

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE BENZOATO, SORBATO, METIL E PROPILPARABENOS EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS UTILIZANDO A ELETROFORESE CAPILAR

João Flávio da Silveira Petrucci e Arnaldo Alves Cardoso

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, CP 355, 14801-970 Araraquara – SP, Brasil

Elisabete Alves Pereira*

Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba, Rod. João Leme dos Santos - SP 264, km 110, 18052-780 Sorocaba – SP, Brasil

Recebido em 7/10/10; aceito em 10/2/11; publicado na web em 15/4/11

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD TO DETERMINATION OF BENZOATE, SORBATE, METHYL AND PROPYL PARABEN IN FOODSTUFFS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS. In this work, a rapid and simple method using capillary electrophoresis (CE) was developed for the determination of the benzoate, sorbate, methyl and propylparaben in foodstuffs. A running buffer consisting of 20 mmol L⁻¹ (pH = 9.3) tetraborate enabled separation of the analytes in less than 5 min. The detector wavelength was set at 220 nm. The method was successfully applied to the analysis of sodas, sweeteners, sauces and juices. The range of preservatives found were from 478.5-466.6 mg kg⁻¹ for methylparaben, 83.7-231.3 mg kg⁻¹ for sorbate and 336.7-428.3 mg kg⁻¹ for benzoate.

Keywords: food analysis; preservatives; capillary electrophoresis.

INTRODUÇÃO

Preservar alimentos foi sempre essencial à vida do homem no ambiente. Alimentos preservados permitem não só a sobrevivência em períodos de escassez, mas também deslocamentos de grandes distâncias. Descobertas de novos continentes no passado e viagens interplanetárias futuras têm em comum a necessidade de alimentos preservados. A adição de compostos químicos para atuarem como preservativos em alimentos e bebidas é uma prática cada vez mais comum presente da indústria alimentícia. A principal função desses aditivos é impedir o crescimento e a germinação de micro-organismos mantendo, desta forma, a aparência e o sabor do mesmo e protegendo os consumidores dos riscos provocados por bactérias, fungos e leveduras, responsáveis por diversas patologias e infecções. Entre os compostos com propriedades conservantes mais utilizados em refrigerantes, sucos concentrados, águas gaseificadas e outras bebidas de pH ligeiramente ácido, estão os ácidos sórbico e benzoico e seus respectivos sais, sorbato e benzoato.¹⁻³ Estas condições ácidas favorecem a forma não ionizada do ácido orgânico, que é responsável pela ação antimicrobiana dos conservantes.^{4,5} A eficiência destas espécies de atuarem como conservantes está diretamente relacionada com a fração de moléculas que estão na forma não ionizada. Os ésteres do ácido *p*-hidroxibenzoico (metil e propilparabeno) são utilizados como preservativos desde a década de 40.⁶ Os parabenos são frequentemente utilizados em condimentos, adoçantes e sucos. O metilparabeno é mais eficaz contra bolores e o propilparabeno contra proliferação de leveduras. Entretanto, sua utilização é limitada devido a sua baixa solubilidade em água.¹

O amplo uso desses agentes antimicrobianos em alimentos tem como inconvenientes efeitos adversos à saúde como, por exemplo, convulsões, acidose metabólica e alergias. O surgimento de reações alérgicas, como urticária e asma, relacionada com a ingestão de ben-

zoatos tem sido reportado na literatura.² Os sorbatos possuem baixa toxicidade, resultado do fato de serem rapidamente metabolizados, entretanto, existem relatos de casos de convulsões, alergias e inflamações em pessoas com sensibilidade a esses compostos.⁶

As concentrações máximas aceitáveis de preservativos em alimentos e bebidas são controladas pela legislação. No Brasil, o órgão responsável pela regulação do uso destes compostos é a ANVISA que estabeleceu, através da RDC nº 5 de 15/1/2007, o uso desses conservantes em sucos, refrigerantes e bebidas não alcoólicas para no máximo 500 mg kg⁻¹ de ácido benzoico e seus respectivos sais, 300 mg kg⁻¹ (em bebidas sem gás) e 800 mg kg⁻¹ (em bebidas com gás) de ácido sórbico e seus respectivos sais e 300 mg kg⁻¹ para metil e propilparabeno.⁷

A determinação analítica de conservantes não é somente importante para a finalidade de controle de qualidade, mas também para o interesse e a proteção do consumidor. Uma variedade de métodos analíticos para a determinação de benzoato e sorbato ou parabenos tem sido descrita na literatura, incluindo espectrofotometria,⁸ cromatografia gasosa (GC, *Gas chromatography*),⁹⁻¹² cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High performance liquid chromatography*),¹³⁻¹⁶ eletroforese capilar (CE, *Capillary electrophoresis*).¹⁷⁻²³ A maioria dos métodos relatados são para benzoato e sorbato ou entre os parabenos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método simples e rápido, utilizando a eletroforese capilar para a análise simultânea de benzoato, sorbato, metilparabeno e propilparabeno em produtos alimentícios (suco, refrigerante, adoçante e molho de soja) para análises de rotina.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e soluções

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico. Os sais de sorbato de sódio e benzoato de sódio foram obtidos da Riedel-de Haen, (Alemanha), metilparabeno e propilparabeno foram

*e-mail: ealves@ufscar.br

obtidos da Reagen (Brasil). As soluções estoque de benzoato e sorbato (1000 mg L^{-1}) foram preparadas pela dissolução de uma quantidade apropriada dos sais de sódio em água deionizada (Milli-Q, Millipore, EUA) e estocadas sob refrigeração.

Soluções estoque de metil e propilparabeno (1000 mg L^{-1}) foram preparadas pela dissolução de uma quantidade apropriada de cada conservante em etanol (J.T. Baker, México) e estocadas sob refrigeração por 1 mês. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente por diluição da solução estoque em água deionizada.

Soluções estoque de tetraborato de sódio e mono-hidrogenofosfato de sódio (NaHPO_4) foram preparadas na concentração 100 mmol L^{-1} e di-hidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) na concentração 200 mmol L^{-1} .

Amostras

As amostras de refrigerante, suco concentrado, água gaseificada, adoçante e molho de soja foram adquiridas no comércio local.

As amostras de refrigerante e água foram mantidas em banho de ultrassom por 5 min. Uma alíquota de $1,000 \text{ g}$ de cada amostra foi transferida para um balão volumétrico de $50,0 \text{ mL}$ e o volume completado com água deionizada. A solução foi filtrada em membrana de $0,45 \mu\text{m}$ para posteriormente ser analisada por CE.

As amostras de suco, molho e adoçante foram preparadas pesando-se $1,000 \text{ g}$ de cada amostra, transferindo para um balão volumétrico de 50 mL e ajustando o volume final com água deionizada. Antes de serem analisadas as amostras foram mantidas em banho de ultrassom por 5 min e filtradas utilizando membrana de $0,45 \mu\text{m}$.

Recuperação

Para determinar a exatidão do método proposto, foram realizados ensaios de recuperação. Os testes de recuperação foram feitos fortificando-se a amostra com benzoato, sorbato, metil e propilparabeno, em três diferentes níveis de concentração ($75, 250$ e 500 mg kg^{-1}). A porcentagem de recuperação foi determinada pela comparação de diferentes determinações feitas em triplicata das amostras fortificadas e as amostras não fortificadas todas submetidas ao mesmo procedimento de extração. Foi considerada como 100% de recuperação a área do pico da solução padrão, com concentração equivalente, que não foi submetida ao processo de extração.

A porcentagem de recuperação foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(A_F - A_{SF}) \times 100}{A_P} \quad (1)$$

onde: A_F = Área do analito em amostra fortificada; A_{SF} = Área do analito em amostra sem fortificar; A_P = Área do analito em solução aquosa padrão.

Instrumentação

Todos os experimentos foram realizados no equipamento modelo HP 3D CE da Agilent, equipado com fonte de alta tensão ($0\text{-}30 \text{ kV}$), detector de arranjo de diodos, que opera na faixa de $190\text{-}600 \text{ nm}$, controlador de temperatura e com programa de aquisição e tratamento de dados (ChemStation, USA). Os capilares de sílica fundida utilizados foram da Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, com dimensões de $75 \mu\text{m d.i.}$ e $48,5 \text{ cm}$ de comprimento total (40 cm até o detector). Uma janela de detecção de aproximadamente $0,3 \text{ cm}$ foi aberta pela remoção do revestimento de poli-imida do capilar por aquecimento.

O condicionamento do capilar foi feito através da passagem de solução de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ durante 5 min, seguida de água deionizada durante 5 min e solução de eletrólito (40 min), no início de cada dia ou quando foi efetuada mudança de condição de análise. Entre as corridas o capilar foi condicionado com eletrólito durante 3 min.

Os analitos de interesse foram injetados pelo modo hidrodinâmico com pressão $30 \text{ mBar} \times 8 \text{ s}$ e detectados diretamente em 220 nm .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos métodos existentes na literatura utilizando a eletroforese capilar para a análise de ácidos orgânicos (sorbato e benzoato) utiliza fosfato como eletrólito de corrida sob inversão de fluxo.²⁰ Sob esta condição, um sal quaternário de amônio deve ser adicionado ao eletrólito para inverter a direção do fluxo eletrosmótico (EOF, *electroosmotic flow*). Apesar de ser uma alternativa eficiente para a separação de diferentes ácidos orgânicos, o uso de um inversor de fluxo reduz consideravelmente a janela de separação resultando em uma comigração dos parabens, tornando complexa a otimização do método. A composição do eletrólito para a determinação dos analitos de interesse foi escolhida de forma a se obter melhor resolução entre os pares críticos (metil e propilparabeno), bem como menor tempo de análise.

De acordo com a literatura,^{18,25} a separação entre benzoato ($pK_a = 4,2$) e sorbato ($pK_a = 4,8$) pode ser obtida entre $\text{pH } 3$ e 12 , enquanto a separação entre metilparabeno ($pK_a = 8,2$) e propilparabeno ($pK_a = 8,3$) pode ser obtida entre $\text{pH } 8$ e 11 . Entretanto, é interessante utilizar um valor de pH superior a $8,0$ porque todos os solutos estão totalmente dissociados, tornando o método mais robusto. Inicialmente utilizou-se um eletrólito de corrida contendo 20 mmol L^{-1} de mono-hidrogenofosfato de sódio (NaHPO_4) e $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de di-hidrogenofosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$), pH de $8,5$. O eletrólito selecionado proporcionou boa separação dos ânions investigados (benzoato, sorbato, metil e propilparabeno), mas apresentou instabilidade na linha base (Figura 1) e baixa repetibilidade. Este comportamento deve estar relacionado à perda da capacidade tamponante do eletrólito no valor de pH utilizado. Em CE soluções tamponadas tendem a ser utilizadas como eletrólito de corrida para limitar possíveis variações no sistema de separação causadas pela mudança de pH e para obter resultados com melhor repetibilidade.^{26,27}

Com objetivo de otimizar o sistema de separação, 20 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio foi selecionado como eletrólito de corrida. Como mostra a Figura 2, o tetraborato apresentou melhor resolução entre

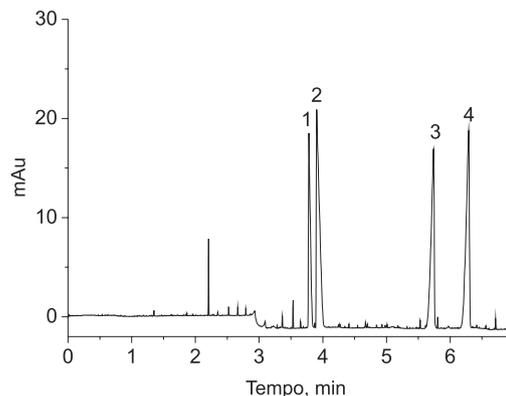


Figura 1. Eletroferograma da mistura padrão contendo 20 mg L^{-1} de cada conservante. Capilar de sílica fundida de $75 \mu\text{m} \times 48,5 \text{ cm}$ ($40,0 \text{ cm}$ até o detector). Eletrólito: $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaHPO}_4$ e $0,2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{pH } 8,5$; temperatura: $29 \text{ }^\circ\text{C}$; tensão: 15 kV ; injeção: $5 \text{ s} \times 30 \text{ mBar}$; detecção direta: 200 nm . 1. metilparabeno, 2. propilparabeno, 3. sorbato e 4. benzoato

os picos e maior estabilidade da linha de base quando comparado ao sistema fosfato. Visando diminuir o tempo de corrida, avaliou-se o comportamento do sistema variando a tensão aplicada de 15 a 25 kV. Valores de tensão superiores a 20 kV proporcionaram um aumento considerável na corrente, aumentando as chances de quebra do capilar devido ao aumento de temperatura no seu interior, como resultado do efeito Joule. Com base nos resultados obtidos a tensão foi fixada em 20 kV.

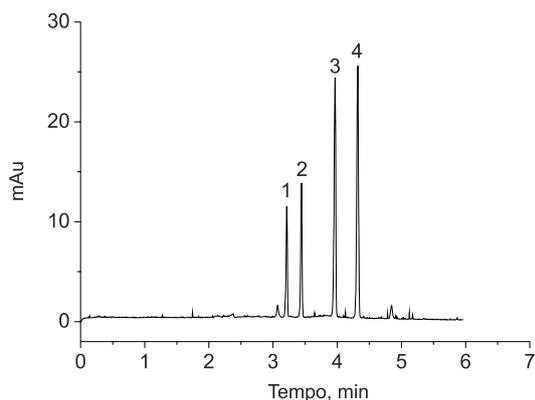


Figura 2. Eletroferograma da mistura padrão contendo 20 mg L⁻¹ de cada conservante. Capilar de sílica fundida de 75 µm x 48,5 cm (40,0 cm até o detector). Eletrólito: 20 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio, pH 9,3; temperatura: 29 °C; tensão: 20 kV; injeção: 5 s X 30 mBar; detecção direta: 220 nm. 1. metilparabeno, 2. propilparabeno, 3. sorbato e 4. benzoato

Um dos parâmetros mais simples a ser otimizado na detecção direta é o comprimento de onda. A Figura 3 apresenta o comportamento do sinal analítico em função do comprimento de onda utilizado para as análises dos conservantes. Este estudo foi feito utilizando uma mistura padrão contendo 20 mg L⁻¹ de cada analito de interesse. Apesar de cada analito apresentar um máximo de absorbância, o comprimento de onda de 220 nm foi selecionado para as análises, pois apresentou menor variação de sinal analítico entre os conservantes.

A precisão do método foi determinada em relação ao tempo de migração e área dos picos. Os valores de coeficiente de variação foram inferiores a 1,90% para tempo de migração e 1,5% para área dos picos (Tabela 1).

A exatidão do método proposto foi calculada como a porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida de analito adicionada à amostra. Os resultados estão apresentados na Tabela 2. Os testes de recuperação mostraram valores que variaram de 98,8 a 104,7% para os níveis de concentração estudados.

Para estabelecer a linearidade do método, foram construídas curvas analíticas utilizando uma mistura padrão dos conservantes em 6 diferentes níveis de concentração. Os parâmetros estatísticos apresentados na Tabela 3 mostram que as curvas de calibração apresentaram boa linearidade ($r > 0,998$) na faixa de concentração avaliada (0,94-24,7 mg kg⁻¹). Cabe mencionar que os limites de detecção instrumentais variam de 0,53-1,46 mg kg⁻¹.

Tabela 2. Teste de recuperação

Concentração adicionada mg kg ⁻¹	Recuperação %			
	Metilparabeno	Propilparabeno	Sorbato	Benzoato
75,00	104,7 ± 2,5	102,9 ± 2,7	99,7 ± 2,0	101,6 ± 2,4
250,00	98,8 ± 1,8	99,8 ± 2,0	103,7 ± 2,3	99,7 ± 1,9
500,00	99,8 ± 2,1	100,5 ± 1,7	104,9 ± 1,9	100,4 ± 2,1

Injeção das amostras em triplicata

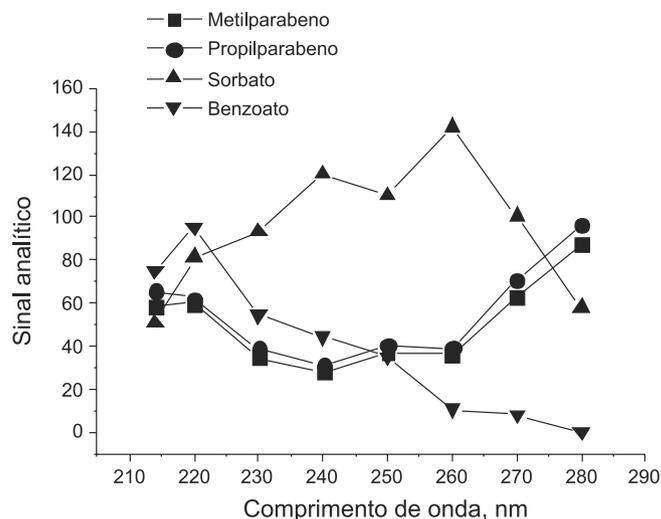


Figura 3. Espectro de absorção dos analitos estudados. Mistura padrão contendo 20 mg L⁻¹ de cada conservante

Tabela 1. Coeficiente de variação dos tempos de migração e área picos dos conservantes

Ânion	Tempo de migração	Tempo de migração CV(%)	Área CV (%)
Metilparabeno	3,3	1,9	1,4
Propilparabeno	3,6	1,6	1,3
Sorbato	4,2	0,86	1,3
Benzoato	4,5	1,4	1,2

Injeção hidrodinâmica (8 s x 30 mBar); CV = Coeficiente de variação (n = 10)

Para demonstrar a aplicabilidade do método desenvolvido, diferentes amostras de suco, refrigerante, adoçante e molho de soja foram analisadas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4 e Tabela 4. Com base na Figura 4 foi possível observar que o conservante benzoato estava presente em todas as amostras analisadas, com exceção da amostra de molho de soja. O conservante propilparabeno não foi encontrado em nenhuma amostra e metilparabeno apenas nas amostras de adoçante. Em nenhuma das amostras analisadas foram encontradas concentrações dos conservantes acima do permitido pela legislação brasileira.

CONCLUSÃO

O método desenvolvido neste trabalho, quando comparado a outros métodos utilizando a eletroforese capilar,^{28,29} apresenta como vantagens: a utilização de um eletrólito de corrida contendo simplesmente tetraborato de sódio para a separação simultânea de benzoato, sorbato, metil e propilparabeno, rapidez (tempo de análise inferior a 5 min), baixo custo e requer um simples pré-tratamento da amostra. O método desenvolvido apresentou bons resultados no que diz respeito

Tabela 3. Validação do método em termos de linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Conservante	Equação da reta ^a	Coefficiente de correlação	LOD ^b (mg kg ⁻¹)	LOQ ^c (mg kg ⁻¹)
Metilparabeno	$Y = -0,5851 + 1,737 X$	0,9998	0,53	1,59
Propilparabeno	$Y = 0,1531 + 2,001 X$	0,9989	1,46	4,42
Sorbato	$Y = -1,093 + 3,577 X$	0,9998	0,72	2,17
Benzoato	$Y = -2,119 + 3,354 X$	0,9995	1,03	3,14

^aCurva de calibração no intervalo de 0,94-24,7 mg kg⁻¹; ^bcalculado de acordo com a literatura: LOD=3,3 SD/B; ^cLOQ=10 SD/B, onde SD é o desvio padrão da resposta e B é a inclinação da curva de calibração

Tabela 4. Resultados obtidos para análises de conservantes em refrigerantes, sucos concentrados, águas gaseificadas, adoçantes e molhos

Amostra	Conservantes (mg kg ⁻¹)			
	Metilparabeno ^a	Propilparabeno ^a	Sorbato ^a	Benzoato ^a
Refrigerante "A"	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Refrigerante "B"	< LOD	< LOD	< LOD	311,1 ± 5,1
Refrigerante "C"	< LOD	< LOD	< LOD	224,4 ± 3,7
Refrigerante "D"	< LOD	< LOD	< LOD	341,1 ± 6,2
Suco goiaba	< LOD	< LOD	83,8 ± 2,5	336,7 ± 5,4
Suco caju	< LOD	< LOD	231,3 ± 5,2	414,2 ± 7,5
Água gaseificada "A"	< LOD	< LOD	196,1 ± 5,0	395,5 ± 4,5
Água gaseificada "B"	< LOD	< LOD	205,7 ± 3,8	336,4 ± 6,2
Adoçante "A"	478,5 ± 6,9	< LOD	< LOD	333,3 ± 4,3
Adoçante "B"	466,6 ± 6,4	< LOD	< LOD	428,3 ± 6,1
Molho "Shoyo"	< LOD	< LOD	135,3 ± 2,9	< LOD

^atriplicata; LOD: limite de detecção

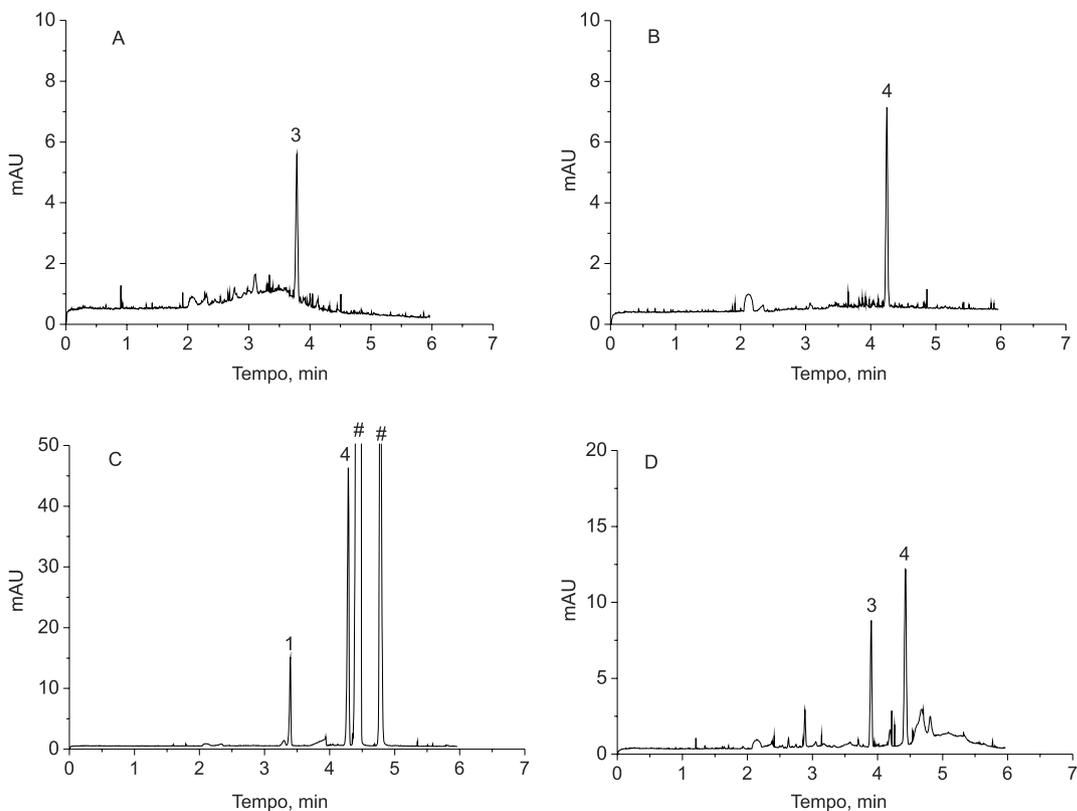


Figura 4. Eletroferogramas das amostras de alimentos. (A) Molho Shoyo, (B) refrigerante, (C) adoçante e (D) suco concentrado. Capilar de sílica fundida de 75 μm x 48,5 cm (40,0 cm até o detector). Eletrólito: 20 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio, pH 9,3; temperatura: 29 °C; tensão: 20 kV; injeção: 8 s X 30 mBar; detecção direta: 220 nm. 1. metilparabeno, 2. propilparabeno, 3. sorbato, 4. benzoato e # não identificado

à sensibilidade, precisão e recuperação sendo, portanto, perfeitamente aplicável para determinação de conservantes em amostras de alimentos tanto para fins de controle analítico de produção como de vigilância de qualidade de produto comercializado.

É importante ressaltar que as concentrações dos conservantes encontradas nas amostras estão de acordo com os limites máximos estabelecidos pela ANVISA.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela bolsa de produtividade (500888/2009-4) e à CAPES pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Burini, G.; Damiani, P.; *J. Chromatogr.* **1991**, *543*, 69.
2. World Health Organization; *Benzoic acid and sodium benzoate: concise International chemical assessment document*, 26, WHO: Genebra, 2000.
3. Soni, M. G.; Burdock, G. A.; Taylor, S. L.; Greenberg, N. A.; *Food Chem. Toxicol.* **2001**, *39*, 513.
4. Burini, G.; *J. Chromatogr., A* **1994**, *664*, 213.
5. Stratford, M.; Anslow, P. A.; *Letters in Applied Microbiology* **1998**, *27*, 203.
6. Wang, L.; Zhang, X.; Wang, Y.; Wang, W.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *577*, 62.
7. http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/05_170107.htm, acessada em Março 2011.
8. Marsili, N. R.; Lista, A.; Band, B. S. F.; Goicoecheia, H. C.; Olivieri, A. C.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2479.
9. Dong, C.; Wang, W.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *562*, 23.
10. Gonzalez, M.; Gallego, M.; Valcarcel, M.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *823*, 321.
11. Kakemoto, K.; *J. Chromatogr.* **1992**, *594*, 253.
12. Pan, Z.; Wang, L.; Mo, W.; Wang, W.; Hu, W.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, *545*, 218.
13. Saad, B.; Bari, Md. F.; Saleh, M. I.; Ahmad, K.; Talib, M. M. K.; *J. Chromatogr., A* **2005**, *1073*, 393.
14. Mota, F. J. M.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Cunha, S. C.; Oliveira, M. B. P. P.; *Food Chem.* **2003**, *82*, 469.
15. Tfouni, S. A. V.; Toledo, M. C. F.; *Food Control.* **2002**, *13*, 117.
16. Garcia, I.; Ortiz, M. C.; Sarabia, L.; Vilches, C.; Gredilla, E.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *992*, 11.
17. Boyce, M. C.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *847*, 369.
18. Costa, A. C. O.; Perfeito, L. S.; Tavares, M. F. M.; Micke, G. A.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1204*, 123.
19. Tang, Y.; Mingjia, W.; *Food Chem.* **2007**, *103*, 243.
20. Mato, I.; Hidobro, J. F.; Simal-Lozano, J.; Sancho, M. T.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *565*, 190.
21. Walker, J. C.; Zaugg, S. E.; Walker, E. B.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *781*, 481.
22. Kuo, K. L.; Hsieh, Y. Z.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *768*, 334.
23. Pant, I.; Trenerly, V. C.; *Food Chem.* **1995**, *53*, 219.
24. Dallet, P.; Dubost, J. P.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *23*, 763.
25. Muijselaar, P. G.; Claessens, H. A.; Cramers, C. A.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *765*, 295.
26. Haddad, P. R.; Doble, P.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *834*, 189.
27. Pereira, E. A.; Stevanato, A.; Cardoso, A. A.; Tavares, M. F. M.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 66.
28. Uysal, U. D.; Güray, T.; *J. Anal. Chem.* **2008**, *63*, 982.
29. Driouich, R.; Takayanagi, T.; Oshima, M.; Motomizu, S.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *903*, 271.