

Desenvolvimento de Metodologia Analítica para a Quantificação de Teor de Fosfato de Mistura de Estabilizantes para Sangue Animal por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Development of an Analytical Methodology for Quantification of Phosphate Content in Animal Blood Stabilizer Mixtures by Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Júlia L. Tavares, Jéssica A. R. Ambrosio, Janicy A. Carvalho, Andreza R. Simioni & Denilson N. Moraes

Desde a antiguidade utilizavam-se métodos visando à conservação de alimentos, como exposição solar, defumação e salga. Entretanto, não havia dados científicos sobre a decomposição de alimentos. Atualmente, os fosfatos são uma classe de conservante forte e amplamente utilizado em vários segmentos. Este trabalho apresenta uma nova metodologia para quantificação direta de P_2O_5 e NaCl de um produto comercial utilizado como estabilizante para sangue animal produzido por uma empresa da região do Vale do Paraíba (SP), utilizando espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) como tecnologia aplicada na análise. Os resultados do FTIR foram comparados estatisticamente com a análise realizada por titulação potenciométrica (como metodologia referência). Os testes estatísticos indicaram que o FTIR e a técnica de referência são equivalentes na obtenção da quantificação do teor destes conservantes possibilitando a substituição da titulação potenciométrica como forma de análise do material.

Palavras-chave: *titulação; potencimetria; espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).*

Since ancient times, methods have been used to preserve food, such as sun exposure, smoking and salting. However, there was no scientific data on the food decomposition. Currently, phosphates are a strong class of preservative and widely used in several segments. This work presents a new methodology for direct quantification of P_2O_5 and NaCl from a commercial product used as a stabilizer for animal blood produced by a company in the Vale do Paraíba (SP) region, using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) as technology applied in the analysis. The FTIR results were statistically compared with the analysis performed by potentiometric titration (as a reference methodology). The statistical tests indicated that the FTIR and the reference technique are equivalent in obtaining the quantification of the content of these preservatives, making it possible to replace the potentiometric titration as a way of analyzing the material.

Keywords: *titration; potentiometry; Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).*

Introdução

Os alimentos, mesmo os obtidos a partir de fontes naturais, apresentam um tempo de vida útil. Após certo período ocorre o processo de deterioração dos alimentos, devido a ação de microorganismos, contato com o ar, ação de enzimas, entre outros fatores, inviabilizando o seu consumo.¹

Na antiguidade eram utilizados como principais métodos de conservação de alimentos os processos de defumação e salga. Atualmente, com a evolução das pesquisas e das técnicas empregadas pela indústria de alimentos já existem novas técnicas, tais como: controle da umidade, fermentação, uso de irradiação, temperatura e adição de aditivos conservantes etc.^{1,2}

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) apresenta regulamentações específicas para os aditivos alimentares que são permitidos e quais as quantidades. Os fosfatos apresentam limite máximo permitido pela legislação brasileira em 0,5g/100g ou 0,5g/100mL.³

O estabilizante utilizado neste trabalho é um fosfato de grau alimentício fabricado por uma empresa da região do Vale do Paraíba (SP), projetado para ser estabilizante de sangue animal coletado no abate de frigoríficos e utilizado na produção de ração animal, atuando para evitar os processos de coagulação do sangue durante o transporte e estocagem. Sua estrutura é composta de cloreto de sódio (NaCl), pirofosfato ácido de sódio (SAPP) e tripolifosfato de sódio (STP).

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica de caracterização baseada na interação da luz com a matéria. Após a interação cada tipo de ligação química apresenta uma vibração característica, permitindo a diferenciação e a quantificação de componentes presentes nos materiais analisados.⁴

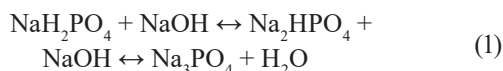
O objetivo do trabalho foi melhorar a análise do teor de fosfato (P_2O_5) no estabilizante comercial por espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), eliminando a necessidade de tratamento específico de efluentes contendo substâncias potencialmente tóxicas e proporcionar a substituição da titulação potenciométrica como forma de análise do material.

Materiais e Métodos

Para a realização da parte experimental do trabalho foram utilizados os seguintes solventes e reagentes: hidróxido de sódio 50% - Na(OH), ácido clorídrico P.A. 65% - HCl, ácido acético glacial P.A - CH_3COOH , nitrato de prata - $AgNO_3$, tripolifosfato de sódio - STP, pirofosfato ácido de sódio - SAPP, cloreto de sódio-NaCl e água desmineralizada.

ANÁLISE QUANTITATIVA DE P_2O_5 POR POTENCIOMETRIA

A metodologia utilizada para a quantificação de P_2O_5 foi baseada em Lutz (2005).⁵ O princípio da realização da análise é o processo de hidrólise do fosfato em ortofosfato, seguido da sua titulação potenciométrica e a liberação de um íon H^+ da molécula, conforme o descrito na Equação 1:



Inicialmente, é necessária a quantificação de P_2O_5 nas matérias primas, para se ter uma base para a curva de calibração. Pesou-se 0,5000 g de amostra contendo fosfato, adicionou-se 50mL de água desmineralizada e 10mL de HCl P.A para a digestão do grupo fosfato P_2O_7 , ou P_3O_{10} em sua forma mais simples, PO_4 . A solução passou pelos processos de agitação manual e aquecimento (durante 10 min após o ponto de ebulição). A solução foi resfriada em temperatura ambiente e avolumada para 100 mL com água desmineralizada. Em seguida, o pH da foi ajustado (faixa entre 1,50 e 1,80). A titulação foi realizada utilizando o titulador automático Titrino Plus 848 (Metrohm) com solução aquosa de NaOH (0,2 mol.L⁻¹). A titulação se completou ao detectar-se dois pontos de viragem. O resultado foi calculado a partir da Equação 2:

$$\%P_2O_5 = \frac{(V_2 - V_1)NaOH \cdot NNaOH \cdot EqP_2O_5}{Mamostra} \quad (2)$$

Onde: V_1 = volume do ponto de inflexão 1, V_2 = volume do ponto de inflexão 2, $NNaOH$ = normalidade real da solução de NaOH, $EqP_2O_5 = 1$ mL de NaOH - 0,20 mol.L⁻¹ = 7,0972mg de P_2O_5 e Mamostra corresponde a massa da amostra em gramas. O procedimento foi repetido em triplicata para o SAPP e o STP.

ANÁLISE QUANTITATIVA DE CLORETOS POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE PRECIPITAÇÃO

A metodologia utilizada para a quantificação de cloretos por titulação potenciométrica foi baseada em Lutz (2005).⁵ O método tem como base a precipitação do íon cloreto com nitrato de prata, conforme a Equação 3:



Para a realização da análise, inicialmente pesou-se 0,2 g do estabilizante de fosfato e adicionou-se 100 mL de água desmineralizada sob agitação, posteriormente adicionou-se 5 mL de ácido acético P.A. Utilizou-se o titulador automático Titrino Plus 848 (Metrohm) com solução aquosa de NaOH (0,2 mol.L⁻¹).

O resultado foi calculado a partir da Equação 4:

$$\% \text{NaCl} = \frac{V * \text{N}_{\text{AgNO}_3} * \text{Eq}_{\text{NaCl}}}{\text{Mamostra}} \quad (4)$$

Onde: v = volume do ponto de inflexão, N_{AgNO₃} = normalidade real da solução de AgNO₃, Eq_{NaCl} = 1 mL de AgNO₃ – 0,1 mol.L⁻¹ = 5,8450 mg de NaCl e Mamostra corresponde a massa da amostra em gramas.

ANÁLISE QUANTITATIVA DE P₂O₅ POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A metodologia de quantificação de P₂O₅ no em fosfatos alimentares foi desenvolvida e realizada no espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR Nicolet iS5 ATR ID7 da Thermo Scientific. Foram realizadas leituras na faixa de 4000-400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹, com a leitura de 16 scans.

PREPARO DAS AMOSTRAS DO ESTABILIZANTE DE FOSFATO PARA A REALIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

O estabilizante para sangue animal é composto por uma mistura de três produtos com granulometrias diferentes. O SAPP é um pó muito mais fino do que as outras duas matérias primas e por isso a análise direta pelo ATR seria prejudicada, sendo necessário incluir uma etapa de moagem que se não for bem executada, pode

acarretar erros analíticos. Dessa forma, optou-se por fazer a preparação da curva analítica em solução aquosa 10% em água desmineralizada.

Conforme estabelecido na especificação do produto, há uma faixa para a quantidade de cada componente, demonstrado na Tabela 1. A regra geral para a variação de cada matéria prima é de 25-50% no maior componente da mistura e de 50-100% nos componentes de menor quantidade.

Tabela 1. Composição permitida para a composição do estabilizante de fosfato.

| Matéria prima | Composição ideal | Limite mínimo | Limite máximo | Variação |
|---------------|------------------|---------------|---------------|----------|
| SAPP | 19% | 9,5% | 28,5% | 50% |
| STP | 29% | 14,5% | 43,5% | 50% |
| NaCl | 52% | 39% | 65% | 25% |

Os limites mínimo e máximo são colocados a uma distância suficiente para que o resultado esteja dentro da área delimitada e não distorça o espectro de forma que dificulte a calibração. Uma tabela de execução randômica (Tabela 2) contendo 26 pontos (dos quais 20 serão usados para calibração e 6 para validação) foi criada pelo software Minitab®.

A partir do valor obtido previamente por titulação é possível calcular o valor de P₂O₅ esperado para a amostra, a partir da Equação 5.

$$\% \text{P}_2\text{O}_5 = \frac{(\% \text{P1e} * \% \text{P1}) + (\% \text{P2e} * \% \text{P2})}{100} \quad (5)$$

Na qual: P1e é o valor calculado de %P₂O₅ do SAPP, P1 é o valor de %P₂O₅ obtido através de titulação potenciométrica do SAPP, P2e é o valor calculado de %P₂O₅ do STP e P2 é o valor de %P₂O₅ obtido através de titulação potenciométrica do STP.

As amostras para leitura foram preparadas da seguinte forma: pesaram-se as amostras, em seguida foram diluídas com 50mL de água desmineralizada. No equipamento, usou-se água desmineralizada como background, padronizando 4 gotas por leitura, obteve-se o espectro de todas as 26 amostras.

Tabela 2. Massa dos materiais utilizados na formulação das amostras para a curva de calibração.

| SAPP (g) | STP (g) | NaCl (g) | SOMA (g) |
|----------|---------|----------|----------|
| 1,2250 | 0,7250 | 3,0500 | 5,0 |
| 1,0250 | 0,7250 | 3,2500 | 5,0 |
| 1,4250 | 1,1750 | 2,4000 | 5,0 |
| 0,4750 | 1,7250 | 2,8000 | 5,0 |
| 0,7150 | 1,3650 | 2,9200 | 5,0 |
| 1,4250 | 0,7250 | 2,8500 | 5,0 |
| 0,8750 | 2,1750 | 1,9500 | 5,0 |
| 0,7150 | 1,8150 | 2,4700 | 5,0 |
| 0,9150 | 1,8150 | 2,2700 | 5,0 |
| 0,9900 | 1,0900 | 2,9200 | 5,0 |
| 1,4250 | 1,6250 | 1,9500 | 5,0 |
| 0,7500 | 1,0000 | 3,2500 | 5,0 |
| 1,1500 | 1,9000 | 1,9500 | 5,0 |
| 0,4750 | 2,1750 | 2,3500 | 5,0 |
| 0,9500 | 1,4500 | 2,6000 | 5,0 |
| 0,6750 | 2,1750 | 2,1500 | 5,0 |
| 1,1900 | 1,0900 | 2,7200 | 5,0 |
| 1,1900 | 1,5400 | 2,2700 | 5,0 |
| 0,4750 | 1,2750 | 3,2500 | 5,0 |
| 0,9500 | 1,4500 | 2,6000 | 5,0 |
| 1,1800 | 1,3150 | 2,5050 | 5,0 |
| 1,4300 | 0,7650 | 2,8050 | 5,0 |
| 0,5550 | 2,0750 | 2,3700 | 5,0 |
| 1,1350 | 1,5050 | 2,3600 | 5,0 |
| 1,1450 | 0,9350 | 2,9200 | 5,0 |
| 1,0000 | 1,6650 | 2,3350 | 5,0 |

Com o *software TQ Analyst* montou-se a curva de calibração. O primeiro passo foi adicionar à tabela do *software* os componentes das amostras que se deseja obter os resultados em porcentagem e o P_2O_5 . Selecionaram-se todos os espectros obtidos das amostras de calibração e validação lidas anteriormente. Completou-se a tabela

selecionando as opções de calibração e validação para cada amostra e incluiu os valores calculados de cada componente que se deseja obter.

ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para a realização das medidas correspondentes ao estabilizante de fosfato foi utilizado o equipamento FTIR Nicolet iS5 ATR ID7 (Thermo Scientific). Foram realizadas leituras na faixa de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , com a leitura de 16 scans.

Resultados e Discussão

Na análise quantitativa de P_2O_5 por potenciometria (Figura 1) o ponto de inflexão foi detectado a partir da diferença potenciométrica, que ocorre quando um pico é gerado quando o analito e o titulado atingem um equilíbrio. A Tabela 3 contém os valores obtidos das análises em triplicata realizadas com o STP e o SAPP.

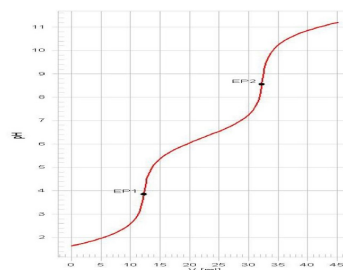


Figura 1. Ponto de viragem na titulação de teor de P_2O_5 por potenciometria.

Tabela 3. Resultados das análises de P_2O_5 das matérias-primas por titulação potenciométrica.

| Produto | Amostra | Massa | Volume | Resultado | Média |
|---------|---------|--------|---------|-----------|--------|
| STP | 1 | 0,5027 | 20,1963 | 57,46% | 57,51% |
| | 2 | 0,5060 | 20,2820 | 57,71% | |
| | 3 | 0,5046 | 20,1578 | 57,36% | |
| SAPP | 1 | 0,5030 | 22,4540 | 64,09% | 64,02% |
| | 2 | 0,5009 | 22,3237 | 63,99% | |
| | 3 | 0,5003 | 22,2987 | 63,99% | |

Já na análise do teor de cloretos, a titulação se completou ao detectar o ponto de viragem que é aproximadamente a 100mV (Figura 2).

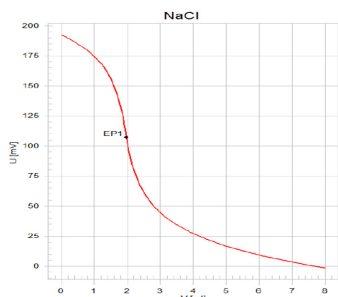


Figura 2. Ponto de viragem na titulação potenciométrica de teor de cloretos.

No espectro é possível observar uma banda em $886,97\text{cm}^{-1}$ correspondente à vibração do grupo fosfato (P-O-P) e outra banda em $1141,13\text{cm}^{-1}$ que corresponde à vibração P=O.⁶

Para verificar se o método sugerido era realmente eficaz, foram realizadas análises para garantir que os resultados fossem comparáveis (Tabela 4). Usando titulação potenciométrica, examinou-se 6 lotes distintos do teor de P_2O_5 e NaCl do estabilizante de fosfato em triplicata.

Tabela 4. Resultados de P_2O_5 e NaCl obtidos por titulação e por FTIR.

| Lote | P_2O_5 (FTIR) | P_2O_5 (titulação) | NaCl (FTIR) | NaCl (titulação) |
|-----------|-------------------------------|------------------------------------|----------------------|---------------------------|
| B3210415A | 27,86% | 28,63% | 53,68% | 51,32% |
| B3210416A | 29,38% | 28,94% | 51,05% | 52,15% |
| B3210416B | 27,31% | 28,85% | 54,71% | 53,01% |
| B3210420A | 28,28% | 28,25% | 53,01% | 52,84% |
| B3210818A | 28,68% | 28,77% | 52,21% | 52,89% |
| B3210818B | 28,56% | 29,00% | 52,50% | 49,60% |

A análise de teor de NaCl foi realizada para 6 lotes diferentes do estabilizante de fosfato obteve-se o resultado expresso na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados das análises de teor de NaCl .

| Produto | Resultado |
|---|---------------|
| SAPP | 63,0% - 64,0% |
| STP | 56,0% - 58,0% |
| Estabilizante de fosfato | 26,5% - 29,0% |
| NaCl do estabilizante de fosfato | < 54,0% |

Por meio da titulação potenciométrica, pode-se observar que os resultados das análises de P_2O_5 e NaCl variam. Além dos erros analíticos dos equipamentos e analistas, a variação de pesagem e o fator real das soluções contribuem para isso. Existe uma faixa de resultado aceitável devido a esses erros e variações na composição do produto, conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Faixa de resultados aceitáveis para os produtos.

| Lote | NaCl titulação | Massa | Volume |
|-----------|-------------------------|--------|---------|
| B3210415A | 54,56% | 0,2004 | 17,7283 |
| B3210416A | 50,60% | 0,2003 | 16,4715 |
| B3210416B | 51,57% | 0,2001 | 16,7674 |
| B3210420A | 62,32% | 0,2000 | 20,2555 |
| B3210818A | 51,86% | 0,2000 | 16,8652 |
| B3210818B | 51,61% | 0,2001 | 16,7855 |

O *software* montou a curva de calibração detectando as bandas do espectro e calculando suas variações de acordo com as amostras e os valores calculados. Montaram-se as curvas de calibração de acordo com a Figura 4.

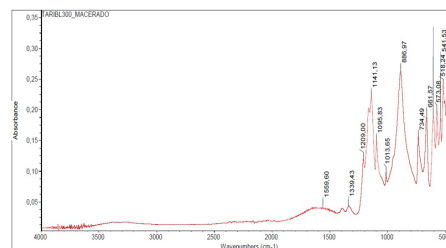


Figura 3. Espectro do estabilizante de fosfato.

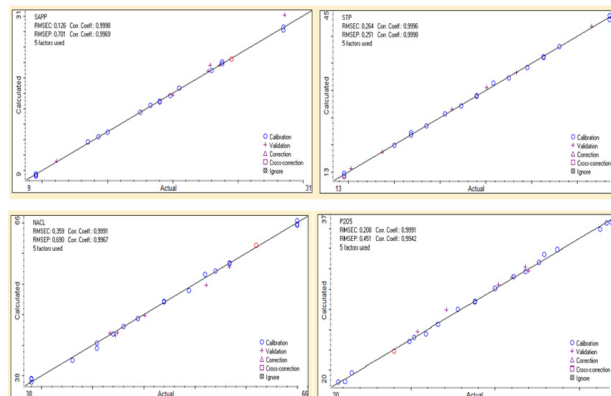


Figura 4. Curvas de calibração

Observa-se que entre os pontos de calibração e validação, não houve ponto a ser ignorado por estarem muito distantes da reta. A calibração com PLS foi extremamente eficaz, visto que os valores de R² foram próximos de 1. O cálculo da reta R² pode ser expresso pela Equação 6:

$$R^2 = \text{SQt} - \text{SQres} / \text{SQt} \quad (6)$$

Onde: SQt corresponde a soma dos quadrados totais e SQres corresponde soma dos quadrados dos resíduos. Os valores dos resíduos (pontos distantes da reta) foram quase 0, tendo os pontos muito próximos à reta proposta.

VERIFICAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para determinar se o método sugerido era eficaz e viável para uso em laboratório. A análise é necessária porque, embora as diferenças nas medianas dos grupos possam ser atribuídas a um erro de amostragem, em vez do efeito da variável independente sobre a variável dependente, isso ainda é possível. Se o erro de amostragem for a causa das diferenças entre os grupos, elas não são significativas.

| Anova: Single Factor | | | | | | |
|----------------------|---------------------------|--------------|------------|----------------|-----------------|------------------------------|
| SUMMARY | | | | | | |
| | <i>Groups</i> | <i>Count</i> | <i>Sum</i> | <i>Average</i> | <i>Variance</i> | |
| | P2O5 (FTIR) | 6 | 1,7007 | 0,28345 | 5,08E-05 | |
| | P2O5 (titulação) | 6 | 1,7244 | 0,2874 | 7,46E-06 | |
| ANOVA | | | | | | |
| | <i>Source of Variator</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-value</i> <i>F crit</i> |
| | Between Groups | 4,68075E-05 | 1 | 4,681E-05 | 1,606766 | 0,2336673 4,964603 |
| | Within Groups | 0,000291315 | 10 | 2,913E-05 | | |
| | Total | 0,000338122 | 11 | | | |

Figura 5. ANOVA dos resultados das análises de quantificação de P₂O₅.

| Anova: Single Factor | | | | | | |
|----------------------|---------------------------|--------------|------------|----------------|-----------------|------------------------------|
| SUMMARY | | | | | | |
| | <i>Groups</i> | <i>Count</i> | <i>Sum</i> | <i>Average</i> | <i>Variance</i> | |
| | NaCl (FTIR) | 6 | 3,1716 | 0,5286 | 0,000159 | |
| | NaCl (titulação) | 6 | 3,1181 | 0,5196833 | 0,000175 | |
| | | 0 | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | |
| ANOVA | | | | | | |
| | <i>Source of Variator</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-value</i> <i>F crit</i> |
| | Between Groups | 0,000238521 | 2 | 0,0001193 | 0,642633 | 0,5484303 4,256495 |
| | Within Groups | 0,001670228 | 9 | 0,0001856 | | |
| | Total | 0,001908749 | 11 | | | |

Figura 6. ANOVA dos resultados das análises de quantificação de NaCl.

Conclusão

O trabalho desenvolvido demonstrou eficácia e viabilidade ao otimizar a análise de P₂O₅ por infravermelho com transformada de Fourier – FTIR, reduzindo tempo e consumo de reagentes. A aplicação de princípios da Química Verde minimizou o descarte de substâncias tóxicas e a necessidade de tratamento de efluentes. Utilizou-se equipamento acessível, de baixa manutenção, com preparo simples de amostras e leitura facilitada por ATR. Os resultados evidenciam avanços na gestão da qualidade, na eficiência dos processos laboratoriais e no alinhamento com normas ambientais e econômicas.

Agradecimentos

Os autores do trabalho agradecem a empresa ICL BRASIL LTDA pela contribuição na pesquisa e desenvolvimento na formulação do estabilizante de fosfato utilizado no trabalho.

Referências

- LEONARDI, J.G; AZEVEDO, B.M. Revista Saúde em Foco. **2018**, 10.
- PINTO, S.M; MOREIRA, I.S. Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management. **2018**, 14, 2.
- ANVISA (Brasil). Biblioteca Virtual em Saúde (org.). RESOLUÇÃO Nº 64, DE 16 DE SETEMBRO DE **2008**: aprova regulamento técnico sobre atribuição de aditivos e seus limites máximos para alimentos. Aprova Regulamento Técnico sobre Atribuição de aditivos e seus limites máximos para alimentos. 2008. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0064_16_09_2008.html.
- BUREAU, S; COZZOLINO, D; CLARK, C.J. Postharvest Biology and Technology. **2019**, 148, 14.
- LUTZ, Instituto Adolfo. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1000 p.
- THIPPERUDRA, A; MANJUNATHA, S; PUSHPALATHA, H.L; KUMAR, M.P. J. Phys.: Conf. Ser. **2021**, 1921, 012110.

Júlia L. Tavares, Jéssica A. R. Ambrosio, Janicy A. Carvalho, Andreza R. Simioni & Denilson N. Moraes*

Laboratório de Sistemas Micro e Nanoparticulados, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

*E-mail: dnmoraes@univap.br