



MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE SORBATO DE POTÁSSIO EM PRODUTOS CÁRNEOS POR HPLC-UV

Gabriela Ragazzi Santana dos **Santos**¹; Jéssica de Castro **Lima**²; José Ricardo **Gonçalves**³;
Márcia Regina Cucatti **Alves**⁴

Nº 20221

RESUMO

A utilização do sorbato de potássio como conservante é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA e seu uso não é permitido para carnes e produtos cárneos no Brasil, com exceção da aplicação na camada externa de produtos cárneos das categorias de industrializados secos e salgados crus. A importância de quantificar esse aditivo em carnes e produtos cárneos é detectar fraudes. Nesse estudo foram realizados ensaios para estabelecer um método analítico adequado para detecção e quantificação de sorbato de potássio em produtos cárneos. Após ensaios preliminares, procedimentos baseados no método descrito na norma NMKL nº 124, e em artigos que referenciam essa norma, foram feitos testes com amostras de mortadela e costela defumada, isentas de sorbato (brancas) e fortificadas com sorbato de potássio. A extração do analito foi realizada com soluções de metanol e água. A detecção do sorbato de potássio foi feita através de cromatografia líquida com detecção por UV e a quantificação através da injeção de soluções padrões desse analito. Os resultados obtidos permitiram verificar que o método definido para análise de produtos cárneos apresenta características satisfatórias de linearidade ($R^2 = 0,998$), recuperação (93,6%) e limite de detecção ($<1\text{mg.L}^{-1}$).

Palavras-chaves: sorbato, produtos cárneos, CLAE-UV, conservante, mortadela, aditivo.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP; gabrielaragazzisantos@gmail.com

2 Colaborador, Técnico de laboratório, Graduação em Química, UNICAMP, Campinas-SP.

3 Co-orientador, Pesquisador Científico: Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP..

4 Orientador: Assistente Técnico de Pesquisa, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP; marcia@ital.sp.gov.br.



ABSTRACT

The use of potassium sorbate as a preservative is regulated by the National Health Surveillance Agency - ANVISA and its use is not permitted for meat and meat products in Brazil, except for the application in the outer layer of meat products in the dry and salted processed categories. The importance of quantifying this additive in meat and meat products is to detect fraud. In this study, tests were carried out to establish an adequate analytical method for the detection and quantification of potassium sorbate in meat products. After preliminary tests, procedures based on the method described in the standard NMKL n° 124 and in articles that refer to this standard were tested with samples of mortadella and smoked rib free of sorbato (blank) and samples fortified with potassium sorbate. The extraction of the analyte was performed with solutions of methanol and water. The detection of potassium sorbate was done through liquid chromatography with UV detection and quantification through the injection of standard solutions of this analyte. The results obtained allowed to verify that the method defined for the analysis of meat products has satisfactory characteristics of linearity ($R^2 = 0.998$), recovery (93.6%), detection limit ($<1\text{mg.L}^{-1}$), sensitivity / selectivity. it is permitted for meat and meat products in Brazil, with the exception of the application in the outer layer of meat products in the dry and salted processed categories.

Keywords: sorbate, meat products, HPLC-UV, preservative, mortadella, additive.

1. INTRODUÇÃO

Para a tecnologia de alimentos, a preservação química de produtos abriu portas para um grande crescimento, de modo que conservantes são adicionados para retardar alterações microbiológicas e enzimáticas e aumentar a vida útil, sem que prejudiquem a saúde dos consumidores. O ácido sórbico (E200) e seus sais de sódio, potássio e cálcio (E201, E202, E203), têm sido utilizados para a prevenção do desenvolvimento microbiológico em diversos produtos alimentícios e inibem bolores, leveduras e outras bactérias (Gerschenson et al. 1986). A utilização desses conservantes é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa e a legislação deve ser acatada pelas empresas que empregam esses conservantes em seus produtos.

O sais de ácido sórbico são utilizados por apresentarem maior solubilidade em água quando comparados ao ácido em comparação ao ácido. Sua aplicabilidade depende do pH do produto, sendo maior em meio ácido (predominante na forma não-dissociada), por isso são empregados em

alimentos com pH inferior a 6,5, tais como os queijos, laticínios e etc (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

Apesar de o sorbato ser considerado uma substância aditiva GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration), a RDC nº 272, de 14 de março de 2019 da Anvisa, não autoriza o uso do sorbato na formulação dos produtos cárneos. Seu uso é liberado apenas na camada externa de produtos cárneos das categorias de industrializados secos e salgados crus. Essa restrição se deve ao fato do sorbato e nitrito em conjunto no pH gástrico, formarem espécies mutagênicas e genotóxicas, dentre elas o ácido etil nitrílico (ENA) e a 1,4-dinitro-2-metilpirrol (NMP) (OLIVEIRA, 2014). No trabalho realizado por PYLYPIW (2000) foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV a 255 nm, coluna de fase reversa C18 e fases móveis acetonitrila e tampão de acetato de amônio. Analisou-se diversos alimentos processados como sucos de frutas, pasta de amendoim e molho de soja. Produtos industrializados brasileiros foram avaliados quanto ao teor de ácido sórbico e benzoico por método utilizando cromatografia líquida de alta resolução com detector de arranjo de diodos, coluna de fase reversa C18 e fases móveis acetonitrila, água e tampão acetato de amônio-ácido acético no trabalho conduzido por TFOUNI (2002). Nesse estudo foram avaliados refrigerantes, sucos, margarinas, iogurtes e queijos. Molognoni (2015) desenvolveu um método para análise simultânea de ácido sórbico, natamicina, nisina e tilosina em produtos lácteos por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (LC-MS).

GOLGE et al (2015) validaram um método baseado na norma NMKL nº 124 para determinação de ácido sórbico e ácido benzoico em amostras de catchup, cujos parâmetros de validação obtidos para o ácido sórbico foram 0,998 de coeficiente de determinação (R^2), recuperação de 81,7% e 85,1% em concentrações de 50 mg.Kg⁻¹ e 250 mg.Kg⁻¹, respectivamente; limite de detecção de 2,49 mg.Kg⁻¹ e de quantificação igual a 8,29 mg.Kg⁻¹. Essa norma também foi utilizada como referência por KÜÇÜKÇETIN et al (2008) na análise de produtos lácteos comerciais. Os níveis de ácido sórbico e benzoico em conservas de azeitona verde também foram determinados com base no método descrito na NMKL nº 124 por BAYIZIT et al (2019) na Turquia. A norma NMKL nº 124 é preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2019) para análise de ácido sórbico/sorbato em produtos cárneos e descreve um método para determinação de ácido sórbico, entre outros conservantes, através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV) aplicável a diversos tipos de alimentos. A importância da determinação do sorbato nos produtos cárneos está em detectar sua presença em produtos cárneos, cuja adição não é permitida pela legislação brasileira vigente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Amostras

Foram utilizadas amostras comerciais de mortadela e costela defumada, que foram previamente analisadas quanto ao teor de ácido sórbico/sorbato e com resultado negativo para esses conservantes.

2.1.2 Vidrarias e equipamentos

Foram utilizados frascos de vidro para homogeneização, balões volumétricos, provetas, funis, papel de filtro Whatman nº4, seringas, filtro de seringa PVDF 0,45 µm e membrana de filtração de Nylon® 0,45 µm.

Os seguintes equipamentos foram utilizados: homogeneizador Omni Mixer (Omni International), banho ultrassônico (UNIQUE), micropipetas volumétricas, Cromatógrafo líquido: Shimadzu Class VP, composto de um sistema quaternário de bombas LC-10AT, módulo controlador SCL-10A, injetor SIL-10AF, forno CTO-10AS, coluna ACE 5 C18 (5 µm x 250 x 4,6 mm) e detector UV-VIS SPD-10A. Sistema cromatográfico controlado pelo programa Class VP 6.13 SP2.

2.1.3 Reagentes e Soluções

Foram utilizados os seguintes reagentes: Sorbato de potássio (Sigma-Aldrich, 99,0%), Metanol grau HPLC (PanReac), Ácido acético glacial (PanReac), água ultrapura (MilliQ).

2.1.3.1. Preparo de soluções

Solução estoque de sorbato de sódio 1000 mg. L⁻¹: pesou-se 200 mg de sorbato de sódio e dilui-se em 200 ml de solução de 35% de água e 65% de metanol.

Solução tampão 0,1 mol. L⁻¹, pH 4,74: dilui-se 5,7 ml de ácido acético glacial em aproximadamente 900 ml de água deionizada, ajustou-se o pH para 4,74 com solução de hidróxido de sódio 5mol/L e o volume foi completado para 1000 ml com água deionizada.

Fase móvel: 300 ml de solução tampão foram adicionados em 700 ml de metanol.

2.1.3.2. Curva analítica

Foram preparadas soluções de sorbato de sódio nas concentrações 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 mg.L⁻¹ a partir da solução estoque na concentração de 1,0 g.L⁻¹, que foram diluídas em solução de 35% de água e 65% de metanol.

2.2 Métodos

2.2.1. Preparo da amostra

Foram pesados 10,00 g de amostra previamente triturada em frasco de vidro, adicionados 50 ml de água deionizada e homogeneizados por 2 minutos à velocidade 3 do homogeneizador Omni Mixer. Esse conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 100 ml com adição de 30 ml de metanol e completando o volume com água deionizada. Após agitação, o conteúdo do balão foi filtrado em papel de filtro Whatman nº4. Uma porção de aproximadamente 2 ml foi filtrada em filtro de seringa de PVDF 0,45 µm.

2.2.2. Análise cromatográfica

Foi utilizada como fase móvel a mistura de 30% de tampão acetato 0,1 mol/L, pH 4,74 e 70% de metanol; com eluição isocrática e coluna C18 à temperatura de 30°C, injeção de 20 µL, fluxo de fase móvel de 1ml/min e detector UV com comprimento de onda variável, onde foram avaliados os comprimentos de onda 254 nm (BAYIZIT, 2019) e 262 nm (GOLGE, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dos testes e ensaios realizados foi possível detectar e quantificar satisfatoriamente o sorbato de potássio adicionado às matrizes de produtos cárneos isentos desse conservante.

Nas condições cromatográficas utilizadas, o sorbato de potássio produziu um pico no tempo de retenção 3,6 minutos, que pode ser verificado tanto para a amostra fortificada quanto para o padrão injetado (figura 1). O tempo de retenção desse composto foi confirmado pela análise de soluções padrão dessa substância (figura 2) nas mesmas condições cromatográficas utilizadas para análise das amostras.

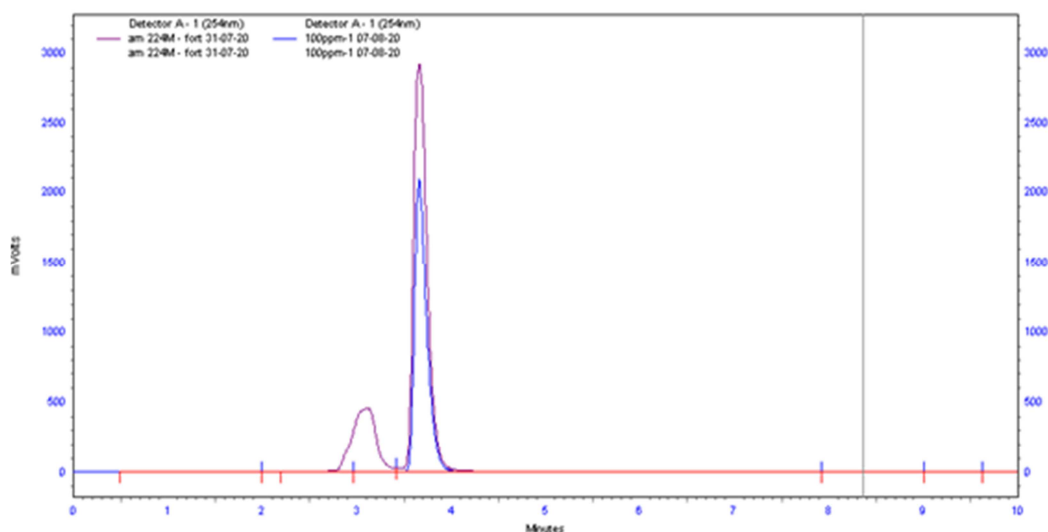


Figura 1: Cromatogramas do padrão de sorbato de sódio (traço azul) e da amostra fortificada com sorbato de sódio (traço rosa).

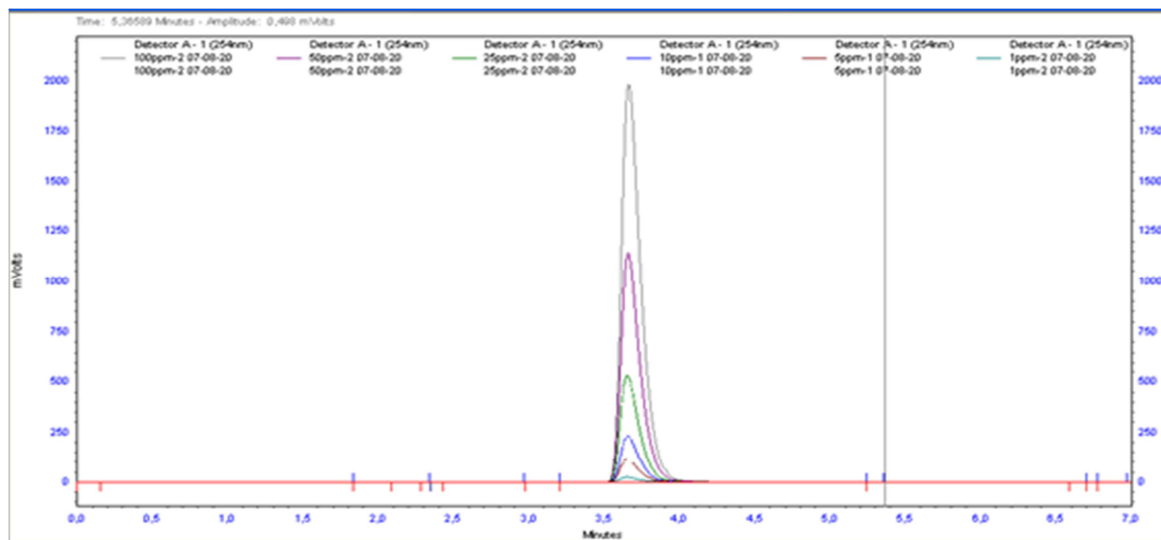


Figura 2: Cromatogramas dos padrões de sorbato de potássio: concentrações entre 1 e 100mg.L⁻¹.

A análise das amostras isentas de sorbato permitiu verificar que, após extração, não há substâncias presentes na amostra que produzam picos interferentes na mesma região ou mesmo tempo de retenção do pico cromatográfico produzido pelo sorbato de potássio (figura 3).

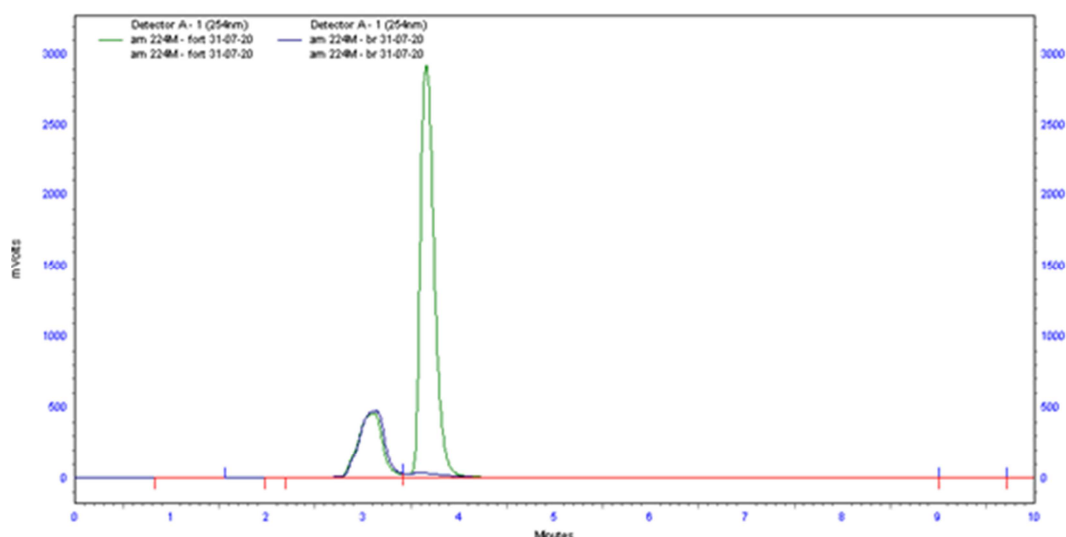


Figura 3: Cromatogramas da amostra de mortadela sem sorbato (traço azul) e fortificada com sorbato (traço verde).



A linearidade de 0,998, expressa como coeficiente de determinação (R^2) foi obtida a partir da regressão linear aplicada às leituras realizadas em duplicata das áreas referentes aos pontos da curva analítica 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 mg.L⁻¹. Foi considerado o comprimento de onda de 254 nm por apresentar absorção ligeiramente maior do que no comprimento de onda 262 nm.

A recuperação de 93,6% foi obtida através da análise de amostras de mortadela branca e fortificada com 100 mg.Kg⁻¹ de sorbato de sódio.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos conclui-se que o método de determinação de sorbato em carnes e produtos cárneos é compatível com os equipamentos disponíveis no laboratório de físico-química, produzindo resultados confiáveis e que sejam aceitos por órgãos competentes ligados a área de carnes e produtos cárneos.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa PIBIC concedida e ao CTC/Ital pela oportunidade de realização do estágio.

6. REFERÊNCIAS

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 272, de 14 de Março de 2019. Estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. http://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/67378977

BAYIZIT, A. A. et al. Quantitation of benzoic and sorbic acid levels from green olives by high-performance liquid chromatography. **MOJ Food Process Technol**, v. 7, n. 1, p. 4-9, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – 2. Ed. - Brasília: MAPA, 2019.

CECCHI, H. M. Comparação e desenvolvimento de métodos analíticos para ácido benzóico e sórbico em alimentos. 1988. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1988.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S.; Fundamentos de Cromatografia. Edição. Campinas, SP.: Editora da Unicamp, 2006. p. 1-453.

COSTA, João; SERRA, Celeste; VASCO, Elsa. Validação de um método de cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação simultânea de ácido sórbico e benzóico em gêneros alimentícios. 7ª Reunião Anual PortFIR, INSA, 30 outubro 2014, 2014.



FOOD INGREDIENTS BRASIL. Conservantes. Dossiê conservantes. Food Ingredients Brasil, 18, 2011.

GERSCHENSON, L.N.; ALZAMORA, S.M.; CHIRIFE, J. Stability of sorbic acid in model food systems of reduced water activity: sugar solutions. *Journal of Food Science*, v.51, p.1028-1031, 1986.

GOLGE, Ozgur; HEPSAG, Fatma; KABAK, Bulent. Dietary intake of sorbic and benzoic acids from tomato ketchup for adults and children in Turkey. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 10, n. 4, p. 341-347, 2015.

KÜÇÜKÇETİN, A.; ŞIK, B.; DEMİR, M. Determination of sodium benzoate, potassium sorbate, nitrate and nitrite in some commercial dairy products. **Arastirma Makalesi**, v. 33, n. 4, p. 159-164, 2008.

MOLOGNONI, Luciano. Desenvolvimento de metodologias para análise simultânea de ácido sórbico, natamicina, nisina e tilosina em produtos lácteos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. 2015.

NMKL. (1997). Nordic Committee on Food Analysis. *Benzoic acid, sorbic acid and p-hydroxybenzoic acid esters. Liquid chromatographic determination in foods* (2nd ed., Vol. 124).

OLIVEIRA, Estela Mesquita Diegues de. Nitrato, nitrito e sorbato em produtos cárneos consumidos no Brasil. 2014. 40 f., 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/124295>>.

PERES, Terezinha Bonanho. Noções básicas de cromatografia. *Biológico*, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

PYLYPIW JR, Harry M.; GREITHER, Maureen T. Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods. *Journal of chromatography A*, v. 883, n. 1-2, p. 299-304, 2000.

SOFOS, J.N. Potential of use in meat products. In: *Sorbate Food Preservatives*, p.167-184, CRC Press, Boca Raton, 1989.

SOFOS, J. N. *Sorbate Food Preservatives*. Florida: CRC Press, 1989. 237 p

TFOUNI, S. A. V.; TOLEDO, M. C. F. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. *Food control*, v. 13, n. 2, p. 117-123, 2002.