

Certificação de Material de Referência de Ácido Benzoico em Suco de Laranja

Certification of Reference Material of Benzoic Acid in Orange Juice

Lucas Junqueira de Carvalho¹, Bruno Carius Garrido¹, Eliane Cristina Pires do Rego¹, Janaína Marques Rodrigues Caixeiro¹

¹ Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Avenida Nossa Senhora das Graças, 50 - Xerém, Duque de Caxias - RJ, 25250-020

E-mail: ljarvalho@inmetro.gov.br

Resumo: A produção de laranja é um dos cultivos brasileiros mais importantes, movimentando milhões de reais por ano, e grande parte desta laranja segue para o mercado externo. O suco de laranja precisa ser conservado para chegar com suas propriedades preservadas aos consumidores. Um conservante utilizado é o ácido benzoico. Ele evita que leveduras e bolores possam se proliferar no suco. Assim, como este conservante é utilizado, o controle faz-se necessário, com respaldo de um MRC para tal. Neste trabalho foi desenvolvido um MRC de concentração de 679,8 mg.kg⁻¹, com incerteza de 9,8 mg.kg⁻¹, com homogeneidade e estabilidade adequadas ao uso.

Palavras-chave: Cromatografia, ácido benzoico, laranja, caracterização, MRC.

Abstract: The orange production is one of the most important crops in Brazil, moving large amounts of money per year, and much of this orange goes to the overseas market. The orange juice needs to be preserved to stay with your intact properties to consumers. One of preservative used is benzoic acid. It prevents yeasts and molds from proliferating in the juice. Thus, as this preservative is used, your control is necessary, with the support of a CRM. In this job was developed a CRM, with a concentration of 679.8 mg.kg⁻¹ and 9.8 mg.kg⁻¹ of uncertainty, and homogeneity and stability fit for purpose.

Keywords: Chromatography, benzoic acid, orange, characterization, CRM.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por conservantes químicos advém da necessidade de alimentos mais duráveis e disponíveis para consumo durante um longo tempo, além de proteção a saúde, pois em

muitos destes alimentos podem se formar micro-organismos danosos à saúde humana. Dessa forma, o alimento precisa ser preservado desde o setor terciário até o consumidor [1]. O ácido benzoico foi um dos primeiros conservantes aprovados pelo órgão regulador norte-americano

de alimentos e remédios, o *Food and Drugs Administration* (FDA), e é bem utilizado devido ao seu baixo custo, tendo ação bactericida e fungicida. No Brasil, ele é um dos conservantes autorizados pela ANVISA, através da RDC nº8 (06/03/2013), para a utilização em sucos, néctares de fruta e suco tropical [2]. A ANVISA estabelece o limite máximo de 1000 mg.kg⁻¹ para sucos de frutas o mesmo limite máximo do *Codex Alimentarius*, organismo internacional da área de alimentos [3].

Segundo o VIM, Material de Referência Certificado (MRC) é um material de referência (MR) acompanhado de um documento emitido por um organismo com autoridade específica. Este documento fornece valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos notoriamente válidos. Além disso, todo MRC tem que ser caracterizado por um procedimento metrologicamente válido e ter homogeneidade e estabilidade apropriadas [4].

2. CERTIFICAÇÃO

Para a certificação de um MR, em metrologia química, é necessária utilização de técnicas instrumentais notoriamente consolidadas. Segundo a ISO 17034 [5], o produtor do MR deve selecionar uma estratégia de caracterização apropriada ao uso pretendido. Dentre as 5 sugestões apresentadas, duas delas foram utilizadas neste trabalho: utilizar método primário de medição, e caso isso não for possível, realizar a certificação utilizando dois ou mais métodos, com exatidão demonstrada.

2.1. Preparo Gravimétrico e Diluição Isotópica

O preparo gravimétrico é um importante método de preparo na área de metrologia química, que consiste em se realizar preparos analíticos utilizando a unidade de massa do SI, que é o quilograma (kg). Dessa forma, tem-se a

rastreabilidade a essa unidade através da cadeia de calibração da balança utilizada.

Aliado a este método, utiliza-se também a diluição isotópica, que é um procedimento que consiste em diluir gravimetricamente todas as amostras e padrões com uma solução de um padrão interno que seja um isotopólogo do analito. Esse procedimento é o mais amplamente aceito em metrologia química para análises cromatográficas, visto que se utiliza um padrão interno praticamente idêntico ao analito que se deseja quantificar que, no entanto, possui uma massa molecular diferente. A diluição isotópica deve ser realizada em conjunto com a espectrometria de massas.

2.2. Preparo do MRC e Métodos de Análise

Para a certificação utilizaram-se duas técnicas instrumentais: a análise de fluxo acoplada a espectrometria de massas (AF-EM Waters modelo Xevo-TQ) e a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM Agilent modelo 6890N/5975B). Prepararam-se soluções estoque com ácido benzoico, para montar uma curva de calibração, e solução de ácido benzoico deuterado para a diluição isotópica. Padrões e amostras foram injetados em triplicata, e as amostras foram preparadas em triplicata. O MRC foi preparado fortificando-se 5,9 kg de suco de laranja com 4,09 g de ácido benzoico certificado do NIST (pureza de 99,9978 % ± 0,0044 %), o mesmo utilizado para preparo da solução estoque. Foi preparado um lote de 196 frascos contendo 30 mL de suco em cada. Utilizou-se o MRC de ácido benzoico em suco de laranja do *Health Sciences Authority* (HSA) de Cingapura para verificação da exatidão do método de análise.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Homogeneidade

Foram analisadas 16. Os valores obtidos dos ensaios por CG-EM foram consolidados graficamente na Figura 1. Realizou-se uma análise de variâncias (ANOVA), e através dela verificou-se que $MQ_{Dentro} > MQ_{Entre}$. De tal modo, utiliza-se a Equação 1 para o cálculo de incerteza associada a homogeneidade. Obteve-se $u_{(h)} = 0,42 \text{ mg.kg}^{-1}$.

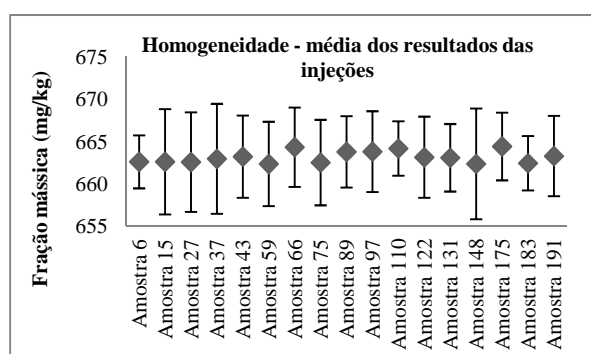


Figura 1: Resultado do estudo de homogeneidade.

$$u_{(h)} = \sqrt{\frac{MQ_{dentro}}{n}} \times \sqrt[4]{\frac{2}{gl_{dentro}}} \quad (1)$$

n=número de replicatas

gl_{dentro} = grau de liberdade dentro da amostra

Para a avaliação da homogeneidade do material é necessário o cálculo de contribuição da não homogeneidade do mesmo (Equação 2). Observa-se que o material é homogêneo, pois a sua contribuição da não homogeneidade, ou seja, sua heterogeneidade foi de somente de 0,064 %.

$$C_{\%} = \frac{u_{(h)} \times 100}{X} \quad (2)$$

X = média dos resultados da homogeneidade;

3.2. Caracterização

Neste estudo define-se o valor de propriedade do material. Foram utilizadas duas técnicas de caracterização, conforme item 2.2. Foram analisadas seis amostras, por ambas as técnicas. Conforme se observa na Figura 2, verifica-se que

o método por AF-EM tem uma exatidão melhor do que o método por CG-EM comparando com o valor da fração mássica do MRC obtido através da gravimetria ($683,513 \text{ mg.kg}^{-1}$). Constata-se que o valor de propriedade do material a ser considerado é o valor médio obtido pela técnica de AF-EM, pois possui um resultado médio mais próximo do valor da gravimetria e a sua incerteza engloba o valor gravimétrico. Além disso, a incerteza obtida por AF-EM foi a maior incerteza dentre os grupos de resultados, sendo uma abordagem mais conservadora. O fato de a incerteza da AF-EM ser mais alta que da CG-EM é inerente à técnica. A $u_{(c)}$ foi de $9,7 \text{ mg.kg}^{-1}$.

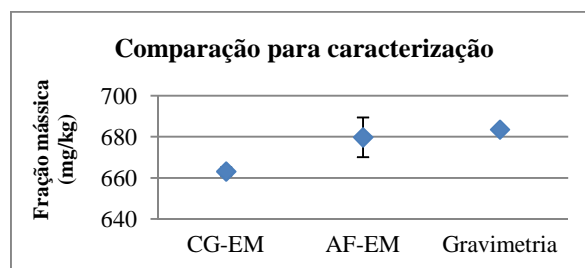


Figura 2: Resultados das amostras por ambas as técnicas.

3.3. Estabilidade

Os estudos de estabilidade têm como objetivo determinar o período de tempo na qual o MRC terá o seu valor de propriedade íntegro e confiável em determinadas condições, principalmente de temperatura. O estudo de estabilidade de curta duração é realizado para avaliar a estabilidade do material durante o transporte, onde o material pode ser exposto a condições ambientais adversas e críticas que podem modificar o seu valor de propriedade. Este estudo foi feito pelo método isócrono, com temperatura de referência a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, e com temperaturas de estudo de 4 e $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O estudo de longa duração tem a finalidade de verificar, ao longo de um grande espaço de tempo, se o valor de propriedade do MRC será mantido. Este estudo foi feito pelo método clássico, com temperatura a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Nas Figuras 3 e 4 estão os gráficos para a estabilidade de curta duração a 4 °C e de longa duração a -20 °C, respectivamente. Os resultados foram obtidos por CG-EM. O estudo de estabilidade de curta duração a 50 °C foi descartado, pois se verificou que o MRC não era estável a esta temperatura nem por três dias. Pelos estudos, o MRC é estável a 4 °C durante 28 dias, e a -20 °C ele é estável por todo o período estudado, e deve ser armazenado nesta temperatura. O gráfico da Figura 4 não demonstra tendência, e assim assume-se a estabilidade do material por mais de 14 meses, o que será acompanhado pelos estudos de monitoramento. A incerteza da estabilidade de curta duração foi de 0,92 mg.kg⁻¹ e a de longa duração 1,1 mg.kg⁻¹.

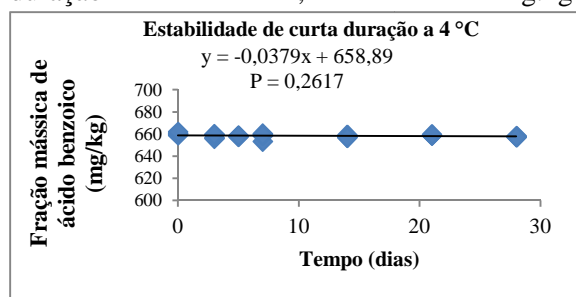


Figura 3: Resultado da estabilidade de curta a 4 °C.

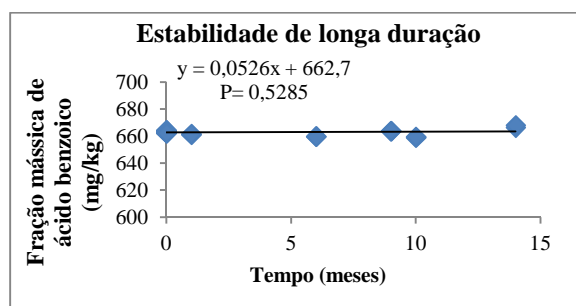


Figura 4: Resultado da estabilidade de longa a -20 °C.

3.4. Incerteza do MRC

Segundo a ABNT ISO Guia 35 [6], a incerteza de um MRC é a combinação das incertezas oriundas dos estudos de homogeneidade, estabilidade e caracterização (Equação 3).

$$u_{(MRC)} = \sqrt{(u_{(h)})^2 + (u_{(e)})^2 + (u_{(c)})^2} \quad (3)$$

Assim, o valor certificado do MRC foi estabelecido 679,8 mg.kg⁻¹ ± 9,8 mg.kg⁻¹.

4. CONCLUSÃO

O MRC de ácido benzoico em suco de laranja foi certificado com sucesso. Os procedimentos laboratoriais utilizados para a produção mostraram-se eficazes para a finalidade pretendida. Apesar de o método por CG-EM apresentar exatidão pior do que o método por AF-EM, os seus resultados foram utilizados para as análises de homogeneidade e estabilidade, pois a precisão deste método foi melhor do que por AF-EM, e para estes parâmetros é mais importante a precisão do que a exatidão. Porém, no monitoramento do MRC será utilizado o método por AF-EM, já que no monitoramento o resultado obtido é comparado àquele obtido na caracterização.

REFERÊNCIAS

- [1] Davidson P M, Sofos J N, Branen A L. Antimicrobials in Food, Third Edition 2005 4/28/2005. 720 p.
- [2] BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) – RDC Nº 8, DE 06 DE MARÇO DE 2013.
- [3] Codex Alimentarius. Normas Alimentares FAO/OMS. 2014; Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/groups/details.html?id=162&lang=es>.
- [4] Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM), (2012).
- [5] ISO 17034:2016. Reference materials - General and statistical principles for certification, (2016).
- [6] ABNT ISO GUIA 35 – Materiais de referência – Princípios Gerais e estatísticos para certificação (2012)