

## DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE CHUMBO EM XANTANA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM FORNO DE GRAFITE COM FONTE CONTÍNUA DE ALTA RESOLUÇÃO VIA AMOSTRAGEM DIRETA DE SÓLIDOS

Emilene M. Becker<sup>1,2\*</sup>, Paulo Roberto Leão<sup>1</sup>, Morgana B. Dessuy<sup>2</sup>, Maria Goreti R. Vale<sup>2,3</sup>, Amanda Ávila Rodrigues, Angelita S. Moreira<sup>1</sup>, Claire T. Vendruscolo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – Centro de Ciências, Químicas, Farmacêuticas e Alimentos, Campus Universitário s/nº, 96160-000 Capão do Leão – RS (emilene.becker@ufrg.br)

<sup>2</sup> Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre – RS.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do CNPq – INCT de Energia e Ambiente, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA; www.inct.cienam.ufba.br

**Resumo** – A xantana é o aditivo espessante, gelificante e estabilizante de origem microbiana mais utilizado em alimentos devido suas incomparáveis propriedades reológicas, além de ser considerada muito segura. Vem sendo cada vez mais aplicada, nas mais diversas áreas industriais. É um biopolímero do tipo exoheteropolissacarídeo aniônico, produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas*. Além de elementos metálicos macroconstituintes, relacionados às propriedades reológicas da xantana, poderá conter elementos traço contaminantes, como metais pesados. Sendo assim, a caracterização adequada dos elementos metálicos se faz de suma importância. Este trabalho contempla o desenvolvimento um método analítico para a determinação de Pb em amostras de gomas xantanas por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite (HR-CS GF AAS) usando a amostragem direta de sólidos. São discutidos os parâmetros de desenvolvimento do método. Para investigar a provável origem desta contaminação foi feita a análise de alguns insumos usados no processo de fermentação das xantanas.

**Palavras-chave:** Goma xantana, caracterização, chumbo, HR-CS GF AAS, amostragem direta de sólidos.

### Introdução

A denominação xantana ou goma xantana engloba os biopolímeros produzidos em fermentação aeróbica por bactérias do gênero *Xanthomonas* [1]. Xantanas são amplamente empregadas pela sua capacidade de formar géis ou soluções com elevada viscosidade em meio aquoso, atuando como um espessante, agente de suspensão e estabilizador de emulsões [2-4]. A xantana tem sido o polissacarídeo microbiano mais utilizado em alimentos, no Brasil e no mundo. Também tem sua aplicabilidade relatada a inúmeros produtos em diversos setores industriais. Entre eles, destacam-se as áreas de fármacos, cosméticos, química e petrolífera. Seu uso se deve principalmente a suas propriedades reológicas, que permitem a formação de soluções viscosas a baixas concentrações (0,05-1,0%), bem como a elevada estabilidade em ampla faixa de pH e elevadas temperaturas.

A xantana possui sua estrutura primária composta de repetidas unidades de  $\beta$ -D-glicose unidas por ligação 1-4, formando a cadeia principal celulósica. Pode conter nos seus resíduos ácidos da cadeia principal cátions como Na, K, Ca e Mg, oriundos dos sais utilizados durante o processo fermentativo, etapa de recuperação ou adicionados após. As propriedades tecnológicas da xantana são influenciadas pela concentração e natureza desses sais adicionados, especialmente no que diz respeito à viscosidade [5-6]. Além da presença de metais macroconstituintes, elementos traço, tais como chumbo (Pb), podem estar presentes como contaminantes, que são lentamente acumulados no organismo causando elevada toxicidade. Por isto, devem se restringir aos limites previstos pela legislação. Os contaminantes possuem a mesma origem dos cátions aceitáveis. A legislação brasileira para aditivos alimentares preconiza que sejam atendidas as exigências de pureza estabelecidas pela FAO-OMS, ou pelo Food Chemical Codex [7]. A determinação do teor de arsênio (As), chumbo (Pb) e metais pesados, expressos como chumbo, são etapas obrigatórias do controle de qualidade em xantana. Para Pb e metais pesados aceitam-se percentuais menores que 0.0002% ou  $2 \mu\text{g.g}^{-1}$  e 0.002% ou  $20 \mu\text{g.g}^{-1}$  [8,9].

Para a determinação de elementos traço que estão normalmente na faixa de  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ou abaixo, são requeridas as mais sensíveis técnicas analíticas. Por outro lado, estas técnicas geralmente são incompatíveis com matrizes complexas onde esses elementos estão inseridos, se fazendo necessários procedimentos de preparo de amostras. Os órgãos reguladores da contaminação de metais tóxicos em alimentos adotam procedimentos que são, na maioria das vezes, laboriosos,

morosos e sujeitos a erros [9]. No caso de aplicação rotineira e principalmente na fase de desenvolvimento de novos produtos, é preferível lançar mão de técnicas analíticas que permitam manusear diretamente as amostras e que usem pequena quantidade de amostra [10-11]. Atualmente, a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite aliada ao espectrômetro de alta resolução com fonte contínua (HR-CS GF AAS) preenche os requisitos de elevada sensibilidade e possibilidade de análise direta das amostras [12-13]. Além disso, esta técnica também permite a minimização e resolução de interferências espectrais muito comuns na análise direta de sólidos via AAS, conferindo, assim, o estabelecimento de métodos rápidos e confiáveis que possam ser aplicados em análises de rotina [12]. Desta forma, o objetivo deste trabalho visa o desenvolvimento de um método analítico para a determinação de Pb em amostras de gomas xantanas comerciais e nas produzidas em escala piloto no Laboratório de Biopolímeros do CDTec/UFPEL por HR-CS GF AAS usando a amostragem direta de sólidos. Para investigar a provável origem desta contaminação, foi feita a análise de alguns insumos usados no processo de fermentação das xantanas.

### Parte Experimental

#### *Materiais analisados*

Utilizou-se duas xantanas comerciais e três xantanas pruni. Os polímeros comerciais utilizados foram denominados como Xantana comercial A, adquirida da Farmaquímica® e Xantana comercial B, cedida pela Petrobras. As xantanas pruni, produzidas no Laboratório de Biopolímeros do CDTec/UFPEL, foram denominadas como Xantana fermentação A, proveniente de processo utilizando a cepa 101 de *Xanthomonas arboricola* pv pruni, durante 66h, e Xantana fermentação B e C, relativas a dois diferentes lotes provenientes da cepa 106, durante 66h, utilizando-se marcas diferentes de açúcar cristal comercial. Os processos fermentativos foram desenvolvidos em biorreator (BioStat B Braun Biotech International®) com jarro de 10L contendo 7L de meio, controlando-se o pH a 7 pela adição de NaOH 2mol.L<sup>-1</sup>, segundo patente WO/2006/047845 [14]. O caldo fermentativo resultante foi tratado termicamente por 15min a 121°C, o polímero foi recuperado pela adição de etanol 96% (4:1 v/v), seco em estufa a 56°C e triturado.

A determinação de Pb foi feita também nos insumos nos reagentes glicose, peptona, dihidrogeno fosfato de amônio, hidrogenofosfato de potássio, extrato de levedura e no álcool utilizado para recuperação da xantana, por determinação direta.

#### *Instrumentação*

Todas as medidas foram feitas em um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite, modelo ContrAA 700 (Analytik Jena®, Alemanha), equipado com uma lâmpada de xenônio de arco curto (300 W) operando no modo *hot-spot* e monocromador duplo de alta resolução (DEMON) e detector com arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD). A avaliação do sinal foi feita utilizando-se 3pixels (CP ± 1) na linha analítica de 283,306 nm. Foram utilizados tubos de grafite pirólíticos com aquecimento transversal para amostragem sólida. Em torno de 0,80 mg das amostras foram pesadas diretamente na plataforma de grafite usando uma microbalança (Sartorius®, Alemanha), com uma precisão de 0,001 mg. As plataformas contendo as amostras foram inseridas no atomizador usando acessório para amostragem sólida. Utilizou-se argônio, com grau de pureza de 99,996% (White Martins®, Brasil), na vazão de 2,0 L min<sup>-1</sup>, durante todas as etapas, excetuando a de atomização, onde o fluxo de gás foi interrompido. As condições de medida para a determinação de Pb por HR-CS GF AAS usando a amostragem direta de sólidos foram avaliadas usando amostra da xantana pruni Fermentação A e uma mistura de Pd + Mg e NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como modificadores químicos, ambos em solução e contendo Triton X-100 0,05% (v/v).

#### *Reagentes e soluções*

As soluções utilizadas foram preparadas a partir de reagentes de elevado grau analítico e água destilada purificada por um sistema Milli-Q (Millipore®, EUA), resultando em água com uma resistividade de 18 MΩ cm a 25 °C. Uma solução estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Pb foi usada para preparar as soluções de calibração. Como modificadores químicos foram utilizadas as soluções de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1% (m/v) e Pd 0,1% (m/v) + Mg 0,06% (m/v) em Triton X-100 0,05% (v/v).

### Resultados e Discussão

Os resultados obtidos com o modificador Pd/Mg mostraram a presença de uma interferência parcialmente sobreposta com o sinal analítico do Pb. O modificador que permitiu uma eliminação adequada da absorção do fundo no CP ±1 foi NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2 mg) na temperatura de atomização de 1800°C, que estabiliza o sinal analítico de Pb tanto das amostras como do padrões aquosos. Fez-se então o estudo da temperatura de pirólise ótima, encontrando-se 900 °C como temperatura que proporciona o maior sinal analítico com menor interferência, sendo esta então a condição utilizada para as demais determinações. Com o objetivo de avaliar qual a massa máxima de amostra que é capaz de ser analisada com menor interferência no CP ±1 nas condições de medida, fez-se o estudo de massa de amostra. Os resultados demonstraram que massas até 0,85 mg não possuem interferência. As demais amostras investigadas não demonstraram interferências no CP ±1.

A quantificação de Pb nas amostras e nos insumos foi realizada com curva analítica usando um branco e sete soluções de calibração aquosas. Linearidade adequada ( $r^2 > 0,99$ ) foi obtida para soluções numa faixa de concentração entre 4,0 e

## 12° Congresso Brasileiro de Polímeros (12°CBPol)

100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (0,04–1,0 ng de Pb). Os parâmetros de mérito avaliados, massa característica ( $m_0$ ), limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), são demonstrados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Parâmetros de mérito para determinação de Pb em xantana usando HR–CS GF AAS com calibração com padrões aquosos

Modificador	Equação de regressão linear	R <sup>2</sup>	LD*/ $\mu\text{g g}^{-1}$	LQ / $\mu\text{g g}^{-1}$	$m_0$ / pg
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	$A_{\text{int}} = 0,0079 + 0,4471 m_{\text{Pb}}$	0,9979	0,007	0,023	9

\*LD calculado para massa máxima de amostra inserida no tubo de grafite (1,9 mg).

A exatidão do método foi avaliada usando-se material de referência certificado, polietileno de baixa densidade ERM EC680K. Os resultados encontrados ( $13,2 \pm 0,9 \mu\text{g g}^{-1}$ ) foram concordantes com o valor certificado ( $13,6 \pm 0,9 \mu\text{g g}^{-1}$ ) à um nível de confiança de 95% (teste T de *student*). A precisão, avaliada pelo coeficiente de variação (CV) da determinação de Pb na amostra F38 (n=10), foi 12%. Para as demais amostras o CV variou de 7 a 24% (n=5).

Os resultados analíticos da determinação de Pb em três amostras de xantana produzidas em escala piloto, em diferentes condições de fermentação, e em duas amostras comerciais são mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Determinação de Pb em amostras de xantana comerciais e xantanas pruni usando HR–CS GF AAS com amostragem direta de sólidos

Amostra	Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) $\pm$ sd
Xantana Fermentação A	0,909 $\pm$ 0,184
Xantana Fermentação B	0,068 $\pm$ 0,008
Xantana Fermentação C	0,440 $\pm$ 0,050
Xantana Comercial A	0,153 $\pm$ 0,010
Xantana Comercial B	0,021 $\pm$ 0,005

\*sd = desvio padrão de 5 medidas replicatas

Todas as amostras analisadas tiveram teores de Pb inferiores ao permitindo. A investigação da provável origem da contaminação das amostras de xantanas produzidas na UFPel foi realizada avaliando-se alguns dos insumos utilizados no processo de fermentação. Apenas a amostra de peptona mostrou contaminação acima do LQ ( $0,041 \pm 0,010 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Amostras dos açúcares comerciais (açúcar cristal) utilizados no processo, e que são insumos que podem conter Pb, não foram incluídos nesta investigação, mas serão posteriormente avaliados.

### Conclusão

A caracterização de biopolímeros com respeito à presença de contaminantes é um tema que merece destaque em virtude da aplicabilidade destes produtos na indústria alimentícia e farmacêutica. A HR–CS GF AAS é uma valiosa ferramenta principalmente no que concerne a possibilidade de identificação e correção de interferências espectrais, o que não seria possível por outra técnica, principalmente empregando a análise direta de sólidos. As interferências espectrais, oriundas das amostras de xantanas, foram adequadamente eliminadas usando NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como modificador químico. Deste modo, a amostragem direta de sólidos mostrou ser uma alternativa promissora quando se requer o uso de pequena quantidade de amostra com o mínimo de preparo. Além disso, cabe destacar que o método desenvolvido mostrou ser rápido e confiável uma vez que mostrou elevada exatidão e precisão. Os resultados dos teores de Pb nas amostras e insumos avaliados ficaram abaixo do estabelecido pela legislação vigente para xantana como aditivo alimentar.

### Agradecimentos

Os autores agradecem: aos órgãos de fomento CNPq e FAPERGS pelo incentivo à pesquisa e pelas bolsas concedidas; ao INCT de Energia e Ambiente, UFBA; Laboratório de Análises de Traços da UFRGS; Laboratório de Biopolímeros da UFPel.

### Referências

1. C. D. Borges; C. P. Bastos; C. T. Vendruscolo *Semina: Ciênc. Exat. Tecnol.* 2007, 28(2), 107.
2. B. Katzbauer. *Polym. Degrad. Stabil.* 1998, 59, 81.
3. C. T. Vendruscolo; S. A. Rodrigues; E. R. B. Pereira; C. R. Redies; J. L. Vendruscolo em Anais IFT – Annual Meeting and Food Expo, Orlando, 2006.
4. M. M. Luvielmo; A. R. P. Scamparini. *Estudos Tecnológicos*, 2009, 5(1), 50.
5. P. S. Diaz; C. T. Vendruscolo; J. L. Vendruscolo *Semina: Ciênc. Exat. Tecnol.*, 2004, 25(1), 15.
6. P. M. A. Klaic; A. M. Nunes; A. S. Moreira; C. L. Vendruscolo; A. S. Ribeiro *Carbohydr. Polym.* 2011, 83, 1895.
7. Brasil. Portaria SVS/MS nº. 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares- definições, classificação e emprego. Publicado no Diário Oficial da União, de 28 de outubro de 1997.

## 12° Congresso Brasileiro de Polímeros (12°CBPol)

8. G. A. Burdock. *Enciclopedia of food and colors additives*. v.3, Boca Raton, CRC Press, 1997.
9. FCC (2003) Xanthan gum. In *Food Chemicals Codex*. 5th Edition. National Academy Press, Washington, DC. p. 504-505.
10. K. Ridgway; S. P. D. Lalljie; R. T. Smith *J. Chrom. A* 2007, 1153, 36.
11. J. Sardans; F. Montes; J. Peñuelas *Spectrochim. Acta B* 2010, 65, 97.
12. A. Virgilio; J. A. Nóbrega; J. F. Rêgo; J. A. Gomes Neto *Spectrochim. Acta B*, 2012, 78, 58.
13. B. Welz; H. Becker-Ross; S. Florek; U. Heitmann in *High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*, Wiley-VCH, Weinheim, New York, 2005.
14. C. T. Vendruscolo; J. L. S. Vendruscolo; A. da S. Moreira. International Patent WO/2006/047845, 2005.