



VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE CONSERVADORES EM MATRIZES ALIMENTARES

Mariana Alves **Monteiro**¹, Fernanda Moralez Leme **Gomes**², Silvia Amelia Verdiani **Tfouni**³

Nº 21220

RESUMO – Para preservar alimentos da degradação e aumentar o seu tempo de vida útil, são utilizados diversos métodos, um deles é o uso de conservadores químicos. A natamicina, o ácido sórbico e o ácido benzóico são compostos amplamente utilizados na indústria alimentícia para a conservação de alimentos processados, frutas e bebidas. O objetivo do presente estudo foi validar métodos analíticos para a determinação de natamicina e dos ácidos sórbico e benzóico em diferentes alimentos utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Os resultados encontrados para os diversos parâmetros de validação mostram que os métodos validados se mostraram adequados para a determinação dos conservadores nas diferentes matrizes. Ambos métodos se mostraram sensíveis, eficientes e reprodutíveis, apresentando limites de detecção e quantificação dos analitos inferiores aos níveis estabelecidos para esses conservadores na legislação vigente.

Palavras-chaves: Conservadores, natamicina, ácido sórbico, ácido benzóico, matrizes alimentares.

1 Autora, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Química, Unicamp, Campinas-SP; m173936@dac.unicamp.br

2 Colaboradora: Técnica de Apoio à Pesquisa do CCQA/ITAL, Campinas-SP

3 Orientadora: Pesquisadora Científica do CCQA/ITAL, Campinas-SP; tfouni@ital.sp.gov.br



ABSTRACT – *There are many methods used to preserve food from degradation and to increase shelf life. One of them is the use of chemical preservatives. Natamycin, sorbic acid and benzoic acid are compounds widely used in the food industry, in order to preserve processed food, fruits and drinks. The objective of the present study was to validate analytical methods for the determination of natamycin and sorbic and benzoic acids in different food matrices using high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). Results obtained for different validation parameters show that the validated method is adequate for these preservatives determination in different matrices. Both methods showed adequate sensitivity, efficiency and reproducibility, presenting limits of detection and quantification below levels established for these preservatives in current regulations.*

Keywords: Preservatives, natamycin, sorbic acid, benzoic acid, food matrices.

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência e multiplicação de microrganismos no meio ambiente é comum, e as reações químicas e enzimáticas associadas a eles resultam em decomposição de materiais, inclusive alimentos. Essa decomposição causa modificações na aparência, sabor, textura, cor, consistência e qualidade nutricional do produto. Além disso, certos microrganismos são tóxicos para o ser humano, podendo causar infecções ou intoxicações quando proliferam em alimentos. Portanto, exceto em fermentações microbiológicas úteis, o crescimento de microrganismos em alimentos é indesejável, sendo necessário evitá-lo ou inibi-lo através de métodos de conservação (SOFOS, 1995).

A conservação de alimentos sempre foi de grande importância na vida do homem, desde o início da convivência em grupos e a necessidade de estocagem de sua colheita. Compostos como sal, açúcar, ácidos e fumaça de madeira têm sido utilizados como conservadores de alimentos há séculos. Atualmente, podem ser utilizados métodos químicos e/ou físicos para esta finalidade. Os métodos físicos são aqueles em que se aplica algum tratamento físico que atue contra o crescimento de microrganismos. Estes incluem: altas temperaturas (cozimento, pasteurização, esterilização), baixas temperaturas (refrigeração, congelamento), radiação ou, ainda, remoção de água (evaporação, secagem). Os métodos químicos são aqueles em que há adição de alguma substância química que impeça o desenvolvimento dos microrganismos. Aos compostos químicos utilizados com o objetivo de atuar como agente antimicrobiano dá-se o nome de conservadores, estes



protegem os alimentos contra contaminação por fungos, leveduras e bactérias (SIMÃO, 1989; SOFOS, 1995).

Devido a ampla utilização desses conservadores nos alimentos industrializados, é importante que os laboratórios de análises disponham de métodos analíticos validados para diversas matrizes alimentares, para poderem monitorar se a utilização dos conservantes não está extrapolando os limites permitidos pela legislação (DE SOUZA, et al. 2019). Este projeto visou validar dois métodos analíticos, um para a determinação de ácido sórbico e seus sais, ácido benzóico e seus sais e outro para natamicina, em matrizes como queijos, salame, embutidos cárneos, manteiga e pão de forma, utilizando a técnica de HPLC-DAD.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais

2.1.1. Amostras

Todas as amostras utilizadas para validação dos métodos analíticos são produtos comerciais processados, produzidos e embalados no Brasil. Para a validação do método analítico referente à determinação de natamicina foram utilizadas amostras de manteiga, queijo muçarela, queijo ralado e salame. Já para a validação do método analítico referente à determinação de ácido sórbico e ácido benzóico, foram utilizadas amostras de manteiga, iogurte, pão de forma e embutidos cárneos.

2.1.2. Solventes, reagentes e materiais

Para a determinação dos ácidos sórbico e benzóico, foram utilizados os seguintes padrões analíticos e solventes: ácido sórbico (Sigma-Aldrich), ácido benzóico (Sigma-Aldrich), hexano grau HPLC (Scharlau S.L.), acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker), ácido acético PA (Synth), ferrocianeto de potássio (Synth) e acetato de zinco (Synth). Na determinação de natamicina, utilizou-se padrão analítico de natamicina (Sigma-Aldrich), metanol grau HPLC (VWR Chemicals) e acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker).

A água utilizada em ambas análises foi obtida através de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore Co.). E para as filtrações foram utilizados filtro de membrana PVDF, 0,45 µm (Clean Pack) e papel de filtro quantitativo (GE Healthcare).



2.2. Métodos

Para a determinação, utilizou-se o método IDF Standard 140A (1992), para validação de natamicina e o método desenvolvido por Buy & Cooper (1987), na validação referente ao ácido sórbico e ácido benzóico, com algumas adaptações.

2.2.1. Extração para determinação de natamicina

As amostras de salame e queijo muçarela primeiramente foram homogeneizadas em um triturador de alimentos doméstico. Foram pesados 5 g de cada amostra, e adicionados 50 mL de metanol grau HPLC. Em seguida as amostras foram levadas para agitação mecânica por 1h30min, para extração da natamicina.

Após a agitação, foram adicionados 25 mL de água Milli-Q ao extrato obtido e as soluções foram levadas para resfriamento a -20°C por 1h, para solidificação da gordura. Posteriormente, por meio de filtração utilizando papel de filtro quantitativo, separou-se a parte sólida da parte aquosa. O extrato foi então filtrado com auxílio de um filtro de membrana PVDF 0,45 µm, para posterior injeção no cromatógrafo.

2.2.2. Extração para determinação do ácido sórbico e do ácido benzóico

Para extração dos ácidos benzóico e sórbico dos pães e embutidos cárneos, as amostras foram previamente trituradas e homogeneizadas em um triturador de alimentos. Foram pesado 5 g de amostra. Às amostras de pães e embutidos cárneos foram adicionados 75 mL de água Milli-Q, e levadas para agitação mecânica por 1h, ao final os resíduos sólidos foram separados dos extratos por filtração em peneira simples e descartados. Já as amostras de manteiga foram aquecidas e levadas para extração líquido-líquido com hexano e água na proporção 50:50 mL.

Nas amostras de iogurte e em todos os extratos obtidos nas extrações foram adicionados 3 mL de ferrocianeto de potássio (0,25 mol) e 3,5 mL de solução de acetato de zinco 0,1mol + 3% ácido acético, e avolumados para 100 mL. As soluções foram levadas para centrifugação por 3 min a 4000 rpm. O sobrenadante obtido foi então filtrado em filtro de membrana PVDF 0,45 µm e levado para injeção no cromatógrafo.

2.2.3. Parâmetros Cromatográficos

Em ambos métodos foi utilizada a técnica analítica de cromatográfica líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), através de um cromatógrafo Shimadzu de bomba



quaternária modelo LC-20AT, injetor automático modelo SIL-20A, forno de coluna modelo CTO-20^a, detector de arranjo de diodos modelo CTO-20^a e coluna Agilent C18 Zorbax SB (4,6 x 250 mm, 5 µm). As quantificações foram realizadas pelo método de padronização externa, por meio de corridas cromatográficas com fluxo de 1,0 mL/min de fase móvel, temperatura da coluna em 25 °C e volume de injeção de 20 µL.

Na detecção de natamicina utilizou-se o comprimento de onda de 303 nm e fase móvel composta por metanol:água:ácido acético (60:40:5). Para determinação dos ácidos utilizou-se fase móvel composta por acetonitrila e ácido acético 5% na proporção 50:50, o comprimento de onda utilizado para detecção do ácido sórbico foi de 261 nm e do ácido benzóico de 232 nm (PUBCHEM, 2021).

2.2.4. Validação da Metodologia Analítica

Os processos de validação da metodologia seguiram os parâmetros estabelecidos no documento INMETRO - DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2020): seletividade, linearidade, faixa de trabalho, faixa linear de trabalho, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), tendências, recuperação e precisão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seletividade

A análise da seletividade se deu pela comparação de três cromatogramas das matrizes sem os analitos (amostra branco), com três cromatogramas das matrizes com os analitos (amostra fortificada no menor nível de concentração determinado) e um cromatograma referente a injeção dos solventes, para confirmar a ausência de substâncias interferentes nos mesmos tempos de retenção dos analitos. Também nesta etapa foram realizados testes para definir as concentrações utilizadas para a construção da curva analítica, limites de detecção e quantificação.

3.2. Linearidade, faixa de trabalho, faixa linear de trabalho, efeito matriz, sensibilidade

A faixa de concentração estabelecida para a construção das curvas referente a natamicina foi de 0,05 µg/L a 3,00 µg/L, e os valores definidos para as soluções padrão foram nas concentrações: 0,05; 0,10; 0,50; 1,0; 2,0; 3,0 µg/mL, preparados a partir de uma solução de 100 µg/mL do padrão de natamicina em metanol:água:acetonitrila (2:1:1). Para as curvas referente aos ácidos, utilizou-se a faixa de concentração 1,0 µg/L a 50,00 µg/L, e as concentrações 1,00; 2,50; 5,00; 7,50; 10,0; 25,00;



15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2021
01 a 02 de setembro de 2021
ISBN 978-65-994972-0-9

50,00 µg/mL para as soluções padrão que foram preparadas a partir de uma solução de 200 µg/mL do padrão de ácido sórbico e ácido benzóico em água:acetonitrila (8:2).

Após a obtenção do extrato das matrizes, filtrou-se 1 mL de cada para realizar a análise do branco. Foram preparadas as soluções padrão utilizando os extratos das matrizes, filtradas com filtro de membrana PVDF e injetadas em triplicata no HPLC-DAD.

Para a quantificação da concentração dos analitos nas soluções e posteriormente o cálculo de efeito matriz, primeiramente obteve-se os valores de área dos picos presentes nos cromatogramas das soluções em triplicatas. Com esses valores foram construídas as curvas de calibração com os valores médios de cada ponto, realizadas nos solventes, nas quatro matrizes para natamicina (manteiga, queijo muçarela, queijo parmesão ralado, salame) e nas quatro matrizes para o ácido sórbico e o ácido benzóico (iogurte, embutidos cárneos, manteigas, pães). Os valores de coeficientes angular (inclinação) e coeficientes de correlação linear (R^2) estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de inclinação e R^2 das curvas analíticas para cada analito nos solventes e nas matrizes.

Analito	Matrizes	Inclinação			R^2	
		Solvente	Matriz	Variação (%)	Solvente	Matriz
Natamicina	Manteiga	99638,4	92559,6	-7,10	0,9954	0,9996
	Queijo Muçarela		99720,1	0,08		0,9988
	Queijo Ralado		90802,6	-8,87		0,9997
	Salame		91032,1	-8,64		0,9984
Ácido Sórbico	Embutidos cárneos	243501,7	244334,1	0,34	0,99981	0,9997
	Iogurte		227966,6	-6,38		0,9994
	Manteiga		183248,7	-24,74		0,9945
	Pães		226864,7	-6,83		0,9994
Ácido Benzóico	Embutidos cárneos	76320,8	77721,7	1,84	0,9982	0,9995
	Iogurte		75912,9	-0,53		0,9996
	Manteiga		74890,7	-1,87		0,9997
	Pães		77454,1	1,48		0,9989

Seguindo os parâmetros estabelecidos no documento INMETRO - DOQ-CGCRE-008, para comparação e consideração do efeito de cada matriz nos valores de concentrações dos analitos utilizamos a equação 1.



$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \frac{\text{Inclinação da curva da matriz} - \text{inclinação da curva do solvente}}{\text{inclinação da curva do solvente}} \times 100 \quad (1)$$

Através dos valores apresentados pelas curvas e o cálculo o teste f com nível de confiança de 95%, foi possível observar que, para a análise de natamicina as curvas não podem ser consideradas equivalentes, pois a matriz apresenta efeito sobre a precisão do método. Sendo necessário adotar a curva realizada nas matrizes para os cálculos de linearidade.

Na comparação entre os valores apresentados pelas curvas realizada no solvente e nas matrizes realizadas com adição dos padrões do ácido sórbico e do ácido benzóico, nas quantificações dos pães e embutidos cárneos, pelo teste f (Snedecor) a 95% e teste t (Student) a 95%, as curvas não apresentaram diferença significativa entre as precisões comparadas, sendo possível realizar os cálculos de linearidade com base nos valores da curva realizada no solvente. Já para iogurte e manteiga, foi observado efeito matriz, levando a utilização das curvas realizadas com os extratos das matrizes.

3.2.1. Repetibilidade

Para a análise de repetibilidade, foram realizadas 5 repetições de ensaios de recuperação para cada método, utilizando amostras branco de cada matriz, fortificadas com adição dos padrões, inter-dia. Três níveis de concentrações diferentes: 0,75; 7,50; 45,00 µg/mL para natamicina e 0,02; 0,10; 1,00 µg/mL para os ácido sórbico e ácido benzóico. Por meio do coeficiente de variação das replicatas apresentados na Tabela 2, foi possível considerar os métodos com repetibilidade diária, por apresentarem variação menor a 20% entre as porcentagens de recuperação. Alguns níveis de recuperação dos ácidos sórbico e benzóico não tiveram recuperação aceitáveis por se apresentarem abaixo de 80% de recuperação.



15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2021
01 a 02 de setembro de 2021
ISBN 978-65-994972-0-9

Tabela 2. Porcentagens de recuperação dos analitos em 3 níveis de concentração para cada.

Natamicina por concentração (µg/g)												
Matrizes	Manteiga			Queijo Muçarela			Queijo Ralado			Salame		
Repetições	(0,75)	(7,50)	(45,0)	(0,75)	(7,50)	(45,0)	(0,75)	(7,50)	(45,0)	(0,75)	(7,50)	(45,0)
1	101,2	111,0	107,8	79,9	108,1	96,1	93,2	106,7	109,4	98,9	104,3	101,4
2	107,2	104,9	105,5	96,0	108,2	93,3	112,2	106,9	113,2	93,8	96,8	100,3
3	100,0	106,5	96,2	104,3	107,4	91,7	102,7	108,6	109,5	96,8	98,5	102,0
4	106,6	105,6	99,7	108,8	89,8	93,1	84,7	106,9	109,2	88,9	91,0	103,3
5	112,2	100,7	98,0	82,8	89,6	95,9	76,9	108,3	106,1	92,0	99,0	104,2
Valor Médio	105,4	105,7	101,5	94,4	100,6	94,0	94,0	107,5	109,5	94,1	97,9	102,2
Coeficiente de Variação (%)	4,7	3,5	4,9	13,5	9,9	2,0	14,9	0,8	2,3	4,2	4,9	1,5

Ácido Sórbico por concentração (µg/g)												
Matrizes	Embutidos cárneos			logurte			Manteiga			Pães		
Repetições	(0,02)	(0,10)	(1,00)	(0,02)	(0,10)	(1,00)	(0,10)	(0,50)	(1,00)	(0,02)	(0,10)	(1,00)
1	93,0	72,8	62,0	67,9	73,4	77,2	70,3	99,0	76,7	45,8*	52,6	80,1
2	99,3	74,6	69,6	80,3	75,4	76,8	88,0	87,5	72,5	90,6	54,2	64,6
3	97,1	72,9	61,6	72,4	71,8	97,4	93,1	88,6	74,6	80,7	69,3	85,4
4	101,8	71,4	62,6	60,2	74,7	96,9	91,3	86,9	79,4	86,9	70,8	89,3
5	102,3	75,5	67,6	88,6	72,9	88,1	82,0	88,9	83,9	86,0	65,2	69,1
Valor Médio	98,7	73,4	64,7	73,9	73,7	87,3	84,9	90,2	77,4	86,0	62,4	77,7
Coeficiente de Variação (%)	3,9	2,2	5,7	14,9	1,9	11,5	10,9	5,5	5,7	4,8	13,6	13,6

Ácido Benzoico por concentração na matriz (µg/g)												
Matrizes	Embutidos cárneos			logurte			Manteiga			Pães		
Repetições	(0,02)	(0,10)	(1,00)	(0,02)	(0,10)	(1,00)	(0,10)	(0,50)	(1,00)	(0,02)	(0,10)	(1,00)
1	71,9	70,3	67,3	102,9	70,8	76,0	75,2	85,3	68,4	14,1*	48,9	77,7
2	82,1	72,0	76,3	99,3	80,1	78,2	71,3	81,4	69,4	70,5	50,5	69,6
3	81,7	71,5	66,4	101,0	75,8	95,3	72,1	80,6	69,8	47,8	72,2	82,5
4	85,2	69,1	66,8	98,6	88,4	93,9	74,4	82,5	74,4	66,3	73,5	83,4
5	81,8	74,8	72,5	100,2	71,1	86,3	73,6	82,4	74,6	63,4	66,5	72,1
Valor Médio	80,6	71,5	69,8	100,4	77,2	86,0	73,3	82,4	71,4	62,0	70,7	77,1
Coeficiente de Variação (%)	6,3	3,0	6,3	1,7	9,4	10,3	2,2	2,1	4,1	15,9	16,8	7,9

*Dados não utilizados para efeito de cálculo.

3.2.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade dos métodos foi calculada a partir de ensaios de recuperação dos analitos nas matrizes. Foram analisadas amostras branco fortificadas com adição dos padrões nas concentrações de 0,75 µg/g para os ensaios de recuperação de natamicina e 0,1 µg/g para o do



ácido sórbico e ácido benzóico, todos realizados em 5 repetições analíticas intra-dias. As porcentagens de recuperação foram calculadas pela equação (1) e estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4. Para todas as matrizes, exceto o queijo ralado, os coeficientes de variação se apresentaram menores que 20%, podendo assim, considerar a conservação da precisão dos métodos em dias distintos. A recuperação para todas as matrizes exceto o queijo ralado foi entre 85-108%, estando dentro da faixa aceitável (80-110%).

Tabela 3. Porcentagem de recuperação de natamicina em 0,75 µg.

Natamicina				
Matrizes				
Repetições	Manteiga	Queijo Muçarela	Queijo Ralado	Salame
1	101	79,4	93	103
2	84	100,9	94	114
3	90	82,8	68	103
4	77	100,6	64	106
5	100	96,0	63	112
Valor Médio	90	91,9	77	108
Coeficiente de Variação (%)	11	11,0	21	5
Desvio Padrão	10	0,1	16	6

Tabela 4. Porcentagem de recuperação de ácido sórbico e ácido benzóico em 0,10 µg.

Ácido Sórbico					Ácido Benzóico			
Matrizes								
Repetições	Embutidos cárneos	logurte	Manteiga	Pães	Embutidos cárneos	logurte	Manteiga	Pães
1	85	95	130	79	92	100	88	84
2	84	95	106	80	89	103	88	87
3	86	99	85	85	93	103	79	91
4	80	98	111	89	93	103	85	94
5	94	100	93	91	111	112	91	97
Valor Médio	86	97	105	85	96	104	86	91
Coeficiente de Variação (%)	6	3	17	6	9	4	5	6
Desv. Padrão	5	2	17	5	9	5	5	5

3.3. Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) dos métodos foram definidos utilizando os valores do desvio padrão obtidos nas análises de reprodutibilidade, e as equações (2) e (3), que representam o método simplificado para obtenção dos mesmos. Os valores utilizados para os cálculos estão apresentados na Tabela 5 e os resultados obtidos na Tabela 6.



15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2021

01 a 02 de setembro de 2021

ISBN 978-65-994972-0-9

$$LD = \frac{3,3S_{bl}}{b} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{10S_{bl}}{b} \quad (3)$$

Sendo: S_{bl} = estimativa de desvio padrão do menor ponto
 b = inclinação da curva de calibração

Tabela 5. Valores das concentrações e estimativa de desvio padrão obtidos na reprodutibilidade.

Matrizes com adição de (0,05 µg/mL)	Conc. 1 (µg/g)	Conc. 2 (µg/g)	Conc. 3 (µg/g)	Conc. 4 (µg/g)	Conc. 5 (µg/g)	Estimativa Desv. Padrão
Natamicina						
Manteiga	0,76	0,63	0,67	0,58	0,75	0,08
Queijo Muçarela	0,60	0,76	0,62	0,75	0,72	0,08
Queijo Ralado	0,7	0,7	0,5	0,5	0,5	0,1
Salame	0,77	0,86	0,77	0,80	0,84	0,04
Matrizes com adição de (0,01 µg/mL)	Conc. 1 (µg/g)	Conc. 2 (µg/g)	Conc. 3 (µg/g)	Conc. 4 (µg/g)	Conc. 5 (µg/g)	Estimativa Desv. Padrão
Ácido Sórbito						
Embutidos cárneos	0,085	0,084	0,086	0,080	0,094	0,005
logurte	0,095	0,095	0,099	0,098	0,100	0,002
Manteiga	0,13	0,11	0,08	0,11	0,09	0,02
Pães	0,079	0,080	0,085	0,089	0,091	0,005
Ácido Benzoico						
Embutidos cárneos	0,092	0,089	0,093	0,093	0,111	0,009
logurte	0,100	0,103	0,102	0,103	0,112	0,005
Manteiga	0,088	0,088	0,079	0,085	0,091	0,005
Pães	0,084	0,087	0,090	0,094	0,097	0,005

Tabela 6. Dados analíticos, LOD e LOQ obtidos para amostras com adição dos padrões.

Matrizes	Dados da curva de calibração utilizada	LOD (g/100g)	LOQ (g/100g)
Natamicina			
Manteiga	Y = 92559,6 X + 1671,8 (r ² = 0,9996)	4,11 x 10 ⁻⁹	1,25 x 10 ⁻⁸
Queijo Muçarela	Y = 99720,1 X + 3888,6 (r ² = 0,9988)	3,78 x 10 ⁻⁹	1,15 x 10 ⁻⁸
Queijo Ralado	Y = 90802,6 X + 3955,1 (r ² = 0,9997)	6,41 x 10 ⁻⁹	1,94 x 10 ⁻⁸
Salame	Y = 91032,1 X + 513,3 (r ² = 0,9984)	2,19 x 10 ⁻⁹	6,63 x 10 ⁻⁹
Ácido Sórbito			
Embutidos cárneos	Y = 244334,1 X + 32694,3 (r ² = 0,9997)	1,39 x 10 ⁻¹⁰	4,22 x 10 ⁻¹⁰
logurte	Y = 227966,6 X + 256611,4 (r ² = 0,9994)	6,99 x 10 ⁻¹¹	2,12 x 10 ⁻¹⁰
Manteiga	Y = 183248,7 X + 685261,8 (r ² = 0,9945)	6,25 x 10 ⁻¹⁰	1,89 x 10 ⁻⁹
Pães	Y = 226864,7 X + 14215,9 (r ² = 0,9994)	1,57 x 10 ⁻¹⁰	4,76 x 10 ⁻¹⁰
Ácido Benzoico			
Embutidos cárneos	Y = 91032,1 X + 19542,4 (r ² = 0,9995)	7,44 x 10 ⁻¹⁰	2,25 x 10 ⁻⁹
logurte	Y = 99720,1 X + 23836,6 (r ² = 0,9996)	4,01 x 10 ⁻¹⁰	1,21 x 10 ⁻⁹
Manteiga	Y = 92559,6 X + 54235,1 (r ² = 0,9997)	4,10 x 10 ⁻¹⁰	1,21 x 10 ⁻⁹
Pães	Y = 90802,6 X + 21994,1 (r ² = 0,9989)	4,33 x 10 ⁻¹⁰	1,31 x 10 ⁻⁹



Os limites de detecção e de quantificação de ambos métodos se mostraram inferiores aos valores referentes ao limite regulamentado pela ANVISA, 2001. Segundo a resolução RDC nº 28, 2001, os limites permitidos para uso de natamicina em produtos variam de 0 a 0,2 g/100g. Os limites permitidos de ácido sórbico nas matrizes utilizadas neste estudo estão entre 0,08 a 0,2 g/100 g, já para ácido benzóico em torno de 0,05 a 0,2 g/100g.

4. CONCLUSÃO

Através dos ensaios, foi possível reunir dados para validar o método analítico para determinação de natamicina nas matrizes queijo parmesão ralado, salame, manteiga e queijo muçarela, utilizando 50% do volume de solvente usualmente utilizados. Também foi possível realizar a validação do método analítico para determinação de ácido sórbico e ácido benzóico em pães, manteigas, iogurtes e embutidos cárneos. Ambos métodos se mostraram sensíveis, eficientes e reproduzíveis. Apresentaram limites de detecção e quantificação dos analitos inferiores aos níveis estabelecidos para esses conservadores na legislação vigente.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida (PIBIC/CNPq) e à toda equipe do Laboratório de Resíduos e Contaminantes do CCQA/ITAL.

6. REFERÊNCIAS

ANVISA, Agência Nacional de vigilância sanitária. Portaria 21/96, Resoluções 04/88, R 04/07, R 21/01 R 25/05.

BUY, L. V.; COOPER, C. Reverse-phase liquid chromatographic determination of benzoic and sorbic acids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemist**, Arlington, v. 70, n. 5, p. 892-896, 1987.

DE SOUZA, Betina Aguiar et al. Aditivos Alimentares: Aspectos Tecnológicos e Impactos na Saúde Humana. **Revista Contexto & Saúde**, v. 19, n. 36, p. 5-13, 2019.

INMETRO - Instituto Nacional De Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **DOQ-CGCRE-008**: Orientação sobre validação de métodos analíticos. 9 rev. Brasília - Brasil, jun de 2020. 30 p.

PUBCHEM BENZOIC ACID. National Center For Biotechnology Information, National Library Of Medicine (US). **PubChem Compound Summary for CID 66509030, Benzoic acid**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzoic-acid>. Acesso em: 15 fev. 2021.

PUBCHEM NATAMICYN. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (US). **PubChem Compound Summary for CID 66509030, Natamycin**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/66509030>. Acesso em: 15 fev. 2021.



15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2021

01 a 02 de setembro de 2021

ISBN 978-65-994972-0-9

PUBCHEM SORBIC ACID. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (US). **PubChem Compound Summary for CID 66509030, Sorbic acid.** Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sorbic-acid>. Acesso em: 15 fev. 2021.

SIMÃO, A. M. 1989. **Aditivos para Alimentos sob o Aspecto Toxicológico.** São Paulo: Nobel.

SOFOS, J. N. **Antimicrobial Agents.** In: MAGA, J. A. & TU, A. T. (Eds.) Food Additive Toxicology. New York: Marcel Dekker Inc., 1995. Cap.11, p.501-529.