esquematizado na Figura 36.

FIGURA 36. ESQUEMA DO IMAGEAMENTO VIA HSI



Adaptado de Aiazzi et al. (2012).

Assim, por meio da comparação do espectro de cada pixel com os espectros característicos de cada analito, também conhecidos como “*spectral fingerprints*”, que podem ser obtidos experimentalmente ou a partir de uma biblioteca espectral, é possível mapear os diferentes componentes presentes na amostra imageada (PEÑA et al., 2016; ROTH et al., 2015).

Ferramentas quimiométricas permitem maximizar a interpretação e a obtenção de informações químicas a partir de resultados multivariados fornecidos por técnicas instrumentais, a exemplo dos obtidos por HSI (FERREIRA et al., 1999). Dentre os modelos de calibração, a resolução multivariada de curvas por mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS, do inglês “*Multivariate Curve Resolution with Alternating Least Squares*”) merece destaque por apresentar grande potencial na determinação de analitos em baixa concentração e na presença de muitos interferentes (MARÇO et al., 2014), e tem sido uma grande aliada no processamento de dados provenientes de imagens hiperespectrais.

A MCR-ALS possibilita a recuperação dos perfis espectrais puros dos constituintes de interesse a partir das amostras analisadas, permitindo a reconstrução do mapa de distribuição espacial com base nesse perfil, o que suprime a influência de interferentes na construção do modelo (ZHANG; DE JUAN; TAULER, 2015). Assim, é capaz de permitir a determinação do analito em uma matriz complexa, a partir de uma curva analítica preparada apenas com os analitos puros, sem a necessidade de inclusão de interferentes na etapa de calibração (MARÇO et al., 2014), o que viabiliza o uso de um mesmo método

para avaliar diversos tipos de matrizes. Vale ressaltar também que este tipo de modelo pode assumir uma forma matemática de calibração considerada pseudo-univariada, sendo as figuras de mérito estimadas de forma muito mais simples do que na calibração multivariada convencional.

Conforme exposto até o momento, a determinação de NM nas mais diversas matrizes tem sido um grande desafio para química analítica atual. A dificuldade no monitoramento ambiental ocorre não apenas devido às baixas concentrações, mas também à dificuldade em manter as características originais dos NM durante o preparo de amostra. Como a questão ambiental dos NM tem tomado grandes proporções, bem como a contaminação é um problema crescente no Brasil e no mundo, o estabelecimento de técnicas de monitoramento de NM de maneira mais simples e baratas se faz extremamente necessário e urgente.

Da mesma forma, tendo em vista as diversas novas evidências com relação à toxicidade do TiO_2 empregado como aditivo em alimentos, sua determinação de forma rápida, simples e eficaz é também um desafio a ser superado nos dias de hoje.

Assim no presente trabalho tem-se como propósito o desenvolvimento de métodos analíticos para a detecção, caracterização e quantificação de NM como NP de prata em matrizes aquosas naturais e do corante E171 em amostras de alimentos, como sucos em pó, sopas desidratadas, doces e chicletes, amostras cujo emprego deste corante é vastamente difundido no Brasil.

II.2. OBJETIVOS

II.2.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objetivo o emprego de técnicas espectroscópicas associadas às ferramentas quimiométricas será investigado, visando estabelecer modelos capazes de detectar e quantificar o TiO_2 (pigmento E171) em amostras de diferentes tipos de alimentos, com a mínima introdução de preparo de amostra.

II.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Meta 1: Estabelecimento e validação de métodos espectroscópicos para a obtenção de modelos quimiométricos visando a detecção e a quantificação do corante E171 em amostras alimentícias sólidas.

Meta 2: Avaliação dos parâmetros de desempenho do método desenvolvido para a análise qualitativa e quantitativa do E171 em amostras reais.

II.3. MATERIAIS E MÉTODOS

II.3.1. REAGENTES E INSUMOS

O TiO_2 foi adquirido como corante comercial E171 (MV Química) com grau de pureza alimentício. A água ultrapura foi obtida em um sistema de purificação Millipore-Simplicity UV, Bedford, MA, USA (18,2 M Ω cm). Os demais reagentes eventualmente necessários (ácidos, bases, sais e solventes) foram de grau analítico PA.

Todos os materiais e vidrarias foram previamente calibrados e descontaminados em banho de extran 5% (v/v) por 24 h, devidamente enxaguados 10 vezes com água destilada e deionizada, seguido de banho em ácido nítrico 10% (v/v) por 24 h e enxague com água destilada e ultrapura por 10 vezes cada.

II.3.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

A caracterização do TiO_2 foi realizada por SEM-EDS e TEM-SAED e por difração de raios X (XRD, do inglês "*X-Ray Diffraction*"). O pigmento E171 foi ainda analisado por Raman para verificar a potencialidade das técnicas na detecção e quantificação de TiO_2 .

II.3.2.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A morfologia das partículas de TiO_2 E171 foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM). As análises por SEM-EDS foram realizadas no equipamento SEM VEGA3 LMU (Tescan), disponível no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR. O padrão E171 foi diretamente colocado sob a fita (de Cu ou C).

O padrão comercial do corante alimentício TiO_2 E171 foi caracterizado por SEM-EDS e por difração de raios X (XRD, do inglês "*X-Ray Diffraction*"). O pigmento E171 foi ainda analisado por Raman para verificar a potencialidade das técnicas na detecção e quantificação de TiO_2 .

II.3.2.2. DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A amostra de TiO_2 anatase (E171) foi analisada por XRD em pó. A análise foi realizada em equipamento Shimadzu (XRD-7000) equipado com anti-cátodo de cobre ($K\alpha$, $\lambda = 0,1543$ nm), operando com voltagem de 40 kV, corrente de 20 mA, com velocidade de coleta de 4 deg/min, disponibilizado pelo Professor Dr. Irineu Mazzaro no Laboratório de Difração e Espalhamento de Raios X da UFPR.

II.3.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA DETERMINAÇÃO DE E171 EM ALIMENTOS

O corante comercial E171 (TiO_2 anatase, MV Química) foi então empregado como padrão para o desenvolvimento de método visando a determinação de TiO_2 em amostras de alimentos por espectroscopia Raman.

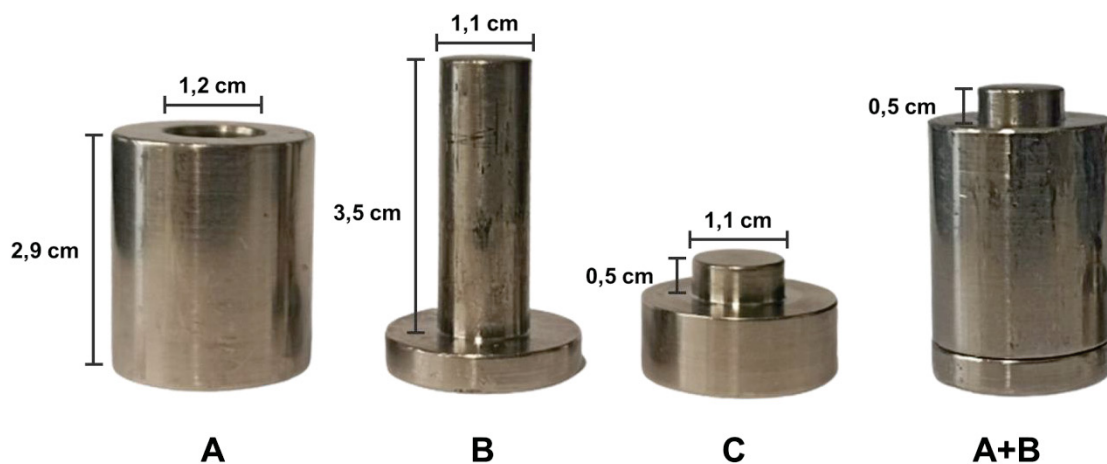
O Al_2O_3 (grau cromatográfico, Carlo Erba) foi empregado como dispersante na diluição do E171, uma vez que este não apresenta espalhamento Raman, conforme já relatado na literatura (LIM; BAE; FONG, 2018). Foram avaliados sete níveis de concentração entre 500 mg kg^{-1} e 50000 mg kg^{-1} (5,000, 2,000, 1,000, 0,5000, 0,2600, 0,1000 e 0,05000 % m/m), sendo preparados 2,0000 g de cada amostra de E171 dispersas em Al_2O_3 . Os padrões foram pesados em balança analítica digital (Mettler Toledo XS205DU) com precisão de $\pm 0,01$ mg. Alíquotas de 0,05 g de cada nível de concentração, previamente pesadas em microtubos de polipropileno, foram transferidas para o molde padrão de 7 mm (Pike Technologies, modelo P/N 161-1010) no momento da análise, sendo as pastilhas prensadas com o auxílio de uma prensa manual (Pike Technologies) por 30 s. As amostras foram prensadas a fim de remover irregularidades na superfície que poderiam levar a erros na etapa de calibração. Não foi possível remover as pastilhas do aparato sem danificá-las, de maneira que as análises foram realizadas no próprio molde de aço inox. Entre cada amostra, o molde foi devidamente limpo com etanol 70 % (m/m) e seco com papel toalha. As amostras de suco em pó foram previamente maceradas utilizando um pistilo e almofariz de ágata, antes da obtenção das pastilhas, a fim de se obter grânulos mais uniformes, e as amostras de chiclete foram apenas prensadas e analisadas no microscópio Raman. Uma amostra de relaxante muscular foi analisada diretamente no microscópio em um ensaio preliminar, a fim de verificar a possibilidade de análise de comprimidos sem nenhum tipo de preparo adicional.

As análises foram realizadas em microscópio Raman Confocal Witec Alpha 300R, empregando laser verde (531,975 nm) disponibilizado pelo Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR. Foi coletado um mapa por amostra, empregando lente de 10x para focalizar o laser. Foram medidos 1024 pontos na faixa de dados espectrais (deslocamento Raman) com uma resolução espectral de $1,31 \text{ cm}^{-1}$. Os mapas foram adquiridos pela coleta de espectros ponto a ponto, aplicando uma potência de 30 mW e avaliando uma área de 50×40 pixels com spot de $1 \mu\text{m}$, totalizando uma área de $2000 \mu\text{m}^2$. Foram coletados 50 pontos por linha em 40 linhas, totalizando 2000 espectros por amostra, com tempo de aquisição de 0,39595 s por ponto.

Foi ainda desenvolvido um molde de aço inox, a fim de possibilitar a obtenção de comprimidos individuais a partir dos padrões e das amostras reais, de maneira a permitir o envio e realização das análises no CME pelo técnico durante a pandemia. O molde foi

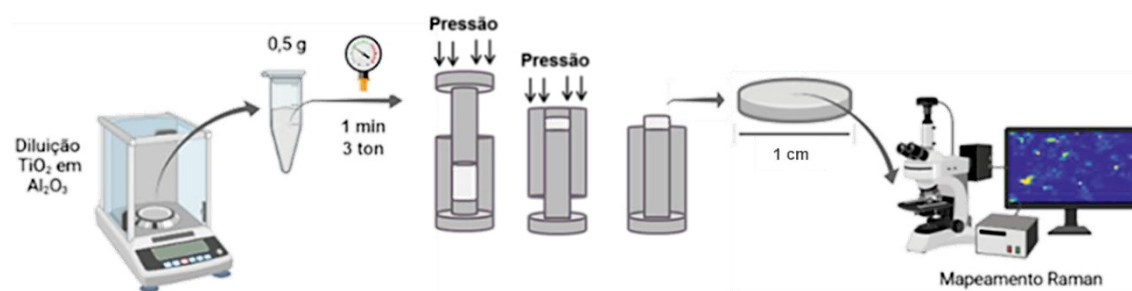
desenhado de maneira a facilitar o desenforme dos comprimidos sem danificá-los, o que não era possível alcançar com o molde da prensa de IR. Isto foi possível devido ao design do aparato desenvolvido em inox, que possibilitou a atuação de uma das peças como êmbolo (peça B, Figura 37) de maneira a garantir a expulsão eficiente do comprimido do molde, pela junção entre as peças A+B, após a prensagem das amostras, conforme ilustrado na Figura 37. Os comprimidos obtidos possuíam um diâmetro de cerca de 1 cm apenas para facilitar seu preparo e garantir um tamanho adequado ao desenforme sem que fossem observados danos às amostras. Contudo, vale ressaltar que não é necessário o mapeamento de toda sua superfície para obtenção de dados reprodutíveis, conforme será demonstrado pelos resultados alcançados neste trabalho.

FIGURA 37. DIMENSÕES DO MOLDE DE AÇO INOX DESENVOLVIDO PARA A CONFECÇÃO DOS COMPRIMIDOS PARA ANÁLISE VIA MAPEAMENTO RAMAN.



Os comprimidos empregando o molde novo foram obtidos a partir de alíquotas de aproximadamente 0,5000 g de amostra, transferidas para o molde e aplicando-se uma pressão equivalente a 3 ton em uma prensa hidráulica (Bovenau, modelo ST15) durante 60 s. Após esse período os comprimidos foram retirados do molde e transferidos para um suporte individual de polipropileno e armazenados em dessecador a temperatura ambiente até o momento da análise, conforme esquematizado na Figura 38.

FIGURA 38. PREPARO DOS COMPRIMIDOS PARA MAPEAMENTO RAMAN.



Os mapas foram coletados nas mesmas condições descritas anteriormente, apenas alterando a potência para 10 mW para as amostras comerciais e para os padrões com concentração superior a 1,00% (m/m), sendo os dados devidamente normalizados (para potência de 30 mW) antes da construção do modelo por MCR-ALS. Além disso, passou a se empregar um tempo de aquisição de 0,59841 s por ponto, totalizando cerca de 20 min de aquisição de dados por amostra.

II.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

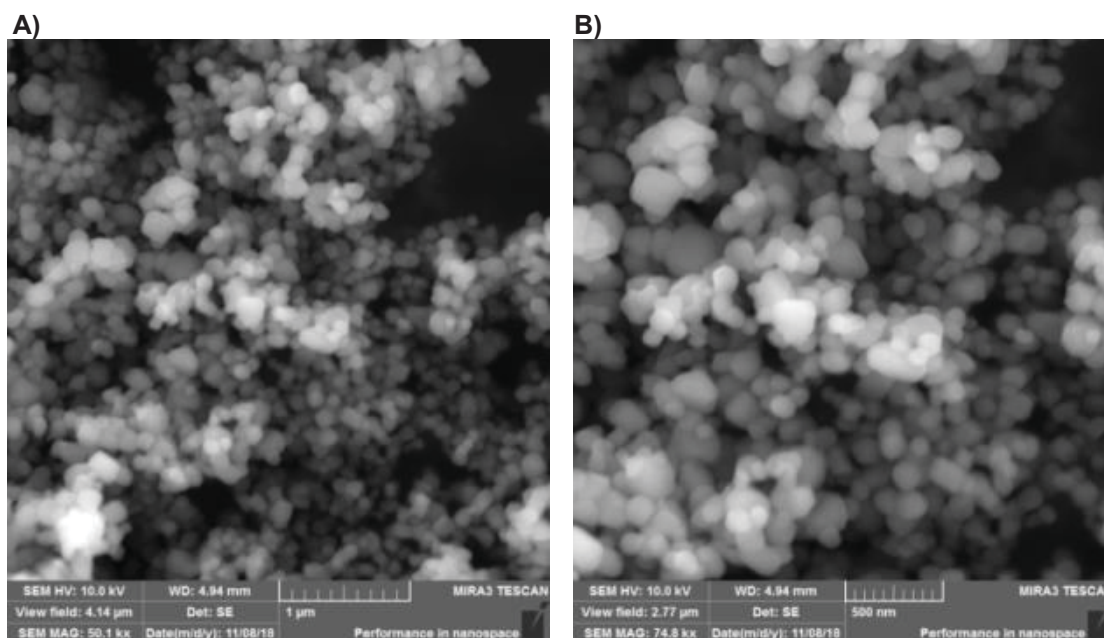
II.4.1. DETERMINAÇÃO DE E171 EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS POR ESPECTROSCOPIA ASSOCIADA À QUIMIOMETRIA

II.4.1.1. CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO COMERCIAL DE E171

O TiO_2 possui três estruturas cristalinas conhecidas: a bruquita, o rutilo e a anatase. Apesar do uso da forma rutilo ser permitida para fins alimentícios, a forma anatase, que é obtida por um processo industrial mais simples e acessível, acaba sendo a principal forma de TiO_2 encontrada em produtos alimentícios (GEISS et al., 2020). Esta forma foi então escolhida para o desenvolvimento de um método de determinação de TiO_2 em amostras de alimentos.

O corante alimentício comercial E171 (TiO_2 anatase) foi adquirido e caracterizado para ser utilizado nas etapas de calibração. Na Figura 39 estão apresentadas as micrografias obtidas via SEM.

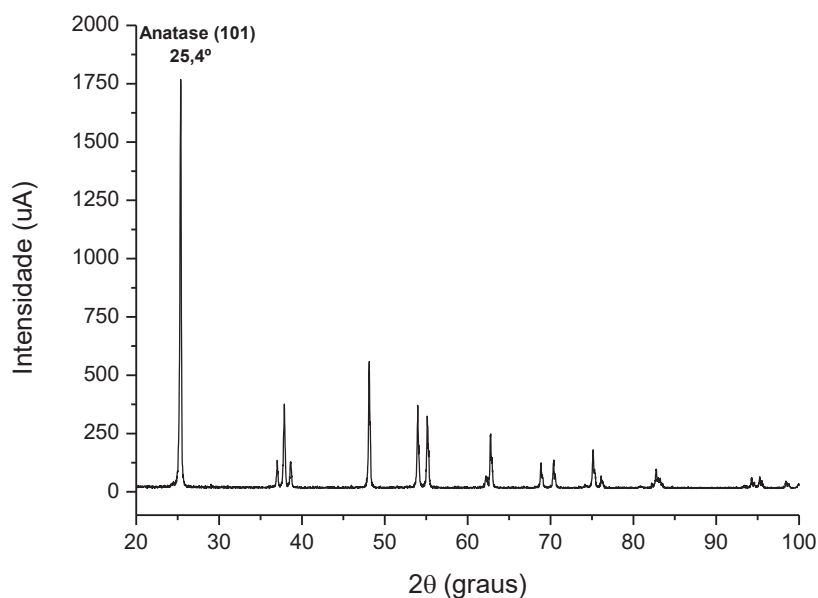
FIGURA 39. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR SEM PARA A AMOSTRA DE TiO_2 ANATASE
A) COM AMPLIAÇÃO DE 50,1 kX, B) 74,8 kX.



É possível verificar que as partículas se apresentam aproximadamente esféricas, sendo observadas partículas variando entre 272 e 43 nm. Na análise por EDS não foi detectada a presença de nenhuma impureza na amostra.

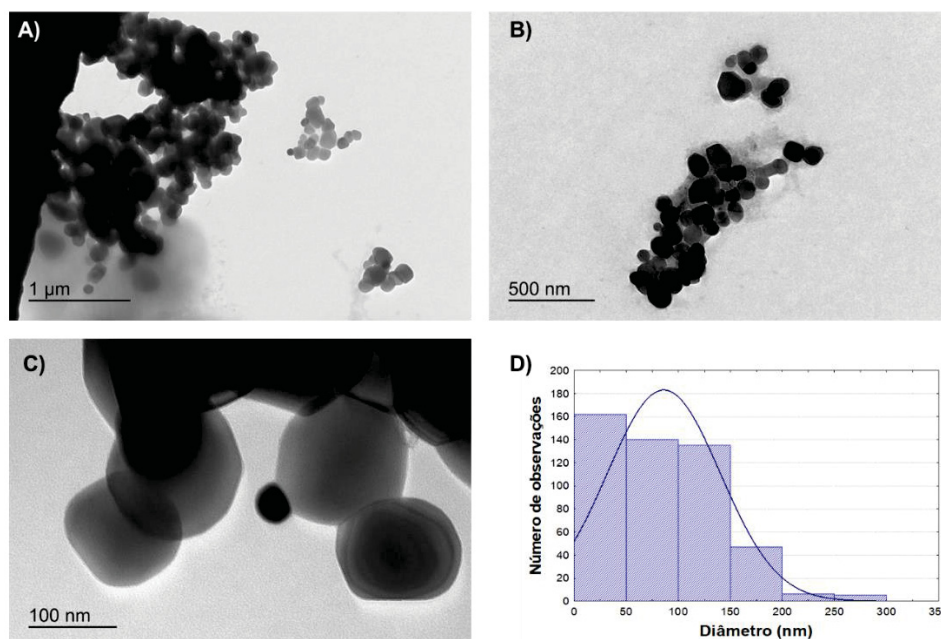
A partir do difratograma de raios X (Figura 40) obtido para o corante E171 (TiO_2 anatase) foi possível verificar alta cristalinidade da amostra, com picos finos e bem definidos. De acordo com a base de dados cristalográficos disponível no equipamento (software Crystallographica Search-Match), os picos obtidos foram condizentes com a fase cristalina anatase (cartão nº 73-1764). Além disso, nenhum pico referente à fase rutilo foi observado, evidenciando a pureza da forma anatase nas amostras analisadas.

FIGURA 40. DIFRATOGRAMA DE RAIOS X OBTIDO PARA A AMOSTRA COMERCIAL DO CORANTE E171.



A fim de avaliar a distribuição de tamanho das partículas foi realizada uma análise do TiO_2 anatase comercial por TEM e algumas das micrografias obtidas estão apresentadas na Figura 41.

FIGURA 41. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR TEM PARA O CORANTE E171 COM AMPLIAÇÃO DE A) 6 kX, B) 10 kX, C) 50 kX. D) DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO ($n = 500$).



Com base nas micrografias obtidas por TEM é possível confirmar que as partículas são majoritariamente esféricas, conforme observado anteriormente por SEM. Foi verificada uma ampla distribuição de tamanho (Figura 41 D), sendo encontradas partículas entre 10 e 286 nm e com diâmetro médio igual a 85 ± 55 nm ($n = 500$). Vale ressaltar que os tamanhos diminutos encontrados justificam a crescente preocupação com a presença deste corante nos mais diversos produtos alimentícios, bem como a necessidade do estabelecimento de técnicas simples e acessíveis para o monitoramento de TiO_2 em alimentos.

Uma vez que o TiO_2 apresenta um perfil de espalhamento Raman bem característico, foi avaliada a potencialidade do uso da espectroscopia Raman a fim de estabelecer um método associado a calibração multivariada para a determinação de E171 em alimentos, visando alcançar um modelo com adequada seletividade e, potencialmente, aplicável a diferentes tipos de matrizes.

II.4.1.2. AVALIAÇÃO DO EMPREGO DE ESPECTROSCOPIA RAMAN NA DETERMINAÇÃO DE TiO_2 EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS

Visando estabelecer um procedimento de preparo de amostra mais simples para determinar TiO_2 em diferentes alimentos por Raman, o presente estudo visa empregar calibração multivariada de maneira a minimizar os efeitos de matriz e eliminar morosos preparos de amostras. Ainda, por possibilitar um detalhamento composicional da superfície

imageada, garantindo maior representatividade amostral em relação ao analito, propõe-se o uso do mapeamento Raman.

II.4.1.2.1. AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES PRELIMINARES DE PREPARO E ANÁLISE POR MAPEAMENTO RAMAN

O mapeamento por microscopia Raman permite contornar a supressão de sinal decorrente da heterogeneidade da distribuição do TiO_2 em amostras comerciais, o que foi observado em ensaios preliminares, dada a possibilidade de selecionar maiores regiões da amostra que contenham o analito para a calibração, melhorando a amostragem espectral, elevando a sensibilidade do método, bem como possibilitando a análise de diferentes matrizes. Este tipo de abordagem, que emprega as vantagens de técnicas espectroscópicas, como a espectroscopia Raman, com métodos de imageamento, é comumente conhecida como métodos hiperespectrais.

O MCR-ALS quando aplicado a dados de imagem hiperespectral, como as obtidas por mapeamento Raman, permite gerar imagens químicas espacialmente resolvidas e recuperar os espectros puros das espécies químicas individuais a partir de uma mistura complexa (SMITH et al., 2019), de maneira que esta foi a ferramenta escolhida para a obtenção de um método para a determinação de TiO_2 em alimentos por mapeamento Raman neste trabalho.

Tendo em vista as potencialidades da associação destas duas técnicas, foi avaliada inicialmente a possibilidade de mapear as amostras de alimentos visando a determinação de TiO_2 sem nenhum preparo prévio. Em ensaios preliminares, amostras de suco em pó foram dispostas em uma placa de vidro e niveladas com o auxílio de uma espátula antes da análise. Contudo, as diferenças de altura presentes na superfície da amostra afetaram significativamente as intensidades espectrais obtidas no mapeamento Raman. Assim, foi introduzida uma etapa de prensagem das amostras, utilizando um sistema próprio para espectroscopia IR contendo um molde e uma prensa manual, de maneira a minimizar imperfeições e evitar erros associados ao desnível da superfície das amostras na calibração. Além disso, amostras com uma superfície plana facilitaram o foco durante a movimentação do laser na coleta dos mapas.

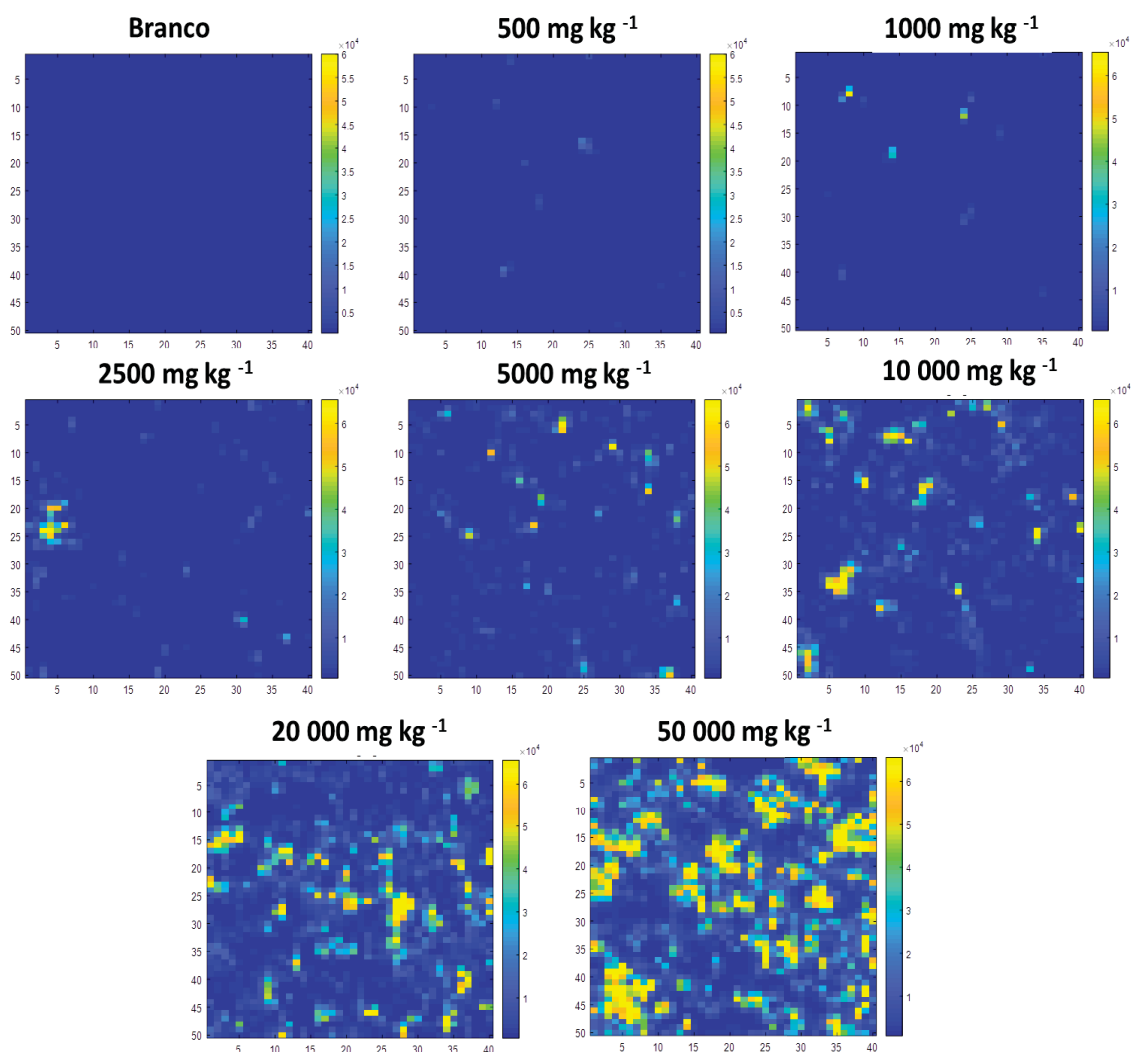
As condições de mapeamento foram estabelecidas com base na literatura (TAN et al., 2016) e otimizadas a fim de aumentar o número de espectros coletados, visando uma análise mais representativa das amostras heterogêneas e o futuro emprego do método em matrizes mais complexas sem, contudo, elevar muito o tempo de análise.

A decomposição dos dados obtidos por MCR-ALS possibilita relacionar as respostas instrumentais com a concentração dos analitos (MARÇO et al., 2014). Logo, a fim de

investigar uma região linear de resposta instrumental, diferentes concentrações de TiO_2 anatase foram preparadas por diluição em Al_2O_3 , de maneira a abranger o limite máximo estabelecido pelo FDA (1% m/m, ou seja, de 10000 mg kg^{-1}), bem como verificar a sensibilidade instrumental, útil na detecção de adulteração em alimentos cuja presença de E171 não é permitida pela legislação. Assim, foram analisadas a prova branco (Al_2O_3) e os padrões fortificados com 500 mg kg^{-1} (0,05000% m/m), 1000 (0,1000% m/m), 2600 (0,2600% m/m), 5000 (0,5000% m/m), 10000 (1,000% m/m), 20000 (2,000% m/m) e 50000 (5,000% m/m).

A partir dos dados brutos foram gerados, em ambiente MATLAB (2018), os mapas de distribuição referentes à banda de maior intensidade (em 143 cm^{-1}) para as diferentes concentrações avaliadas, ou seja, a distribuição de intensidade da banda nas diferentes posições da amostra mapeada, conforme apresentado na Figura 42.

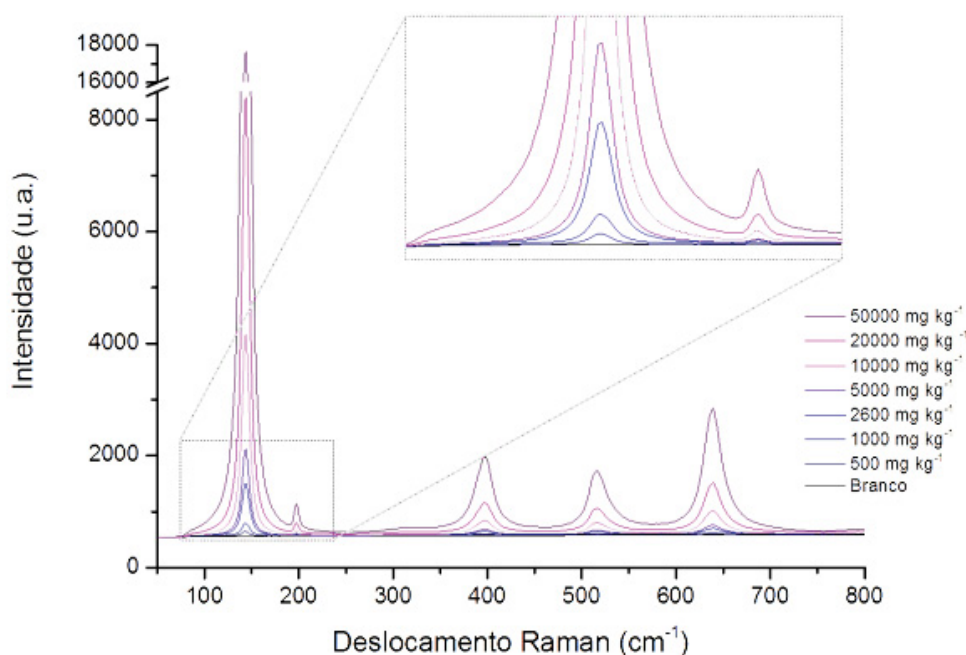
FIGURA 42. MAPAS DE DISTRIBUIÇÃO OBTIDOS EM 143 cm^{-1} PARA OS PADRÕES DE E171 DILUÍDOS EM Al_2O_3 .



Nos mapas de distribuição do TiO_2 , as regiões com coloração azul escuro indicam uma intensidade de sinal próxima do ruído instrumental e os pontos da imagem (“*pixels*”) com colorações variando do azul claro, verde e em seguida o amarelo, representam o aumento na intensidade do sinal, respectivamente. De acordo com as imagens, é possível verificar a ausência de sinal na prova em branco (Al_2O_3), porém observa-se a presença de TiO_2 em todas as amostras fortificadas, mesmo no menor teor avaliado, ainda que com uma grande heterogeneidade da distribuição do analito, indicando uma detectabilidade instrumental $< 500 \text{ mg kg}^{-1}$, de maneira que menores concentrações poderiam ser avaliadas para a estimativa adequada dos limites de detecção e quantificação instrumentais.

Na Figura 43 são apresentados os espectros médios (gerados a partir da média dos 2000 espectros obtidos em cada imageamento) para as diferentes concentrações avaliadas a partir do respectivo mapeamento, em que é possível identificar as vibrações típicas da forma anatase em 143, 197, 399, 515 e 640 cm^{-1} (GEISS et al., 2020).

FIGURA 43. ESPECTROS MÉDIOS PARA OS PADRÕES DE TiO_2 ANATASE OBTIDOS A PARTIR DO MAPEAMENTO RAMAN.

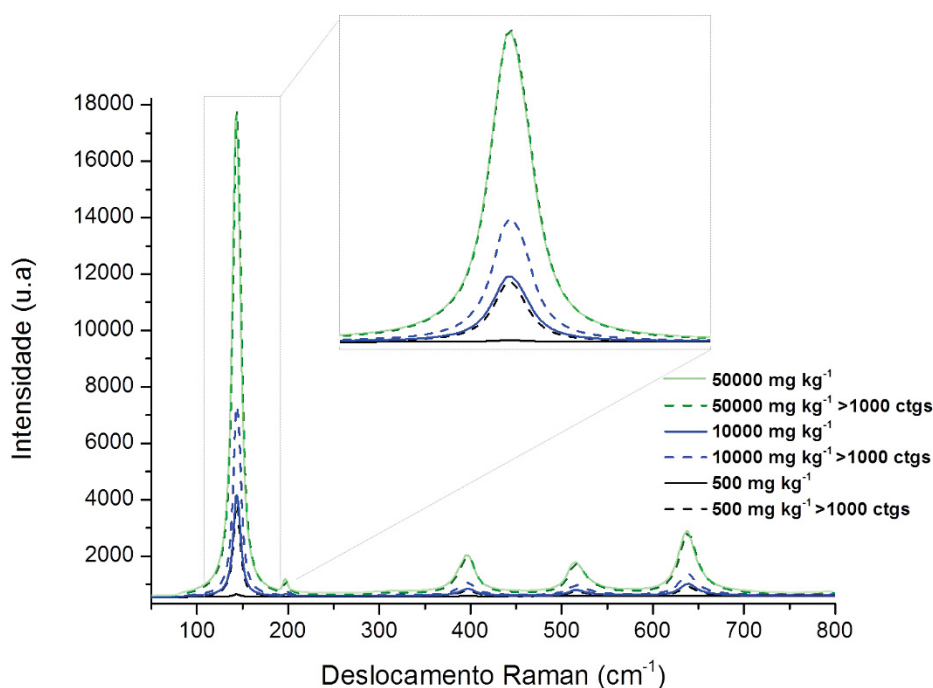


Além disso, é possível verificar uma tendência crescente de intensidade média com relação à concentração do corante, o que não era observado por meio da coleta pontual de uma pequena quantidade de espectros devido à heterogeneidade das amostras (observado em ensaios preliminares e evidenciado nos mapas apresentados na Figura 42). Isso demonstra a vantagem do mapeamento espectral frente a análises pontuais para amostras heterogêneas, o que já era esperado. Ainda, na análise prova em branco, não foi

observado nenhum sinal decorrente do Al_2O_3 no espectro médio, evidenciando que este óxido pode ser empregado como diluente sem interferir nas respostas de interesse.

Apesar do mapeamento minimizar significativamente o efeito da heterogeneidade das amostras na obtenção de um espectro médio (quando comparado a coleta de poucos espectros pontuais), em amostras cuja concentração do TiO_2 é muito baixa em uma determinada região da amostra, a intensidade espectral continua sendo subestimada, pois o sinal onde se detecta o TiO_2 acaba sendo diluído por regiões da imagem onde apenas o Al_2O_3 está presente. A fim de evidenciar essa supressão de sinal, foram selecionados, a partir dos mapas brutos, apenas os espectros com intensidades superiores a 1000 contagens para a banda de maior intensidade (143 cm^{-1}). Este valor foi escolhido pois permitiu eliminar as linhas de base dos espectros obtidos no mapeamento dos padrões de TiO_2 , aumentando a razão sinal ruído e melhorando a sensibilidade do método. A Figura 44 contém os espectros médios de todos os espectros e os espectros médios obtidos para os espectros acima de 1000 contagens, representados pelas linhas pontilhadas para as respectivas concentrações.

FIGURA 44. ESPECTROS MÉDIOS OBTIDOS PARA OS PADRÕES FORTIFICADOS DE E171 A PARTIR DO MAPEAMENTO RAMAN. ESPECTROS BRUTOS (LINHAS CONTÍNUAS) E PRÉ-PROCESSADOS COM INTENSIDADE EM 143 cm^{-1} SUPERIOR A 1000 CONTAGENS (LINHAS PONTILHADAS).

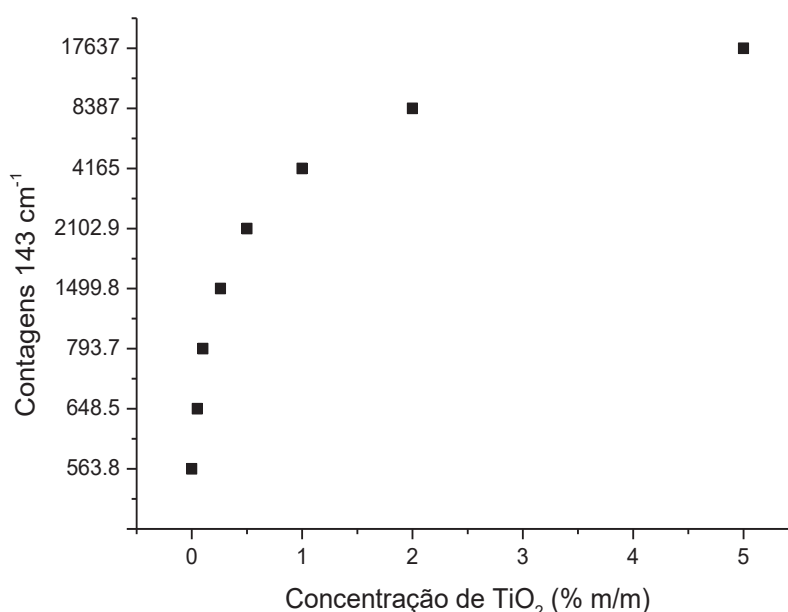


É possível verificar um aumento expressivo na intensidade das amostras de 500 e 10000 mg kg^{-1} ao remover da estimativa da média os espectros do mapa em que não há a presença do analito (ou seja, os que apresentaram intensidades menores que a linha de

base). Já para a amostra de 50000 mg kg^{-1} , esse efeito de supressão praticamente inexistente, uma vez que o alto teor de TiO_2 torna a distribuição do analito de certa forma mais homogênea do que nas demais amostras, conforme é possível observar no mapa a 143 cm^{-1} anteriormente apresentado (Figura 42). Assim, para esta amostra os espectros médios obtidos com e sem a seleção mencionada são bastante semelhantes entre si. Isso demonstra a importância de um processamento das imagens espectrais para melhorar a sensibilidade do método dos modelos de calibração.

A fim de evidenciar uma região de linearidade para o emprego futuro da calibração por MCR-ALS, gerou-se um gráfico de dispersão a partir das contagens obtidas a partir dos espectros médios brutos para a banda de maior intensidade (143 cm^{-1}) em função da concentração do padrão, apresentado na Figura 45.

FIGURA 45. NÚMERO DE CONTAGENS EM 143 cm^{-1} EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO (% m/m), OBTIDAS A PARTIR DOS ESPECTROS MÉDIOS.



Com base nessas medidas, não foi possível encontrar uma região linear única capaz de abranger o limite de detecção instrumental e o teor máximo permitido em alimentos ($1\% \text{ m/m}$), devido especialmente o efeito de supressão de sinal demonstrado anteriormente. Como a influência da supressão de sinal é diferente entre as amostras com baixos e altos teores do analito, a obtenção de uma relação de linearidade nessas condições não é alcançada.

Foram então realizados testes preliminares nos dados obtidos a fim de verificar a capacidade do MCR-ALS na recuperação dos espectros puros a partir dos mapas Raman, visando alcançar uma relação de linearidade entre a concentração e a intensidade de espalhamento.

Ao converter o arranjo tridimensional das imagens hiperespectrais em uma matriz de resposta instrumental D é possível aplicar o MCR-ALS, que decompõe os dados em um modelo bilinear ($D = C.S^T + E$) que correlaciona uma matriz de concentração C , da qual é possível reconstruir os mapas de distribuição dos componentes de interesse, com uma matriz S , que permite a reconstrução dos espectros puros e a identificação do analito. Já a matriz E correspondente aos resíduos, ou seja, aos dados não modelados.

A fim de facilitar o processamento dos dados os espectros obtidos para cada pixel foram cortados entre 85 e 950 cm^{-1} , selecionando 721 variáveis e assim uma região de interesse que compreende as bandas Raman características do TiO_2 anatase. Os mapas foram avaliados individualmente e diferentes condições foram testadas na construção do MCR-ALS.

O uso de restrições no MCR-ALS permite limitar a quantidade de soluções possíveis para o modelo visando a estimativa da matriz D^* a partir da equação $D = C.S^T + E$. A não negatividade é uma restrição geralmente utilizada em dados espectroscópicos, como os provenientes de Raman e foi aplicada no sentido dos espectros e das concentrações, uma vez que magnitudes com valores negativos não possuem sentido químico neste caso.

O número de componentes foi selecionado por Decomposição de Valor Singular (SVD, do inglês "*Singular Value Decomposition*"), visando maximizar a variância capturada com a obtenção de elevado coeficiente de correlação (R^2), e a partir da melhor estimativa visual inicialmente recuperada para o espectro de TiO_2 anatase.

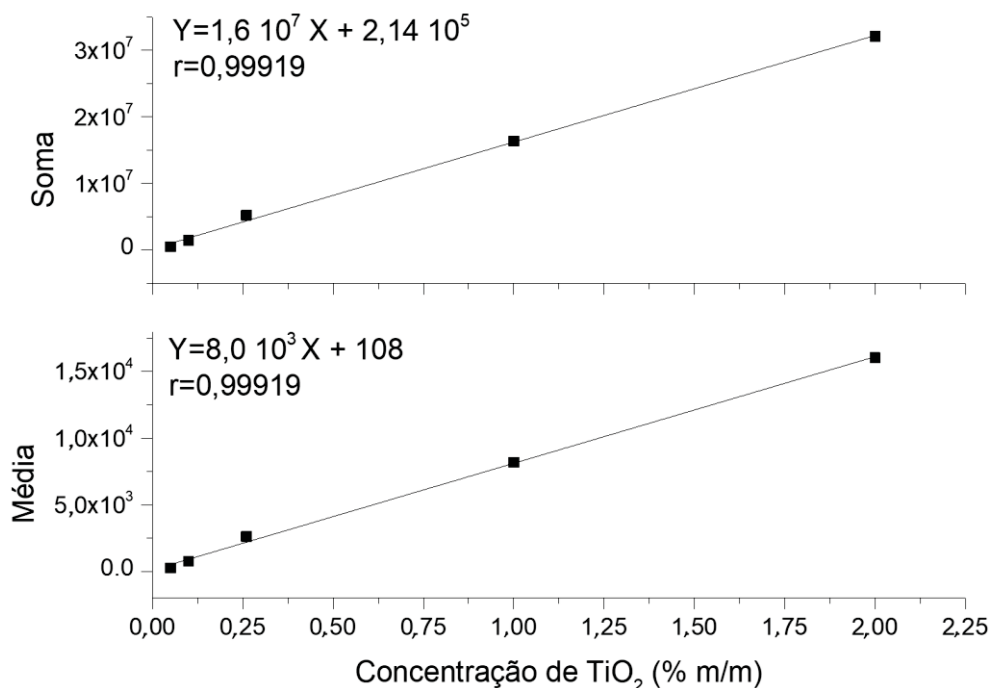
Durante a otimização do MCR-ALS é preciso fornecer informações iniciais para o algoritmo realizar a decomposição. Esse dado pode ser fornecido ao sistema (caso se conheça o sinal do analito e de seus interferentes, como o espectro Raman do E171 e do Al_2O_3) ou, ainda, estimado a partir de métodos como o algoritmo de Análise de Mistura Auto-Modelável Interativa Simples de Usar (SIMPLISMA, do inglês "*Simple-to-use Interactive Self-Modelling Mixture Analysis*"), que permite selecionar os espectros puros com base na quantidade de componentes distintas esperadas nas amostras (MARÇO et al., 2014). Este último foi utilizado para a recuperação da estimativa inicial do espectro de TiO_2 anatase, sendo as melhores estimativas alcançadas empregando-se duas componentes a partir dos dados obtidos para as amostras preparadas para a curva analítica, que contém apenas o analito e o dispersante Al_2O_3 .

A partir da comparação entre a matriz D^* , recuperada pelo modelo, com os dados originais (matriz D) é possível acessar a qualidade do modelo por meio da falta de ajuste (LOF, do inglês "*Lack of Fit*") da análise de componentes principais (PCA, do inglês "*Principal Component Analysis*"), que compara as duas matrizes, sendo ideal baixos valores para o LOF (MARÇO et al., 2014). Nas condições empregadas nesta modelagem preliminar, foram alcançados baixos valores de falta de ajuste para a PCA ($< 0,2\%$) e

variância explicada superior a 98,9% para todos os níveis de concentração avaliados, indicando a escolha adequada do número de componentes.

Realizado o MCR-ALS, foram então gerados os espectros puros e os mapas de distribuição recuperados pelo modelo. Com o mapa de distribuição foi possível estimar a média e a soma das concentrações recuperadas pelo modelo para cada amostra individualmente. Os valores de média e soma foram então plotados em função dos valores de referência, ou seja, dos teores nominais dos padrões de E171 preparados, resultando em uma curva analítica pseudo-univariada, em que se relaciona apenas um único sinal (a média ou soma do mapa de distribuição para a componente do TiO_2) com a concentração do analito. Como o MCR-ALS consegue extrair das imagens os espectros puros do analito, as regiões dos mapas em que há ausência de TiO_2 são automaticamente suprimidas do mapa de distribuição recuperado pelo modelo. Assim, ao realizar o processamento das imagens hiperespectrais foi possível encontrar linearidade adequada tanto a partir da soma quanto a partir da média dos espectros recuperados, conforme se pode observar na Figura 46, algo que não pode ser alcançado a partir dos espectros médios obtidos dos mapas brutos, conforme discutido anteriormente.

FIGURA 46. CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS POR MCR-ALS PARA O TiO_2 PARA AS AMOSTRAS PREPARADAS EMPREGANDO A PRENSA DE IR.

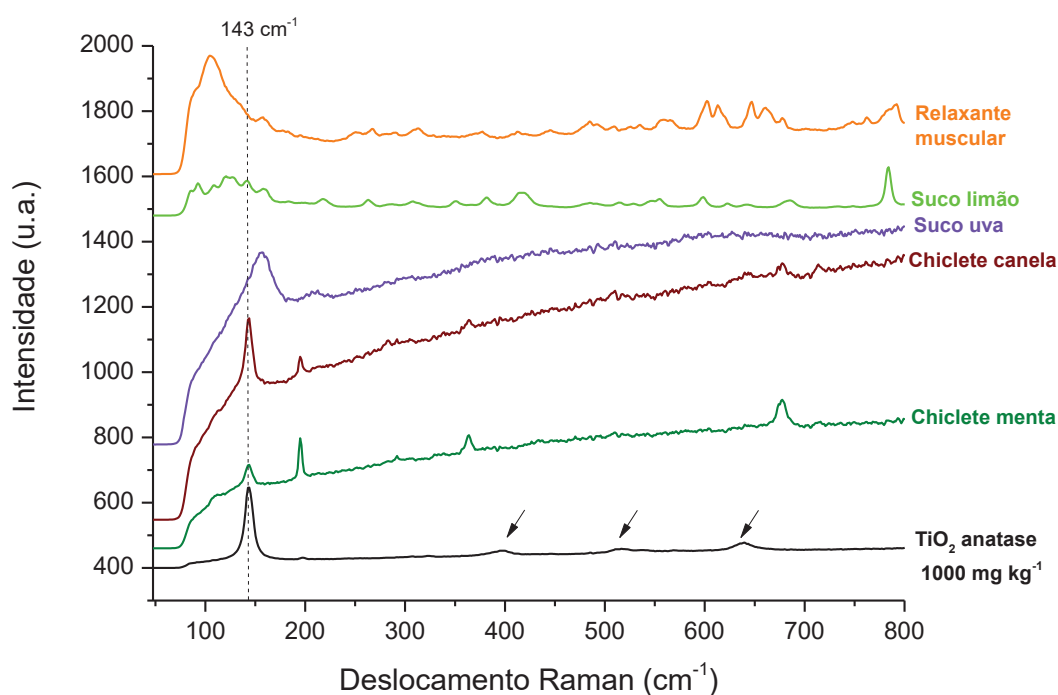


Observando as curvas apresentadas é possível verificar adequada linearidade, com coeficientes de correlação linear superiores a 0,990 (ANVISA, 2017). Também é possível evidenciar uma maior sensibilidade ao se empregar a soma das concentrações em comparação com o valor médio. Contudo, essa condição só é eficiente para a quantificação

caso seja possível recuperar o perfil espectral puro a partir das amostras reais, sem que sejam observadas grandes discrepâncias com o perfil esperado, de maneira a evitar a introdução de erros na quantificação.

A fim de verificar a potencialidade do mapeamento Raman associado ao MCR-ALS, nas condições até então investigadas, para a detecção de E171 em amostras reais, foram analisadas duas amostras comerciais de suco em pó e duas de chicletes. Adicionalmente, foi realizada a análise de uma amostra de comprimido de relaxante muscular, a fim de verificar, preliminarmente, a potencialidade na determinação de E171 também em amostras farmacêuticas. Como a superfície do comprimido já se apresentava compactada e plana, esta amostra foi disposta em uma lâmina de vidro e diretamente analisada no microscópio. A partir dos mapas brutos foram obtidos os espectros médios para as amostras reais, cuja ampliação está apresentada na Figura 47. Todas as amostras analisadas continham TiO_2 de acordo com o fabricante.

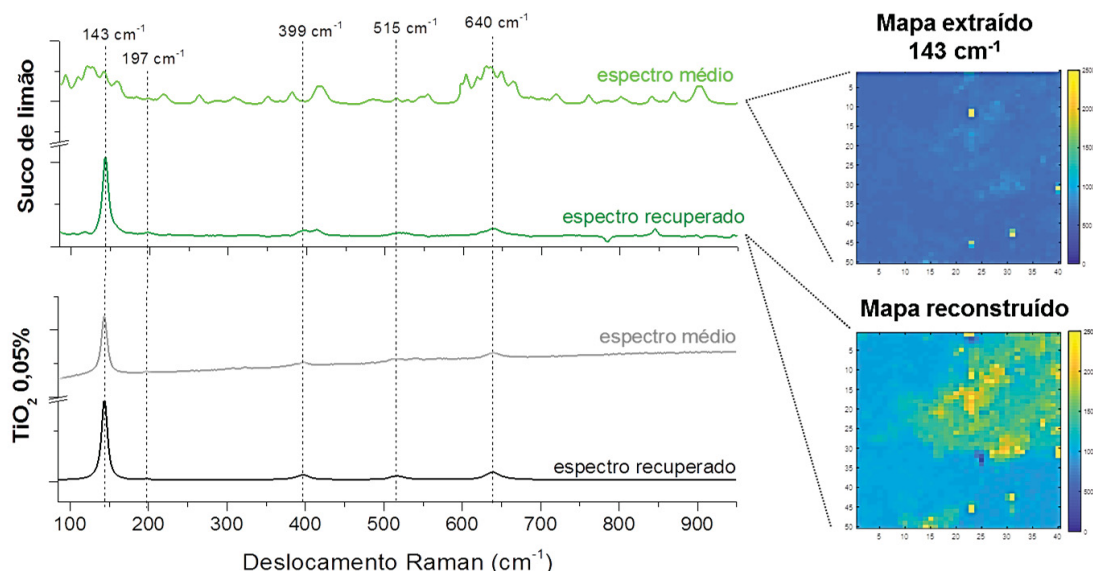
FIGURA 47. ESPECTROS MÉDIOS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS COMERCIAIS DE SUCO EM PÓ, CHICLETE E RELAXANTE MUSCULAR.



Com base nos espectros médios originais é possível verificar facilmente a presença da banda em 143 cm^{-1} nas amostras de chiclete. Já nas amostras de suco em pó e relaxante muscular, que apresentam maior complexidade de matriz, o perfil espectral do analito acaba sendo suprimido, impossibilitando sua detecção nestas condições. Os mapas obtidos para as amostras reais foram então submetidos ao MCR-ALS nas mesmas condições empregadas para os padrões, o que possibilitou a recuperação do espectro do

TiO₂ nas amostras reais e a reconstrução das imagens considerando todo o espectro recuperado, conforme exemplificado para a amostra de suco de limão (Figura 48).

FIGURA 48. A) ESPECTROS MÉDIOS E RECUPERADOS PELO MCR-ALS PARA A AMOSTRA DE SUCO DE LIMÃO E PARA O PADRÃO DE 0,05% m/m, DESTACANDO OS MAPAS DE DISTRIBUIÇÃO A 143 cm⁻¹ E RECONSTRUÍDO A PARTIR DO MCR-ALS DA AMOSTRA REAL.



É possível verificar que o perfil espectral recuperado pelo modelo para a amostra de suco de limão apresenta algumas imperfeições e discrepâncias com relação ao perfil puro do E171. Contudo, isso pode ser contornado por meio da utilização de uma matriz aumentada, na qual todos os dados são organizados de maneira a oferecer um único conjunto. Isso deve possibilitar a recuperação de um espectro único e mais representativo para todas as amostras, uma vez que o perfil espectral do analito puro passa a ser considerado na construção do modelo.

Apesar dessas alterações, o perfil espectral recuperado para a amostra de suco de limão apresenta grande semelhança com o recuperado para o padrão de TiO₂ 0,05% m/m, também apresentado na Figura 48. É possível ainda verificar a presença de todas as bandas características do TiO₂ anatase, conforme destacado pelas linhas pontilhadas. Tais bandas são imperceptíveis ou difíceis de distinguir a partir do espectro médio original da amostra, evidenciando a importância de um adequado processamento das imagens para a extração de informações químicas relevantes.

Ainda, foi possível evidenciar um ganho significativo em sensibilidade ao empregar o MCR-ALS na análise da amostra de suco, sendo observada uma distribuição mais detalhada do analito no mapeamento composicional recuperado pelo modelo (Figura 48), em comparação com o mapa extraído apenas para a máxima intensidade de espalhamento

(143 cm^{-1}), devido a eliminação do ruído e da supressão de sinal decorrente das regiões de amostra que não contém o analito. Além disso, conforme evidenciado, por utilizar todo o perfil espectral característico do analito, e não apenas a intensidade em 143 cm^{-1} , o uso do MCR-ALS deve conferir maior seletividade para o modelo de calibração, o que poderá ser útil na quantificação deste corante em diferentes tipos de matrizes.

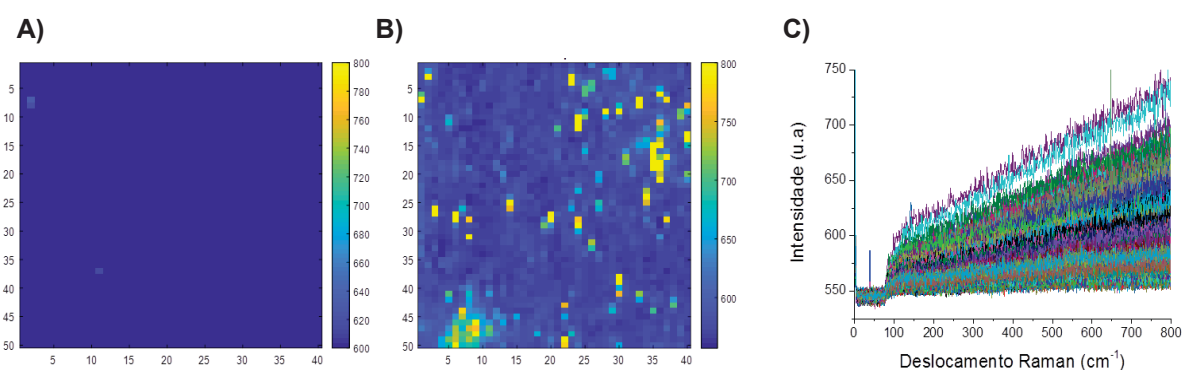
Tais resultados evidenciam a eficácia do imageamento hiperespectral para a análise de amostras complexas e heterogêneas, bem como a importância do processamento dos dados brutos para a obtenção de um modelo de calibração eficiente, de maneira a minimizar a influência dos interferentes e das regiões da amostra com baixo teor do analito, a fim garantir a adequada detecção e quantificação do composto de interesse.

II.4.1.2.2. PREPARO DE AMOSTRA EMPREGANDO O MOLDE DE AÇO INOX DESENVOLVIDO

Devido à impossibilidade de participar presencialmente das análises por Raman, por conta das medidas de distanciamento social decorrentes da pandemia de Covid-19, foi desenvolvido um sistema em aço inox, feito sob medida, a fim de permitir a obtenção de comprimidos individuais das amostras, para que pudessem ser enviados ao CME para a obtenção dos mapas.

Foram então realizados ensaios preliminares empregando os comprimidos obtidos com o novo molde a partir da prova em branco (Al_2O_3) e dos padrões fortificados com 0,05000 e 0,1000% (m/m) de TiO_2 anatase. Foi então realizado o mapeamento Raman nas mesmas condições que as amostras prensadas com o molde de IR. Para fins comparativos os mapas extraídos em 143 cm^{-1} para as amostras branco nas diferentes condições de prensagem estão apresentados na Figura 49.

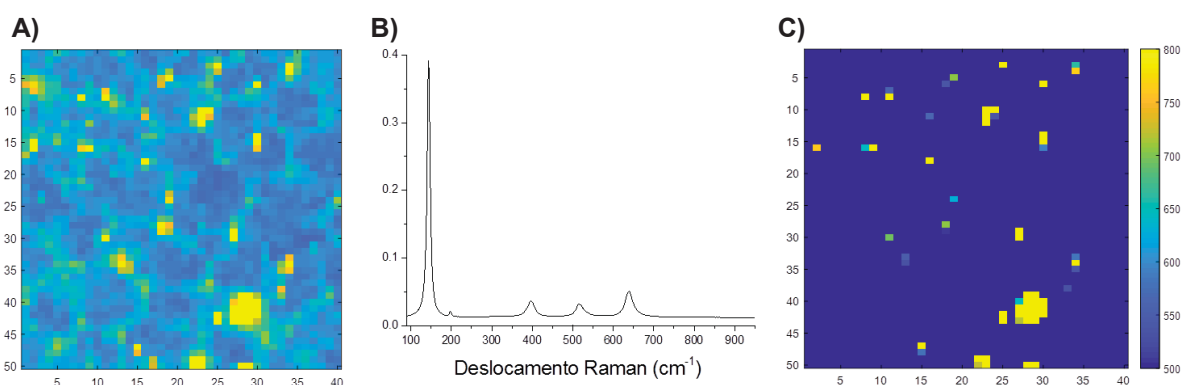
FIGURA 49. MAPAS DE CONCENTRAÇÃO UNIVARIADO EXTRAÍDO A 143 cm^{-1} PARA AS AMOSTRAS BRANCO EMPREGANDO O A) MOLDE DE IR E B) OS COMPRIMIDOS OBTIDOS COM O MOLDE NOVO C) ESPECTROS OBTIDOS PARA O COMPRIMIDO BRANCO.



A partir da comparação dos mapas é possível verificar uma maior rugosidade da amostra de óxido de alumínio ao utilizar a prensa de comprimidos desenvolvida, devido às imperfeições presentes no próprio molde, decorrentes do processo de fabricação. Isso fez com que a superfície da amostra apresentasse diferentes posições em relação ao detector, dando a falsa impressão de presença de TiO_2 na amostra. Contudo, não foi observado nenhum sinal característico do E171 na amostra branco, conforme evidenciado nos espectros brutos (Figura 49 C). Assim, como o modelo MCR-ALS permite recuperar os espectros puros, a presença dessa rugosidade não deve ser um fator limitante para a obtenção de modelo de calibração satisfatório empregando os comprimidos obtidos a partir do novo molde.

A eliminação do efeito da rugosidade dos comprimidos pode ser observada no mapa recuperado pelo MCR-ALS para a amostra de menor concentração avaliada com o molde novo (0,0500% m/m) nos testes preliminares, conforme apresentado na Figura 50, sendo possível obter uma imagem recuperada com perfil real de concentração do analito na amostra.

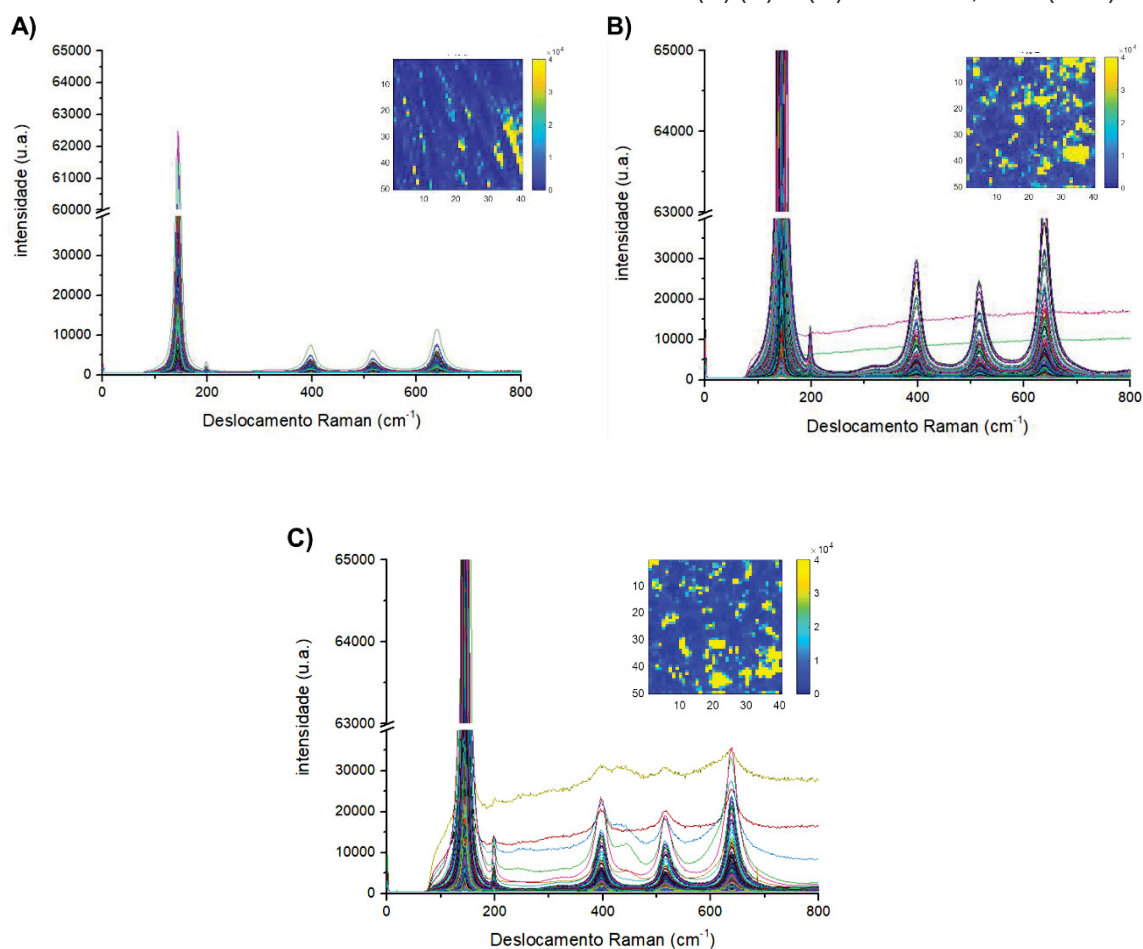
FIGURA 50. A) MAPA DE CONCENTRAÇÃO UNIVARIADO EXTRAÍDO A 143 cm^{-1} , B) ESPECTRO RECUPERADO POR MCR-ALS E C) MAPA RECONSTRUÍDO POR MCR-ALS, QUE CONTÉM TODA A FAIXA ESPECTRAL DE INTERESSE PARA O COMPRIMIDO DE 0,05 % m/m DE TiO_2 OBTIDO COM O MOLDE NOVO.



Além da mudança no preparo das amostras, empregando o molde para a confecção de comprimidos, foi necessário alterar o óxido empregado no preparo dos padrões para a obtenção de uma curva analítica. Com esta mudança do reagente, que possuía maior granulometria que o anteriormente empregado, foi observada grande dificuldade na homogeneização das amostras com concentrações de E171 superiores a 1,00% (m/m). Além da heterogeneidade na distribuição do analito notada nos mapas obtidos, foi verificada a presença de grandes aglomerados nas amostras, conforme pode ser observado na Figura 51, que contém os mapas recuperados pelo MCR-ALS, obtidos pelo

modelo construído com as mesmas condições anteriores, e os espectros brutos obtidos para a triplicata do nível de concentração de 1,00% (m/m). A presença de tais agregados levava à saturação do detector para intensidades superiores a 65000 u.a. durante o mapeamento, conforme pode ser observado também na Figura 51, suprimindo assim o sinal espectral, especialmente para a banda em 143 cm^{-1} , obtido para estas amostras.

FIGURA 51. ESPECTROS RAMAN BRUTOS OBTIDOS NO MAPEAMENTO E MAPAS RECUPERADOS POR MCR-ALS PARA AS RÉPLICAS (A) (B) E (C) DE TiO_2 1,00 % (m/m).



Além disso, é possível verificar uma diferença significativa entre os mapas obtidos para as diferentes réplicas, em especial para a réplica A em que não foi observada a saturação espectral bem como o mapa recuperado apresentou, visualmente, menores concentrações de TiO_2 distribuído pela amostra. Tal fato indica uma falta significativa de homogeneidade entre as réplicas preparadas no laboratório, o que pode levar a problemas de precisão no preparo dos padrões para a obtenção de uma curva adequada. A heterogeneidade é esperada em amostras sólidas comerciais, contudo, tendo em vista a necessidade de uma mesma composição entre diferentes lotes de um mesmo produto, aferindo qualidade ao produto fornecido, uma composição final reprodutível deve ser alcançada.

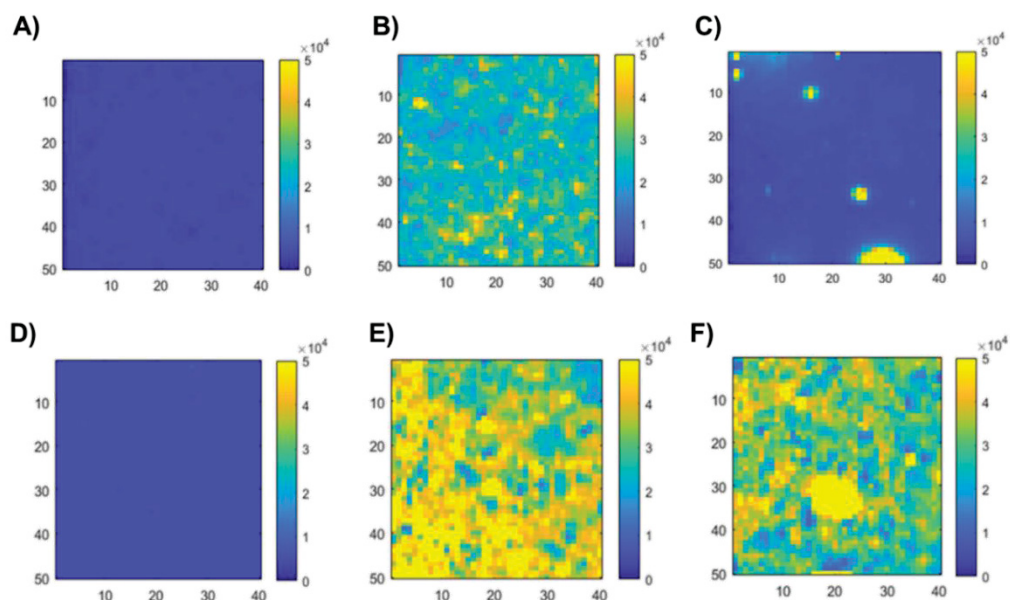
Foram então preparados novos comprimidos em triplicata na concentração de 1,00% (m/m) de E171, utilizando como dispersantes dois óxidos de alumínio com diferentes granulometrias disponíveis no laboratório: óxido A próprio para cromatografia (Merck, PA) e óxido em pó B (PA). Visando minimizar a heterogeneidade das amostras foram preparados 5,00 g de padrão em cada condição sendo avaliados dois tipos de preparo: por agitação em vórtex ou por maceração em pistilo e almofariz de ágata. Para cada preparo foram coletadas três alíquotas, que foram então prensadas e analisadas.

As amostras maceradas foram preparadas por meio da diluição geométrica volume/volume (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2007), conforme as recomendações para o preparo de fármacos. Neste procedimento o dispersante, neste caso o Al_2O_3 , é adicionado inicialmente ao gral em uma quantidade próxima a do ativo, no caso o TiO_2 . A amostra foi macerada e o dispersante novamente adicionado ao gral, agora em uma quantidade semelhante a massa presente no almofariz, e então novamente macerado. Este processo foi repetido até a completa adição do Al_2O_3 , o que garante uma melhor distribuição entre analito e dispersante.

Após o preparo e prensagem, os comprimidos obtidos foram analisados por Raman e os dados foram processados por MCR-ALS nas condições anteriormente otimizadas (avaliando-se apenas uma faixa espectral mais restrita contendo apenas as bandas de interesse do analito, 85 a 720 cm^{-1} , empregando-se duas componentes e não negatividade no sentido das concentrações e dos espectros). Foram então gerados os mapas recuperados para as provas branco dos óxidos A e B, bem como das diferentes condições de preparo avaliadas para as amostras fortificadas, sendo uma réplica de cada condição apresentada na Figura 52.

Não foram observadas grandes diferenças entre os mapas recuperados a partir dos óxidos não fortificados. Além disso os espectros recuperados não apresentaram nenhum sinal de espalhamento Raman na região espectral de interesse para a determinação do E171, conforme já era esperado, indicando que ambos poderiam ser empregados como dispersantes no preparo dos comprimidos para a construção de curvas analíticas.

FIGURA 52. MAPAS RECONSTRUÍDOS POR MCR-ALS PARA AS AMOSTRAS DO ÓXIDO A: A) PROVA EM BRANCO, B) 1,00% (m/m) E171 MACERADO, C) 1,00% (m/m) AGITAÇÃO EM VÓRTEX; E DO ÓXIDO B: D) PROVA EM BRANCO, E) 1,00% (m/m) MACERADO, F) 1,00% (m/m) AGITAÇÃO EM VÓRTEX.



Avaliando os mapas obtidos para as amostras fortificadas, é possível observar uma maior homogeneidade na distribuição do corante E171 para as amostras preparadas por maceração para ambos os óxidos, conforme Figura 52 (B) e (E), em comparação às obtidas por agitação em vórtex (Figura 52 C e F), para as quais ainda é possível observar a presença de grandes agregados com alta concentração do corante. Assim, devido a reduzida quantidade de pixels contendo TiO_2 nas amostras preparadas pela agitação em vórtex, bem como a saturação observada devido à presença de grandes agregados nestas amostras, para ambos os óxidos, foi identificada uma queda expressiva nos valores de concentração recuperadas pelo MCR-ALS com relação ao esperado com base nos ensaios anteriores, indicando que o preparo por simples agitação não é adequado para altas concentrações.

Além disso, foi notada uma aderência parcial das amostras às paredes do almofariz e do pistilo durante a maceração, efeito este bem mais pronunciado para as amostras preparadas com o óxido A, o que implicou na queda das concentrações do analito nos mapas recuperados em comparação ao obtido para o óxido B, como pode ser observado pela comparação dos mapas apresentados na Figura 52 (B) e (E). Isso se deve especialmente a diferença de granulometria entre o TiO_2 e o óxido A, que apresentava grãos visualmente maiores, fator este bem conhecido por interferir na eficiência da homogeneização entre dois sólidos. Já o emprego do óxido B para a diluição dos padrões,

que possuía granulometria mais fina, permitiu uma melhor homogeneização das amostras mesmo ao empregar apenas a agitação por vórtex, como evidenciado na Figura 52 (F).

Ainda, mesmo nas amostras maceradas, foram observados alguns agregados o que também levou à saturação espectral de alguns pixels durante o imageamento, apesar de estarem presentes em quantidades bem inferiores em relação aos resultados obtidos nos ensaios anteriores, apresentados na Figura 51.

Assim, devido a granulometria mais adequada, optou-se por preparar os padrões empregando-se o óxido B. Além disso, por possibilitar a obtenção de amostras mais homogêneas, o preparo por maceração via diluição geométrica passou a ser adotado para as amostras com concentração igual ou superior a 1,00% (m/m). Para as amostras com teores inferiores não foram observados grandes problemas de repetibilidade, sendo estas preparadas por simples agitação em vórtex.

II.4.1.2.3. AVALIAÇÃO DAS FIGURAS DE MÉRITO E DA EFICIÊNCIA DO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO DE E171 EM AMOSTRAS COMERCIAIS

Visando a obtenção de um modelo adequado de calibração por MCR-ALS empregando o mapeamento Raman, foram preparados comprimidos em sete níveis de concentração (0,0200, 0,0300, 0,0500, 0,100, 0,500, 1,00 e 1,40 % m/m) em triplicata a fim de obter uma curva analítica. As amostras com teores iguais ou superiores a 1,00% (m/m) foram preparadas por meio da maceração, agora empregando menores massas de amostra (2,00 g) a fim de permitir um volume mais adequado ao almofariz utilizado. Para estas amostras, os mapas foram coletados empregando uma potência inferior, de apenas 10 mW, a fim de evitar a saturação do detector em pontos com elevado teor do analito. Os dados obtidos foram então normalizados para 30 mW antes da realização do MCR-ALS, potência essa empregada na obtenção dos mapas das amostras com concentrações inferiores a 1,00% (m/m) e os resultados serão apresentados mais adiante.

O método proposto também foi aplicado para a análise de amostras reais. Devido a elevada fluorescência, os dados foram coletados empregando-se a potência de 10 mW, e posteriormente normalizados para 30 mW, seguindo o tratamento para os comprimidos dos padrões em altas concentrações. Foram selecionadas amostras sólidas com diferentes composições, a fim de averiguar a capacidade do modelo na recuperação do espectro do TiO₂ em condições bastante distintas. Assim, foram adquiridas amostras comerciais de sopas e sucos em pó de diferentes marcas e sabores e uma amostra de chiclete e doce de leite em barra. As amostras em pó foram prensadas para a obtenção de comprimidos, empregando-se as mesmas condições descritas anteriormente para o preparo dos padrões

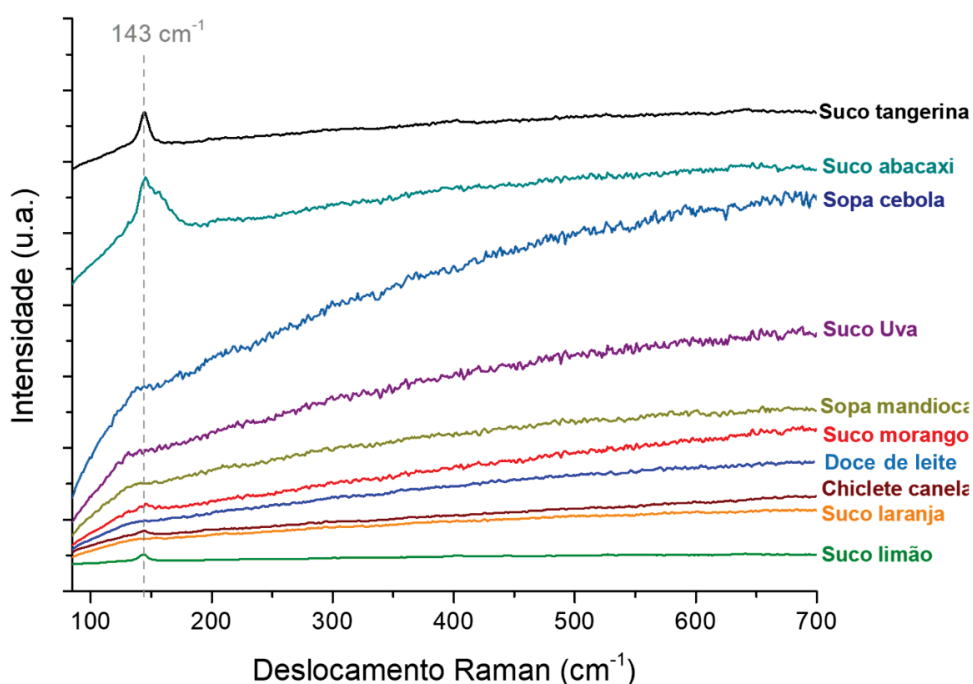
de E171, e as amostras de chiclete e doce de leite em barra foram analisadas diretamente sem nenhum preparo prévio uma vez que já se apresentam intrinsecamente prensadas.

As amostras comerciais foram escolhidas por possibilitarem a análise direta, sem preparo, ou ainda apenas pela obtenção de comprimidos que pudessem ser enviados para análise ao CME.

Foi então construída uma matriz aumentada, contendo todos os espectros de cada imagem referente à curva analítica (incluindo as respectivas réplicas) e às amostras reais, totalizando 57 amostras analisadas. Selecionou-se a região entre 85 e 720 cm^{-1} para os espectros da matriz aumentada, a fim de selecionar apenas a faixa espectral característica do TiO_2 anatase antes da construção do modelo. Assim, foi possível obter uma matriz de 114000 linhas (uma amostra a cada 2000 linhas) por 521 colunas (pontos espectrais entre 85 e 720 cm^{-1}). O emprego dessa matriz possibilita a construção de um único modelo por MCR-ALS para todas as amostras, permitindo associar o espectro puro de interesse, no caso o espectro do TiO_2 , sempre a uma mesma componente recuperada pelo modelo.

No imageamento das amostras comerciais foi observada elevada fluorescência, decorrente da complexidade na composição das diferentes matrizes analisadas, conforme é possível verificar nos espectros médios obtidos a partir dos mapas brutos de cada uma das amostras, antes da realização do MCR-ALS (Figura 53). Vale ressaltar que os espectros apresentados foram verticalmente deslocados no gráfico para evitar a sobreposição e facilitar a comparação dos dados.

FIGURA 53. ESPECTROS RAMAN MÉDIOS OBTIDOS A PARTIR DOS MAPAS COLETADOS PARA AS AMOSTRAS COMERCIAIS.



Avaliando-se os espectros médios é possível verificar uma grande dificuldade em encontrar o perfil espectral característico do analito na maioria das amostras analisadas, sendo evidenciada a presença da banda mais pronunciada 143 cm^{-1} apenas nas amostras de suco de tangerina, abacaxi, morango e limão e na amostra de chiclete de canela. Esta supressão de sinal decorre da elevada complexidade das matrizes, o que já havia sido observado anteriormente nas análises preliminares, supressão esta intimamente relacionada a elevada fluorescência observada nas amostras comerciais.

A fluorescência é um efeito colateral da espectroscopia Raman, e pode ser minimizada por meio da redução da fenda de entrada para o detector, permitindo reduzir a captação de radiação proveniente dos interferentes da matriz, ou ainda diminuindo a energia da fonte de laser utilizada, a fim de evitar excitação eletrônica dos interferentes. Contudo, isso também reduz a intensidade de espalhamento inelástico detectado o que, conseqüentemente, reduz a sensibilidade instrumental para a determinação do analito. Além disso, como o objetivo do presente trabalho é o emprego do método em amostras com diferentes composições, a seleção de um único laser para minimizar a fluorescência de amostras com matrizes tão distintas é dificultada.

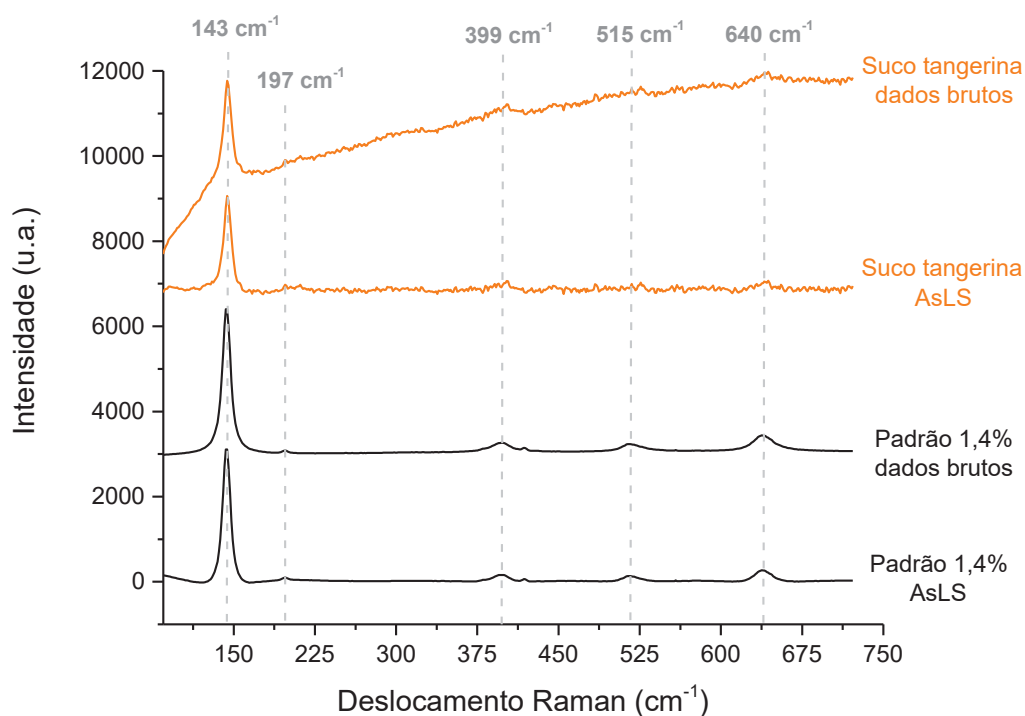
Assim, a fim de suprimir o efeito da fluorescência os mapas obtidos, tanto para as amostras reais quanto para os padrões, foram pré-processados por mínimos quadrados assimétricos (AsLS, do inglês "*Asymmetric Least-Squares*") visando a correção da linha de base. O AsLS permite localizar as regiões de pico nos espectros de maneira automatizada, garantindo a recuperação das informações espectrais de interesse de maneira confiável (BAEK et al., 2015; KOREPANOV, 2020). Permite ainda, além de corrigir a inclinação da linha de base, melhorar a resolução dos picos, o que é extremamente útil no caso de sobreposição espectral.

As condições empregadas foram previamente otimizadas visando alcançar a melhor supressão da fluorescência e uma adequada recuperação do perfil de espalhamento Raman característico do analito nas amostras comerciais sem, contudo, causar perdas de informação espectral relevante. Para tanto foram testados diferentes parâmetros de suavização (λ), que devem variar entre 10^2 e 10^9 , e de assimetria (p), sendo recomendado valores entre 0,001 e 0,1 para sinais de pico positivos. Quanto maior o valor de λ menor a inclinação e mais a linha de base se aproxima da linearidade, enquanto que para valores de λ inferiores uma maior curvatura será observada nos espectros. Já a assimetria confere diferentes pesos a cada ponto espectral, o que permite a recuperação dos picos após o ajuste da linha de base por AsLS.

A Figura 54 contém a média dos espectros obtidos para a amostra de suco de tangerina e para uma das réplicas do padrão de E171 na concentração de 1,40% (m/m) antes e depois do pré-processamento por AsLS. Os espectros apresentados foram obtidos nas

condições otimizadas, ($\lambda=10^3$, $p=0,01$), a fim de exemplificar a capacidade do algoritmo na correção automática da linha de base.

FIGURA 54. ESPECTROS MÉDIOS OBTIDOS A PARTIR DOS MAPAS DA AMOSTRAS COMERCIAL DE SUCO DE TANGERINA E DO PADRÃO DE 1,40% (m/m) DE E171 COM E SEM CORREÇÃO DA LINHA DE BASE POR AsLS.



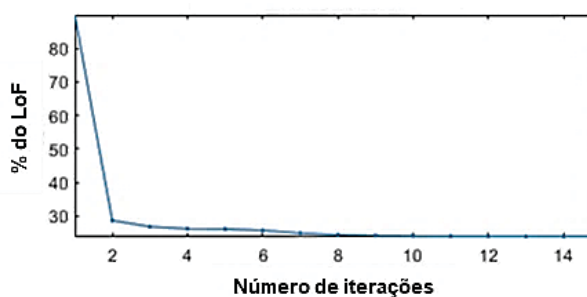
Avaliando-se os espectros é possível observar uma adequada correção da linha de base para a amostras comercial de suco, permitindo verificar com maior facilidade o perfil de espalhamento Raman característicos do analito, conforme evidenciado pela presença das bandas destacadas pelas linhas pontilhadas. Esta supressão da fluorescência foi analogamente observada para as demais amostras comerciais. Vale ressaltar ainda que, para as amostras dos padrões, como exemplificado para o TiO_2 1,40 % (m/m), não foram observadas grandes alterações no perfil espectral após a aplicação do AsLS, uma vez que os dados brutos não sofrem a presença de uma fluorescência significativa.

Foram então avaliadas diferentes condições para a construção do MCR-ALS empregando a matriz aumentada após o pré-processamento por AsLS. O número de componentes foi selecionado por meio do SVD, buscando-se maximizar a variância explicada e alcançar uma adequada estimativa inicial do espectro do analito. A estimativa inicial dos espectros foi realizada a partir dos espectros selecionados dos padrões e de amostras reais de diferentes composições que continham o analito de acordo com o fabricante.

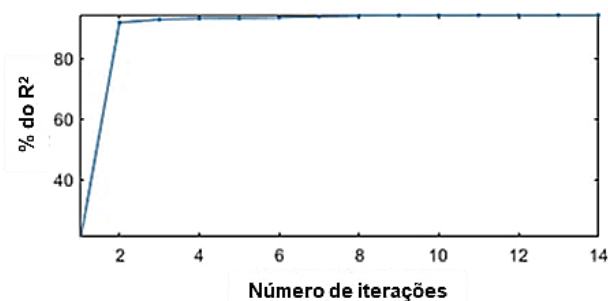
As melhores estimativas foram alcançadas empregando-se não negatividade no sentido dos espectros e das concentrações, oito componentes e normalização pela soma total dos espectros na matriz aumentada obtida após a realização do AsLS. Nestas condições foi alcançado um valor de LOF da PCA relativamente baixo (3,8%) e um R^2 de 94,4%. Além disso, em condições ideais o LOF da PCA e o R^2 não devem variar após dez iterações sucessivas (MARÇO et al., 2014), o que pode ser observado na evolução do LOF e do R^2 em função do número de iterações, apresentados na Figura 55, indicando a adequada qualidade do modelo obtido.

FIGURA 55. EVOLUÇÃO DO A) % LOF DA PCA E DO B) % R^2 OBTIDOS POR MCR-ALS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS.

A)

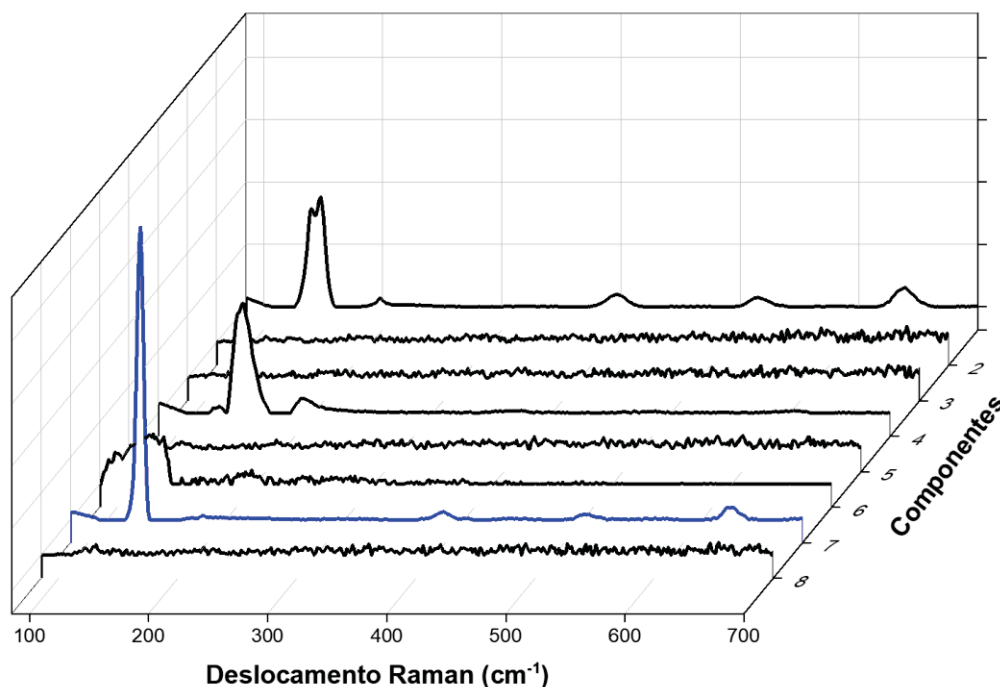


B)



A partir dos espectros recuperados pelo modelo foi possível identificar que a componente 7 corresponde ao espectro recuperado característico do analito, conforme destacado em azul na Figura 56.

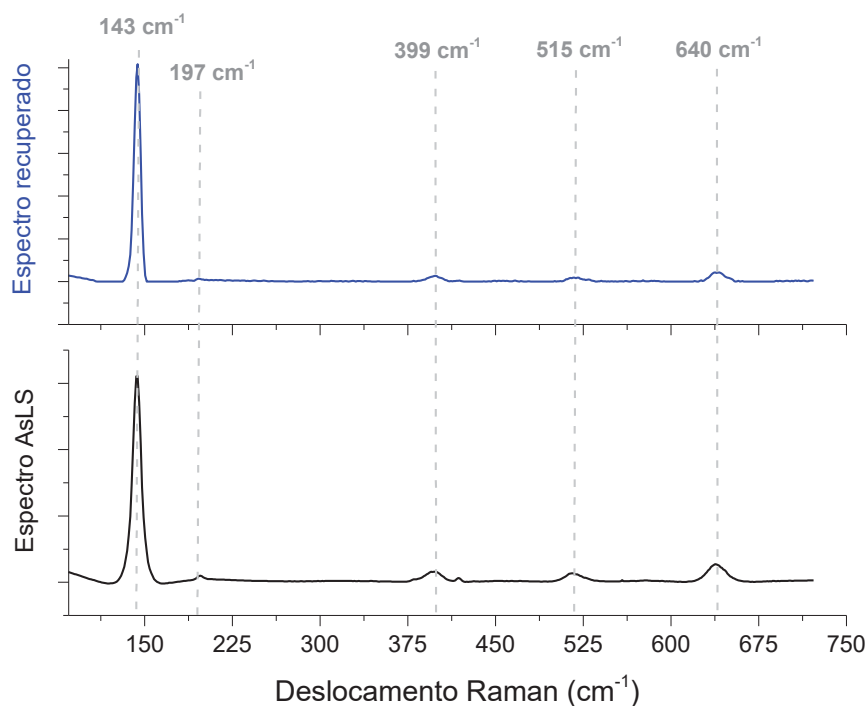
FIGURA 56. ESPECTROS RECUPERADOS POR MCR-ALS PARA AS 8 COMPONENTES.



O MCR-ALS possibilita a avaliação individual das concentrações recuperadas para cada uma das componentes, ou seja, de maneira simplificada, permite o isolamento dos mapas recuperados para cada uma delas. Assim, é possível eliminar o efeito dos demais constituintes das amostras, capazes de interferir na determinação do analito, como por exemplo a componente 4, cujo perfil espectral se sobrepõem a banda de 143 cm^{-1} , característica do TiO_2 . Sem esta possibilidade de seleção dos dados, empregando-se por exemplo a calibração univariada a partir apenas dos espectros médios de cada mapa, a presença deste interferente poderia levar a uma estimativa superestimada do teor encontrado nas amostras, por exemplo. Esta seletividade é o que garante a calibração por MCR-ALS empregando padrões na ausência de interferentes, já que o modelo é capaz de recuperar apenas a influência da componente de interesse, o que é uma das grandes vantagens deste tipo de modelagem. Assim, devido à *vantagem de segunda ordem*, o método não necessita de revalidação no caso de introdução de novos interferentes durante as análises de rotina, garantindo sua aplicabilidade em diferentes tipos de matrizes de amostra.

A Figura 57 contém a comparação entre o espectro recuperados pelo MCR-ALS para a componente 7 (destacado em azul) e o espectro médio de uma das réplicas do padrão de TiO_2 1,40% (m/m) empregado na construção do modelo, cuja linha de base já havia sido corrigida por AsLS.

FIGURA 57. COMPARAÇÃO ENTRE O ESPECTRO RECUPERADO PELO MCR-ALS (AZUL) E O DO PADRÃO DE E171 1,40% (m/m) APENAS PRÉ-PROCESSADO POR AsLS.



É possível verificar grande semelhança entre os espectros, sendo observada a presença de todas as bandas características do analito no espectro recuperado por MCR-ALS. Uma comparação mais refinada pode ser alcançada com o auxílio de um mapeador de ângulo espectral (SAM, do inglês “*Spectral Angle Mapper*”), que permite estimar o ângulo entre os vetores, sendo que valores de ângulo próximos de zero indicam elevada similaridade e ângulos próximos a 90° demonstram pouca similaridade (GALAL; HASSAN; IMAM, 2012). Comparando-se os espectros apresentados na Figura 57, foi estimado em ambiente MATLAB um ângulo igual a $14,4136^\circ$, indicando uma semelhança aceitável entre os espectros recuperado e empregado na calibração, o que demonstra uma boa capacidade do modelo em encontrar nas amostras o espectro do analito, mesmo na presença de interferentes.

Uma vez que o perfil espectral puro do analito foi recuperado com sucesso por MCR-ALS a partir da matriz aumentada, sem grandes discrepâncias com o perfil esperado, os mapas de distribuição recuperados para os padrões foram então empregados para a construção de uma curva analítica pseudo-univariada. A curva foi estimada a partir da soma das concentrações obtidas para a componente 7 em função do teor do corante E171 (% m/m), conforme apresentado na Figura 58, e os valores estimados para as principais figuras de mérito estão contidos na Tabela 12.

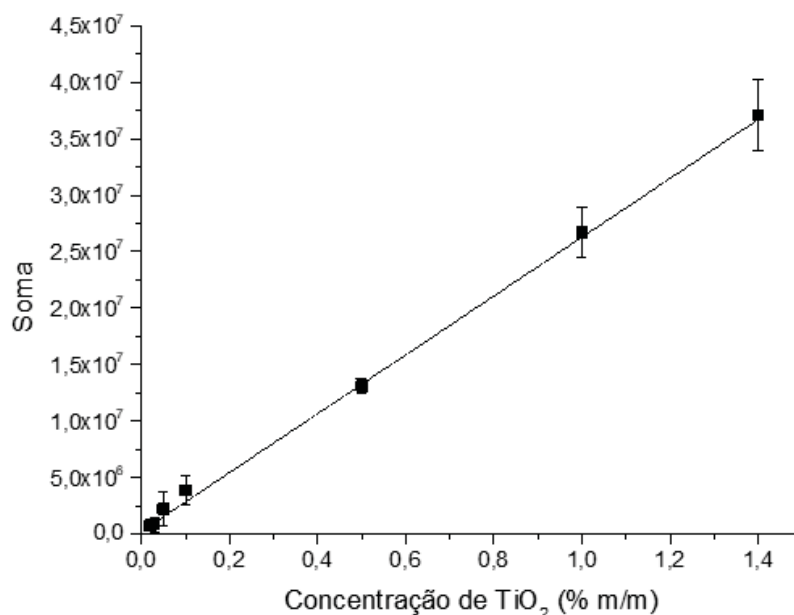
FIGURA 58. CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS POR MCR-ALS PARA O TiO₂ ANATASE.

TABELA 12. PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO PARA A DETERMINAÇÃO DO CORANTE E171 VIA MAPEAMENTO RAMAN ASSOCIADO A MCR-ALS.

Parâmetros	TiO ₂ anatase
Coefficiente Linear	2,25 10 ⁵
Coefficiente Angular	2,60 10 ⁷
Coefficiente de correlação linear (<i>r</i>)	0,9990
LOD (% m/m)	0,0111
LOQ (% m/m)	0,0370

Na Figura 58 é possível verificar um desvio adequado entre as triplicatas obtidas para os padrões de 1,00 e 1,40% (m/m), indicando que o preparo por maceração foi eficiente para alcançar certa homogeneidade entre as amostras, garantindo assim a desejável repetibilidade dos resultados. Isto pode ser verificado, também, nos mapas recuperados apresentados na Figura A 1 do anexo 1. Além disso, avaliando-se as principais figuras de mérito (Tabela 12) é possível observar um coeficiente de correlação linear bastante satisfatório, indicando a eficácia do modelo em recuperar o sinal inerente ao espectro puro do analito a partir dos padrões. Vale ressaltar ainda que o método proposto possibilita a determinação dos teores de TiO₂ em uma ampla faixa linear, abrangendo baixos teores, podendo assim ser empregado desde a análise de adulterações em alimentos cujo emprego do E171 seja proibido, até as determinações em amostras que excedem o limite estabelecido pela legislação internacional de 1,00% (m/m) (FDA, 2020).

A curva analítica obtida foi empregada para estimar a concentração do analito nas amostras reais, e os valores estimados estão apresentados na Tabela 13.

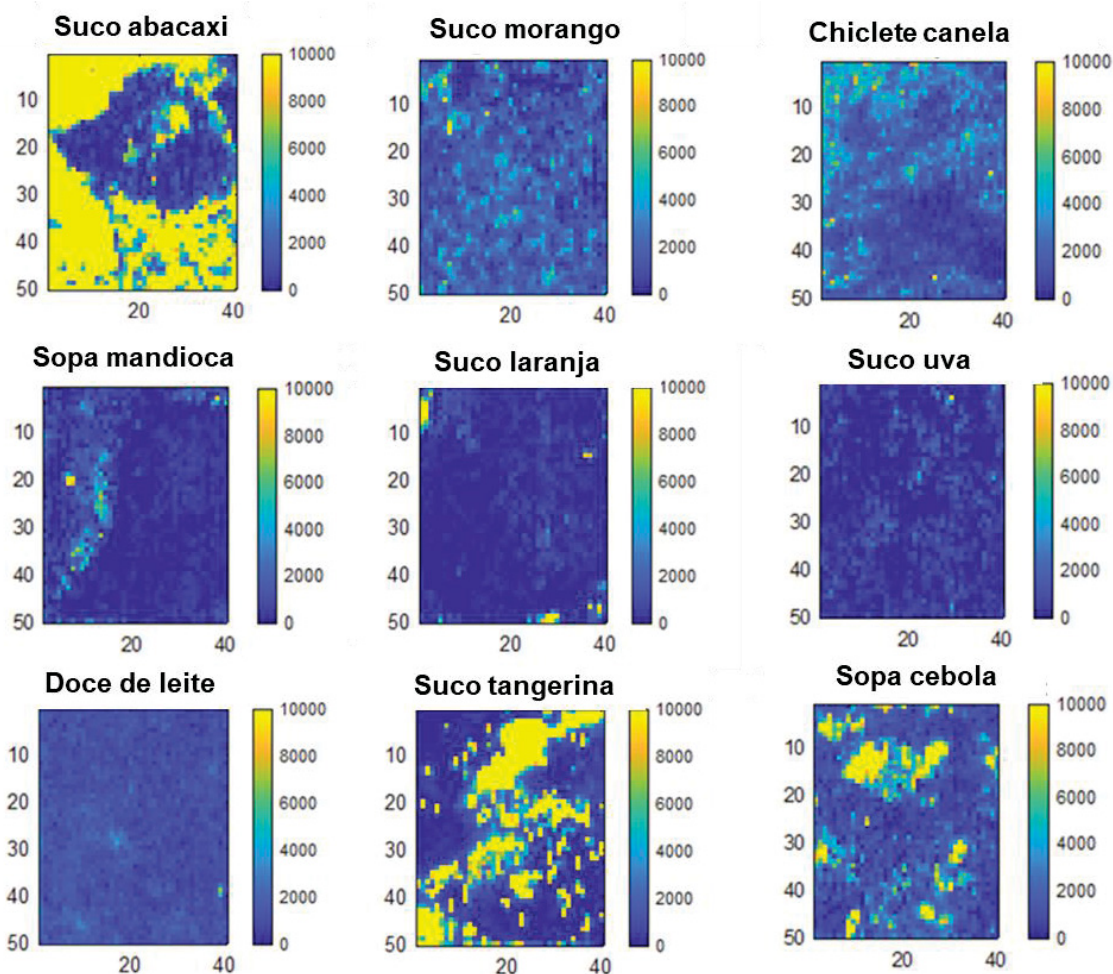
TABELA 13. TEORES DE TiO₂ ESTIMADOS PARA AS AMOSTRAS REAIS POR MAPEAMENTO RAMAN ASSOCIADO A MCR-ALS.

Amostra (marca)	Teor de TiO₂ (% m/m)
Suco em pó laranja (A)	0,025
Suco em pó tangerina (A)	0,99
Suco em pó limão sem açúcar (B)	0,21
Suco em pó Uva (C)	0,022<LOQ
Suco em pó abacaxi (D)	1,3
Suco em pó morango (E)	0,13
Sopa em pó cebola	0,21
Sopa em pó mandioca, cebola e salsa	0,037
Doce de leite	0,095
Chiclete canela	0,15

Foram observados baixos teores do analito na maioria das amostras analisadas, sendo que apenas a amostra de suco em pó sabor abacaxi (marca D) apresentou teor acima do estabelecido pelo *Food and Drug Administration* (FDA, 2020).

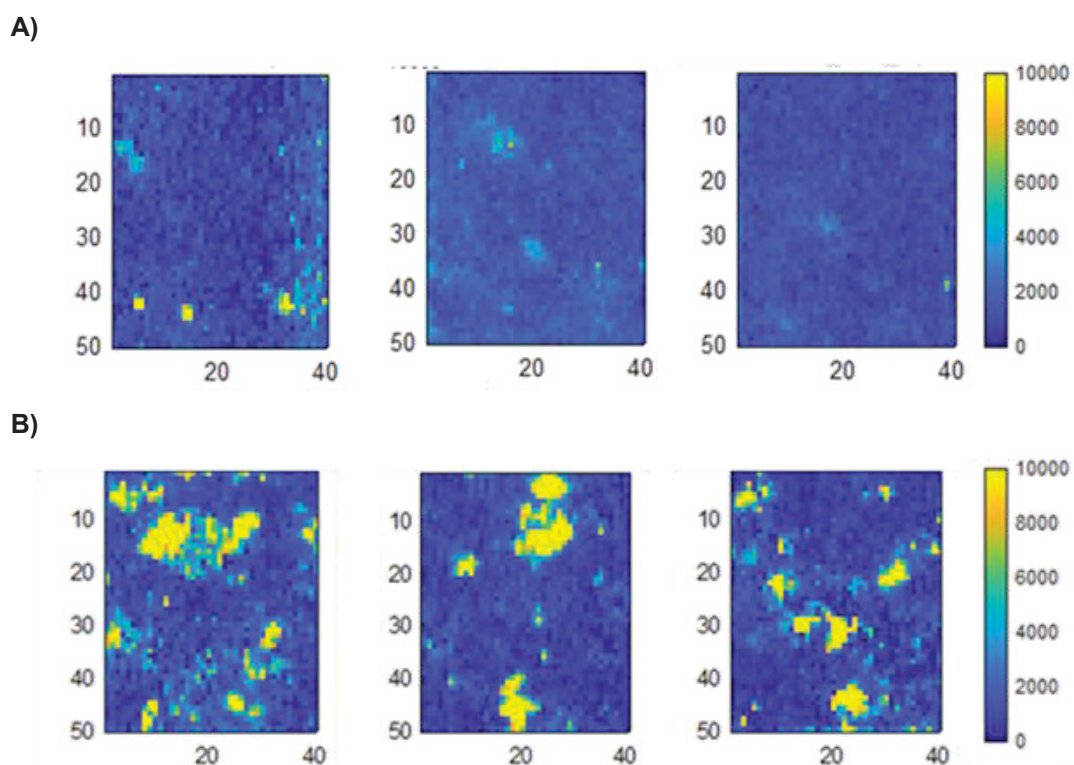
A partir dos mapas recuperados para as amostras comerciais (Figura 59) é possível verificar certa homogeneidade na distribuição do TiO₂ na maioria das amostras, bem como verificar visualmente a diferença de concentração entre elas, sendo observados elevados teores especialmente nas amostras de suco de abacaxi e tangerina e para a sopa de cebola.

FIGURA 59. MAPAS DE CONCENTRAÇÃO RECUPERADOS POR MCR-ALS PELA COMPONENTE 7 (TiO_2) PARA AS AMOSTRAS REAIS.



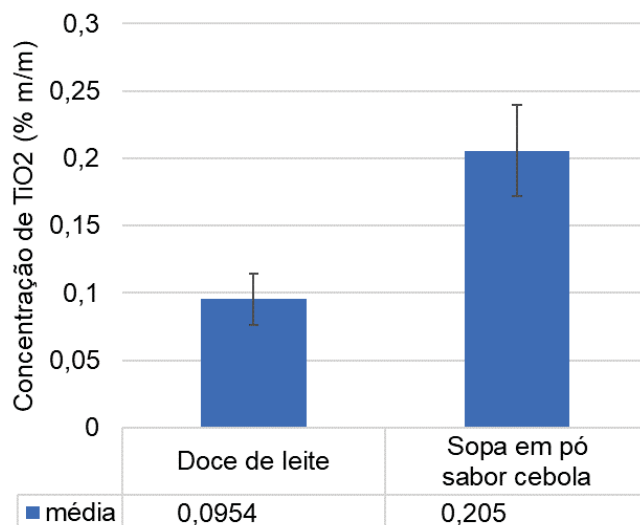
A fim de avaliar a homogeneidade da distribuição do analito nos alimentos comerciais, foram selecionadas duas amostras para realização das análises em triplicata. As amostras de doce de leite e sopa de cebola foram escolhidas por apresentarem matrizes bastante distintas e teores intermediários do analito segundo a estimativa da curva analítica e os mapas recuperados, teores estes semelhantes aos observados para maioria das amostras avaliadas. Para a sopa, três alíquotas foram pesadas e devidamente prensadas, e três partes diferentes de um mesmo doce de leite foram analisadas diretamente sem nenhum preparo prévio. A Figura 60 contém os mapas recuperados para cada uma das réplicas obtidas.

FIGURA 60. MAPAS DE CONCENTRAÇÃO RECUPERADOS POR MCR-ALS PELA COMPONENTE 7 (TiO_2) PARA AS RÉPLICAS DAS AMOSTRAS A) DOCE DE LEITE E B) SOPA DE CEBOLA.



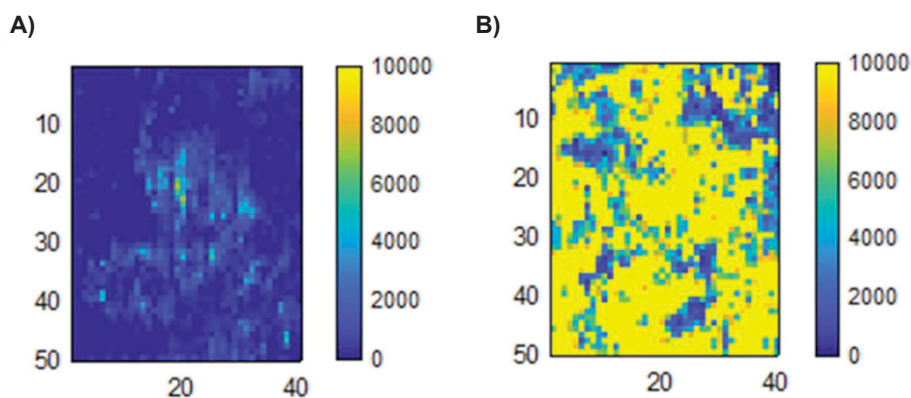
É possível perceber uma grande semelhança entre os mapas recuperados pelo modelo para as respectivas réplicas. A partir dos mapas recuperados foram estimados, com base na curva analítica, os teores de TiO_2 (% m/m) (Figura 61), tendo sido observado um desvio padrão relativamente baixo entre as réplicas (0,02% (m/m) para o doce de leite e 0,03% (m/m) para a sopa), indicando certa homogeneidade na distribuição do analito em uma mesma amostra. Logo, partindo do pressuposto de que as amostras comerciais apresentam uma composição aproximadamente homogênea, é possível inferir que os teores do corante E171 estimados para as demais amostras reais, mesmo sem a realização de réplicas até o presente momento, deve estar bem próximo ao real.

FIGURA 61. TEORES ESTIMADOS POR MCR-ALS PARA AS RÉPLICAS DAS AMOSTRAS DE DOCE DE LEITE E SOPA DE CEBOLA.



Um ensaio preliminar visando avaliar a exatidão do método foi realizado empregando-se uma amostra de suco em pó de guaraná, que não apresenta TiO_2 segundo o fabricante. Foram preparados 2,000 g de amostra fortificada com 0,500% (m/m) de E171, por meio da agitação em vórtex, conforme estabelecido anteriormente para o preparo dos padrões em concentrações menores que 1,00% (m/m). As amostras com e sem fortificação foram devidamente mapeadas por Raman e os mapas recuperados por MCR-ALS para a componente do TiO_2 estão apresentados na Figura 62.

FIGURA 62. MAPAS RECUPERADOS POR MCR-ALS PARA O SUCO EM PÓ SABOR GUARANÁ: A) PROVA BRANCO E B) FORTIFICADO COM 0,500% (m/m).



A partir dos mapas recuperados é possível verificar a presença de sinal mesmo na amostra branco, contudo, o teor estimado com base na curva analítica foi de apenas 0,0260% (m/m), valor inferior ao LOQ do método (0,0370 % m/m). Já para a amostra fortificada é possível verificar um aumento expressivo na distribuição do analito na amostra,

sendo estimado um teor de 0,470% (%m/m). Isso corresponde a uma de exatidão de 93,4%, o que corrobora mais uma vez com a alta capacidade do modelo em isolar o sinal do analito mesmo na presença de interferentes.

Assim, com base no exposto até o momento, foi possível obter uma curva analítica adequada via mapeamento Raman associado ao MCR-ALS para a determinação de TiO_2 em amostras de alimentos. Vale ressaltar que o método proposto garante a detecção e a quantificação do analito em diferentes matrizes de maneira simples e eficiente, sem a necessidade de preparos de amostra específicos para cada tipo de matriz avaliada.

II.5. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO II

Os ensaios inicialmente realizados por espectrometria Raman possibilitaram a detecção de TiO_2 nas amostras de alimento analisadas. Contudo, dada a heterogeneidade das amostras, um maior número de espectros precisou ser obtido para fins de calibração, visando a quantificação do TiO_2 em amostras alimentícias pela técnica, o que foi alcançado por meio do mapeamento Raman.

A partir dos espectros médios obtidos dos mapas dos padrões de E171 não foi possível escolher apenas uma região linear para o modelo de calibração. Isso ocorreu, possivelmente, devido à influência das regiões da amostra em que não há a presença do analito. Contudo, ao empregar o MCR-ALS, esse efeito foi suprimido, sendo possível recuperar os espectros puros a partir das amostras individuais, bem como os perfis de concentração, que apresentaram adequada linearidade na faixa de concentração avaliada.

O preparo de comprimidos a partir dos padrões e de amostras comerciais em pó empregando o molde de aço inox desenvolvido possibilitou condições adequadas para o imageamento das amostras. A partir dos mapas obtidos foi possível construir uma matriz aumentada contendo todas as amostras, que foi então empregada na calibração e na determinação dos teores de E171 nas amostras reais por MCR-ALS. Para tanto, foi avaliada uma curva analítica em triplicata relacionando o teor do corante com a soma das concentrações recuperadas pelo modelo, tendo sido observada elevada linearidade ($r > 0,990$) e baixos valores de desvio.

A análise das amostras comerciais permitiu a determinação do analito em diferentes matrizes, garantindo a análise de amostras de chiclete, doce de leite, sopas e refrescos em pó sem a necessidade de nenhum preparo de amostra específico para as diferentes composições de amostra, sendo esta uma das principais vantagens do método proposto.

Além disso, foi possível calibrar o modelo na ausência de interferentes, sendo observado, ainda, uma elevada similaridade entre o espectro recuperado pelo modelo e o espectro do TiO_2 , evidenciando a capacidade conhecida do MCR-ALS na recuperação dos espectros puros do analito a partir de matrizes complexas.

Os resultados obtidos por mapeamento Raman associado ao MCR-ALS são bastante satisfatórios e indicam a eficiência adequada do método para a determinação do analito em amostras comerciais.

3. CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Foi possível estabelecer um novo protocolo de preparo de amostra empregando o Tanfloc SG como agente extrator para a extração e a pré-concentração de Ag-NP e Ag⁺ a partir de matrizes aquosas visando a determinação por GFAAS.

O método proposto apresentou adequadas figuras de mérito de validação, e permitiu alcançar limites de detecção e quantificação bem abaixo dos limites instrumentais (ou seja, sem a realização da pré-concentração) permitindo atingir detectabilidade em níveis próximos aos ambientalmente relevantes para as Ag-NP (poucos ng L⁻¹).

Ainda, o método possui grande potencial para diferenciação entre as nanopartículas e seus íons, o que é ainda um grande desafio para um monitoramento ambiental mais acessível de NM na química analítica atual.

Vale ressaltar que o Tanfloc SG é um polímero comercial já utilizado em estações de tratamento de águas e efluentes como um coagulante alternativo, o que torna o método ainda mais acessível para o monitoramento de nanomaterias à base de prata nestas estações. Além disso, eventualmente, o processo de digestão desenvolvido tem potencial para ser adaptado para análise direta do sedimento obtido no processo de tratamento, de maneira a acessar a qualidade de águas superficiais frente à presença de metais, como a prata, de forma simples e com baixo custo.

Tendo em vista os resultados apresentados, o método poderia ainda ser útil na determinação de outros metais em amostras aquosas, bem como seus nanomateriais derivados, uma vez que a formação *in situ* do agente extrator pode propiciar a captura de íons e particulados presentes na amostra.

O método proposto para a determinação do corante E171 também apresentou adequadas figuras de mérito de validação e foi aplicado com sucesso na análise de amostras comerciais de alimentos sólidos de diferentes composições. A associação entre o imageamento Raman e o MCR-ALS permitiu obter um modelo adequado para a determinação do corante, e eliminar possíveis efeitos de matriz, garantindo a análise de amostras com matrizes bastante distintas sem a necessidade de introdução de um moroso preparo de amostra.

REFERÊNCIAS

AIAZZI, B. et al. Spectral Distortion in Lossy Compression of Hyperspectral Data. **Journal of Electrical and Computer Engineering**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

ALAGARASI, A. Chapter - INTRODUCTION TO NANOMATERIALS. **National Centre for Catalysis Research**, n. November, p. 1–23, 2011.

ALLEN JR, L. V; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos / Dosage forms and drug delivery systems**. Porto Alegre: [s.n.]. v. Artmed, 8ª edição.

AMAI, R. S.; ROCHA, F. R. P.; NOBREGA, J. A. Sinais de fundo em análise instrumental: uma discussão essencial em cursos de graduação. **Química Nova**, 27 out. 2016.

AMITHARAJAH, A. The mechanisms of coagulation. Em: EDUFSCAR (Ed.). **TECNOLOGIAS PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS DE BASTECIMENTO**. São Carlos, SP, Brasil: [s.n.]. p. 20.

ANEKTHIRAKUN, P.; IMYIM, A. Separation of silver ions and silver nanoparticles by silica based-solid phase extraction prior to ICP-OES determination. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 470–475, mar. 2019.

ANSES. **Titanium dioxide: news of EFSA's updated assessment of the food additive E171**. Disponível em: <<https://www.anses.fr/en/content/titanium-dioxide-news-efsa-s-updated-assessment-food-additive-e171>>. Acesso em: 20 out. 2021.

ANTONIO CARLOS MENDES THAME. **Projeto de Lei 1370/2011 - Proíbe a utilização de dióxido de titânio em alimentos e cosméticos**. 2011. Disponível em: <<https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=502584>>. Acesso em: 13 out. 2022.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 36, de 25 de julho de 2013. **Diário Oficial da União**, v. 2017, p. 32–33, 2013.

ANVISA. RDC Nº 166, De 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, v. 141, n. 1, p. 87, 2017.

AOAC. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. **AOAC Official Methods of Analysis**, 2012.

ASSIS, L. M. et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99–109, jun. 2012.

BAEK, S.-J. et al. Baseline correction using asymmetrically reweighted penalized least squares smoothing. **The Analyst**, v. 140, n. 1, p. 250–257, 2015.

BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. Ácidos húmicos. **Revista Ceres**, v. 61, n. suppl, p. 856–881, dez. 2014.

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

BETTINI, S. et al. Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 40373, 20 fev. 2017.

BHATIA, S. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. Em: **Natural Polymer Drug Delivery Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 33–93.

BIORENDER. **BioRender**. Disponível em: <<https://biorender.com/>>.

BLASER, S. A. et al. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. **Science of The Total Environment**, v. 390, n. 2–3, p. 396–409, 15 fev. 2008.

BODDOLLA, S.; THODETI, S. A review on Characterization techniques of Nanomaterials. **International Journal of Engineering, Science and Mathematics**, v. 7, n. 1, p. 169–175, 2018.

BOLEA, E.; LABORDA, F.; CASTILLO, J. R. Metal associations to microparticles, nanocolloids and macromolecules in compost leachates: Size characterization by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to ICP-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 2, p. 206–214, fev. 2010.

BOLYARD, S. C.; REINHART, D. R.; SANTRA, S. Behavior of Engineered Nanoparticles in Landfill Leachate. **Environmental Science & Technology**, p. 130710152553007, 10 jul. 2013.

BUNDSCHUH, M. et al. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? **Environmental Sciences Europe**, v. 30, n. 1, p. 6, 8 dez. 2018.

BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G.; GOLIMOWSKI, J.; URBAN, P. L. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. **Waste Management**, v. 29, n. 9, p. 2587–2595, set. 2009.

CHADHA, N. et al. Different Analytical Approaches for the Determination of Presence of Engineered Nanomaterials in Natural Environments. **Journal of Hazardous, Toxic & Radioactive Waste**, v. 20, n. 1, p. 1–15, 2016.

CHANG, J. **TiO₂ producers seek to break the cycle**. Disponível em: <<https://www.icis.com/explore/resources/news/2019/02/21/10322681/tio2-producers-seek-to-break-the-cycle/>>. Acesso em out 2022.

CHEN, Q. et al. TiO₂ nanoparticles cause mitochondrial dysfunction, activate inflammatory responses, and attenuate phagocytosis in macrophages: A proteomic and metabolomic insight. **Redox Biology**, v. 15, p. 266–276, maio 2018.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. **Toxicology Letters**, v. 176, n. 1, p. 1–12, jan. 2008.

CHOI, S. et al. Looking for engineered nanoparticles (ENPs) in wastewater treatment systems: Qualification and quantification aspects. **Science of The Total Environment**, v. 590–591, p. 809–817, jul. 2017.

CIABATTIA, I. et al. Demonstration of a treatment system for purification and reuse of laundry wastewater. **Desalination**, v. 245, n. 1–3, p. 451–459, set. 2009.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA nº, 357 de 17 de março de 2005**. , 2005.

DE LA CALLE, I. et al. Towards routine analysis of TiO₂ (nano-)particle size in consumer products: Evaluation of potential techniques. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 147, p. 28–42, set. 2018.

DE SOUZA CORDEIRO, A. C.; MARCONDES SILVA, D. Remoção de matéria orgânica natural em água para consumo humano por processo de Fenton Homogêneo. **Sistemas & Gestão**, v. 13, n. 3, p. 311–320, 3 set. 2018.

DENDISOVÁ, M. et al. The use of infrared spectroscopic techniques to characterize nanomaterials and nanostructures: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1031, p. 1–14, nov. 2018.

DONG, F. et al. Time-resolved toxicity study reveals the dynamic interactions between uncoated silver nanoparticles and bacteria. **Nanotoxicology**, v. 11, n. 5, p. 637–646, 28 maio 2017.

DONOVAN, A. R. et al. Single particle ICP-MS characterization of titanium dioxide, silver, and gold nanoparticles during drinking water treatment. **Chemosphere**, v. 144, p. 148–153, fev. 2016.

DONOVAN, A. R. et al. Fate of nanoparticles during alum and ferric coagulation monitored using single particle ICP-MS. **Chemosphere**, v. 195, p. 531–541, mar. 2018.

Dossiê Aromas: Os aromas. **Food Ingredients Brasil**, v. 8, p. 40–68, 2009.

DURÁN, N. et al. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, v. 42, n. 2, 2019.

EC. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, v. L221, p. 8–36, 2002.

EDUOK, S. et al. Evaluation of engineered nanoparticle toxic effect on wastewater microorganisms: Current status and challenges. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 95, p. 1–9, set. 2013.

ERENO, D. Beleza fundamentada. **Pesquisa Fapesp 146**, v. 146, p. 81–85, 2008.

ESFA, E. F. S. A. **Titanium dioxide: E171 no longer considered safe when used as a food additive**. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/news/titanium-dioxide-e171-no-longer-considered-safe-when-used-food-additive%0A>>.

EUROPEAN COMMISSION. **Communication From the Commission To the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee**. 2012.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950–2962, abr. 2009.

FDA. **Code of Federal Regulations, Title 21, USA**. , 2020.

FEDERICI, G.; SHAW, B.; HANDY, R. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 415–430, 30 out. 2007.

FERGUSON, M. D. The influence of humic acid and water hardness on the partitioning of silver ions and nanoparticles between fresh water and freshwater algae. **WWU Graduate School Collection**, v. 182, 2011.

FERRARI, B. J. D. et al. Predicting Uncertainty in the Ecotoxicological Assessment of Solid Waste Leachates. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 22, p. 7012–7017, nov. 2006.

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724–731, set. 1999.

FIORATI, A. et al. Silver Nanoparticles for Water Pollution Monitoring and Treatments: Ecosafety Challenge and Cellulose-Based Hybrids Solution. **Polymers**, v. 12, n. 8, p. 1635, 23 jul. 2020.

GALAL, A.; HASSAN, H.; IMAM, I. F. A novel approach for measuring hyperspectral similarity. **Applied Soft Computing**, v. 12, n. 10, p. 3115–3123, out. 2012.

GEISS, O. et al. Characterisation of food grade titania with respect to nanoparticle content in pristine additives and in their related food products. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 37, n. 2, p. 239–253, 1 fev. 2020.

GONDIKAS, A. et al. Where is the nano? Analytical approaches for the detection and quantification of TiO₂ engineered nanoparticles in surface waters. **Environmental Science: Nano**, 2018.

GOTTSCHALK, F.; NOWACK, B. The release of engineered nanomaterials to the environment. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 5, p. 1145, 2011.

GUO, Z. et al. Titanium dioxide nanoparticle ingestion alters nutrient absorption in an in vitro model of the small intestine. **NanoImpact**, v. 5, p. 70–82, jan. 2017.

HELLO NATURAL LIVING. **Titanium Dioxide: Is It Safe? Or Should You Avoid It?** Disponível em: <<https://www.hellonaturalliving.com/titanium-dioxide-is-it-safe-or-should-you-avoid-it/>>. Acesso em: 17 fev. 2020.

HJORTH, R. et al. Regulatory adequacy of aquatic ecotoxicity testing of nanomaterials. **NanoImpact**, v. 8, p. 28–37, out. 2017.

HONDA, R. J. et al. Removal of TiO₂ Nanoparticles During Primary Water Treatment: Role of Coagulant Type, Dose, and Nanoparticle Concentration. **Environmental Engineering Science**, v. 31, n. 3, p. 127–134, mar. 2014.

HUYNH, K. A.; CHEN, K. L. Aggregation Kinetics of Citrate and Polyvinylpyrrolidone Coated Silver Nanoparticles in Monovalent and Divalent Electrolyte Solutions. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 13, p. 5564–5571, jul. 2011.

IGLESIAS, M.; TORRENT, L. Silver Nanoparticles and Ionic Silver Separation Using a Cation-Exchange Resin. Variables Affecting Their Separation and Improvements of AgNP Characterization by SP-ICPMS. **Nanomaterials**, v. 11, n. 10, p. 2626, 6 out. 2021.

INGHAM, B. X-ray scattering characterisation of nanoparticles. **Crystallography Reviews**, v. 21, n. 4, p. 229–303, 2 out. 2015.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008. **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia**, 2020.

JIANG, C.; LIU, S.; ZHANG, T.; LIU, Q.; ALVAREZ, P. J. J.; CHEN, W. Current Methods and Prospects for Analysis and Characterization of Nanomaterials in the Environment. **Environmental Science & Technology**, v. 56, n. 12, p. 7426–7447, 2022.

JYOTI, K.; BAUNTHIYAL, M.; SINGH, A. Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 3, p. 217–227, jul. 2016.

KAEGI, R. et al. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 2, p. 233–239, nov. 2008.

KHOSRAVI, K. et al. A novel approach for determining total titanium from titanium dioxide nanoparticles suspended in water and biosolids by digestion with ammonium persulfate. **Analytica Chimica Acta**, v. 713, p. 86–91, fev. 2012.

KIM, H.-A. et al. Nanometrology and its perspectives in environmental research. **Environmental Health and Toxicology**, v. 29, p. e2014016, 15 out. 2014.

KIRCHNER, C. et al. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. **Nano Letters**, v. 5, n. 2, p. 331–338, 2005.

KOREPANOV, V. I. Asymmetric least-squares baseline algorithm with peak screening for automatic processing of the Raman spectra. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 51, n. 10, p. 2061–2065, 4 out. 2020.

LI, X.; LENHART, J. J.; WALKER, H. W. Aggregation Kinetics and Dissolution of Coated Silver Nanoparticles. **Langmuir**, v. 28, n. 2, p. 1095–1104, 17 jan. 2012.

LIM, J.-H.; BAE, D.; FONG, A. Titanium Dioxide in Food Products: Quantitative Analysis Using ICP-MS and Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 51, p. 13533–13540, 26 dez. 2018.

LÓPEZ-LORENTE, A. I.; SIMONET, B. M.; VALCÁRCEL, M. Electrophoretic methods for the analysis of nanoparticles. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 58–71, jan. 2011.

MANGRICH, A. S. et al. Green Chemistry in Water Treatment: Use of Coagulant Derived from *Acacia mearnsii* Tannin Extracts. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, 2014.

MARÇO, P. H. et al. Multivariate curve resolution with alternating least squares: description, operation and applications. **Química Nova**, 2014.

MCGILLICUDDY, E. et al. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. **Science of The Total Environment**, v. 575, p. 231–246, jan. 2017.

MEERMANN, B.; LABORDA, F. Analysis of nanomaterials by field-flow fractionation and single particle ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, n. 6, p. 1226–1228, 2015.

MOHAMED, H. R. H. Estimation of TiO₂ nanoparticle-induced genotoxicity persistence and possible chronic gastritis-induction in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 76–83, set. 2015.

MONTAÑO, M. D. et al. Single Particle ICP-MS: Advances toward routine analysis of nanomaterials. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 19, p. 5053–5074, 23 jul. 2016.

MOZHAYEVA, D.; ENGELHARD, C. A critical review of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry – A step towards an ideal method for nanomaterial characterization. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 2020.

MUDUNKOTUWA, I. A. et al. Accurate quantification of TiO₂ nanoparticles collected on air filters using a microwave-assisted acid digestion method. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, v. 13, n. 1, p. 30–39, 2 jan. 2016.

MÜHLING, M. et al. An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment. **Marine Environmental Research**, v. 68, n. 5, p. 278–283, dez. 2009.

MUSAFIR, M. et al. **MANUAL DE COLETA PARA ANÁLISES DE ÁGUA DE CONSUMO HUMANO**. 2017.

NARUNE, A.; MOHITE, S.; PRASAD, E. **Silver Nanoparticles Market**. Disponível em: <<https://www.alliedmarketresearch.com/silver-nanoparticles-market-A06923%0B%0A>>. Acesso em: 20 out. 2021.

NÓBREGA, J. A. et al. Sample preparation in alkaline media. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 5, p. 465–495, maio 2006.

OTUBO, L. Monografia - Técnicas de Caracterização de Nanopartículas Metálicas Funcionalizadas. **LQES, Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP**, p. 26, 2005.

PART, F. et al. Current limitations and challenges in nanowaste detection, characterisation and monitoring. **Waste Management**, v. 43, p. 407–420, set. 2015.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421–430, 2010.

PAVANELLI, G. **EFICIÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE COAGULANTES NA COAGULAÇÃO , FLOCULAÇÃO E SEDIMENTAÇÃO DE ÁGUA COM COR OU TUBIDÊS ELEVADA**. [s.l.] Universidade Estadual de São Paulo, USP, 2001.

PEÑA, M. D. P. S. et al. Hyperspectral imaging of nanoparticles in biological samples: Simultaneous visualization and elemental identification. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 5, p. 349–358, maio 2016.

PICCINNO, F. et al. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 9, 2012.

PICÓ, Y. Challenges in the determination of engineered nanomaterials in foods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 84, p. 149–159, nov. 2016.

POTOCNIK, J. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). **Official Journal of the European Union**, v. L275, p. 38–40, 2011.

ROTH, G. A. et al. Hyperspectral microscopy as an analytical tool for nanomaterials. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, n. 4, p. 565–579, jul. 2015.

RÓZ, A. L. DA et al. **Técnicas de Nanocaracterização**. Elsevier Editora Ltda, 2015.

SALEH, T. A. Trends in the sample preparation and analysis of nanomaterials as environmental contaminants. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v 28, dezembro 2020.

SCENIHR, S. C. ON E. AND N. I. H. R.; EU, E. C. The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. **SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS (SCENIHR)**, n. March, p. 1–79, 2006.

SELCK, H. et al. Nanomaterials in the aquatic environment: A European Union–United States perspective on the status of ecotoxicity testing, research priorities, and challenges ahead. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 5, p. 1055–1067, 18 maio 2016.

ŠILEIKAITĖ, A. et al. Analysis of Silver Nanoparticles Produced by Chemical Reduction of Silver Salt Solution. **Materials Science (Medžiagotyra)**, v. 12, n. 4, p. 287–291, 2006.

ŠILEIKAITE, A. et al. Investigation of silver nanoparticles formation kinetics during reduction of silver nitrate with sodium citrate. **Medžiagotyra**, v. 15, n. 1, p. 21–27, 2009.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos De Quimica Analitica**. 8. ed. 2009.

SMITH, J. P. et al. A novel multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) methodology for application in hyperspectral Raman imaging analysis. **The Analyst**, v. 144, n. 18, p. 5425–5438, 2019.

SONGSILAWAT, K.; SHIOWATANA, J.; SIRIPINYANOND, A. Flow field-flow fractionation with off-line electrothermal atomic absorption spectrometry for size characterization of silver nanoparticles. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 27, p. 4213–4218, jul. 2011.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 4, p. 409–427, 6 dez. 2016.

SUN, Q. et al. Removal of silver nanoparticles by coagulation processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 261, p. 414–420, out. 2013.

SYAFIUDDIN, A. et al. Silver Nanoparticles in the Water Environment in Malaysia: Inspection, characterization, removal, modeling, and future perspective. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 986, 17 dez. 2018.

TAGG, A. S. et al. Identification and Quantification of Microplastics in Wastewater Using Focal Plane Array-Based Reflectance Micro-FT-IR Imaging. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 12, p. 6032–6040, 16 jun. 2015.

TAN, C. et al. Rapid detection of TiO₂ (E171) in table sugar using Raman spectroscopy. **Food Additives & Contaminants: Part A**, p. 1–9, 15 dez. 2016.

TANAC. Ficha Técnica -Tanfloc sg. p. 1–11, [s.d.].

TIWARI, B. et al. A Simple and Universal Technique To Extract One- and Two-Dimensional Nanomaterials from Contaminated Water. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 47, p. 26108–26116, 2 dez. 2015.

UNIÃO EUROPEIRA. REGULAMENTO (UE) 2022/63 DA COMISSÃO EUROPEIA. **Jornal Oficial da União Europeia**, 22 jan. 2022.

VEJERANO, E. P. et al. Characterization of particle emissions and fate of nanomaterials during incineration. **Environ. Sci.: Nano**, v. 1, n. 2, p. 133–143, 2014.

WEINBERG, H.; GALYEAN, A.; LEOPOLD, M. Evaluating engineered nanoparticles in natural waters. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 72–83, jan. 2011.

WEIR, A. et al. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 4, p. 2242–2250, 21 fev. 2012.

WITZLER, M.; KÜLLMER, F.; GÜNTHER, K. Validating a Single-Particle ICP-MS Method to Measure Nanoparticles in Human Whole Blood for Nanotoxicology. **Analytical Letters**, v. 51, n. 4, p. 587–599, 4 mar. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Silver in drinking-water Background document for development of.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://apps.who.int/bookorders>>.

YIN, Y. et al. Water chemistry controlled aggregation and photo-transformation of silver nanoparticles in environmental waters. **Journal of Environmental Sciences**, v. 34, p. 116–125, ago. 2015.

ZHANG, C.; HU, Z.; DENG, B. Silver nanoparticles in aquatic environments: Physicochemical behavior and antimicrobial mechanisms. **Water Research**, v. 88, p. 403–427, jan. 2016.

ZHANG, J. Z. Chapter 2: Spectroscopic Techniques for Studying Optical Properties of Nanomaterials. Em: **Optical properties and spectroscopy of nanomaterials.** [s.l.] WORLD SCIENTIFIC, 2009.

ZHANG, X.; DE JUAN, A.; TAULER, R. Multivariate Curve Resolution Applied to Hyperspectral Imaging Analysis of Chocolate Samples. **Applied Spectroscopy**, v. 69, n. 8, p. 993–1003, 1 ago. 2015.

ZHAO, B. et al. A green, facile, and rapid method for microextraction and Raman detection of titanium dioxide nanoparticles from milk powder. **RSC Advances**, v. 7, n. 35, p. 21380–21388, 2017.

ZHAO, B. et al. Ligand-assisted magnetic solid phase extraction for fast speciation of silver nanoparticles and silver ions in environmental water. **Talanta**, v. 183, n. Novembro 2017, p. 268–275, 2018.

ZUBER, A. et al. Detection of gold nanoparticles with different sizes using absorption and fluorescence based method. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 227, p. 117–127, maio 2016.

ANEXO 1

TABELA A 1. VALORES PARA O TESTE DE GRUBBS ESTIMADOS PARA A CURVA ANALÍTICA DE Ag-CITRATO OBTIDA POR PADRONIZAÇÃO EXTERNA

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor de G ($G_{\text{crítico, } n=3, 95\%} = 1,115$)
1	-0,81
	1,11
	-0,31
5	1,02
	-0,60
	-0,56
10	-1,15
	0,62
	0,53
15	-1,15
	0,45
	0,70
30	-1,13
	0,76
	0,38
40	-0,59
	1,05
	-0,56
60	0,71
	-0,71
	-139

TABELA A 2. VALORES PARA O TESTE DE GRUBBS ESTIMADOS PARA A CURVA ANALÍTICA DE Ag-CITRATO OBTIDA POR MATRIZ MATCHED.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor de G ($G_{\text{crítico, } n=3, 95\%} = 1,115$)
0,05	-24,72
	0,71
	-0,71
0,1	-1,10
	0,36
	0,77
0,25	0,71
	-0,71
	-9,23
0,5	-0,46
	-0,69
	1,10
1	0,71
	-0,71
	-466

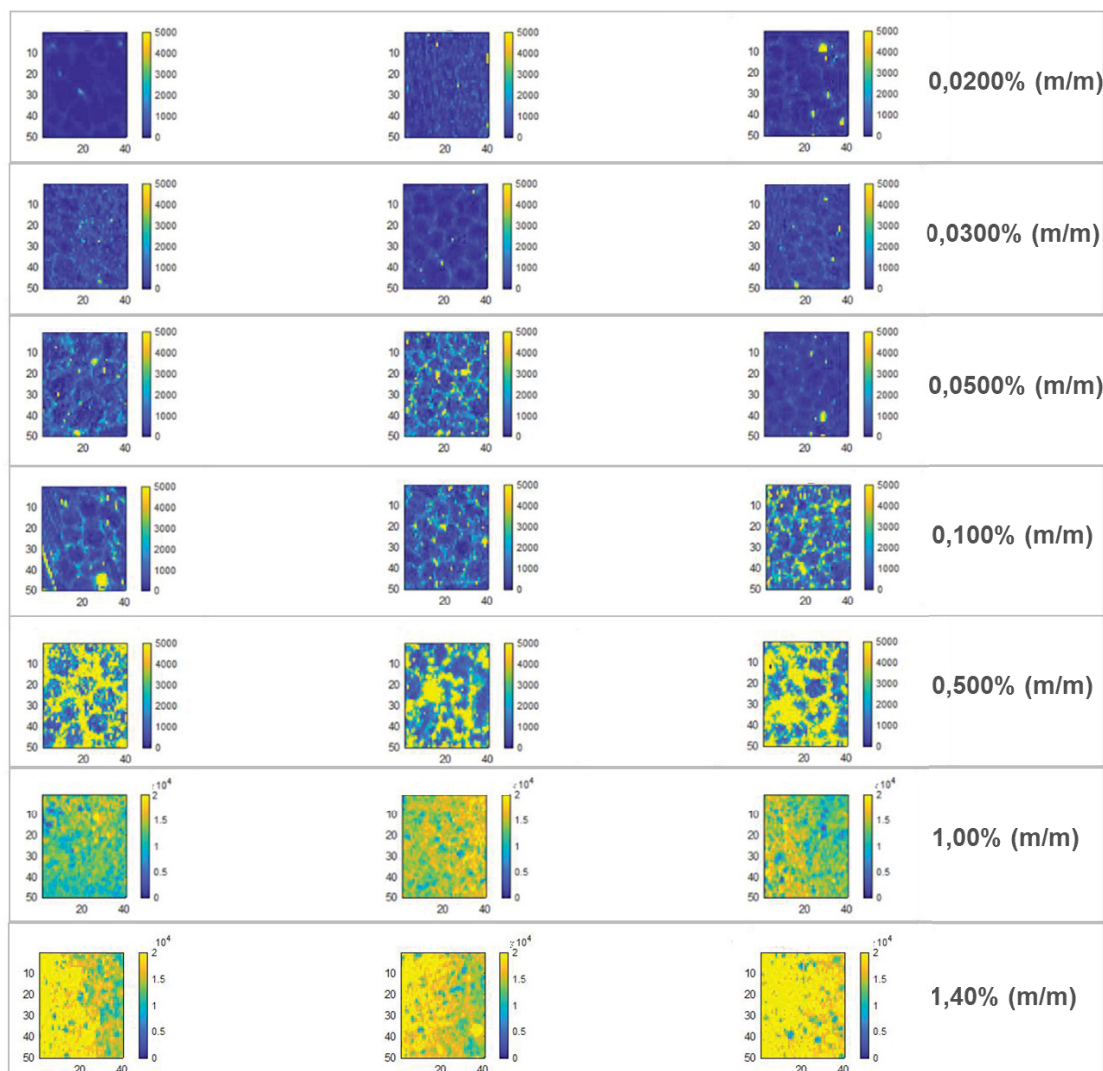
TABELA A 3. VALORES PARA O TESTE DE COCHRAN ESTIMADOS PARA A CURVA ANALÍTICA DE Ag-CITRATO OBTIDA POR PADRONIZAÇÃO EXTERNA.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Variância dos resíduos
1	0,00000
5	0,00016
10	0,00025
15	0,00030
30	0,00052
40	0,00075
60	0,00087
Valor máximo de variância	0,0008720
Somatório da variância	0,002863
C calculado	0,3045
C crítico (95% confiança)	0,5612
$C_{\text{calculado}} < C_{\text{crítico}}$	Homocedásticos

TABELA A 4. VALORES PARA O TESTE DE COCHRAN ESTIMADOS PARA A CURVA ANALÍTICA DE Ag-CITRATO OBTIDA POR MATRIX MATCHED.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Variância dos resíduos
0,05	0,00105
0,1	0,00000
0,25	0,00007
0,5	0,00006
1	0,00014
1,5	0,00025
Valor máximo de variância	0,00105
Somatório da variância	0,001561
C calculado	0,6694
C crítico (95% confiança)	0,6838
$C_{\text{calculado}} < C_{\text{crítico}}$	Homocedásticos

FIGURA A 1. MAPAS RECUPERADOS PARA OS PADRÕES DE E171 POR MCR-ALS.



ANEXO 2

ATIVIDADES COMPLEMENTARES

➤ **Participação em Curso**

III Curso de Introdução a Nanotecnologia & Nanotoxicologia, fornecido pelo Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), integrante do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), nos dias 25 e 26 de Outubro de 2018, em Campinas - SP.

Escola Brasileira de Síncrotron: “Fundamentos e Aplicações”, fornecido pelo Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), integrante do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), entre 15 e 26 de julho de 2019, em Campinas, SP.

Mini curso “Multivariate data analysis: from nano to macro analytical systems” (3 horas), ocorrido no dia 25 de setembro de 2022 no 20º ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica e 8º CIAQA - Congresso Ibero-Americano de Química em Bento Gonçalves, RS.

➤ **Palestras ministradas**

Seminário intitulado “*Contaminantes em baixa concentração: afinal pra que tanta preocupação?*” ministrado para alunos do curso de Farmácia (Disciplina CQ096) em 11 de outubro de 2019 com carga horária de 2h, no Departamento de Química da UFPR, Curitiba, PR.

Palestra ministrada na “Rodas de Conversa – PPGQ”, durante a XXIV Semana Acadêmica da Química - UFPR, realizado no período de 07/10/2019 a 11/10/2019, com carga horária de 1h e 30min, no Departamento de Química da UFPR, Curitiba, PR.

➤ **Participação em banca**

Avaliadora de Banca Avaliadora de Trabalhos apresentados durante a 11ª SIEPE – SEMANA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO da Universidade Federal do Paraná (11ª SIEPE), realizada nos períodos de 24 a 26 de setembro de 2019 em Curitiba. A carga horária total de atividades é de 4 horas.

➤ **Participação em workshop**

Participação como ouvinte no I Workshop on emerging contaminants in aquatic systems: Environmental management and risks to human health” ocorrido entre 03 e 04 de outubro de 2019 na UFPR, Curitiba, PR.

Participação como ouvinte no Workshop “Advances, Perspectives and Research Opportunities at the National Institute of Advanced Analytical Science and Technology (INCTAA)” (2 horas), ocorrido no dia 25 de setembro de 2022 no 20º ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica e 8º CIAQA - Congresso Ibero-Americano de Química em Bento Gonçalves, RS.

➤ **Apresentação de pôster**

PRISCILA LAGNER DA SILVEIRA ESTEVÃO, PATRÍCIO PERALTA-ZAMORA, NOEMI NAGATA “Coagulation as a sample preparation: an alternative for GFAAS determination of silver nanoparticles in aqueous matrices at environmental level”. Poster apresentado no I Workshop on emerging contaminants in aquatic systems: Environmental management and risks to human health” ocorrido entre 03 e 04 de outubro de 2019 na UFPR, Curitiba, PR.

PRISCILA LAGNER DA SILVEIRA ESTEVÃO, PATRÍCIO PERALTA-ZAMORA, FREDERICO LUIS FELIPE SOARES, NOEMI NAGATA “A new method based on the coagulation process for the determination of silver nanoparticles in water by GFAAS”. Poster apresentado no 20º ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica e 8º CIAQA - Congresso Ibero-Americano de Química ocorrido entre os dias 25 e 28 de setembro de 2022 em Bento Gonçalves, RS.

➤ **Participação em Congresso Internacional - Portugal**

Participação como ouvinte no 10º Encontro da Divisão de Química Analítica da Sociedade Portuguesa de Química, realizado de maneira remota entre 26 e 28 de outubro de 2020, Lisboa, Portugal.

➤ **Participação em Congresso Nacional/Internacional - Brasil**

Participação como ouvinte no 20º ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica e 8º CIAQA - Congresso Ibero-Americano de Química ocorrido entre os dias 25 e 28 de setembro de 2022 realizado em Bento Gonçalves, RS.

➤ **Apresentação de Pitch Poster – Pôster Premiado**

PRISCILA LAGNER DA SILVEIRA ESTEVÃO, PATRÍCIO PERALTA-ZAMORA, NOEMI NAGATA “Coagulation as a sample preparation for determination of silver nanoparticles in aqueous matrices”. Pitch poster apresentado no 10º Encontro da Divisão de Química Analítica da Sociedade Portuguesa de Química, realizado de maneira remota, entre 26 e

28 de outubro de 2020, Lisboa, Portugal. Este trabalho foi premiado como melhor pitch pôster.

➤ **Grupo de Ação Voluntária constituído pela UFPR**

Participação na Ação de Extensão “Rede de Combate ao COVID-19”, registrada na PROEC | UFPR, no período de 06 de abril a 30 de julho de 2020, com 10 horas semanais, e de 01 de agosto de 2020 a 30 de agosto de 2021 com 4 horas semanais. Projeto de ação voluntária do Departamento de Química da UFPR, supervisionado pelo Professor Dr. Rilton Alves de Freitas para produzir, analisar e envasar produtos de higienização de mãos e/ou ambientais, conforme determina a Resolução RDC nº 350.

➤ **Projeto de pesquisa realizado no Grupo de ação voluntária de produção de álcool gel da UFPR – Publicação de artigo**

Participação de um projeto paralelo ao doutorado a fim de avaliar o potencial uso do alcoômetro Gay Lussac (desenvolvido para amostras líquidas) na determinação do teor de etanol em amostras de gel sanitizante para mãos. Os resultados do projeto, desenvolvido entre agosto e novembro de 2020, foram submetidos ao Journal of the Brazilian Chemical Society em 20 de novembro de 2020, sendo o artigo intitulado “Alcoholmeter as a simple and accessible way for ethanol determination in alcohol-based hand sanitizers” aceito em 19 de janeiro de 2021, tendo Priscila L. da S. Estevão como primeira autora. O projeto foi desenvolvido com a colaboração de Franciely G. Colodi, Lucas C. L. do Carmo, Maria de Fátima C. Santos, Andersson Barison, Caroline da R. M. D'Oca, Noemi Nagata e Rilton A. de Freitas. A aluna teve participação na concepção, análise, pesquisa e redação do esboço original do artigo. (DOI: 10.21577/0103-5053.20210026).