

# VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÁCIDO BENZÓICO E SÓRBICO EM GÊNEROS ALIMENTÍCIOS

João Costa<sup>1,2</sup>, Celeste Serra<sup>2</sup>, Elsa Vasco<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, IP, Av. Padre Cruz, 1649-016 LISBOA, Portugal (e-mail: elsa.vasco@insa.min-saude.pt)

<sup>2</sup> Centro de Investigação em Engenharia Química e Biotecnologia, Área Departamental de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Rua Conselheiro Emídio Navarro, 1, 1959-007 LISBOA, Portugal

## Introdução

O crescente consumo de alimentos processados tem impulsionado o uso de aditivos para conservar ou conferir características aos produtos que os tornem mais atrativos aos consumidores.

Os **Ácidos Benzóico (Fig. 1)** e **Sórbico (Fig. 2)** são os conservantes mais usados na indústria alimentar devido à sua baixa toxicidade, estando em geral, presentes numa grande variedade de alimentos consumidos diariamente.

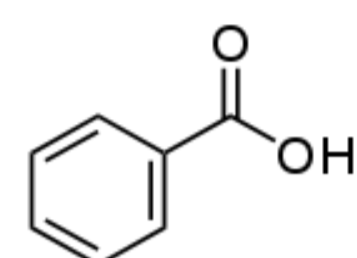


Fig. 1 – Ácido Benzóico

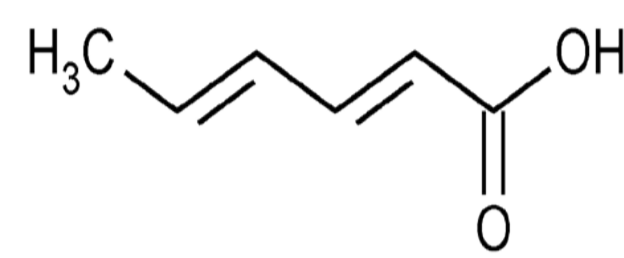


Fig. 2 – Ácido Sórbico

A avaliação da sua ocorrência é essencial para garantir a segurança dos consumidores e, exige resultados precisos e fiáveis, determinados através de métodos validados [1].

## Objetivos

Este estudo envolveu a validação de um método de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (HPLC-UV) para a determinação simultânea de conservantes em diversas matrizes alimentares. A validação do método foi realizada com vista à acreditação pela norma ISO 17025.

## Resultados e Discussão

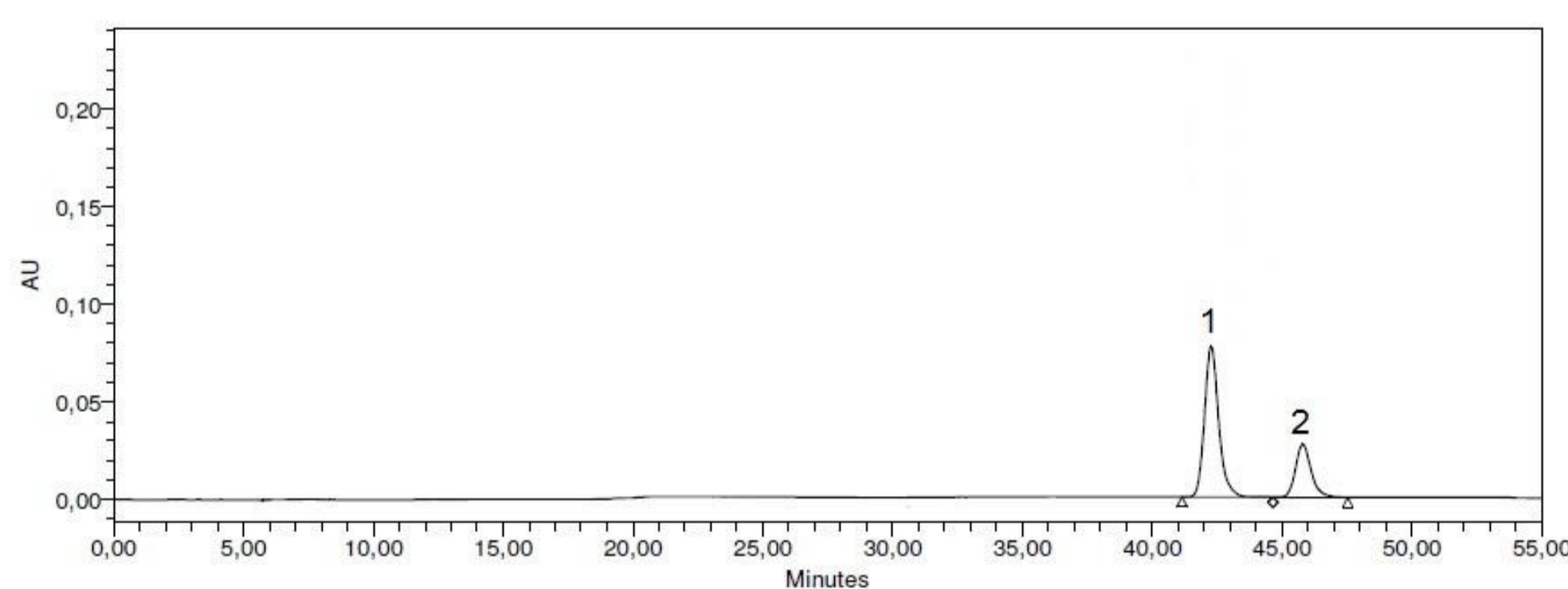


Figura 1 – Cromatograma dos conservantes 1 - Ácido Benzóico ( $t_r = 42,2$  min) e 2 - Ácido Sórbico ( $t_r = 45,8$  min).

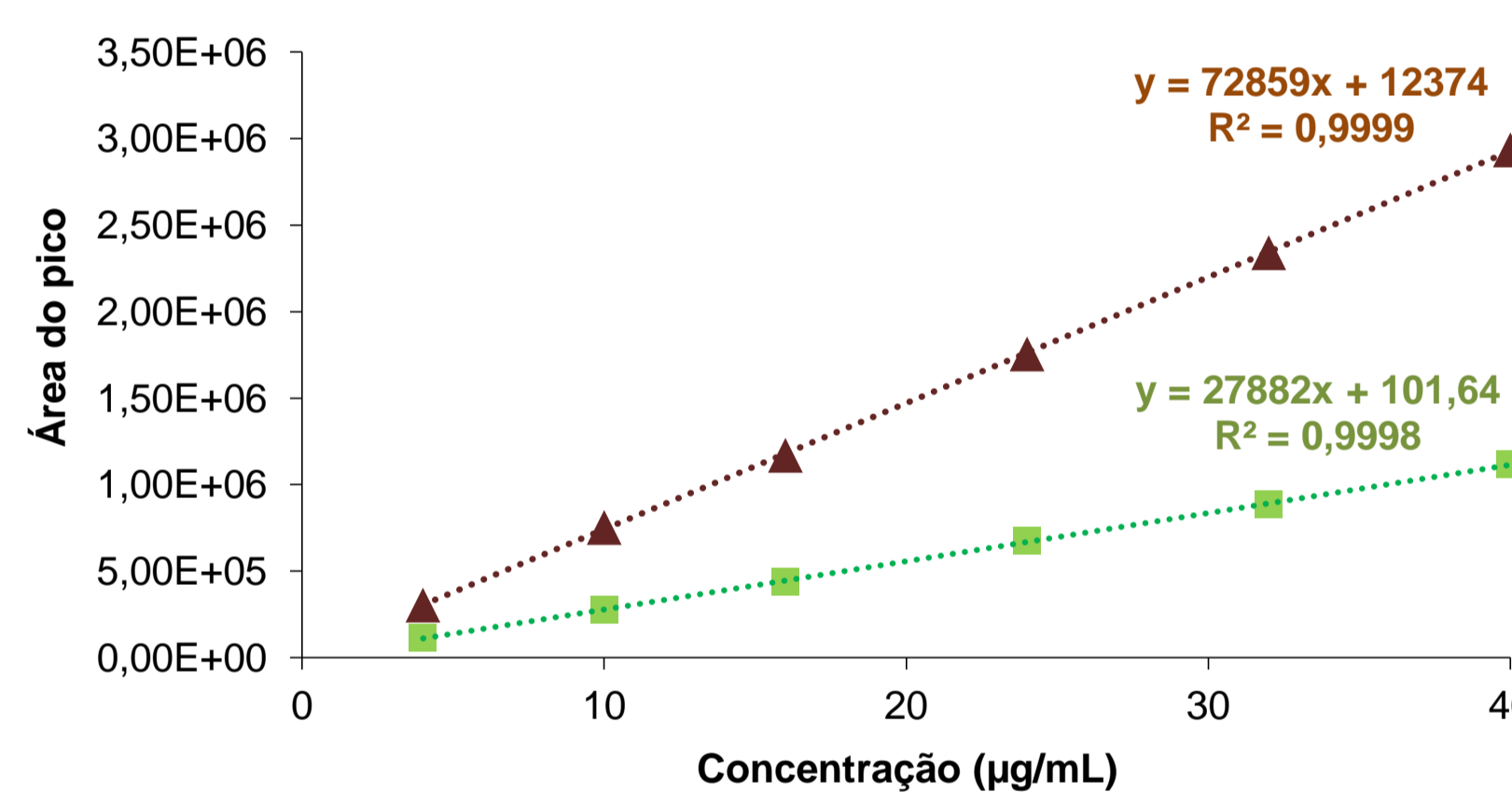


Figura 2 – Curvas de calibração para o ácido benzóico e ácido sórbico.  $\blacktriangle$  - Ácido Benzóico;  $\blacksquare$  - Ácido Sórbico.

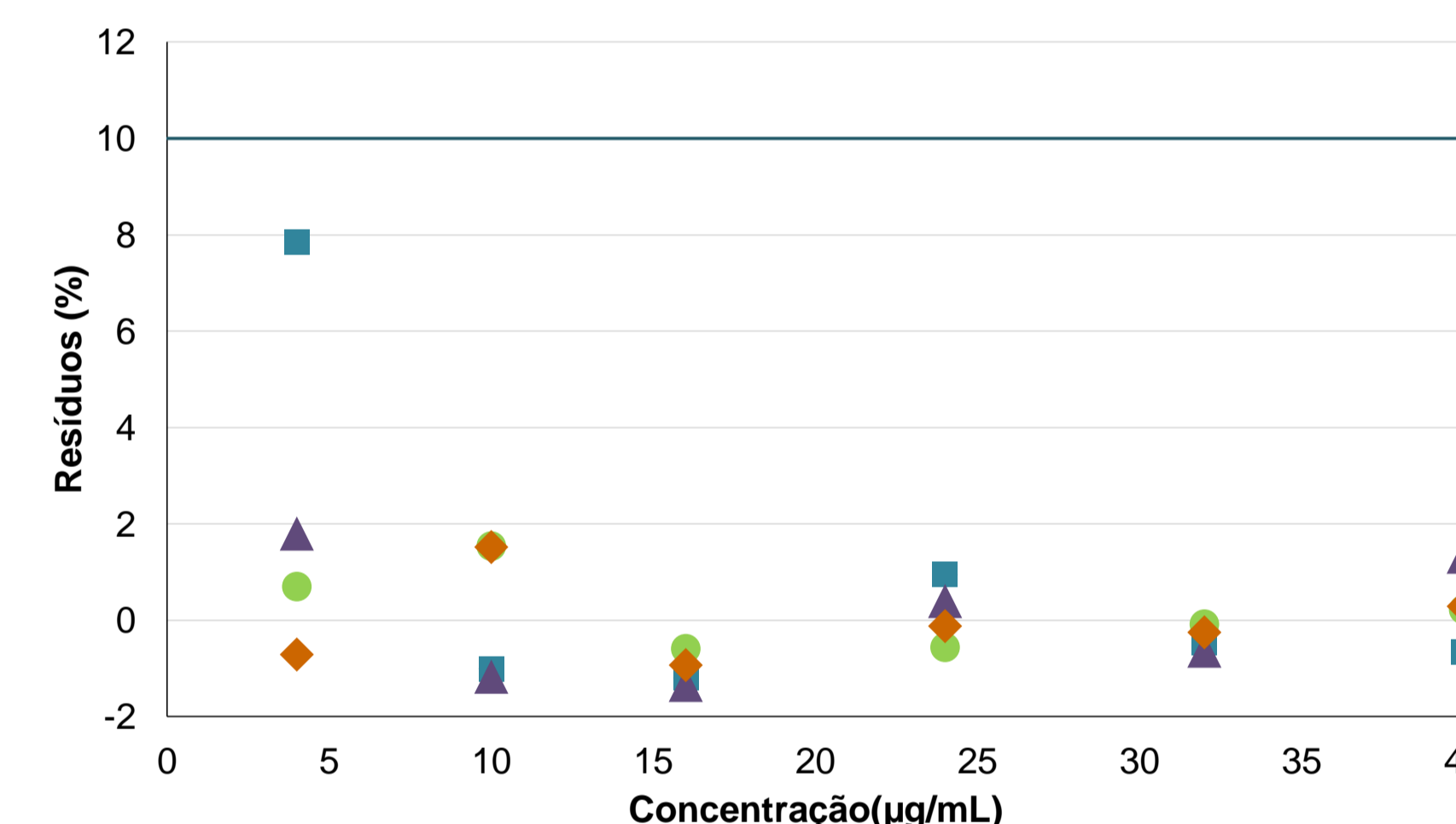


Figura 3 – Análise dos Resíduos (%) nos diferentes pontos da curva de calibração. Ácido Benzóico (1ª injeção -  $\blacksquare$ ; 2ª injeção -  $\blacktriangle$ ); Ácido Sórbico (1ª injeção -  $\blacksquare$ ; 2ª injeção -  $\blacktriangle$ ).

Tabela 1 – Dados relativos às curvas de calibração e testes estatísticos envolvidos na validação do método. F – Valor (tabelado) da Distribuição F de Fisher/Snedecor; LOQ – limite de quantificação; LOD – limite de detecção.

Analito	Gama de Trabalho (µg/mL)	Equação da curva $y=bx+a$	Coefficiente de Determinação ( $r^2$ )	Teste de Mandel (PG) $F_{(1, N-3, 99\%)} - 10,56$	Homogeneidade das Variâncias (PG) $F_{(99\%)} - 5,35$	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Ácido Benzóico	4 a 40	$y=72859x + 12374$	0,9999	4,36	1,16	1,3	4
Ácido Sórbico		$y=27882x + 101,64$	0,9998	1,34	1,12		

Tabela 2 – Resultados dos ensaios de repetibilidade e precisão intermédia, representados pelos respetivos RSD (%) e, taxas de recuperação obtidas para as amostras analisadas. RSD<sub>r</sub> e RSD<sub>R</sub> – desvio padrão relativo da repetibilidade e da precisão intermédia, respetivamente.

Amostra	Ácido Benzóico		Ácido Sórbico		Taxa de Recuperação (%)	
	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	Ácido Benzóico	Ácido Sórbico
Refrigerantes	0,4 - 2,8	1,3 - 3,0	0,5 - 3,7	4,4 - 5,5	98,9 - 104,9	92,9 - 116,2
Derivados do Leite	-	-	1,3 - 1,6	3,0	-	91,3 - 103,0
Marmeladas	0,8 - 2,6	2,8 - 3,9	1,0 - 3,3	2,2 - 7,2	91,4 - 98,4	97,3 - 102,8
Molhos (emulsionados e não emulsionados)	0,3 - 1,4	2,7	0,7 - 4,0	1,6 - 5,2	100,3	97,3 - 110,7
Produtos de Panificação	-	-	1,4 - 4,5	6,5	-	87,7
Produtos de Pastelaria	0,8 - 4,0	2,9	0,4 - 3,6	2,3	93,1	92,8

Tabela 3 – Resultados dos ensaios FAPAS realizados para avaliação da exatidão do método.

Descrição	Analito	Teor (mg/kg ou mg/L) experimental	Teor (mg/kg ou mg/L) teórico	Recuperação (%)	Desvio-padrão (S)	z-score
FAPAS 03115 (Cola Drink)	Ácido Benzóico	139,44	140	91,9	10,6	-0,05
FAPAS 20109 (Jam)	Ácido Benzóico	258,11	253	94,5	17,6	0,29
	Ácido Sórbico	186,74	203	95,3	14,6	-1,11

- O método descrito na norma EN 12856 permitiu a obtenção de uma boa resolução na separação de ambos os analitos (Fig. 1).
- Os valores de PG obtidos no Teste de Mandel e na Homogeneidade das Variâncias foram inferiores ao valor da Distribuição F de Fisher/Snedecor, o que permitiu validar a **gama de trabalho** 4-40 µg/mL. Considerou-se como LOQ o 1º ponto da curva de calibração, ou seja, 4 µg/mL e, o LOD como 1/3 do LOQ.
- A avaliação da **linearidade** do método incluiu a construção de curvas de calibração (Fig. 2) a cada novo ensaio e a validação destas envolveu a análise dos coeficientes de determinação (Tab. 1),  $r^2 > 0,995$ , e dos resíduos (Fig. 3),  $< 10\%$ .
- Os valores de **repetibilidade** (RSD<sub>r</sub>%) e **precisão intermédia** (RSD<sub>R</sub>%) foram inferiores a 5% para o ácido benzóico e a 8% para o ácido sórbico (Tab. 2). As **taxas de recuperação** variaram entre 80 e 120% (Tab. 2).
- Os valores de z-score  $< 2$  (Tab. 3), obtidos nos ensaios FAPAS, permitiram avaliar o método como sendo **exato**.
- A incerteza dos resultados foi calculada através dos resultados da precisão intermédia e da exatidão. A **incerteza combinada expandida** foi de 7% para o ácido benzóico, e 10% para o ácido sórbico.

## Conclusão

O método utilizado neste trabalho permitiu a determinação de ambos os conservantes alimentares estudados, com precisão e exatidão aceitáveis para todas as matrizes alimentares analisadas.

## Referências

- [1] Lino C. M., Pena A., Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment, *Food Chemistry*, **121** (2010) 503-508.
- [2] EN 12856:1999 – Foodstuffs - Determination of acesulfame-K, aspartame and saccharin - High performance liquid chromatographic method;
- [3] IPAC, *Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos*, Instituto Português de Acreditação, 2007.