

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS, DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIAS DE ALIMENTOS.

MODIFICAÇÕES E AVALIAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO
DE ANTIOXIDANTES EM ALIMENTOS

VALERIA PAULA RODRIGUES MINIM
ENGENHEIRA DE ALIMENTOS

PROFA. DRA. HELOISA MASCIA CECCHI

ORIENTADORA

Parecer

Este exemplar corresponde a versão final da
tese desenvolvida por Valéria Paula Rodrigues Minim
e aprovada pela Comissão Julgadora em 28.02.91.
Campinas, 21 de fevereiro de 1991.

BANCA EXAMINADORA

Heloisa M. Cecchi

Profa. Dra. Heloisa Máscia Cecchi

(Presidente)

Lireny Aparecida Quando Gonçalves

Profa. Dra. Lireny Ap. G. Gonçalves

(Membro)

Lucia Valente Soares

Profa. Dra. Lúcia Maria Valente Soares

(Membro)

Suplente

Profa. Dra. Maria Cecília de F. Toledo

(Membro)

Campinas 18 de fevereiro de 1991.

Aos meus pais.

Ao Luis, pelo amor e
inspiração.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Heloisa Máscia Cecchi, pela orientação desta tese e pela amizade.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Lireny Ap. G. Gonçalves, Profa. Dra. Lúcia Maria Valente e Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo, pelas sugestões apresentadas na redação final da tese.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão de auxílio à pesquisa, que tornou possível a realização deste projeto. Ao CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

A minha família, sempre perto do coração, me apoiando e incentivando sem restrições.

Ao pessoal do Laboratório de Análise de Alimentos, pela força, amizade e boa convivência.

Ao pessoal do Laboratório de Toxicologia, pelo apoio de uma maneira geral.

A ABIA, Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, pelas cópias do trabalho.

ÍNDICE

Página

ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. ADITIVOS - CONSIDERAÇÕES GERAIS, LEGISLAÇÃO E SEGURANÇA.....	4
2.2. ANTIOXIDANTES.....	8
2.2.1. GALATO DE PROPILA (PG).....	10
2.2.1.1. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS.....	13
2.2.2. BUTIL HIDROXIANISOL (BHA).....	14
2.2.2.1. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS.....	15
2.2.3. BUTIL HIDROXITOLUENO (BHT).....	16
2.2.3.1. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS.....	16
2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANTIOXIDANTES.....	18
2.3.1. EXTRAÇÃO.....	18
2.3.2. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (UV).....	21

2.3.3. MÉTODOS COLORIMÉTRICOS.....	24
2.3.4. MÉTODOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.	36
3.1. AMOSTRAGEM.....	36
3.2. SOLVENTES E REAGENTES.....	37
3.3. EXTRAÇÃO.....	37
3.3.1. PROCEDIMENTO 1.....	37
3.3.2. PROCEDIMENTO 2.....	38
3.3.3. PROCEDIMENTO 3.....	38
3.4. SEPARAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES E INTERFERENTES.....	39
3.4.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (UV).....	39
3.4.2. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO VISÍVEL (COLORIMETRIA).....	39
3.4.3. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA / ABSORÇÃO NAS REGIÕES ULTRAVIOLETA E VISÍVEL (CCD-UV E CCD-COLORIMETRIA).....	40
3.5. IDENTIFICAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES.....	42
3.5.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (UV).....	42
3.5.2. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO VISÍVEL (COLORIMETRIA).....	42

3.5.2.1. REAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA O GALATO DE PROPILA.....	44
3.5.2.2. REAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA O BUTIL HIDROXIANISOL.....	44
3.5.2.3. REAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA O BUTIL HIDROXITOLUENO.....	44
3.5.3. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA / ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (CCD-UV).....	45
3.5.4. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA / ABSORÇÃO NA REGIÃO VISÍVEL (CCD-COLORIMETRIA).....	46
3.5.5. CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE.....	47
3.5.5.1. REVELAÇÃO 1: CLORETO FÉRRICO - 2,2' BIPYRIDINA.....	47
3.5.5.2. REVELAÇÃO 2: REAGENTE DE GIBB.....	47
3.5.5.3. REVELAÇÃO 3: ÁCIDO FOSFOMOLÍBDICO.....	48
3.6. QUANTIFICAÇÃO.....	48
3.6.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (UV).....	48
3.6.2. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO VISÍVEL (COLORIMETRIA).....	49
3.6.3. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA / ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (CCD-UV).....	49
3.5.4. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA / ABSORÇÃO NA REGIÃO VISÍVEL (CCD-COLORIMETRIA).....	49

3.7. ESTUDO DE RECUPERAÇÃO.....	50
3.8. AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA EM AMOSTRA ISENTA DE ANTIOXIDANTES.....	50
3.9. DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE MÍNIMA DETECTÁVEL DOS ANTIOXIDANTES.....	51
3.10. AVALIAÇÃO DE TEMPO E CUSTO DOS QUATRO MÉTODOS DE ANÁLISE.....	51
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1. PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS.....	53
4.1.1. EXTRAÇÃO.....	53
4.1.2. SEPARAÇÃO.....	54
4.1.3. IDENTIFICAÇÃO.....	63
4.1.3.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (UV).....	63
4.1.3.2. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO VISÍVEL (COLORIMETRIA).....	66
4.1.3.3. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA / ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (CCD-UV).....	68
4.1.3.4. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA / ABSORÇÃO NA REGIÃO VISÍVEL (CCD-COLORIMETRIA).....	70

4.1.4. CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE.....	70
4.1.5. QUANTIFICAÇÃO.....	71
4.1.6. ESTUDO DE RECUPERAÇÃO.....	76
4.1.7. LIMITE DE DETECÇÃO.....	77
4.2. COMPARAÇÃO DOS QUATRO MÉTODOS.....	80
4.2.1. ANÁLISE DA BANHA APÓS ADIÇÃO DE GALATO DE PROPILA.....	80
4.2.2. ANÁLISE DA BANHA APÓS ADIÇÃO DE BUTIL HIDROXIANISOL.....	83
4.2.3. ANÁLISE DA BANHA APÓS ADIÇÃO DE BUTIL HIDROXITOLUENO.....	86
4.2.4. ANÁLISE DA BANHA APÓS ADIÇÃO DOS TRÊS ANTIOXIDANTES.....	86
4.3. CUSTO E TEMPO.....	91
5. CONCLUSÕES.....	93
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
ANEXO A.....	110

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
1. SOLUBILIDADE DO PG, BHA E BHT EM DIFERENTES SOLVENTES.....	12
2. DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA.....	22
3. MÉTODOS COLORIMÉTRICOS PARA ANTIOXIDANTES.....	25
4. DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA.....	32
5. VALORES DE R _f PARA O PG, BHA E BHT EM VÁRIOS SOLVENTES.....	56
6. PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DO BHA EM GORDURA VEGETAL HIDROGENADA, ANALISADO PELO MÉTODO UV, APÓS ADIÇÃO DE 25 % E 50% DO TEOR ENCONTRADO NA AMOSTRA (177,3 ppm).....	77
7. MÍNIMO DETECTÁVEL DOS ANTIOXIDANTES.....	78
8. RESULTADOS DA ANÁLISE EM TRIPLICATA DO GALATO DE PROPILA ADICIONADO NUMA RAZÃO DE 100 mg / kg DE BANHA (100 ppm), OBTIDOS PELOS QUATRO MÉTODOS.....	81
9. RESULTADOS DA ANÁLISE EM TRIPLICATA DE BHA ADICIONADO NUMA RAZÃO DE 100 mg / kg DE BANHA (100 ppm),OBTIDOS PELOS QUATRO MÉTODOS.....	84
10. RESULTADOS DA ANÁLISE EM TRIPLICATA DE BHA ADICIONADO NUMA RAZÃO DE 100 mg / kg DE BANHA (100 ppm),OBTIDOS PELOS QUATRO MÉTODOS.....	87

11. RESULTADOS DA ANÁLISE EM TRIPLICATA DE PG, BHA E BHT ADICIONADOS NUMA RAZÃO DE 100 mg / kg DE BANHA (100 ppm), OBTIDOS PELOS TRÊS MÉTODOS.....	90
12. CUSTO E TEMPO DAS ANÁLISES PELOS QUATRO MÉTODOS.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

1. ESTRUTURAS DOS ANTIOXIDANTES.....	11
2. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO UV DOS PADRÕES DOS ANTIOXIDANTES...	43
3. REPRODUÇÃO DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA REVELADA POR RADIAÇÃO UV A 254 nm (SÍLICA-GEL FLUORESCENTE GF 254 DESENVOLVIDA EM HEXANO / ACETONA / ACIDO ACÉTICO (70:20:10)) NOS SEGUINTE PRODUTOS: 1. PG, 2. BHA, 3. BHT, 4. MISTURA DOS TRÊS ANTIOXIDANTES, 5.ÓLEO DE MILHO MAIS MISTURA DOS TRÊS ANTIOXIDANTES.....	58
4. REPRODUÇÃO DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA REVELADA POR RADIAÇÃO UV A 254 nm (SÍLICA-GEL FLUORESCENTE GF 254 DESENVOLVIDA EM HEXANO / ACETONA / ACIDO ACÉTICO (70:20:10)) NOS SEGUINTE PRODUTOS: 1. MISTURA DOS TRÊS ANTIOXIDANTES, 2. GORDURA VEGETAL HIDROGENADA, 3. MARGARINA, 4. SOPA, 5. CALDO DE GALINHA, 6. CALDO DE CARNE, 7. MISTURA PARA PATÊ.....	59
5. REPRODUÇÃO DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA REVELADA POR RADIAÇÃO UV A 254 nm (SÍLICA-GEL FLUORESCENTE GF 254 DESENVOLVIDA EM ÉTER DE PETRÓLEO / ÉTER ETÍLICO / ACIDO ACÉTICO (80:10:10) NOS SEGUINTE PRODUTOS: 1. PG, 2. BHA, 3. BHT, 4. MISTURA DOS TRÊS ANTIOXIDANTES, 5.ÓLEO DE MILHO MAIS MISTURA DOS TRÊS ANTIOXIDANTES, 6. BANHA MAIS OS TRÊS ANTIOXIDANTES.....	61

6. REPRODUÇÃO DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA REVELADA POR RADIAÇÃO UV A 254 nm (SÍLICA-GEL FLUORESCENTE GF 254 DESENVOLVIDA EM ÉTER DE PETRÓLEO / ÉTER ETÍLICO / ÁCIDO ACÉTICO (80:10:10) NOS SEGUINTE PRODUTOS: 1. MISTURA DOS TRÊS ANTIOXIDANTES, 2. GORDURA VEGETAL HIDROGENADA (PRIMEIRA AMOSTRA), 3. GORDURA VEGETAL HIDROGENADA (AMOSTRAS POSTERIORES), 4. MARGARINA, 5. SOPA, 6. CALDO DE GALINHA, 7. CALDO DE CARNE, 8. MISTURA PARA PATÊ.....	62
7. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV DO EXTRATO OBTIDO A PARTIR DA GORDURA VEGETAL HIDROGENADA E DO PADRÃO (BHA).....	64
8. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO UV DO EXTRATO OBTIDO A PARTIR DA MARGARINA.....	65
9. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DOS OUTROS PRODUTOS.....	67
10. ESPECTROS DE ABSORÇÃO CCD-UV DO EXTRATO OBTIDO A PARTIR DA GORDURA VEGETAL HIDROGENADA E DO PADRÃO (BHA).....	69
11. REPRODUÇÃO DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (DESENVOLVIDA EM ÉTER DE PETRÓLEO / ÉTER ETÍLICO / ÁCIDO ACÉTICO (80:10:10))REVELADA COM CLORETO FÉRRICO - 2,2' BIPYRIDINA NOS SEGUINTE PRODUTOS: 1. PG, 2. BHA, 3. BHT, 4. MISTURA DOS TRÊS ANTIOXIDANTES, 5. ÓLEO DE MILHO (MAIS OS TRÊS ANTIOXIDANTES), 6. BANHA (MAIS OS TRÊS ANTIOXIDANTES).....	72

12. REPRODUÇÃO DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA
(DESENVOLVIDA EM ÉTER DE PETRÓLEO / ÉTER ETÍLICO / ÁCIDO
ACÉTICO (80:10:10)) REVELADA COM CLORETO FÉRRICO - 2,2'
BIPIRIDINA NOS SEGUINTE PRODUTOS: 1. MISTURA DOS TRÊS
ANTIOXIDANTES, 2. GORDURA VEGETAL HIDROGENADA (PRIMEIRA
AMOSTRA), 3. GORDURA VEGETAL HIDROGENADA (AMOSTRAS
POSTERIORES), 4. MARGARINA, 5. SOPA, 6. CALDO DE GALINHA,
7. CALDO DE CARNE, 8. MISTURA PARA PATÊ..... 73
13. REPRODUÇÃO DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA
(DESENVOLVIDA EM ÉTER DE PETRÓLEO / ÉTER ETÍLICO / ÁCIDO
ACÉTICO (80:10:10)) REVELADA COM REAGENTE DE GIBB NOS
SEGUINTE PRODUTOS: 1. PG, 2. BHA, 3. BHT, 4. MISTURA
DOS TRÊS ANTIOXIDANTES, 5. ÓLEO DE MILHO (MAIS OS TRÊS
ANTIOXIDANTES), 6. BANHA (MAIS OS TRÊS ANTIOXIDANTES)..... 74
14. REPRODUÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA
(DESENVOLVIDA EM ÉTER DE PETRÓLEO / ÉTER ETÍLICO / ÁCIDO
ACÉTICO (80:10:10)) REVELADA COM REAGENTE DE GIBB NOS
SEGUINTE PRODUTOS: 1. MISTURA DOS TRÊS ANTIOXIDANTES, 2.
GORDURA VEGETAL HIDROGENADA (PRIMEIRA AMOSTRA), 3.
GORDURA VEGETAL HIDROGENADA (AMOSTRAS POSTERIORES), 4.
MARGARINA, 5. SOPA, 6. CALDO DE GALINHA, 7. CALDO DE
CARNE, 8. MISTURA PARA PATÊ..... 75

15. ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO EXTRATO OBTIDO A PARTIR DA BANHA (PG).....	82
16. ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO EXTRATO OBTIDO A PARTIR DA BANHA (BHA).....	85
17. ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO EXTRATO OBTIDO A PARTIR DA BANHA (BHT).....	88
18. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV DO EXTRATO OBTIDO A PARTIR DA BANHA APÓS ADIÇÃO DOS TRÊS ANTIOXIDANTES.....	89

RESUMO

O controle dos aditivos nos alimentos processados deve ser abordado tanto em relação aos níveis máximos permitidos como aos níveis mínimos necessários para exercerem a sua função. Para que este controle seja efetivamente colocado em funcionamento, é necessário a disponibilidade de métodos analíticos simples, rápidos, econômicos e ao mesmo tempo exatos e precisos.

Neste trabalho foram comparados quatro métodos de análise: (1) utilizando absorção de radiação ultravioleta (UV), (2) cromatografia em camada delgada / absorção na região ultravioleta (CCD-UV), (3) absorção na região visível (Colorimetria) e (4) cromatografia em camada delgada / absorção na região visível (CCD-Colorimetria). Os métodos foram inicialmente testados, e a seguir modificados e padronizados.

Foram analisados seis produtos: gordura vegetal hidrogenada, margarina, sopa, mistura para patês, caldo de carne e caldo de galinha. Foi detectada a presença de antioxidante somente na primeira amostra da gordura vegetal hidrogenada, apesar de constarem nos rótulos destes produtos o código de pelo menos um dos antioxidantes em estudo.

Os resultados demonstraram que a escolha do método depende da natureza da amostra. O método UV não é apropriado para

produtos contendo mais de um antioxdante e/ou substâncias interferentes. Para estes produtos, os métodos CCD-UV e CCD-Colorimetria são mais adequados; o método colorimétrico também pode ser utilizado dependendo das substâncias interferentes existentes e da especificidade do reagente colorimétrico. O método por colorimetria tem ainda as vantagens de ser mais rápido e econômico que os métodos que utilizam a separação em camada delgada.

SUMMARY

The control of the additives in processed foods should be approached both in terms of the maximum levels permitted as well as the minimum amounts necessary to accomplish their functions. Analytical methods which are simple, rapid and low cost but also precise and accurate should be available in order to effectively implement this control.

In this study, four methods of analysis was compared, utilizing (1) absorption in the ultraviolet region (UV), (2) thin-layer chromatography / absorption in the ultraviolet (TLC-UV), (3) absorption in the visible region (Colorimetry) and (4) thin-layer chromatography / absorption in the visible region (TLC-Colorimetry). The methods were first tested, then modified and standardized.

Six products were analysed: fat hydrogenated, soup, margarine, dehydrated pâté, meat and chicken broth. Only the first fat hydrogenated sample was detected the presence of antioxidants, although they have been labelled on to the package.

The results indicated that the choice of methods will depend on the nature of the samples. The UV methods are not appropriate for products containing two or more antioxidants and/or interferences substances. For such products, the TLC-UV and

TLC-Colorimetry methods are more adequate; the Colorimetric method can also be used, depending on the existent interfering substances and the colorimetric reagent specificity. Moreover, the colorimetric method is more economical and fast than methods utilizing thin layer chromatography.

1. INTRODUÇÃO

Antioxidantes são usados em alimentos processados para prevenir uma variedade de mudanças indesejáveis causadas pela oxidação. Tal fenômeno inclui rancidez de gorduras, óleos e alimentos contendo gordura, descoloração de produtos cárnicos, escurecimento enzimático em frutas, vegetais e seus produtos, por exemplo, sucos cítricos.

A grande preocupação em relação ao uso de antioxidantes e outros aditivos se deve a possíveis efeitos tóxicos que possam estar associados a estes compostos. Portanto, análises devem ser feitas para garantir que as quantidades nos alimentos estejam dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira. No entanto, é igualmente necessário verificar se a adição em níveis baixos é suficiente para que o antioxidante exerça as suas funções. Também é de grande importância verificar se a ausência dos antioxidantes pode estar permitindo a oxidação e consequente formação de compostos tóxicos.

A fim de se agilizar esta fiscalização e controle de qualidade, é importante a disponibilidade de métodos analíticos simples, rápidos, exatos e também de baixo custo.

Esta pesquisa teve por objetivo o estudo e a comparação de métodos analíticos para determinação de antioxidantes. Os antioxidantes permitidos pela legislação brasileira são em número de dezesseis; porém, dos mais encontrados nos rótulos de nossos

produtos, o butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT) e o galato de propila (PG) são os mais tóxicos. Portanto, o estudo se concentrou apenas na determinação destes três antioxidantes.

Foram estudados e comparados quatro métodos: espectrofotometria de absorção na região ultravioleta (UV), espectrofotometria de absorção na região visível (Colorimetria), cromatografia em camada delgada / absorção na região ultravioleta (CCD-UV) e cromatografia em camada delgada / absorção na região visível (CCD-Colorimetria).

No método por espectrofotometria de absorção ultravioleta, os antioxidantes são quantificados diretamente sem nenhuma etapa de limpeza. É um método simples, rápido, mas que pode ter seus resultados prejudicados pela presença de interferentes na amostra ou mesmo pela mistura dos antioxidantes.

No método colorimétrico também não há nenhuma etapa de limpeza do extrato. Os antioxidantes são quantificados após reação química com reagentes específicos e lidos diretamente no espectrofotômetro. É um método simples e rápido, onde os resultados obtidos estão diretamente relacionados com a especificidade dos reagentes colorimétricos.

Os métodos que utilizam separação em camada delgada antes da determinação por espectrofotometria de absorção na região ultravioleta (CCD-UV) ou antes da determinação por espectrofotometria de absorção na região visível (CCD-Colorimetria), tem a vantagem da separação dos interferentes da matriz, além da separação entre os três antioxidantes. Mas,

existem as desvantagens de serem métodos demorados, trabalhosos e caros.

As avaliações compreenderam: estudo da extração dos antioxidantes dos alimentos, separação entre os mesmos e interferentes provenientes da amostra, identificação e quantificação. Adicionalmente, vários alimentos processados foram analisados, englobando produtos lipídicos, produtos desidratados e caldos cárnicos concentrados.

Espera-se que os resultados auxiliem os órgãos governamentais de vigilância sanitária, na exigência de uma fiscalização, e à indústria, no controle rotineiro dos antioxidantes em alimentos, a fim de se chegar a uma maior proteção ao consumidor.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1. ADITIVOS - CONSIDERAÇÕES GERAIS, LEGISLAÇÃO E SEGURANÇA

O Codex Alimentarius define aditivos para alimentos como: "Toda substância não consumida como um alimento e não utilizada como um ingrediente típico do alimento, tendo ou não valor nutritivo, cuja adição ao alimento é intencional e com uma finalidade tecnológica na fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, transporte e estocagem do alimento, resultando na sua incorporação ou de seus derivados ou apenas afetando as características do produto. Não estando incluídas as substâncias denominadas contaminantes ou as que são adicionadas para manter ou melhorar as qualidades nutritivas."

Segundo o Decreto Lei nº 986 de 21/10/69, da legislação brasileira que instituiu as "Normas Básicas sobre Alimentos"; aditivo intencional é "toda substância ou mistura de substâncias, dotadas, ou não de valor nutritivo, ajuntada ao alimento com finalidade de impedir as alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor e sabor, modificar ou manter seu estado físico geral ou exercer qualquer ação exigida para uma boa tecnologia de fabricação do mesmo".

No Brasil, os aditivos permitidos para fins alimentícios estão relacionados na Tabela I, anexa ao Decreto nº 55.871 de 26/03/65. Contudo, esta Tabela original tem sofrido

diversas alterações, inclusões e exclusões, que foram regulamentadas por Resoluções da CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos), CTA (Camára Técnica de Alimentos) e portarias da DINAL (Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos).

O Codex Alimentarius estabeleceu princípios gerais para o uso de aditivos em alimentos, de acordo com o apresentado a seguir:

" O uso de aditivo em alimentos se justifica somente quando ele serve para um ou mais propósitos relacionados e somente quando esses propósitos não podem ser conseguidos por meios que sejam econômica e tecnologicamente praticáveis e desde que não apresente perigo à saúde do consumidor:

- a) Para preservar a qualidade nutricional do alimento;
- b) Para prover ingredientes necessários ou constituintes para fabricação de alimentos para grupos de consumidores com necessidades dietéticas especiais;
- c) Para melhorar a qualidade de conservação ou estabilidade de um alimento ou para melhorar suas propriedades organolépticas, desde que isso não altere a natureza da substância ou a qualidade do alimento, com a intenção de enganar o consumidor;
- d) Para ajudar a manufatura, o processamento, a preparação, o tratamento, a embalagem, o transporte, ou armazenamento do alimento, desde que o aditivo não se preste a disfarçar matérias-primas inadequadas ou técnicas indesejáveis, durante o exercício dessas atividades".

Do mesmo modo, a legislação brasileira através do Decreto-lei nº 986/69 dá as diretrizes para a permissão do uso de aditivos, bem como as proibições do seu uso quando ferir um dos itens mencionados:

"Será permitido o uso de aditivo quando:

- a) Seja indispensável à adequada tecnologia de fabricação;
- b) Tenha sido previamente registrado no órgão competente do Ministério da Saúde;
- c) Seja empregado na quantidade estritamente necessária do efeito desejado.

É proibido o uso de aditivos em alimentos quando:

- a) Houver evidência ou suspeita de que o mesmo possui toxicidade potencial;
- b) Interferir sensível e desfavoravelmente no valor nutritivo do alimento;
- c) Servir para encobrir falhas no processamento e nas técnicas de manipulação;
- d) Encobrir alteração ou adulteração na matéria-prima ou do produto já acabado;
- e) Induzir o consumidor a erro, engano ou confusão;
- f) Não satisfazer às exigências do presente decreto."

Segundo o Decreto-Lei número 63.526 de 04/11/68, da legislação brasileira: "Será autorizado o emprego, no mesmo alimento, de mais de um aditivo da mesma classe, desde que a soma dos aditivos empregados não ultrapassem o limite máximo de tolerância fixado para aquele permitido em maior teor, e a

quantidade de cada um, isoladamente, não ultrapasse o seu próprio limite de tolerância".

A toxicidade dos aditivos é um assunto que está atualmente em bastante evidência, quando se fala em defesa do consumidor. Os aditivos são avaliados periodicamente pelo JECFA (Joint-FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) que, após interpretação de resultados de ensaios toxicológicos disponíveis, estabelece para cada aditivo a quantidade aceitável de ingestão diária, denominada IDA, expressa em mg / Kg de peso corpóreo.

É importante lembrar que algumas substâncias naturalmente presentes nos alimentos já tem seus efeitos tóxicos bem estabelecidos a níveis mais altos, bem acima dos teores presentes nos alimentos. Exemplos de substâncias reconhecidamente cancerígenas encontradas naturalmente em alimentos incluem a hidrazina (cogumelos), isotiocianato (brócolis e repolho), alcalóides pirrolizidínicos (chá de ervas), taninos (plantas em geral) e benzopireno (churrasco). As substâncias tóxicas estão tão espalhadas pelos alimentos de um modo geral que o Dr. Ames, o famoso criador do teste de mutagenicidade, afirma que "nenhum tipo de alimentação humana está inteiramente livre de substâncias mutagênicas e cancerígenas" (Summit, 1986).

Pode-se até afirmar que se os mesmos princípios adotados para avaliação toxicológica de aditivos fossem empregados para avaliar alguns alimentos "in natura", um grande número deles não passaria nos testes (Council for Agricultural Science and Technology, 1981).

2.2. ANTIOXIDANTES

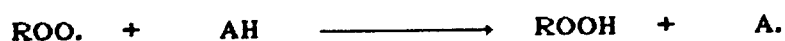
De acordo com o Decreto-Lei número 55.871 de 26/03/1965, antioxidante é a "substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa nos alimentos".

Os antioxidantes permitidos pela legislação brasileira são em número de dezesseis e estão listados no anexo A, juntamente com seus códigos de rotulagem, alimentos em que podem ser adicionados e os seus respectivos limites máximos.

Um dos fatores que provocam alterações durante processamento, distribuição e armazenamento dos alimentos é a oxidação. Oxidação de lipídeos causa várias mudanças nos alimentos, as quais influem na qualidade dos mesmos. Por exemplo, a qualidade nutricional pode ser diminuída pela perda de vitaminas, ácidos graxos e aminoácidos essenciais, enquanto que vários compostos de degradação associados com a oxidação de lipídeos podem ter toxicidade aguda ou até mutagênica, ou agirem como promotores. Em adição, o efeito nos compostos responsáveis pelo "flavour" podem causar uma mudança de característica positiva para negativa. Perdas na qualidade da proteína podem causar mudanças na textura e a cor pode ser afetada pela presença de peróxidos, descolorindo carotenóides, mioglobinas, antocianinas e clorofilas (Finley & Given, 1986).

O mecanismo mais aceito para a ação dos antioxidantes é o proposto por Bolland (1947), pelo qual o antioxidante cede um

átomo de hidrogênio ao radical livre, segundo as equações:



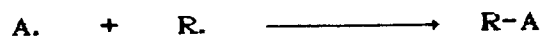
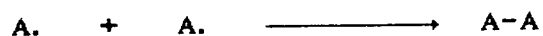
onde: R. e ROO. são radicais livres ativos;

AH é o antioxidante;

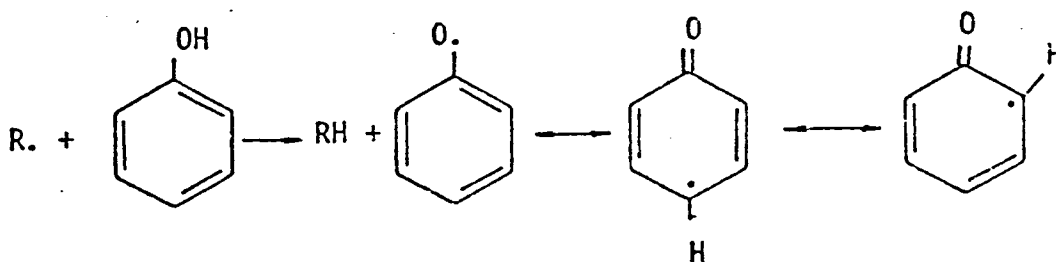
RH e ROOH são produtos da reação de antioxidante com radical livre;

A. é um radical livre estável.

Segundo Frankel (1980), o radical livre formado pelo antioxidante pode formar outros produtos estáveis por dimerização ou pela reação com outro radical livre, conforme as equações:



Na reação dos antioxidantes fenólicos com os radicais livres ocorre a formação de um radical livre que se estabiliza por ressonância conforme a equação:



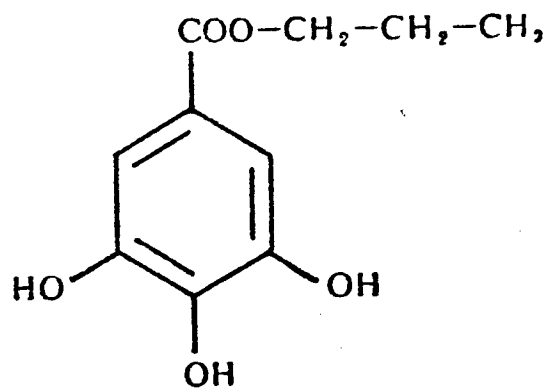
A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende basicamente da possibilidade do deslocamento do elétron isolado que aparece após a reação com radical livre. Quanto mais estáveis as formas de ressonância, melhor a atividade antioxidante do composto fenólico. Dessa forma, as substituições nas posições orto e para no anel fenólico são mais efetivas que as substituições meta, porque proporcionam um número maior de estruturas de ressonância (Scott, 1965).

A mistura de dois ou mais antioxidantes pode causar o aumento da atividade dos antioxidantes isolados, num efeito chamado sinergismo. Por esta razão, é comum a mistura de várias substâncias antioxidantes na formulação de antioxidantes para alimentos (Eastman, 1963).

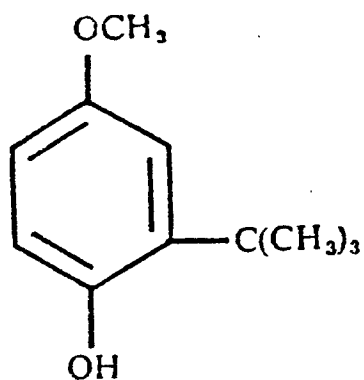
2.2.1. GALATO DE PROPILA (PG)

Durante a segunda guerra mundial, os galatos foram preparados em grande escala e muito utilizados, principalmente os galatos de etila e propila (Valdehita & Vicente, 1971).

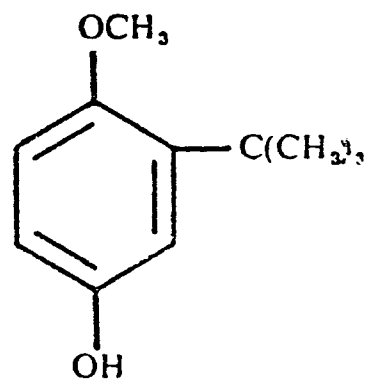
Galato de propila, propil éster do ácido gálico ou 3,4,5 trihidroxibenzoato de propila, é um sólido cristalino de cor branca a branca amarelada, sem odor, apresentando sabor ligeiramente amargo. Sua fórmula molecular é $C_{10}H_{12}O_5$ e após secagem à $110^{\circ}C$ / 4hs deve conter não menos de 98% e não mais de 102,5% de $C_{10}H_{12}O_5$. A fórmula estrutural está ilustrada na figura 1a. A faixa do ponto de fusão é de 146° a $150^{\circ}C$. As características de solubilidades estão listadas na Tabela 1 (JECFA, 1986).



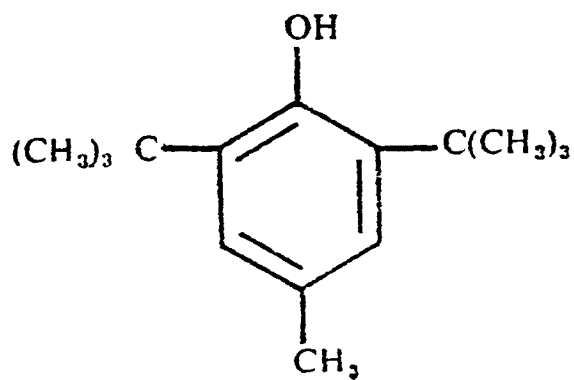
a. PG



b.1. 3-BHA



b.2. 2-BHA



c. BHT

FIGURA 1 - ESTRUTURAS DOS ANTIOXIDANTES

TABELA 1 - SOLUBILIDADE DO PG, BHA E BHT EM DIFERENTES SOLVENTES

ANTIOXIDANTE	SOLVENTES (g / 100 ml)		
	Água	Etanol	Propileno glicol
PG	0,3	30,0	30,0
BHA	insolúvel	25,0	100,0
BHT	insolúvel	25,0	insolúvel

Um problema associado ao emprego do galato de propila é a possibilidade do aparecimento de uma coloração violeta em alimentos que contenham ferro. Em muitos casos é possível evitar este problema de desenvolvimento de cor através do emprego de agentes quelantes como, por exemplo, o ácido cítrico (Antunes & Canhos, 1983).

2.2.1.1. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Após administração oral, mais de 70% da dose do galato de propila é absorvida no intestino. O metabolismo em ratos e coelhos envolve hidrólise, formando o ácido gálico e posteriormente ocorre metilação, produzindo o ácido 4-o-metilgálico como produto da biotransformação. Esse produto é excretado na urina como composto livre ou como conjugado glucuronado. Vários autores constataram que os ratos também excretam pela urina o éster inalterado (Van Esch, 1955; Booth et alii 1959; Dacre, 1960; 1974).

A toxicidade oral aguda (DL₅₀) do galato de propila em camundongos, ratos e coelhos varia de 2000 a 3800 mg / kg de peso corpóreo (JECFA, 1976).

Galatos causam dermatites em padeiros e outras pessoas que os manejam (JECFA, 1976). A sensibilidade, em porcos é mais forte após aplicação intradérmica do que após tratamento epicutâneo. A sensibilidade não ocorre quando houve pré-exposição oral (COLIPA, 1983).

Estudos sobre a carcinogenicidade foram conduzidos em ratos e coelhos com níveis diários de 5.000 a 20.000 mg/kg de ração, e não foi detectado aumento na incidência de tumores (Pathology Working Group, 1982; Abdo *et alii*, 1983).

Em 1980, Rosian & Stich investigaram o potencial mutagênico do galato de propila em vários sistemas testes e não observaram nenhum efeito mutagênico.

Segundo recomendação do JECFA (1986), o índice de ingestão diária aceitável (IDA) do PG é 2,5 mg / kg de peso corpóreo.

2.2.2. BUTIL HIDROXIANISOL (BHA)

Foi lançado no mercado em 1948 e desde então se encontra no comércio com nomes distintos (Valdehita & Vicente, 1971). O produto comercial é uma mistura de 3-tertbutil-4-hidroxianisol (3-BHA) e 2-tertbutil-4-hidroxianisol (2-BHA). A ação antioxidante do 3-BHA é maior que a do 2-BHA e há evidência de efeito sinérgico entre os isômeros quando são usados juntos. Desta forma, a mistura contendo alta proporção de 3-BHA é aproximadamente tão eficiente quanto o 3-BHA puro. (Dugan, *et alii*, 1951 e Rosenwald & Chenieck, 1951).

Segundo definições do JECFA (1986), BHA é um sólido cristalino, branco ou ligeiramente amarelado, apresentando odor fenólico característico; e a sua fórmula molecular é $C_{11}H_{16}O_2$. Quanto à pureza, deve conter no mínimo 98,5% de $C_{11}H_{16}O_2$ e 85% de

3-tertbutilhidroxianisol. As fórmulas estruturais dos isômeros do BHA estão ilustradas na figura 1b. A faixa do ponto de fusão é de 48 - 65°C. As características de solubilidade estão listadas na Tabela 1.

2.2.2.1. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

BHA, junto com outros antioxidantes, tem sido considerados capazes de causar mudanças químicas em substâncias indutoras de carcinogêneses e mutagêneses, exibindo tanto propriedades anti como procarcinogênica / mutagênica (Wattenberg, 1980; 1985; Kahl, 1984; 1986; Ito, Fukushima & Tsuda, 1985). Além disso, administração oral de BHA a roedores causou lesões, hiperplasia, papilomas e carcinomas no estômago (Ito *et alii*, 1983; Altmann *et alii*, 1985; Ito, Fukushima & Tsuda, 1985; Abraham *et alii*, 1986; Masui, *et alii*, 1986; Rodrigues *et alii*, 1986). A International Agency for Research of Cancer declarou que estes estudos demonstram suficiente evidência da carcinogenicidade do BHA (Masui *et alii*, 1986). Pouco se sabe a respeito do mecanismo carcinogênico do butil hidroxianisol; entretanto, estudos indicaram que o 3-BHA tem maior potencial que o 2-BHA (Ito *et alii*, 1984; Hirose *et alii*, 1986).

Como consequência desses estudos o Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, reduziu o índice de ingestão diária aceitável (IDA) do BHA de 0,5 mg / kg de peso corpóreo para 0,3 mg / kg de peso corpóreo (JECFA, 1986).

Em 1989, Verhagen *et alii* compararam a cinética e o metabolismo do butil hidroxianisol em homens e ratos. Doses orais de 2, 20 ou 200 mg de BHA / kg de peso corpóreo foram administrados a ratos Wistar machos e uma dose oral de 0,5 mg / kg de peso corpóreo foi administrado a voluntários humanos (homens não fumantes). Os resultados desse estudo indicaram uma considerável diferença entre os efeitos biológicos do BHA, após administração oral em doses altas para os ratos e uma dose baixa para os homens. Os autores concluíram que se o metabolismo e a cinética do BHA "in vivo" são associados com potencial carcinogênico após administração oral, a cota segura de consumo pelo homem não pode ser extrapolado de dados de animais.

2.2.3. BUTIL HIDROXITOLUENO (BHT)

Butil hidroxitolueno (2,6 ditertbutil-p-cresol ou 4 metil 2,6 ditertbutilfenol) é um sólido cristalino branco, apresentando odor fenólico característico. Seu ponto de fusão é da ordem de 69 a 72°C. A fórmula molecular é $C_{15}H_{24}O$ e a estrutural está ilustrada na figura 1C. Quanto à pureza, deve conter 99% de $C_{15}H_{24}O$. As características de solubilidade estão listadas na Tabela 1 (JECFA, 1986).

2.2.3.1. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Assim como o BHA, o BHT também tem sido utilizado em estudos com animais. Verificou-se que pode exercer efeitos

maléficos e benéficos, pois enquanto reduz a toxicidade e carcinogenicidade de alguns agentes químicos, aumenta a de outros (Fernandez, 1984).

No estudo de Witschi, Williamson & Lock (1977), a injeção intraperitoneal do BHT produziu uma proliferação celular nos pulmões de camundongos em 2-4 dias. Os camundongos Webster Suíços machos foram tratados com 1 mg de uretana / g. A estimulação do crescimento celular após tratamento com uretana aumentou a tumorigenicidade. Injeções repetidas de BHT aumentaram significativamente o aparecimento de tumores nos pulmões no grupo tratado com uretana e no controle.

Em outro trabalho, verificou-se a hemorragia induzida pelo butil hidroxitolueno. Em todos os animais mortos aos quais foi administrado BHT, foram observados: hemorragia intranasal, hematoma intracranial, hematórax, hematomielia e hematoma no epidídimo, testículos e músculos. Também foram testados o BHA e o Ionox 330 os quais não causaram sangramento. Esses resultados sugerem que as propriedades hemorrágicas não são características de todos os antioxidantes e que o efeito hemorrágico do BHT aparece relacionado à sua estrutura química (Takahashi & Higara, 1978).

Em estudos feitos com animais de laboratório observou-se que o BHT causa necrose das células do pulmão, pode afetar adversamente as glândulas adrenais, interfere com o funcionamento normal dos rins, danifica as células do coração, diminui a velocidade de crescimento. Pode ainda causar aberrações

cromossômicas e, devido à sua natureza lipofílica, distorce a estrutura e a função das membranas plasmáticas (Fernandez, 1984).

Em 1986, o JECFA reduziu o índice de ingestão diária aceitável (IDA) do BHT de 0,5 mg / kg de peso corpóreo para 0,125 mg / kg de peso corpóreo.

2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANTIOXIDANTES

2.3.1. EXTRAÇÃO

Devido às condições dinâmicas associadas à sua ação, um procedimento de extração satisfatório para antioxidantes deve cobrir uma ampla faixa de concentração estendendo desde níveis normais até traços. A extração é geralmente dificultada pela necessidade de considerar, além dos antioxidantes livres, os ligados e os produtos de decomposição dos mesmos.

A dificuldade com a recuperação de antioxidantes é devido à grande diferença nas suas propriedades. Por exemplo, PG é consideravelmente mais polar que o BHA, o qual é mais polar que o BHT que tem por sua vez caráter lipofílico (Anglin, Mahon & Chapman, 1956). Com relação a essas diferenças, extração com solvente tem sido frequentemente usada para isolar antioxidantes, com ou sem subsequente etapa de limpeza. Certamente, um procedimento universal para extração de antioxidantes é impraticável, quando se trata de alimentos que possuem matrizes muito complexas e diferentes. Um problema na extração com

solventes é que quantidades consideráveis da matriz do alimento são co-extraídas com os antioxidantes. Para superar isto, partição líquido-líquido (Heidrick & Conroy, 1962; Schwien & Conroy, 1965; Page, 1983), coluna de limpeza dos extratos (Alcino, *et alii*, 1963; Aczel *et alii*, 1972) e separação dos interferentes em cromatografia de camada delgada (Sahasrabudhe, 1964) tem sido usados. Os solventes utilizados para extração são acetonitrila (Shasrabudhe, 1964; Scheidt & Conroy, 1966; Stiyve & Diserens, 1983); hexana (Stuckey & Osborne, 1965); vários álcoois (Mahon & Chapmam, 1951; Austin, 1954; Whetsel, Roberson & Johnson, 1955; Anglin, Mahon & Chapman, 1956; Phillips & Hinkel, 1957; Hansen, Kauffman & Wiederman, 1959; Laszlo & Dugan, 1961; Heidrick & Conroy, 1962; Salazarmacian & Del Pozo, 1963; Prakasa, Ekambareswara Rao & Prasad, 1982; Beaulieu & Hadziyev, 1982; Sanders & Coppen, 1983; Prasad, Rao & Sastry, 1985; Kobayashi, Tonogai & Ito, 1986; Prasad *et alii*, 1987) e água (Heidrick & Conroy, 1962; Schwien & Conroy, 1966). Como traços de impurezas podem causar perdas de antioxidantes, o uso de solventes puros é importante para o processo de extração (Saag, 1982). Para determinação quantitativa, muito cuidado deve ser tomado durante a etapa de concentração sob vácuo para prevenir perdas de certos antioxidantes, como o BHA, BHT, TBHQ e IONOX 100, por evaporação. Felizmente, os antioxidantes NDGA, THBP, PG, OG e DG são compostos relativamente polares não voláteis (Saag, 1982). Pode ocorrer também perdas associadas com determinados tipos de amostras. Por exemplo, BHA foi quantitativamente recuperado com etanol 80% do

papel utilizado como embalagem (Austin, 1954); quando o mesmo procedimento foi utilizado por Phillips & Hinkel (1957), para análise de banha, os resultados obtidos não foram quantitativos. Similarmente, a baixa recuperação de BHA em batatas desidratadas foi atribuída à sua retenção pela amilose, componente do amido (Beaulieu & Hadziyev, 1982).

Destilação com vapor (Anglin, Mahon & Chapman, 1956; Sloman, Romagnoli & Cavagnoli, 1962), destilação à vácuo (McCaulley *et alii*, 1967) e destilação com vapor e vácuo (Shu & Mukherjee, 1985) tem sido usados para isolar antioxidantes, mas precisam ser reconhecidas como técnicas de extrações limitadas. Por esta razão, Anglin, Mahon & Chapman (1956) constataram que destilação com vapor foi apropriada para extração de BHA e BHT, não sendo para PG e NDGA. Esses autores criticaram também o tempo e o volume de destilado necessários para obter extratos quantitativos. A adição de sal para aumentar a temperatura do vapor e acelerar a destilação foi insatisfatória devido à dificuldade de manter a temperatura elevada até completar a destilação.

Destilação com vapor superaquecido extrai quantitativamente BHA e BHT. Entretanto, a necessidade de vapor superaquecido foi sendo substituída pelo uso de aparelhos de destilação incorporando uma suspensão de óxido de magnésio para remover interferentes (Filipic & Ogg, 1960). Em 1962, Sloman, Romagnoli & Cavagnoli desenvolveram a destilação com vapor, utilizando uma suspensão de óxido de magnésio aquecida, para

remover qualquer componente ácido e fenólico natural da amostra que poderiam interferir na determinação colorimétrica do BHA e BHT. Porém consideraram impróprio o uso da suspensão aquecida para recuperação quantitativa do BHT.

2.3.2. MÉTODOS ESPECTOFOTOMÉTRICOS NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (UV)

A princípio, a medida da absorção na região ultravioleta é um meio adequado para quantificação de antioxidantes fenólicos, os quais tem espectros UV característicos devido à transição $\pi - \pi^*$. Entretanto, o método não é específico e muitas substâncias podem interferir na determinação. Em 1982, Soucek & Jelínková desenvolveram um método para determinação de dois antioxidantes fenólicos (2,6 ditertbutil-4 metil fenol e 4 substituído 2,6 xilenol) que possuem espectro de absorção ultravioleta idênticos. Os antioxidantes foram distinguidos em meio alcalino, onde o último forma fenolato. Desta maneira, o efeito fenol batocromico é combinado com a espectrofotometria derivativa e os dois antioxidantes foram quantificados separadamente. O uso da espectrofotometria derivativa reduz o espalhamento da luz e os interferentes da matriz do alimento.

Examinando os vários métodos baseados na medida da absorção na região ultravioleta, pode-se observar que são aplicados, na maioria das vezes, para análise de um antioxidante ou, no máximo, de misturas de PG com BHA, BHT ou NDGA (Tabela 2).

TABELA 2 - DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA (UV).

AOS ¹	AMOSTRA	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIA
BHA e PG	Óleo	Amostra dissolvida direto em 2-propanol e analisada a 232, 241 e 252 nm. Determinação de BHA e PG juntos ou separados.	Whetsel, Roberson & Johnson, 1955
BHT	Banha	A amostra dissolvida em ciclohexano e percolada em colunas empacotadas com sílica, o eluato analisado a 284 nm. Limite de detecção: 20 - 200 ppm. BHA, NDGA, ácido cítrico e ácido fosfórico não interferem.	Phillips & Hinkel, 1957
BHA	Banha	Amostra derretida e dissolvida em clorofórmio-metanol e analisada a 290 nm. BHT e tocoferol interferem.	Hansen, Kauffman & Wiedermann, 1959
BHT	Gordura	O espectro UV é medido com BHT na forma ionizada por estar em solução alcalina forte. A leitura feita a 306 nm	Berger, Sylester & Haines, 1960
BHA e BHT	Amostras solúveis em hidrocarboneto	Coluna de limpeza de florisil. Solv.: solução aquosa de etanol. Leitura: 283,5 nm	Alcino <i>et alii</i> , 1963
BHA, NDGA ESTERES DE GALATOS	Óleo	Solvente: metanol-etanol Leitura: 240, 250 e 274 nm	Salazar-macian & Del Pozo, 1963
BHT	Óleo	Coluna de limpeza de celulose. Solvente: ciclohexano. Leitura: 276 nm	Aczel <i>et alii</i> , 1972
BHT	Folha de propileno	Espectrofotometria derivativa.	Soucek & Jelinkova, 1982

Em 1955, Whetsel, Roberson & Johnson desenvolveram um método UV para determinação de BHA e PG após dissolução direta da amostra em 2-propanol e a medida da absorção feita a 232, 241 e 252 nm. Woff (1958) desenvolveu um método similar para determinação de BHA e ésteres do ácido gálico, após partição entre a solução da amostra em ciclohexano e etanol à 7,2°C. A absorção foi medida em três comprimentos de onda, onde BHA e galatos foram quantificados por substituição dentro de um conjunto de equações que incluía a absorção de fundo da amostra.

Em 1957, Phillips & Hinkel desenvolveram um método para análise de BHT em banha. A amostra foi dissolvida em ciclohexano e percolada em coluna cromatográfica, empacotada com ácido silícico. Através da lavagem da coluna com sucessivas porções de ciclohexano, o BHT foi seletivamente removido do adsorvente. Os eluatos foram subsequentemente analisados e quantificados por absorção UV a 284 nm. Os autores também analisaram o efeito da estocagem na recuperação do BHT e observaram que, a partir de cinco meses, ocorreu perda do BHT. Não se sabe se foi devido à reação química do BHT com a banha ou devido à interferência da absorção de fundo das mudanças químicas da amostra.

No trabalho de Hansen, Kauffman & Wiederman (1959), BHA foi analisado em banha, a 270, 290 e 310 nm, num extrato clorofórmio-metanol, após precipitação da gordura por resfriamento. Segundo os autores, este método tem boa precisão quando a banha contém de 0 a 100 ppm de BHA e é mais confiável que as técnicas colorimétricas existentes, especialmente em

concentrações baixas do antioxidante. BHT e tocoferol inteferem na análise.

2.3.3. MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

Os métodos colorimétricos são os mais frequentemente utilizados para determinações quantitativas e qualitativas. As reações envolvidas nesses métodos são baseadas nas propriedades fenólicas e redutoras dos antioxidantes. Idealmente, um reagente colorimétrico deveria ser específico para cada antioxidante, mas naturalmente isto é impraticável. Por exemplo, os isômeros do BHA geralmente reagem com diferentes intensidades, o que dificulta a determinação do BHA colorimetricamente (Sahasrabudhe, 1964).

São vários os reagentes colorimétricos utilizados na determinação de antioxidantes. Na Tabela 3 estão listados resumidamente alguns métodos colorimétricos estudados em análises qualitativas e quantitativas de antioxidantes.

O reagente menos específico, o cloreto férrico - 2,2' bipyridina, depende da propriedade de redução dos antioxidantes para produzir o ferro II, o qual forma com a bipyridina um complexo de cor vermelha. Qualquer composto com capacidade de reduzir o ferro III pode interferir. Outra desvantagem do reagente é que o BHA, quando presente, altera a velocidade da reação do BHT com o cloreto férrico - 2,2' bipyridina fazendo com que a reação não se complete no tempo normal de análise e aumenta a intensidade da cor (Phillips & Hinkel, 1957; Stuckey & Osborne, 1965). Em 1951, Mahon & Chapman desenvolveram um método para análise

TABELA 3 - MÉTODOS COLORIMÉTRICOS PARA ANTIOXIDANTES

AOS ¹	AMOSTRAS	REAGENTES	OBSERVAÇÕES	REFERENCIA
BHA	Gordura vegetal hidrogenada e Banha	Gibb	Reação específica/BHA, estável a luz, cor máxima após 15' estável por 5hs, dependente do pH, λ máximo 620 nm.	Mahon & Chapman, 1951
BHA	Papel (utilizado para embalagem)	Cloreto férrico - 2,2 bipiridina	Reação não específica, instável a luz. λ max 522 nm	Austin, 1954
BHA BHT PG NDGA	Banha	Cloreto férrico- 2,2' bipiridina e Gibb Sulfato ferroso	BHA e BHT reagem com o cloreto férrico e o BHA com Gibb's. BHT é determinado pela diferença das absorbâncias. BHA e BHT não reagem com sulfato ferroso.	Anglin, Mahon & Chapman, 1956
BHA BHT	Flocos de batatas	Cloreto férrico- 2,2' bipiridina e Gibb	Sulfito de sódio causa resultados errôneos.	Filipic & Ogg, 1960
BHA PG	óleos	Gibb tartarato ferroso	Desenvolvimento da cor ocorreu em 1h / 0°C. λ máximo 532 nm.	Berger, Sylvester & Haines, 1960
BHA	óleos e gorduras	ác. sulfanílico diazotado	Teste qualitativo e quantitativo. Outros antioxidantes não interferem.	Laszlo & Dugan, 1961
BHT	óleos e gorduras	dianisidina	Específico para BHT Limite de detecção 10 - 200 ppm. Foram estudadas todas variações do processo colorimétrico.	Szalkowski & Garber, 1962

1 - AOS = ANTIOXIDANTES

TABELA 3 - CONTINUAÇÃO

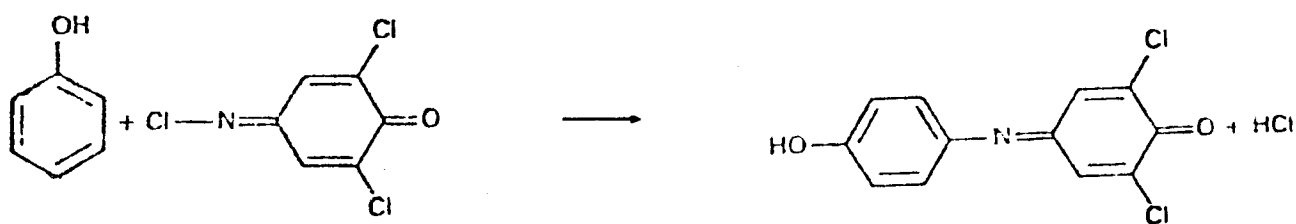
AOS ¹	AMOSTRAS	REAGENTES	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIA
BHA BHT	Desidratados	Gibb Dianisidina	Análise de traços.	Sloman, Romagnoli & Cavagnol, 1962
PG BHA BHT	Óleos e Gorduras	Hidróxido de amônia e sulfato ferroso Ácido sulfanílico diazotado Dianisidina	Teste qualitativo, cor rosa indica presença de PG Cor vermelha → BHA Cor vermelha → BHT	Schiwien & Conroy, 1966
BHA PG	Gorduras	Metaperiodato de sódio e aminofenol	Determinação de BHA e PG juntos ou separados. λ máximo 500 nm (BHA) λ máximo 560 nm (PG)	Prakasa, Ekambareswara Rao & Prasad, 1982
BHA	Óleos, banha e gordura	N, N dimetil-p-fenileno-diamina	Limite de detecção: 0,4 ppm	Komaitis & Kapel, 1985
BHT BHA	Óleos e gorduras	Dianisidina Gibb	Limite de detecção: 2,0 ppm	Kobayashi, Tonogai & Ito, 1986
BHA TBHQ	Óleos e Gorduras	MBTH e sulfato de amônia	Teste qualitativo e quantitativo. λ máximo 480 nm (BHA) λ máximo 500 nm (TBHQ)	Prasad et alii, 1987

1 - AOS = ANTIOXIDANTES.

qualitativa e quantitativa de antioxidantes, e utilizaram para determinação de BHA e NDGA o reagente cloreto férrico - 2,2' bipyridina. O procedimento analítico foi idêntico para os dois antioxidantes, exceto que a leitura da absorbância do NDGA foi realizada após 3 minutos e a do BHA após 30 minutos. Austin (1954) utilizou este reagente para determinação de BHA em papel, utilizado como embalagem. Após a extração dos antioxidantes em aparelho de Soxhlet (10 hs com solução de etanol), a absorbância do composto foi medida a 522 nm. Para correção da absorção de fundo foi utilizado um extrato de papel que não continha o BHA. Em 1956, Anglin, Mahon & Chapman determinaram BHA e BHT em óleo comestível, após destilação com vapor superaquecido, através da reação colorimétrica com o cloreto férrico. O BHA foi quantificado com o reagente de Gibb, e o BHT pela diferença entre os resultados das duas reações colorimétricas. Fillipic & Ogg (1960) utilizaram o mesmo processo para determinação de BHA e BHT em flocos de batata e verificaram que o sulfito de sódio, que é adicionado frequentemente em processamento de batatas, conduzia a resultados errôneos. Para evitar a presença do mesmo no destilado, recomendaram que a destilação fosse realizada em meio suficientemente alcalino.

O reagente de Gibb (2,6 dicloroquinona-4-clorimina) liga-se com substâncias fenólicas nas posições livres em orto ou para e, conseqüentemente, não reage com BHT e nem com o PG. A reação ilustrada para o fenol na equação 1, produz indofenóis, os quais têm cor azul característica e absorção máxima a 620 nm.

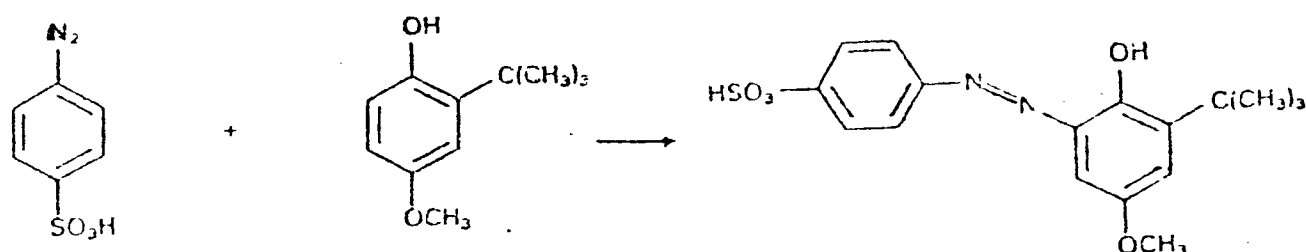
Qualquer composto fenólico é um potencial interferente, se tiver as posições livres em orto ou para. Stuckey & Osborne (1965) reportaram que quantidades pequenas de compostos presumidamente fenólicos, encontrados naturalmente em banha e outras gorduras, deram resultados positivos com este reagente. Apesar dessa limitação e da dependência do desenvolvimento da cor com o pH, este reagente tem sido utilizado em vários trabalhos (Mahon & Chapman, 1951; Mahon & Chapman, 1952; Austin, 1954; Sloman, Romagnoli & Cavagnol, 1962; Fillipic & Ogg, 1960; Berger, Sylvester & Haines, 1960; Davidek & Beniac, 1966; Kobayashi Tonogai & Ito, 1986).



EQUAÇÃO 1 - Reação do fenol com o reagente de Gibb.

Outro reagente comumente utilizado é o ácido sulfanílico diazotado que reage com BHA em solução etanólica formando complexo vermelho-purpura, conforme ilustrado na equação 2 (Lazso & Dugan, 1961; Pujol Forn & Lopez Sabater, 1984). O BHT também reage com este composto, mas tão lentamente que, se estiver presente, não interfere na medida se esta for feita depois de 5-10

minutos da adição do reagente. O PG inibe o desenvolvimento da reação; portanto, deve ser retirado antes da análise, através da extração com solução de acetato de amônia. Esta reação está sujeita a várias complicações. Por exemplo, a inclinação da curva de calibração é afetada pela concentração alcoólica da solução teste. A quantidade de nitrito também é crítica porque pode causar redução na intensidade da cor. Apesar dessas limitações, este reagente é recomendado pelo método da AOAC.



EQUAÇÃO 2 - Reação entre o ácido sulfanílico diazotado e o BHT.

Um reagente específico para determinação de BHT é o 3,3 dimetoxibenzidina (dianisidina). Em 1962, Szalkowski & Garber desenvolveram um método específico para BHT, baseado na reação com dianisidina e ácido nitroso. O processo incluía destilação com arraste de vapor, seguida pela diluição do destilado em uma solução de metanol 50%. Após a adição do ácido nitroso e da dianisidina, o produto colorido foi extraído com clorofórmio e a absorbância medida a 520 nm. Dos antioxidantes, somente o

etoxiquinona (6 etoxi 1,2 dihidro-2,2,4 trimetilquinolina) interferiu dando um erro maior que 3%.

Em 1956, Anglin, Mahon & Chapman desenvolveram um método específico para identificação de PG. Após o antioxidante ter sido extraído da gordura com uma solução de etanol 50%, o extrato foi diluído com água para obter uma solução 25%. O pH da solução foi acertado para 10 com bicarbonato de sódio e, em seguida, foi adicionado o reagente colorimétrico sulfato ferroso. A absorbância da solução púrpura foi medida a 515 nm. O antioxidante NDGA interfere na análise, mas como NDGA e PG tem propriedades antioxidantes similares, não são normalmente encontrados juntos.

Recentemente vários outros reagentes tem sido propostos para análise de antioxidantes, incluindo p - aminofenol (Rao, Murthy & Sastry, 1982) e o N,N dimetil - p - fenilenodiamina (Komaitis & Kapel, 1985) para BHA; p - N metilaminofenol com periodato (Sastry, Rao & Prasad, 1982) e o permanganato de potássio com metol (Prasad, Rao & Sastry, 1985) para PG e BHA; 3 metil - 2 - benzotiazolinona hidrazona hidrocloreto (MBTH) e sulfato de amônia (Prasad *et alii*, 1987) para TBHQ, BHA e ácido gálico.

2.3.4. MÉTODOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Há uma variação muito grande entre os métodos por cromatografia em camada delgada, já que estes podem utilizar diversos adsorventes e solventes. Um resumo dos trabalhos

encontrados na literatura, apresentando as principais diferenças entre os métodos está na Tabela 4.

Provavelmente, a forma mais apropriada para CCD é a desenvolvida por Van der Neut & Maagdenberg (1966), na qual os antioxidantes são separados em grupos, de acordo com os valores de R_f por uma cromatografia preliminar. Baseado nessas classificações preliminares, subsequentes seleções de sistemas de solventes foram realizadas. Nove sistemas de solventes e quatro reagentes de detecção foram especificados e aplicados à trinta antioxidantes. Mais recentemente, Van Peteghem & Dekeyser (1981) desenvolveram um método por CCD para separar onze antioxidantes usando somente dois adsorventes e três sistemas de solventes.

Poliamida tem sido largamente usada como adsorvente em CCD para antioxidantes (Davidek & Pokorny, 1961; Copius-Pereboom, 1964; Alvarez-Pino, Vinagre Leiro & Schmidt-Hebbel, 1969; Van Peteghem & Dekeyser, 1981). A placa de poliamida age como um suporte apolar ou, em casos especiais, como um tipo de fase estacionária polar; a natureza da fase estacionária é determinada pela composição da fase móvel. Em 1964, Copius-Pereboom, usando poliamida como adsorvente, observaram ótima separação de PG e NDGA; o mesmo não ocorrendo para BHA e BHT.

Celulose acetilada (Mancini, Delton & Gelsomini, 1977); alumina (Mathew & Mitra, 1965) ou sílica-gel (Sahasrabudhe, 1964; Scheidt & Conroy, 1966; Woggon, Uhde & Zydek, 1968; Van Dessel & Clement, 1969; Valdehita & Vicente, 1970; Phipps, 1973; Guven & Guven, 1973; Jayaraman, Vasundhara & Parihar, 1976; Pujol Form, 1980; Guldborg, 1981; Van Peteghem & Dekeyser, 1981) também

TABELA 4 - DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA.

AOS ¹	FASES MÓVEIS	FASE ESTACIONARIA	REAGENTES (DETECÇÃO)	REFEREN- CIA
BHA, PG e NDGA	Metanol-acetona- -água (6:1:3)	Poliamida	Ac. fosfomo- lípido. Ac. sulfaníli- co.	Davidek & Pokorny, 1961
BHA, PG e NDGA	Hexana-benzeno- -ácido acético - -dimetilformamida (10:10:5:0,25)	Poliamida	Ferro III - hexacianofer- rato.	Copius- -Peere- boom, 1964
BHA, BHT, PG e NDGA	Clorofórmio- -metanol-hexana (90:10:2)	Sílica-gel	Gibb	Isbikaws & Katsui, 1964
BHA, BHT, PG e NDGA	1 ^a eluição:benze- no. 2 ^a eluição:aceto- nitrila.	Sílica-gel	não utilizou	Sahasra- budhe, 1964
BHA, BHT e PG	Éter de petróleo- -dioxana (10:1)	Alumina	Ac. Fosfomo- lípido	Mathew & Mitra, 1965
BHA, BHT, PG e NDGA	Clorofórmio- -metanol-ácido acético (90:10:2)	Sílica-gel	Gibb	Scheidt & Conroy, 1966
BHA, BHT e α -to- cofe- rol	Benzeno-metanol (99:1)	Sílica-gel	α,α' difenil β picrilhidra- zil (DPPH)	Glavind & Holmer, 1967

1- AOS = ANTIOXIDANTES

TABELA 4 - CONTINUAÇÃO

AOS ¹	FASES MÔVEIS	FASE ESTACIONARIA	REAGENTES (DETECÇÃO)	REFEREN- CIA
BHT	Ciclohexana- -acetato de etila (10:1)	Sílica-gel	Gibb	Woggon, Uhde & Zy- dek, 1968
BHA, BHT, PG e NDGA	Benzeno- -ác. acético (15:4)	Kieselgel	Gibb	Van Des- sel & Ciement, 1969
BHA, BHT, PG e NDGA	Clorofórmio	Sílica-gel	Gibb	Valdehita & Vicen- te, 1970
BHA e BHT	Hexana	Sílica-gel	Ácido fosfo- molíbdico	Phipps, 1973
PG	Ciclohexana	Sílica-gel	Ferro III	Güven & Güven, 1973
BHA, BHT, PG e NDGA	Hexana- -ácido acético (9:1)	Sílica-gel	Ácido fosfo- molíbdico	Jayaraman Vasundha- ra & Pari- har, 1976
BHA, BHT, PG e NDGA TBHQ	Clorofórmio- -metanol- -ácido acético (80:03:10) Hexana-benzeno- -ácido acético (40:40:20) Clorofórmio- -tolueno- -ácido acético (55:20:20)	Sílica-gel	Cloreto férrico 2,2' bipi- ridina	Pujol Form, 1980

1- AOS = ANTIOXIDANTES.

TABELA 4 - CONTINUAÇÃO

AOS ¹	FASES MÓVEIS	FASE ESTACIONARIA	REAGENTES (DETECÇÃO)	REFEREN- CIA
BHA, BHT, PG e NDGA	Éter de petróleo- benzeno- -ácido acético (40:40:20) Clorofórmio- -metanol- -ácido acético (90:10:02)	Sílica-gel	Gibb	Guldborg 1981
BHA, BHT, NDGA TBHQ PG e α TO- COFE- ROL	Éter de petróleo- benzeno- -ácido acético (40:40:20) Hexana-acetona- -ácido acético (55:40:15) Éter de petróleo- benzeno- -ácido acético (40:40:20) Hexana-acetona- -ácido acético (55:40:15) Metanol-acetona- -água	Sílica-gel Poliamida	Gibb Cloreto férrico 2,2' biperidina Gibb	Van Pe- teghem, & Dekey- ser, 1981

1- AOS = ANTIOXIDANTES.

tem sido como adsorventes em CCD. No trabalho de Guldborg (1981), onde a sílica-gel foi utilizada como adsorvente, a separação de BHA, BHT, esteres de galato e NDGA apresentou resultados satisfatórios para o óleo de soja, banha e biscoitos altamente amanteigados, o mesmo não acontecendo para o óleo de milho.

A maioria dos trabalhos citados na literatura utilizam CCD apenas para separação e identificação dos antioxidantes; poucos são os trabalhos quantitativos. Em 1964, Sahasrabudhe desenvolveu um método para estimativa quantitativa de BHA, BHT, PG e NDGA em banha. Os antioxidantes foram extraídos com etanol 80% e acetonitrila, separados por CCD bidimensional, usando benzeno e acetonitrila, e estimados quantitativamente por métodos colorimétricos após a retirada das manchas da placa cromatográfica. No trabalho de Jayaraman, Vasundhara & Parihar (1976), BHA, BHT, PG e NDGA foram quantificados após extração com metanol, separação em CCD, usando sílica-gel e hexano / ácido acético (9:1) e revelação na camada delgada com ácido fosfomolibdico. As manchas foram raspadas e diluídas para 5 ml com etanol absoluto e as absorbâncias foram lidas a 675 nm para BHA e BHT e a 700 nm para PG e NDGA.

Os reagentes usados nos métodos colorimétricos para antioxidantes são empregados como reagentes de detecção em CCD. Em 1966, Van Der Heide identificou vinte reagentes e tabelou a cor dada para cada antioxidante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia de análise para determinação de antioxidantes em alimentos envolveu cinco etapas principais: (1) amostragem, (2) extração, (3) separação entre antioxidantes e interferentes, (4) identificação e (5) quantificação. As avaliações foram feitas em torno dessas etapas.

Três tipos de amostras foram analisadas totalizando seis produtos:

- A) produtos lipídicos - gordura vegetal hidrogenada e margarina;
- B) produtos desidratados - sopas e patês;
- C) caldos cárnicos concentrados - caldo de carne e caldo de galinha.

Foram estudados quatro diferentes métodos para determinação dos antioxidantes:

- A) Espectrofotometria de absorção na região ultravioleta (UV)
- B) Espectrofotometria de absorção na região visível (colorimetria)
- C) Cromatografia em camada delgada / absorção na região ultravioleta (CCD-UV)
- D) Cromatografia em camada delgada / absorção na região visível (CCD-colorimetria)

3.1. AMOSTRAGEM

Os produtos comprados nos supermercados foram analisados em triplicatas e a amostra para análise foi obtido,

misturando-se dois recipientes de cada produto com a mesma data de fabricação. Foram analisadas seis amostras da gordura vegetal hidrogenada e uma dos demais produtos.

Para certos produtos, foi necessário um tratamento prévio das amostras antes da extração propriamente dita. A margarina e a gordura vegetal hidrogenada foram aquecidas até à fusão, para facilitar a dissolução das amostras em etanol durante a extração. A sopa foi triturada em liquidificador para que ficasse mais homogênea. Os caldos, tanto os de galinha como os de carne, foram triturados com uma espátula em almofariz e homogeneizados com etanol até formar uma pasta.

3.2. SOLVENTES E REAGENTES

Todos os solventes e reagentes foram de grau analítico, com exceção do etanol que foi de grau comercial.

3.3. EXTRAÇÃO

Foram comparados três procedimentos de extração provenientes da literatura (Hansen, Kauffman & Wiedermann, 1959; Scheidt & Conroy, 1966 e Van Peteghem & Dekeyser, 1981).

3.3.1. PROCEDIMENTO 1 - Van Peteghem & Dekeyser (1981) adaptado.

1- Pesar 50 g da amostra.

2- Adicionar 100 mL de etanol 96%.

- 3- Agitar por 5 minutos em funil de separação de 250 mL.
- 4- Separar as fases, reservando a fase alcoólica, e extrair novamente com 100 mL de etanol 96 %.
- 5- Combinar as fases alcoólicas.
- 6- Evaporar o etanol em roto-evaporador à vácuo à temperatura $\leq 45^{\circ}\text{C}$, até um volume de aproximadamente 20 mL.
- 7- Transferir para um funil de separação de 60 mL para retirar o resíduo de material gorduroso existente.
- 8- Evaporar o solvente em roto-evaporador à vácuo à temperatura $\leq 45^{\circ}\text{C}$, até volume conveniente.
- 9- Fazer as determinações espectrofotométricas ou cromatográficas.

3.3.2. PROCEDIMENTO 2 - Scheidt & Conroy (1966) adaptado.

- 1- Pesar 25 g de amostra e transferir para um funil de separação de 250 mL.
- 2- Adicionar 100 mL de éter de petróleo ($30^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$).
- 3- Extrair com quatro porções de 25 mL de etanol 96%.
- 4- Combinar a fase alcoólica e evaporar em roto-evaporador à temperatura $\leq 45^{\circ}\text{C}$, até volume conveniente.
- 5- Fazer as determinações espectrofotométricas ou cromatográficas.

3.3.3. PROCEDIMENTO 3 - Hansen, Kauffman & Wiederman (1959) adaptado.

- 1- Pesar 50 g de amostra.
- 2- Adicionar 200 mL de etanol 96%.

- 3- Agitar por 5 minutos em agitador mecânico.
- 4- Resfriar em banho de gelo, até solidificar a gordura.
- 5- Filtrar em papel de filtro.
- 6- Repetir a extração utilizando-se 100 mL de etanol 96%.
- 7- Lavar o papel de filtro com etanol 96%, resfriado.
- 8- Evaporar o filtrado em roto-evaporador à vácuo à temperatura $\leq 45^{\circ}\text{C}$, até aproximadamente 20 mL.
- 9- Resfriar e filtrar novamente para retirar o excesso de material gorduroso existente.
- 10- Evaporar à vácuo à temperatura $\leq 45^{\circ}\text{C}$, até volume conveniente.
- 11- Fazer as determinações espectrofotométricas ou cromatográficas

3.4. SEPARAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES E INTERFERENTES

3.4.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (UV)

Utilizando-se este método, não foi feita nenhuma separação após a extração. O extrato, após diluição conveniente em etanol, foi lido diretamente no espectrofotômetro UV/Visível, duplo feixe, com registrador, marca Varian DMS 80.

3.4.2. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO VISÍVEL (COLORIMETRIA)

Utilizando-se este método, também não foi feita nenhuma separação após a extração. O extrato, após reação colorimétrica

com reagentes específicos, foi lido diretamente no espectrofotômetro, duplo feixe, com registrador, marca Varian DMS 80.

3.4.3. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA / ABSORÇÃO NAS REGIÕES ULTRAVIOLETA E VISÍVEL (CCD-UV E CCD-COLORIMETRIA)

A separação entre antioxidantes e interferentes foi efetuada através da aplicação do extrato etanólico numa placa cromatográfica que foi desenvolvida num determinado sistema de solventes.

A fim de se encontrar as melhores condições de separação, foram realizados estudos preliminares para a escolha dos sistemas de solventes mais convenientes (fase móvel).

Os sistemas de solventes testados, descritos pela literatura, foram os seguintes:

- A) Clorofórmio / Metanol / Ácido acético (90:10:2) (Guldborg, 1981);
- B) Éter de petróleo / Benzeno / Ácido acético (40:40:20) (Guldborg, 1981);
- C) Éter de petróleo / Éter de etílico / Ácido acético (40:40:20) (Van Peteghem & Dekeyser, 1981);
- D) Hexano / Ácido acético (90:10) (Jayaraman, Vasundhara & Parihar, 1976);
- E) Hexano / Acetona / Ácido acético (55:40:15) (Van Peteghem & Dekeyser, 1981).

Como os sistemas de solventes não apresentaram boa separação, foram testados outras proporções dos solventes acima e novas misturas de solventes.

A) Hexano / Acetona / Ácido acético, nas seguintes proporções:

(85:5:10); (80:10:10); (75:15:10); (70:20:10); (65:25:10) e (55:45:15).

B) Hexano / Etanol 96% / Ácido acético, nas seguintes proporções:

(70:20:10); (60:30:10) e (60:20:20).

C) Hexano / Ácido acético, nas seguintes proporções:

(85:15); (80:20) e (70:30).

D) Éter de petróleo / Éter etílico / Ácido acético, nas seguintes proporções:

(85:10:5); (80:10:10); (70:20:10); (60:30:10) e (50:40:10).

Esses testes foram efetuados em placas de sílica-gel GF 254, utilizando-se padrões de galato de propila, butil hidroxianisol, butil hidroxitolueno e a mistura dos três.

As placas de sílica-gel GF-254 foram preparadas em nosso laboratório, com o equipamento Desaga, em placas de vidro de 20x20 cm. Foram também comparadas duas espessuras da camada de sílica (0,25 mm e 0,5 mm). A ativação foi a 110°C por 30 minutos.

Foram testados quatro tempos para saturação da cuba cromatográfica : 0, 10, 20 e 30 minutos.

A separação final se deu aplicando-se 50 µL de amostra e 10 µL dos padrões na camada de sílica-gel GF 254 com 0,5 mm de espessura, desenvolvendo com éter de petróleo / éter etílico / ácido acético (80:10:10) até cerca de 15 cm do ponto de aplicação,

após 20 minutos de saturação da cuba cromatográfica.

Os seguintes padrões foram preparados em etanol: (1) galato de propila - 5 mg / mL; (2) butil hidroxianisol - 5 mg /mL; (3) butil hidroxitolueno - 10 mg / mL; (4) mistura dos três antioxidantes, mantendo-se as mesmas proporções.

3.5. IDENTIFICAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES

3.5.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (UV)

A detecção e identificação dos antioxidantes extraídos de cada amostra foram realizadas varrendo-se o espectro UV de 240 a 320 nm, em espectrofotômetro Varian DMS 80 com cubetas de quartzo de 1 cm.

O comprimento de onda de máxima absorbância é 276 nm para o PG, 278 nm para o BHT e 292 nm para o BHA. Os espectros foram comparados com os dos respectivos padrões (Figura 2).

A identificação, não conclusiva, foi realizada através do comprimento de onda de máxima absorção e do perfil do espectro.

3.5.2. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO VISÍVEL (COLORIMETRIA)

A identificação por colorimetria foi realizada através de reações colorimétricas, específicas para cada antioxidante. A cor azul indica presença de BHA, a cor lilás de galato de propila e a vermelha de BHT.

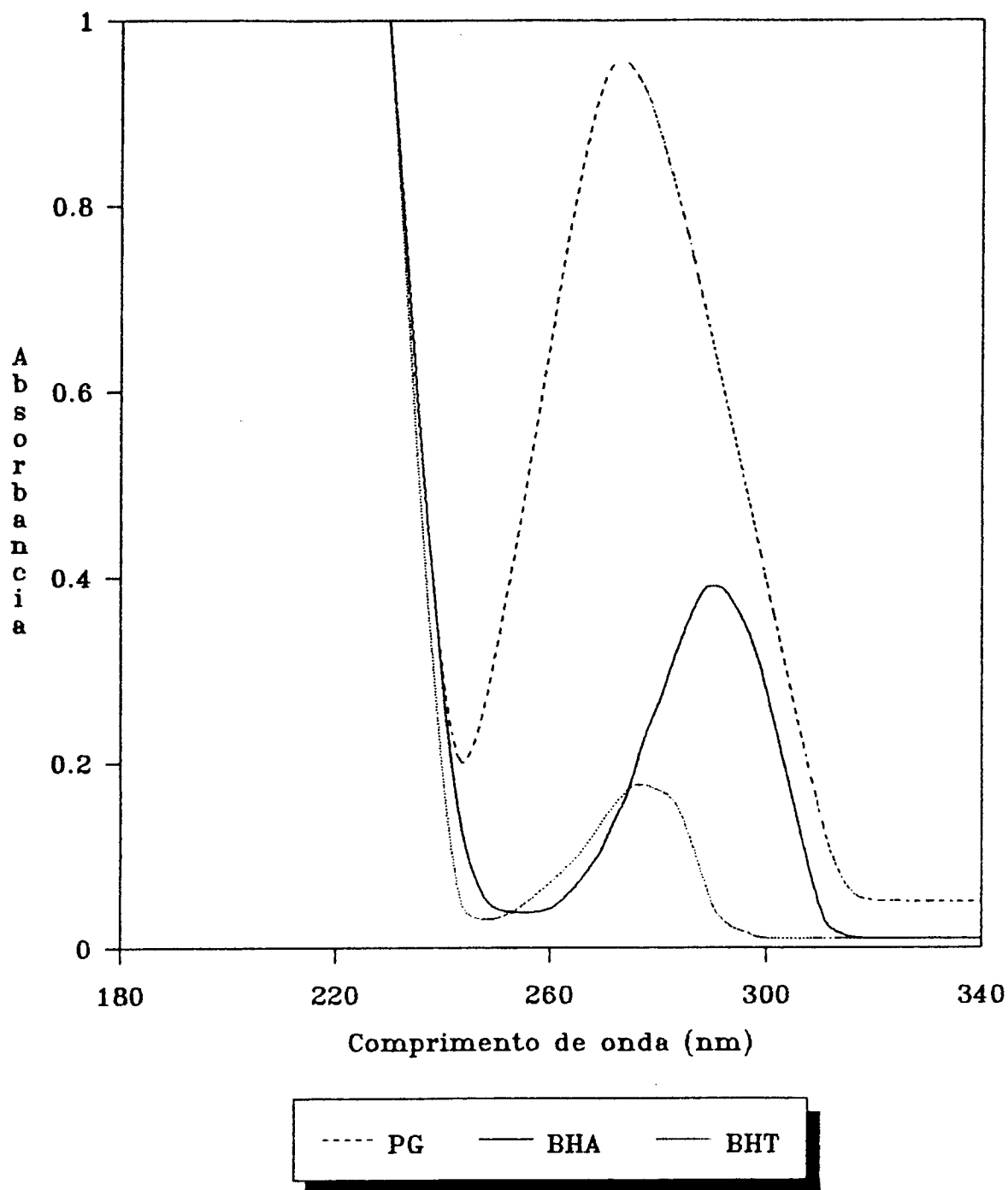


FIGURA 2 - Espectros de absorção no UV dos padrões dos antioxidantes.

3.5.2.1. REAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA O GALATO DE PROPILA (SAHASRABUDHE, 1964)

- 1- Adicionar 5 mL de solução aquosa de acetato de amônia 2,5 % em 5 mL do extrato em solução etanólica 50%.
- 2- Adicionar 1 mL de solução aquosa de sulfato ferroso 0,04 % (esta solução deve ser preparada no dia).
- 3- Esperar 10 minutos.
- 4- Ler a absorbância à 515 nm.

3.5.2.2. REAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA O BHA (SAHASRABUDHE, 1964)

- 1- Adicionar 2 mL de solução aquosa de Bórax 2 % ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) em 10 mL do extrato em solução etanólica 50%.
- 2- Adicionar 2 mL do reagente de Gibb¹
- 3- Deixar em repouso por 15 minutos.
- 4- Adicionar 5 mL de butanol.
- 5- Ler a absorbância a 620 nm.

3.5.2.3. REAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA BHT (SZALKOWSKI & GARBER, 1962)

- 1- Secar sob nitrogênio uma alíquota de 1 mL da solução etanólica da amostra.

¹ 10 mg DO REAGENTE DE GIBB (2,6 DICLOROQUINONA-4-CLORIMINA) DISSOLVIDOS EM 100 mL DE ETANOL 96 % (ESTA SOLUÇÃO DEVE SER PREPARADA NO DIA DE SEU USO).

- 2- Adicionar 25 mL de metanol 50% e transferir para um funil de separação de 60 mL (protegido da luz).
- 3- Adicionar 5 mL de solução de dianisidina²
- 4- Adicionar 2 mL de solução aquosa de nitrito de sódio 3%.
Misturar e deixar em repouso por 10 minutos.
- 5- Adicionar 10 mL de clorofórmio.
- 6- Agitar vigorosamente por 30 segundos.
- 7- Deixar em repouso por três minutos para separar as fases.
- 8- Adicionar 2 mL de metanol anidro em um balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com a fase de clorofórmio obtida no item 7.
- 9- Medir a absorbância a 520 nm.

3.5.3. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA / ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (CCD - UV)

Na camada delgada , as manchas invisíveis à luz natural foram localizadas por lâmpada com radiação ultravioleta curta (254 nm) em uma cabine de luzes UV, marca Hanau, modelo Fluotest. Os antioxidantes aparecem como manchas azuis arroxeadas sobre um

² - DISSOLVER 200 mg DE DIANISIDINA (9,9' DIMETOXIBENZIDINA) EM 50 mL DE METANOL ANIDRO. ADICIONAR 0,1 g DE CARVÃO ATIVADO, AGITAR DURANTE 5 MINUTOS E FILTRAR. NUMA ALÍQUOTA DE 40 mL DO FILTRADO, ADICIONAR 60 mL DE HCL (1 N) (ESTA SOLUÇÃO NÃO PODE SER ESTOCADA).

fundo fluorescente. Os valores dos R_fs entre as manchas e padrões foram comparados como tentativa de identificação.

As manchas, ainda sob a luz ultravioleta, foram marcadas com um lápis, fazendo-se um círculo em torno das mesmas. Posteriormente, estas manchas foram raspadas com uma espátula de aço inoxidável e transferidas individualmente para balões volumétricos de 5 mL. Após adição de 3 mL de etanol 96%, agitou-se o balão por 30 segundos e completou-se o volume. Foi preparado também um branco, raspando-se uma região não utilizada da placa, conforme sugerido por Pinella, Falco & Schwartzman (1966). A separação da sílica foi feita através da centrifugação dessas soluções em centrífuga Fanem à 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma cubeta de quartzo de 1 cm e foi registrado o espectro entre 240 a 320 nm. A identificação foi feita através da comparação entre os espectros de absorção UV das amostras e dos padrões.

3.5.4. CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA / ABSORÇÃO NA REGIÃO VISÍVEL (CCD - COLORIMETRIA)

Todas as etapas descritas no item 3.5.3. até a obtenção do sobrenadante foram realizadas nesse método, variando-se apenas os solventes de diluição. Utilizou-se para BHA e PG o etanol 50% e para BHT metanol 50%. Os sobrenadantes obtidos foram quantitativamente transferidos para tubos de ensaio, onde as reações colorimétricas, descritas no item 3.5.2., foram realizadas

e os antioxidantes identificados pela coloração formada.

3.5.5. CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE

A confirmação da identidade foi concluída, utilizando-se reveladores específicos na camada delgada. Foram testados três maneiras de revelação, descritas abaixo.

3.5.5.1. REVELAÇÃO 1 - CLORETO FÉRRICO - 2,2'BIPIRIDINA (Van Peteghem & Dekeyser, 1981).

- Dissolver 100 mg de cloreto férrico em 100 mL de água destilada.
- Dissolver 500 mg de 2,2'bipiridina em 100 mL de etanol 96%.
- Borrifar a placa cromatográfica com a solução de cloreto férrico.
- Secar com ar frio.
- Borrifar imediatamente com a solução de 2,2'bipiridina.
- A mancha do PG apresenta-se vinho, do BHA laranja e do BHT vermelha.

3.5.5.2. REVELAÇÃO 2 - REAGENTE DE GIBB (Van Peteghem & Dekeyser, 1981).

- Dissolver 100 mg de 2,6 dicloroquinona-4-cloroamina (Reagente de Gibb) em 100 mL de etanol 96%.
- Borrifar a placa cromatográfica com a solução preparada no item acima.

- Aquecer a placa à temperatura de 105°C por cinco minutos.
- Colocar imediatamente a placa em tanque saturado com vapor de amônia.
- A mancha do PG apresenta-se cinza, do BHA roxa e do BHT amarela.

3.5.5.3. REVELAÇÃO 3 - ÁCIDO FOSFOMOLÍBDICO (Jayaraman, Vasundhara & Parihar, 1976).

- Dissolver 10 g do ácido fosfomolíbico em 100 mL de etanol 96%.
- Borrifar a placa cromatográfica com a solução acima.
- Colocar a mesma em tanque saturado com vapor de amônia.
- As manchas dos três antioxidantes apresentam-se azuis.

As separações cromatográficas realizadas antes das revelações foram feitas de acordo com o item 3.4.2., que utiliza sílica-gel GF 254 como adsorvente e éter de petróleo / éter etílico / ácido acético (80:10:10) como solvente.

3.6. QUANTIFICAÇÃO

3.6.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (UV)

Os valores das absorbâncias máximas nos espectros UV dos antioxidantes foram interpolados na curva padrão Absorbância X Concentração. As curvas padrão do BHA e BHT foram construídas a partir das seguintes concentrações: 0, 10, 20, 30 e 40 ppm. As concentrações para se obter a curva padrão do PG foram: 0, 5, 10 e 15 ppm.

3.6.2. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO VISÍVEL (COLORIMETRIA)

Os valores das absorbâncias a 620, 520 e 515 nm para BHA, BHT e PG, respectivamente, após reação de cor específica, foram interpoladas na curva padrão Absorbância X Concentração, que foram construídas nas seguintes concentrações: 0, 3, 5, 7, 10 ppm para o BHT; 0, 5, 10 e 15 ppm para o BHA e 0, 10, 20, 30, 40 ppm para o PG.

3.6.3. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA / ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (CCD - UV)

Os espectros obtidos no item 3.5.3. foram usados para a quantificação dos antioxidantes em CCD - UV. Com os valores máximos das absorbâncias desses espectros e com o procedimento descrito no item 3.6.1., determinou-se as concentrações dos antioxidantes.

3.6.4. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA / ABSORÇÃO NA REGIÃO VISÍVEL (CCD - COLORIMETRIA)

O mesmo procedimento do item 3.5.4. foi aqui utilizado para as reações dos antioxidantes com os reagentes específicos, descritos no item 3.5.2.. A quantificação dos antioxidantes foi feita conforme procedimento descrito no item 3.6.2..

3.7. ESTUDO DE RECUPERAÇÃO.

Os testes de recuperação foram realizados nas amostras onde foi detectada a presença de um dos antioxidantes em estudo. Soluções padrões do PG, BHT e BHA foram adicionadas em torno de 25 % e 50 % do teor do antioxidante encontrado no alimento. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas.

3.8. AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA EM AMOSTRA ISENTA DE ANTIOXIDANTES

Foi selecionada uma amostra que não continha no rótulo nenhum dos três antioxidantes em estudo. A amostra selecionada foi a banha.

Para avaliação da metodologia foram feitos quatro ensaios, adicionando-se os seguintes antioxidantes dissolvidos em etanol 96 %:

- (1) PG;
- (2) BHA;
- (3) BHT;
- (4) mistura dos três antioxidantes.

A adição dos antioxidantes foi realizada, após a fusão da banha em estufa, homogenizando-se com bastão de vidro. A concentração dos antioxidantes na amostra foi de 100 ppm.

Os quatro métodos foram avaliados e comparados entre si.

3.9. DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE MÍNIMA DETECTÁVEL DOS ANTIOXIDANTES

O estudo foi realizado com padrões dos três antioxidantes em várias concentrações. Foi verificada a quantidade mínima detectável para os antioxidantes nos quatro métodos em estudo (UV, Colorimetria, CCD-UV e CCD-Colorimetria). O mínimo detectável é a quantidade mínima do antioxidante que se consegue observar.

Cabe lembrar que as avaliações feitas foram em torno das técnicas de identificação e não dos métodos completos. Considerando que as recuperações foram boas, julga-se desnecessária a avaliação demorada e trabalhosa dos métodos completos.

3.10. AVALIAÇÃO DE TEMPO E CUSTO DOS QUATRO MÉTODOS DE ANÁLISE

O tempo de análise foi medido desde a pesagem da amostra até o cálculo final dos resultados.

O custo de cada método foi avaliado levando-se em conta as quantidades e os preços de todo material utilizado na análise.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das porcentagens dos antioxidantes foram expressos como médias, desvio-padrão e coeficiente de variação

entre triplicatas.

A comparação entre os quatro métodos de determinação de antioxidantes foi efetuada através de análise da variância para verificação se existia diferença entre eles. A comparação entre os métodos dois a dois foi realizada através do Teste de Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS

4.1.1. EXTRAÇÃO

O procedimento 1 (item 3.3.1.) de extração não pôde ser utilizado em amostras gordurosas que se solidificam à temperatura ambiente (gordura vegetal hidrogenada e margarina), pois ocorria precipitação de flocos do material gorduroso tornando, dessa forma, impossível a separação das fases. Para os produtos desidratados e os cárnicos concentrados, esse procedimento também não foi apropriado porque essas amostras continham sólidos que não eram dissolvidos no etanol, impossibilitando a extração em funil de separação. O procedimento 1 foi adequado apenas para amostras líquidas à temperatura ambiente (óleos), não entupindo o funil de separação. Entretanto, o extrato continha resíduos de óleo que eram provenientes de gotículas aderidas ao funil e que permaneciam na fase alcoólica.

Com o objetivo de separar melhor as fases, evitando assim o resíduo de óleo no extrato, foi testado o procedimento 2 (item 3.3.2.), o qual dissolve a amostra em éter de petróleo antes de extrair os antioxidantes por partição em etanol. Mas, à medida que se adicionava novas porções de etanol, uma fração do óleo mudava de fase, passando da fase éterea para a fase alcóolica.

Quando esse procedimento foi testado na gordura vegetal hidrogenada, a inversão também ocorreu. Comparando o procedimento 2 com o utilizado pelo método de extração do BHA, adotado pelo Instituto Adolfo Lutz (1985), observou-se diferença nas concentrações do etanol usado (96 % e 72% respectivamente); por isso não ocorreu inversão das fases no método do Instituto Adolfo Lutz. Mas como o objetivo era a obtenção de um método de extração dos três antioxidantes simultaneamente, descartou-se a possibilidade de utilização desses procedimentos, já que o BHT não seria extraído quantitativamente.

O procedimento 3 (item 3.3.3.) foi o mais adequado para os tipos de amostras em estudo e para os três antioxidantes. Através do resfriamento, a fração gordurosa foi solidificada, ficando retida no papel de filtro, juntamente com os sólidos não solúveis em etanol 96 %, tornando o extrato mais limpo. Outra vantagem observada foi que este procedimento extraiu quantitativamente os três antioxidantes em estudo, conforme verificado nos testes de recuperação realizados na gordura vegetal hidrogenada e na banha (itens 4.1.6. e 4.2.); sendo desta forma adotado como procedimento de extração.

4.1.2. SEPARAÇÃO

A técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) revelou ser vantajosa, pois promoveu a separação entre os antioxidantes, além de separá-los dos possíveis interferentes. A resolução entre os antioxidantes foi demonstrada apenas através

dos padrões dos três antioxidantes dissolvidos em etanol, em óleo de milho e em banha, já que os mesmos não foram encontrados juntos nos produtos analisados, apesar de constarem nos rótulos de alguns produtos, tais como mistura para patês (BHA e BHT), sopas (BHA e PG) e caldo de galinha (BHA e PG).

Na procura do sistema de solvente mais apropriado, foram várias as dificuldades encontradas. A Tabela 5 lista os valores dos Rf's dos antioxidantes, para os vários sistemas de solventes testados. O sistema de solvente hexano / acetona / ácido acético (70:20:10) foi muito eficiente na separação dos interferentes e dos antioxidantes (Figuras 3 e 4) mas não foi escolhido como sistema de solvente, porque a acetona apresenta limite de absorção no UV em 330 nm. Desta forma o branco da camada apresentou um espectro com máximo de absorção próximo ao do BHA. Quando o padrão do BHA foi raspado da placa e analisado o espectro apresentou um pico negativo.

Para evitar esse problema, trocou-se a acetona pelo etanol, pois os índices de polaridade dos dois são bem próximos e o limite de absorção no UV do etanol é em 200 nm. A proporção de 60 ml de hexano, 30 ml de etanol e 10 ml de ácido acético foi a que proporcionou melhor separação dos antioxidantes e dos interferentes, mas o fator tempo limitou a utilização dessa fase móvel, porque a placa gastou duas horas para eluir.

Foram testados, em seguida, outras proporções da mistura de hexano e ácido acético, mas nenhuma foi considerada boa porque o Rf do galato de propila foi zero em todas as proporções dos solventes testadas.

TABELA 5 - VALORES DE R_f PARA O PG, BHA E BHT EM VARIOS SISTEMAS DE SOLVENTES.

FASE MÓVEL	R _f		
	PG	BHA	BHT
Clorofórmio: Metanol: Ácido Acético (90:10:2)	0,67	0,90	0,99
Éter de petróleo: Benzeno: Ácido Acético (40:40:20)	0,21	0,80	0,96
Éter de petróleo:Éter etílico:Ác. Acético (40:40:20)	0,80	0,83	0,96
Éter de petróleo:Éter etílico:Ác. Acético (50:40:10)	0,80,	0,91	0,98
Éter de petróleo:Éter etílico:Ác. Acético (60:30:10)	0,65	0,90	0,98
Éter de petróleo:Éter etílico:Ác. Acético (70:20:10)	0,36	0,83	0,97
Éter de petróleo:Éter etílico:Ác. Acético (80:10:10)	0,18	0,48	0,97
Éter de petróleo:Éter etílico:Ác. Acético (85:10:5)	0,05	0,33	0,96
Hexano: Ácido Acético (70:30)	0,03	0,35	0,90
Hexano: Ácido Acético (80:20)	0,00	0,36	0,90
Hexano: Ácido Acético (85:15)	0,00	0,29	0,89
Hexano: Ácido Acético (90:10)	0,00	0,29	0,91

TABELA 5 - CONTINUAÇÃO.

FASE MÓVEL	Rf		
	PG	BHA	BHT
Hexano: Acetona: Ácido Acético (65:25:10)	0,20	0,70	0,97
Hexano: Acetona: Ácido Acético (70:20:10)	0,15	0,54	0,96
Hexano: Acetona: Ácido Acético (75:15:10)	0,12	0,48	0,96
Hexano: Acetona: Ácido Acético (80:10:10)	0,00	0,37	0,96
Hexano: Etanol: Ácido Acético (60:20:20)	0,17	0,35	0,96
Hexano: Etanol: Ácido Acético (60:30:10)	0,20	0,40	0,94
Hexano: Etanol: Ácido Acético (70:20:10)	0,07	0,20	0,94

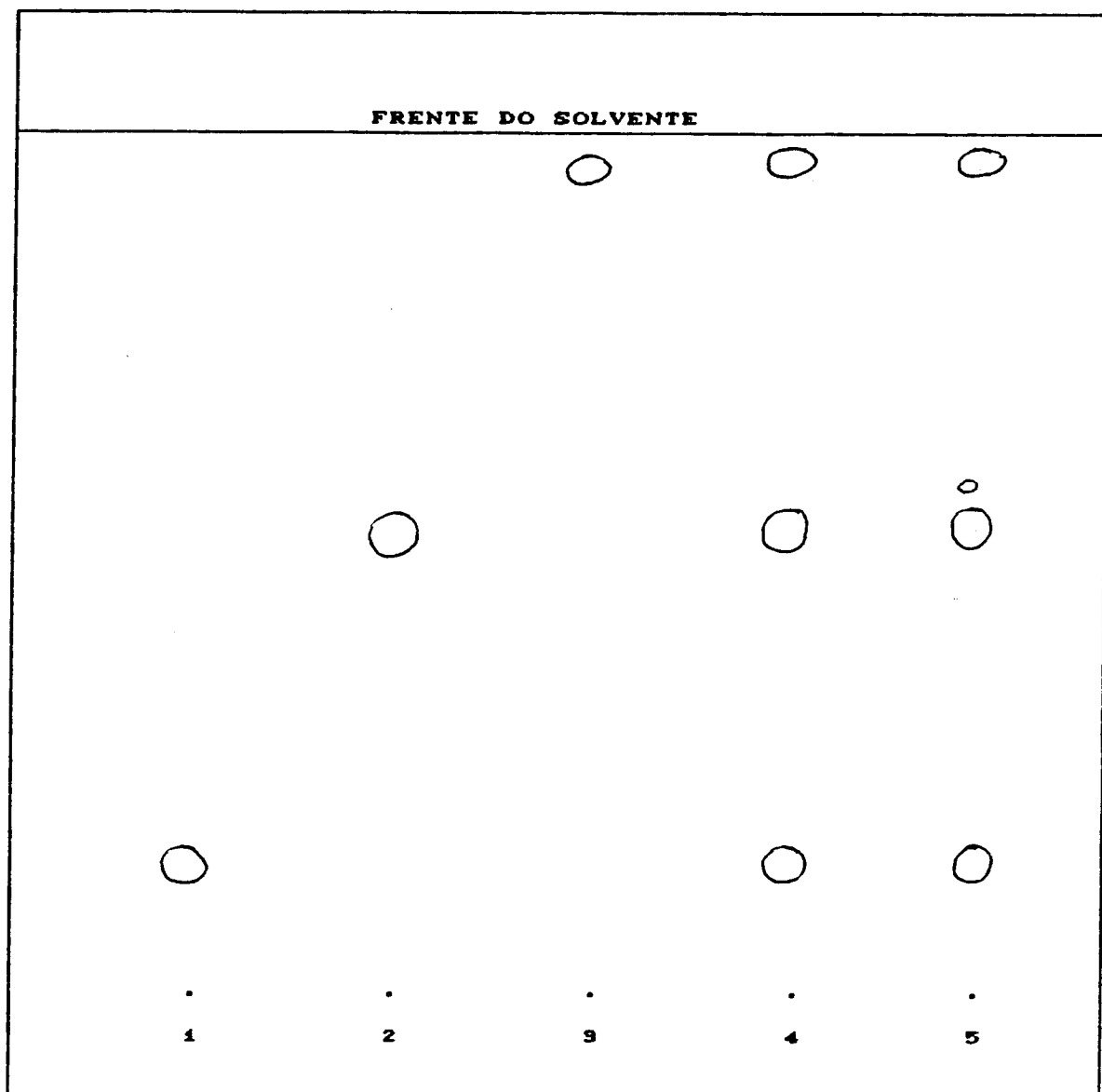


FIGURA 3 - Reprodução da cromatografia em camada delgada revelada por radiação UV à 254 nm (sílica-gel fluorescente GF 254 desenvolvida em hexano / acetona / ácido acético (70:20:10)) nos seguintes produtos: 1. PG, 2. BHA, 3. BHT, 4. mistura dos três antioxidantes, 5. Óleo de milho mais mistura dos três antioxidantes.

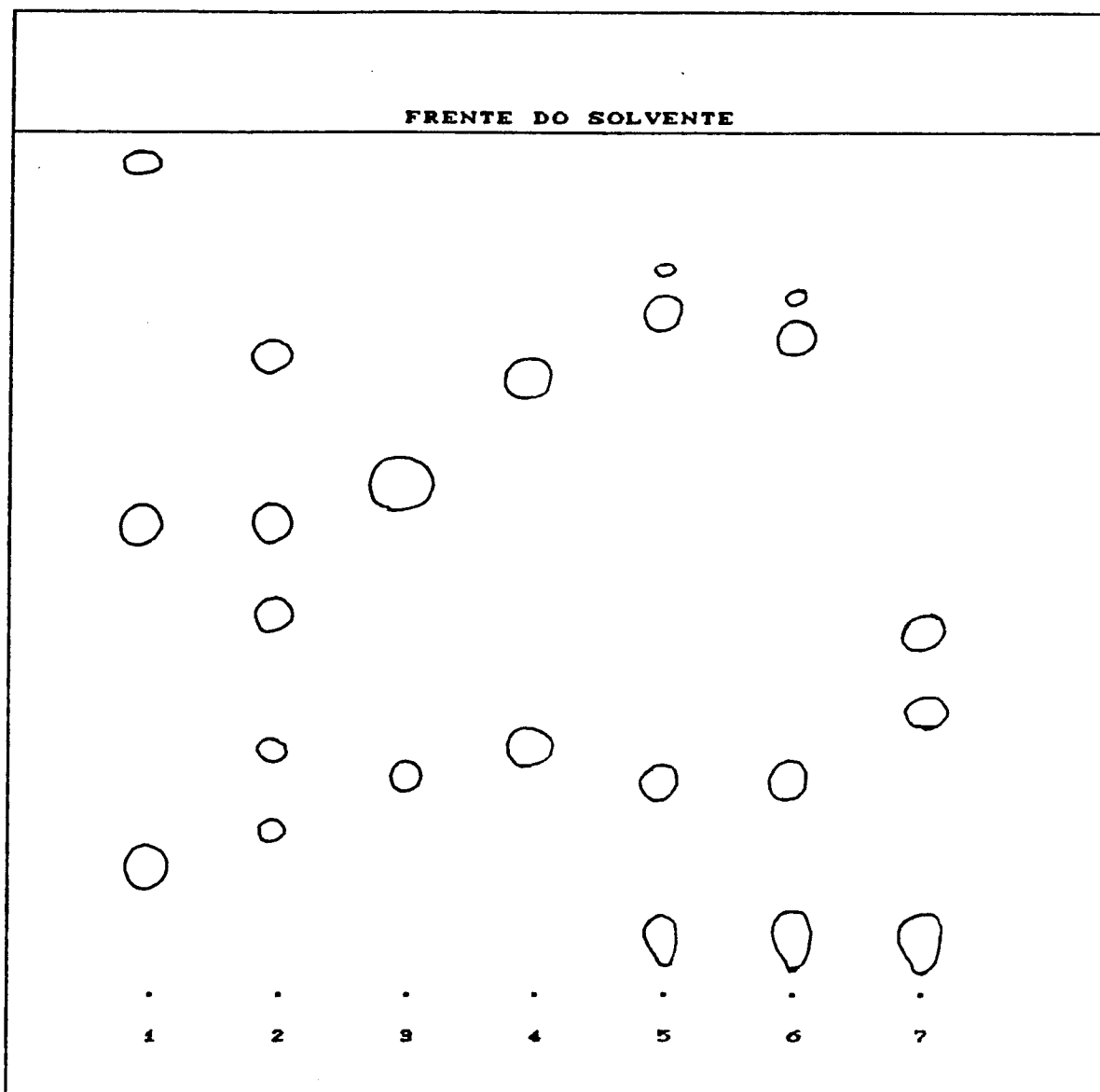


FIGURA 4 - Reprodução da cromatografia em camada delgada, revelada por radiação UV à 254 nm (sílica-gel fluorescente GF 254 desenvolvida em hexano / acetona / ácido acético (70:20:10)), nos seguintes produtos: 1. Mistura dos três antioxidantes, 2. Gordura vegetal hidrogenada, 3. Margarina, 4. Sopa, 5. Caldo de Galinha, 6. Caldo de Carne, 7. Mistura para Patês.

O sistema de solventes que se mostrou mais apropriado foi o éter de petróleo / éter etílico / ácido acético (80:10:10), apresentando boa separação dos três antioxidantes e interferentes e tendo limite de absorção no UV abaixo do comprimento de onda de absorção dos antioxidantes. O tempo gasto para eluição foi de aproximadamente 40 minutos. As Figuras 5 e 6 mostram as reproduções das cromatografias em camada delgada eluídas com este solvente, podendo ser observado que, se os antioxidantes estivessem presentes nos produtos analisados, haveria boa separação entre eles e as substâncias interferentes presentes em cada produto. A margarina possui um interferente que apresenta uma mancha com Rf bem próximo ao do BHA, o qual poderia comprometer a eficiência de separação deste antioxidante; entretanto, isto não ocorre, uma vez que costuma-se utilizar BHT em vez de BHA, conforme descrito no rótulo do produto.

Quando foi estudada a espessura da camada de sílica-gel, verificou-se que, usando uma espessura de 0,25 mm, havia formação de manchas com caudas, e no ponto de aplicação as manchas ficavam muito grandes; esses problemas não foram verificados quando a espessura usada foi de 0,5 mm.

Entre as variações do tempo de saturação da cuba cromatográfica, as que apresentaram melhores resultados foram as de 20 e 30 minutos. Optamos por 20 minutos porque houve boa reprodutibilidade dos resultados em menor tempo.

Resumindo, as condições ótimas de separação foram as seguintes:

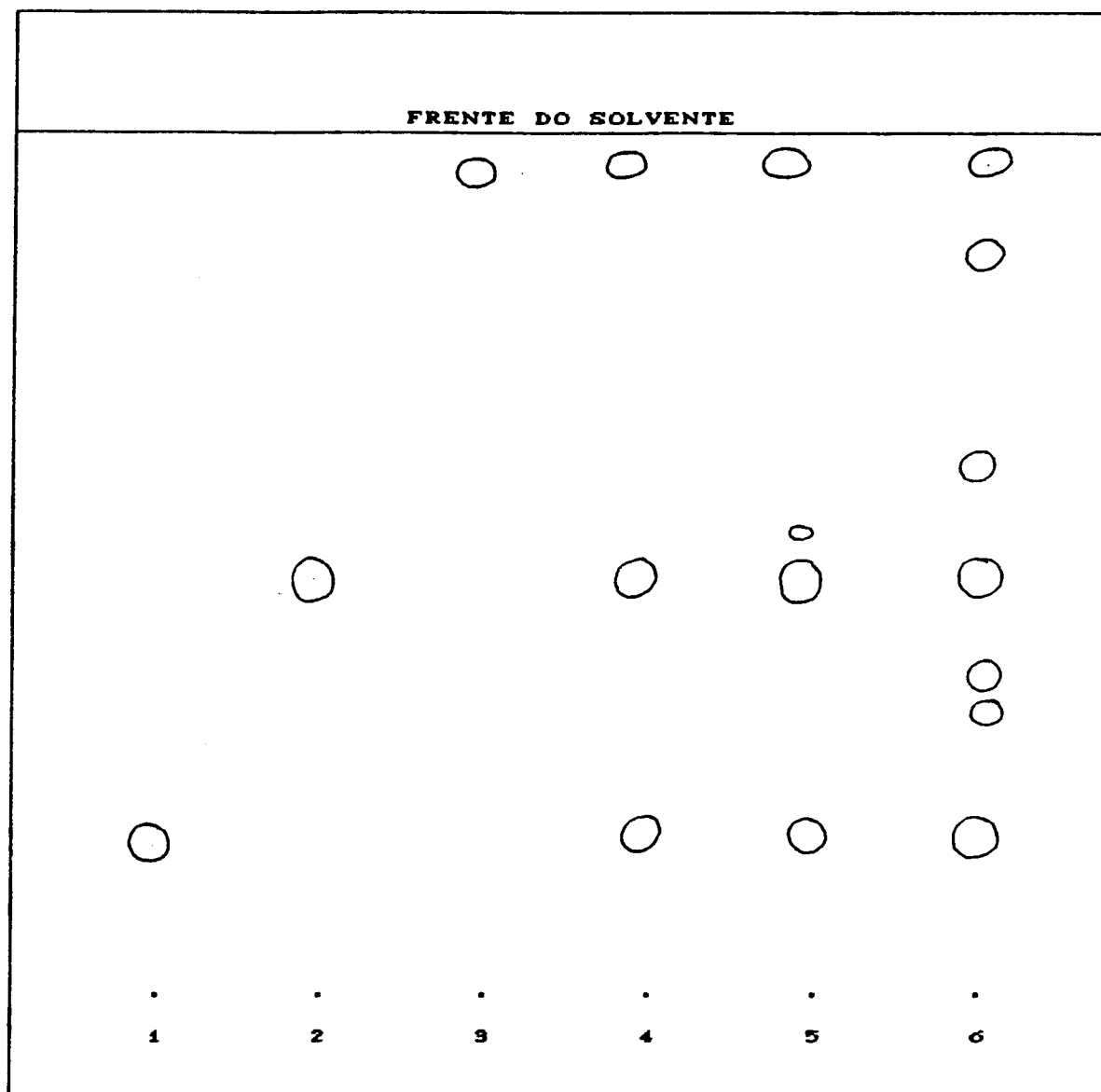


FIGURA 5 - Reprodução da cromatografia em camada delgada revelada por radiação UV à 254 nm (sílica-gel fluorescente GF 254 desenvolvida em éter de petróleo / éter etílico / ácido acético (80:10:10)) nos seguintes produtos: 1. PG, 2. BHA, 3. BHT, 4. mistura dos três antioxidantes, 5. Óleo de milho mais os três antioxidantes, 6. banha mais os três antioxidantes.

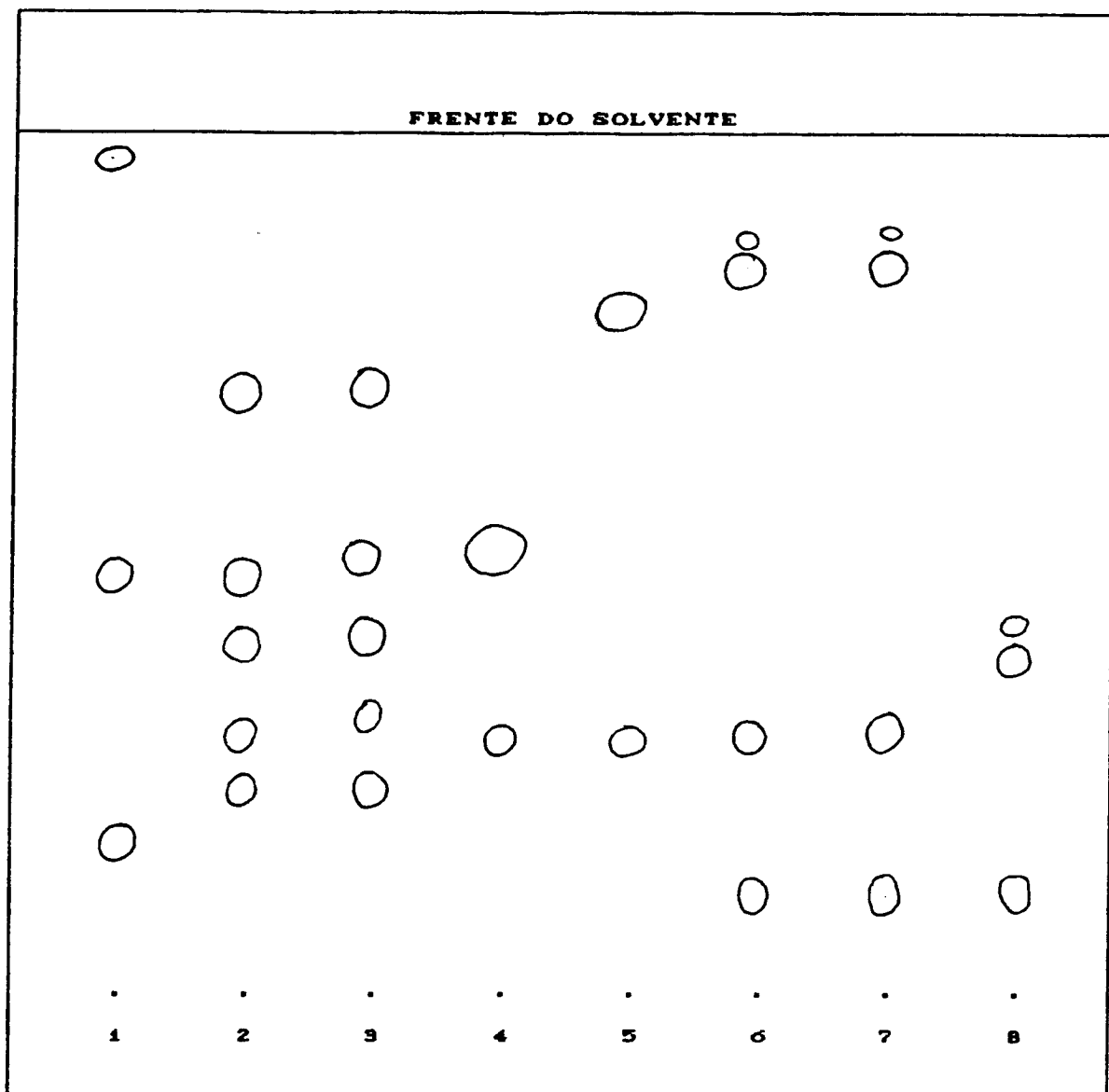


FIGURA 6 - Reprodução da cromatografia em camada delgada revelada por radiação UV à 254 nm (sílica-gel fluorescente GF 254 desenvolvida em éter de petróleo / éter etílico / ácido acético (80:10:10)) nos seguintes produtos: 1. Mistura dos três antioxidantes, 2. Gordura vegetal hidrogenada (primeira amostra), 3. Gordura vegetal hidrogenada (amostras posteriores), 4. Margarina, 5. Sopa, 6. Caldo de Galinha, 7. Caldo de Carne, 8. Mistura para Patês.

- fase estacionária: sílica-gel GF 254;
- espessura da camada: 0,5 mm;
- fase móvel: éter de petróleo / éter etílico / ácido acético (80:10:10);
- tempo de saturação da cuba: 20 minutos
- volume de aplicação da amostra: 50 μ L
- altura de corrida da fase móvel a partir do ponto de aplicação: 15 cm.

4.1.3 IDENTIFICAÇÃO

4.1.3.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (UV)

GORDURA VEGETAL HIDROGENADA - Somente na primeira amostra analisada, o espectro de absorção do extrato na região ultravioleta (UV), comparado com o do padrão de BHA, revelou a possível presença desse antioxidante no produto, como especificado no rótulo. Nas amostras seguintes (cinco) os espectros obtidos já não foram idênticos ao do padrão do BHA, demonstrando existir alguma alteração na formulação do produto (Figura 7).

MARGARINA - O espectro UV, obtido do extrato de margarina, apresentou um máximo à 255 nm, podendo ser devido à presença de ácido sórbico (conservador) (Figura 8). Isto demonstra que este método não é apropriado para determinação de antioxidante nessa matriz, sendo necessário a separação dos interferentes por

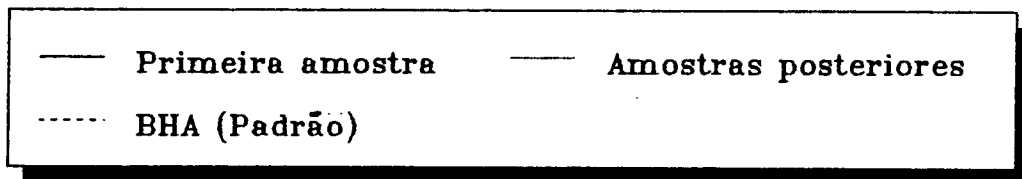
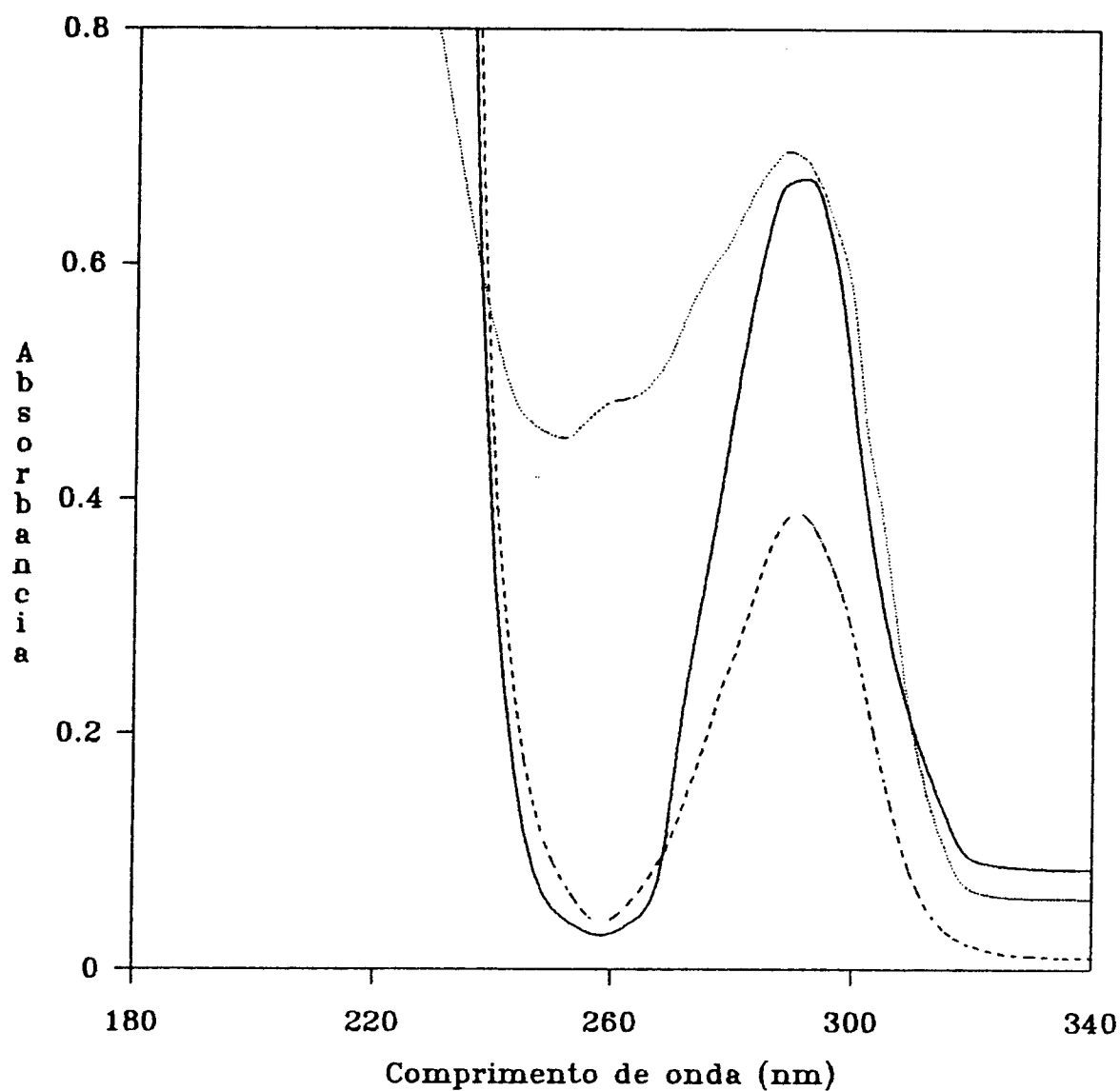


FIGURA 7 - Espectros de absorção no UV do extrato obtido a partir da gordura vegetal hidrogenada e do padrão (BHA).

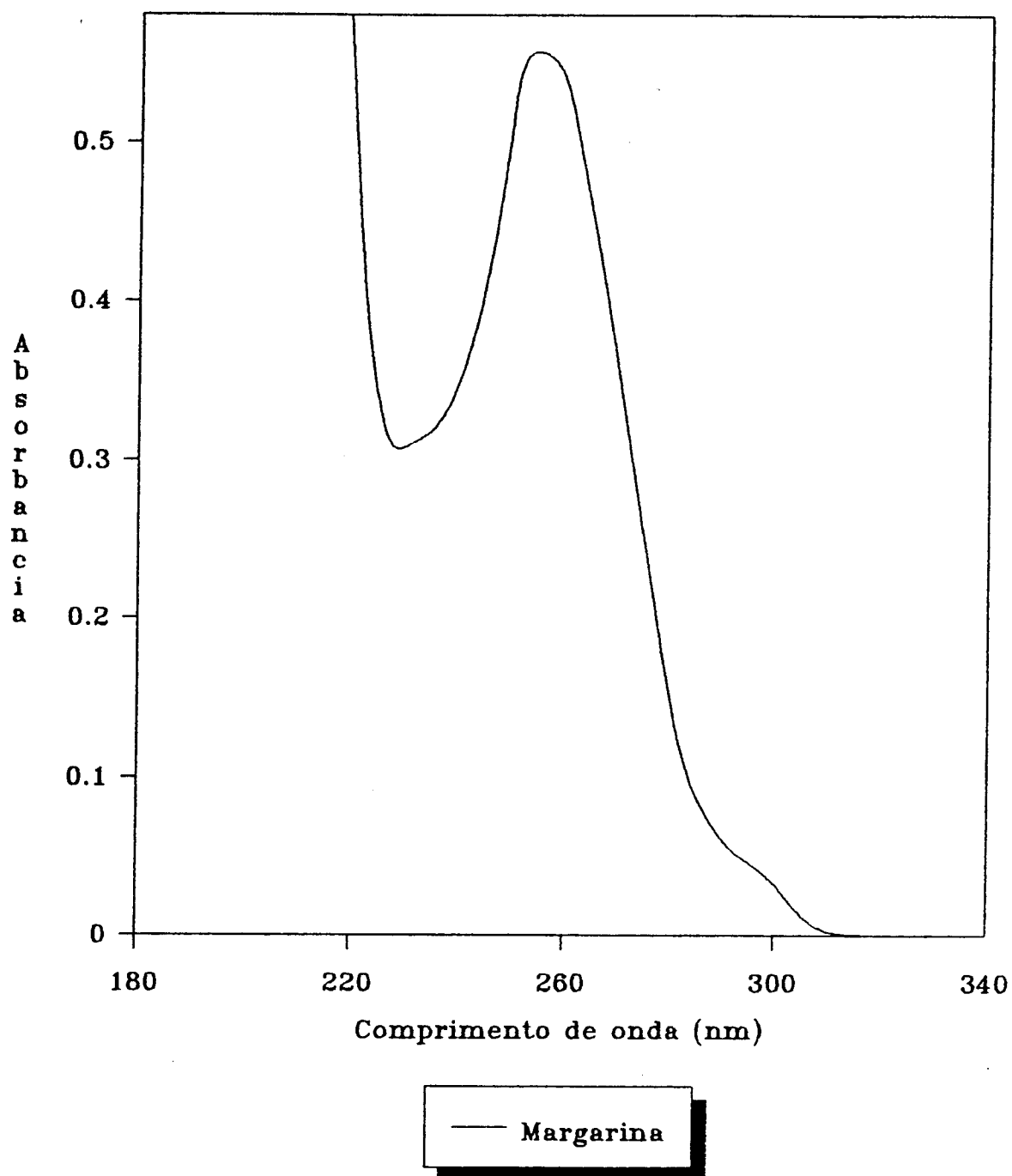


FIGURA 8 - Espectro de absorção no UV do extrato obtido a partir da margarina.

cromatografia em camada delgada

OUTROS PRODUTOS (CALDO DE GALINHA, CALDO DE CARNE, SOPA MISTURA PARA PATES) - Os espectros desses produtos não apresentaram nenhum pico bem definido, sugerindo que fosse utilizado a cromatografia em camada delgada para separar os interferentes (Figura 9).

4.1.3.2. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO VISÍVEL (COLORIMETRIA)

GORDURA VEGETAL HIDROGENADA - Uma vez detectada a presença do BHA na primeira amostra analisada (amostra preliminar), através do método UV direto, optamos por não fazer as determinações colorimétricas nessa amostra, e fazê-las nas cinco amostras seguintes de uma só vez, com o objetivo de economizar reagentes. Como a formulação do produto foi alterada, e BHA tendo sido não mais adicionado, as determinações colorimétricas nas cinco amostras analisadas posteriormente deram resultados negativos para o BHA, isto é, não houve o aparecimento da cor azul característica da reação da BHA com reagente de Gibb.

MARGARINA - Quando o extrato foi submetido à reação com a dianisidina, não houve o aparecimento da cor vermelha característica da reação com o BHT. Desta maneira não foi identificada a presença desse antioxidante, apesar de estar mencionado no rótulo .

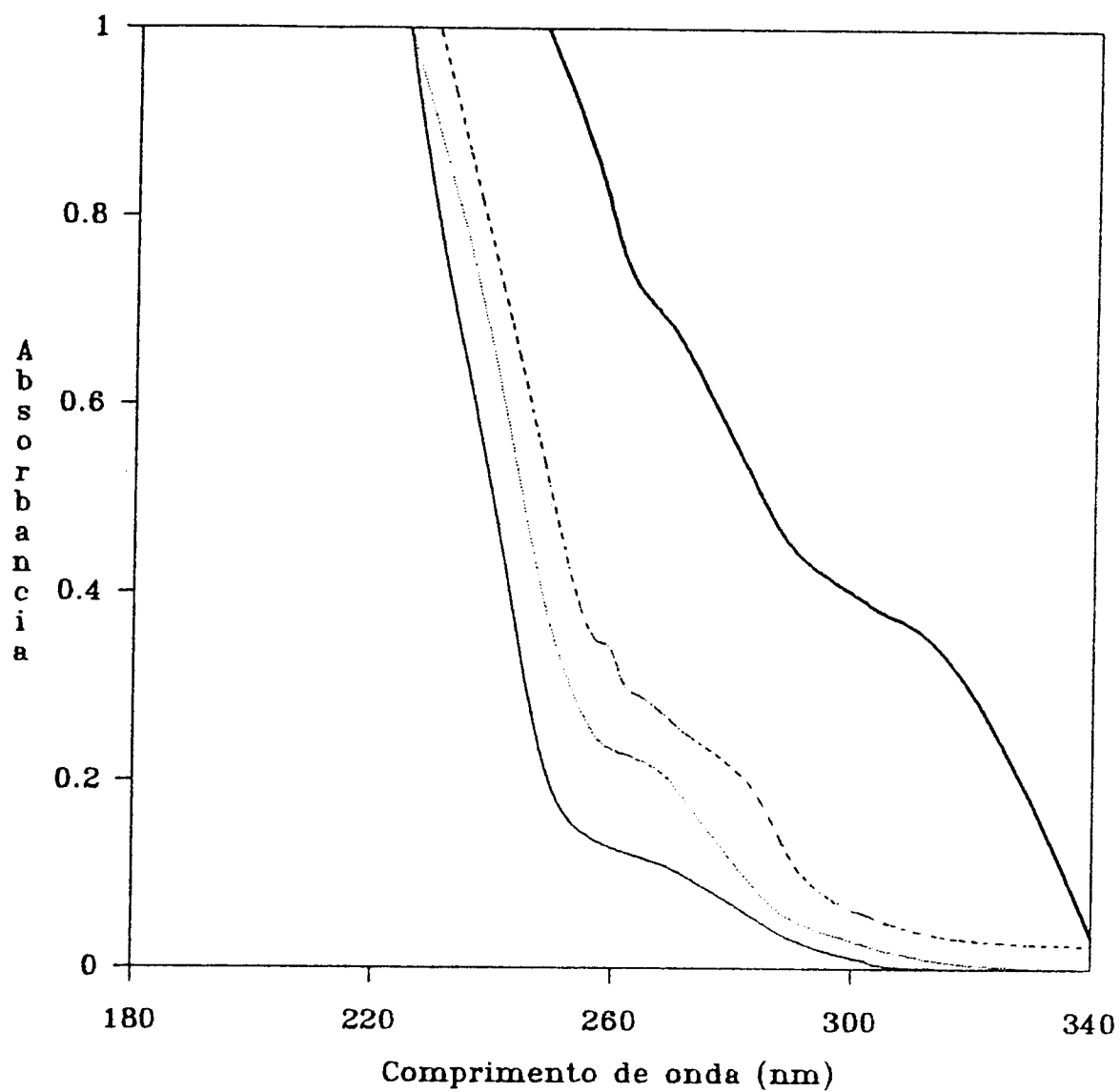


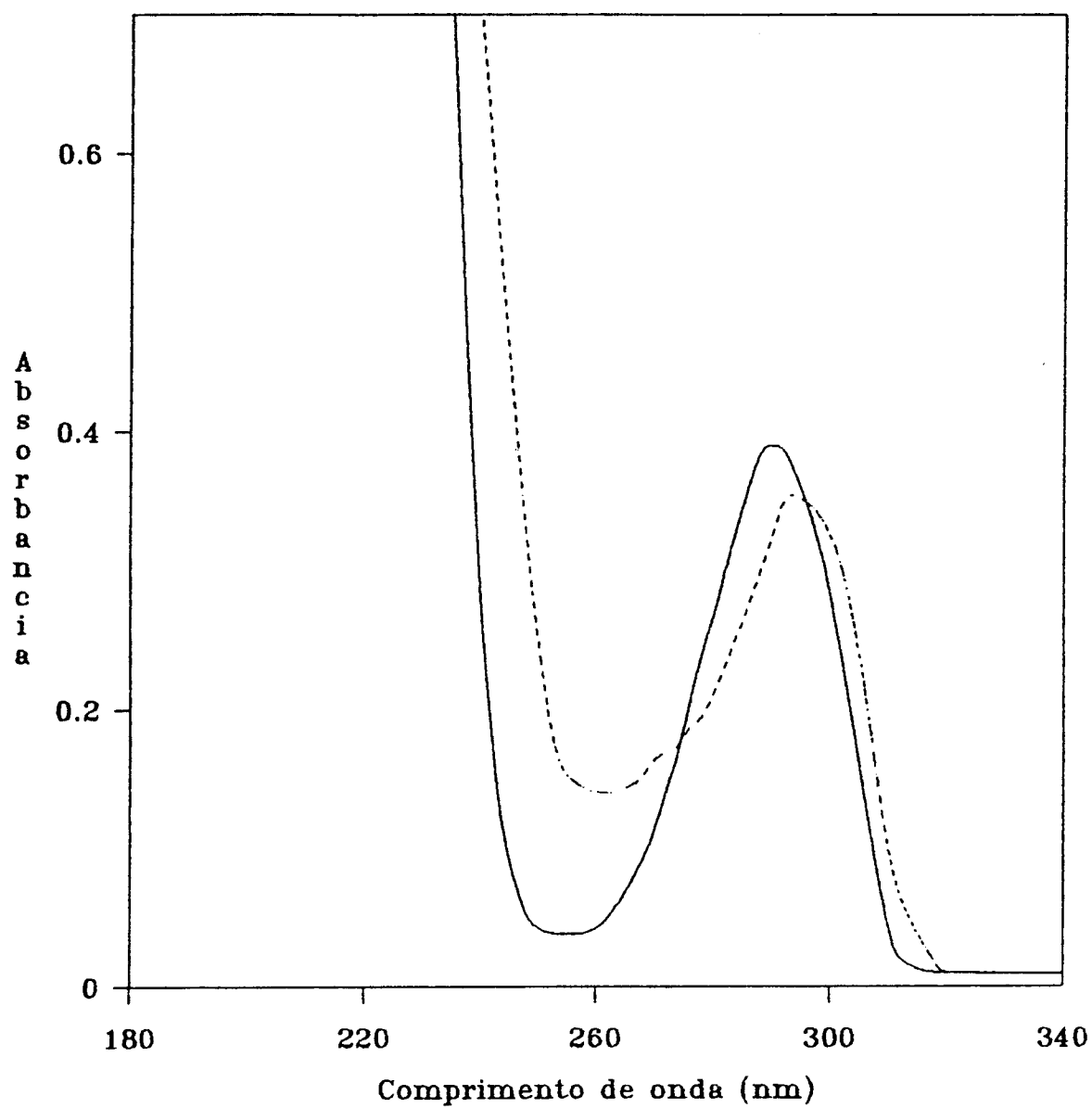
Figura 9 - Espectros de absorção no UV dos extratos obtidos a partir dos outros produtos.

OUTROS PRODUTOS (CALDO DE GALINHA, CALDO DE CARNE, SOPA E MISTURA PARA PATES) - Quando esses produtos foram submetidos às reações colorimétricas, conforme descrito no item 3.5.2., não houve formação de coloração característica para identificação dos antioxidantes. Portanto, apesar de constarem no rótulo algum dos antioxidantes em estudo, estes não foram adicionados até o limite de detecção da técnica.

4.1.3.3. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA / ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (CCD - UV)

GORDURA VEGETAL HIDROGENADA - O extrato da primeira amostra (amostra preliminar) não foi raspado da placa cromatográfica, pelo mesmo motivo citado no item 4.1.3.2.. Os extratos das cinco amostras posteriores foram separados por CCD, e foi detectado uma mancha com valor de Rf bem próximo ao do padrão do BHA. Posteriormente, foi levantado o espectro dessa mancha e do padrão do BHA e observou-se que os perfis foram muito semelhantes. Isto sugere que a mancha, separada por CCD, seja o antioxidante BHA, adicionado ao produto (Figura 10).

OUTROS PRODUTOS (CALDO DE CARNE, CALDO DE GALINHA, SOPA, MISTURA PARA PATES E MARGARINA) - Não foram observadas manchas com valores de Rfs iguais aos dos antioxidantes em estudo (padrões), indicando que esses antioxidantes não estavam presentes nesses produtos.



----- GVH (A. Posteriores) — BHA (Padrão)

FIGURA 10 - Espectros de absorção CCD-UV do extrato obtido a partir da gordura vegetal hidrogenada e do padrão (BHA).

4.1.3.4. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA / ABSORÇÃO NA REGIÃO VISÍVEL (CCD - COLORIMETRIA)

CORDURA VEGETAL HIDROGENADA - Após separação em CCD, a mancha com valor de Rf próximo ao do padrão de BHA foi raspada e analisada (reação colorimétrica), conforme o item 3.5.4.. Não foi observado formação de cor azul, característica da reação com BHA, indicando que esta mancha não era este antioxidante.

OUTROS PRODUTOS (CALDO DE CARNE, CALDO DE GALINHA, SOPA, MISTURA PARA PATÊS E MARGARINA) - Como não houve o aparecimento de manchas com valores de Rfs iguais aos dos padrões dos antioxidantes em estudo, este método não foi realizado para estes produtos.

4.1.4. CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO

A confirmação da identidade foi realizada através de três parâmetros: (1) espectro UV ou absorção no comprimento de onda fixo, após reação colorimétrica, (2) Valor do Rf comparado com os dos padrões e (3) revelação dos antioxidantes com reagentes colorimétricos específicos na camada delgada.

A revelação, utilizando o ácido fosfomolibdico, foi eliminada para confirmação pois os três antioxidantes e alguns interferentes ficaram todos azuis. O revelador 1 (cloreto férrico / 2,2' bipyridina) apresentou uma diferenciação boa e específica

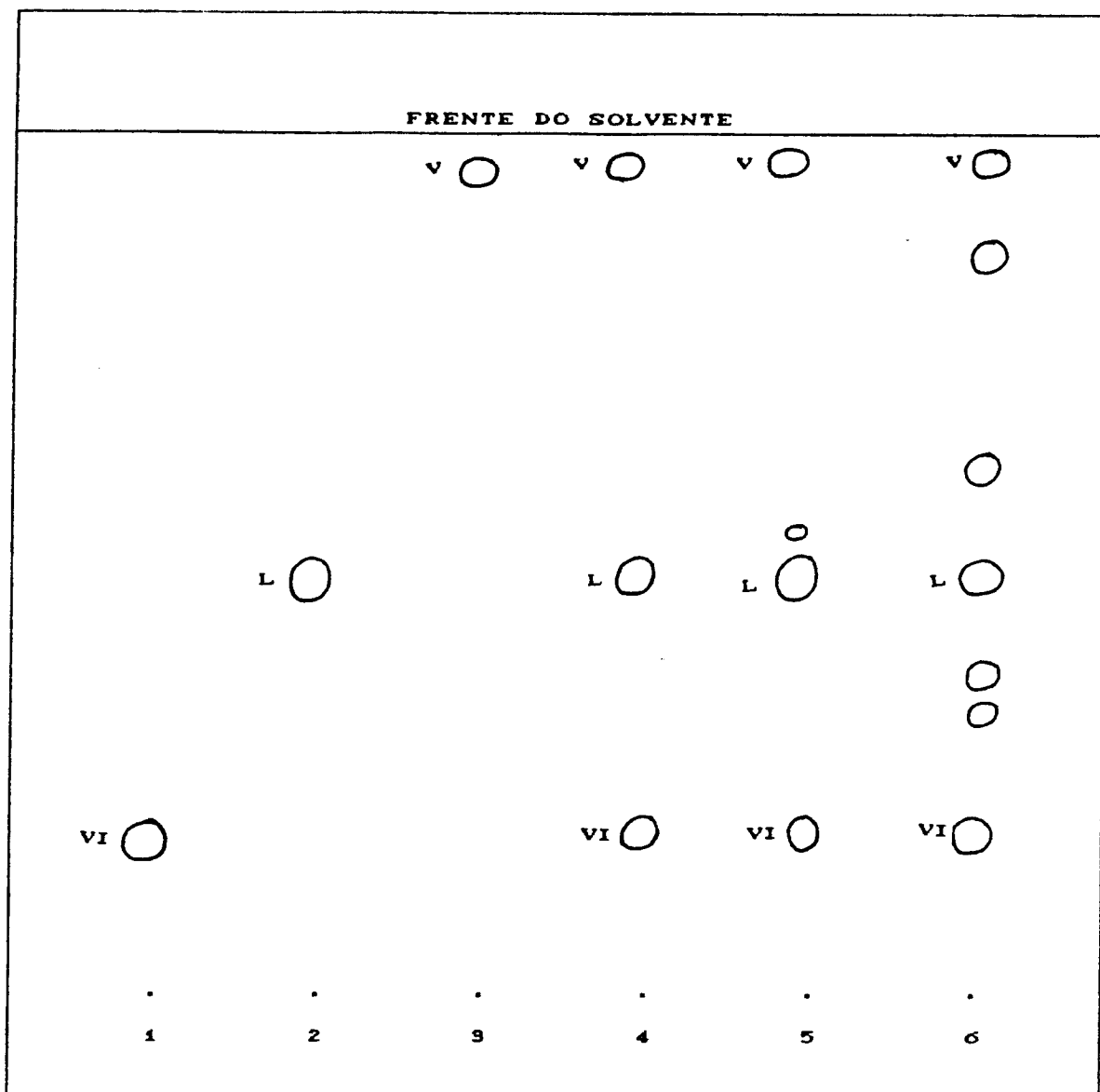
entre as cores das manchas dos três antioxidantes, sendo que a cor vermelha, específica do BHT, só apareceu após 15 minutos (Figuras 11 e 12). O revelador 2 (reagente de Gibb), também apresentou cores específicas para cada antioxidante (Figuras 13 e 14).

Amostras de gordura vegetal hidrogenada adquiridas em épocas diferentes foram analisadas. Na primeira amostra confirmou-se a presença do BHA, pois foi observada a cor roxa com o reagente de Gibb e a cor laranja com o cloreto férrico / 2,2' bipiridina. Nas amostras adquiridas posteriormente (cinco), uma mancha de R_f próximo ao do BHA foi visualizada na exposição da placa à radiação UV a 254 nm; porém, as revelações pelas duas técnicas apresentaram resultados negativos, salientando a necessidade da confirmação da identidade.

Nos demais produtos, a ausência de cores características na reação com os dois reveladores confirmaram que nenhum dos três antioxidantes foram adicionados nestes produtos até o limite de detecção da técnica.

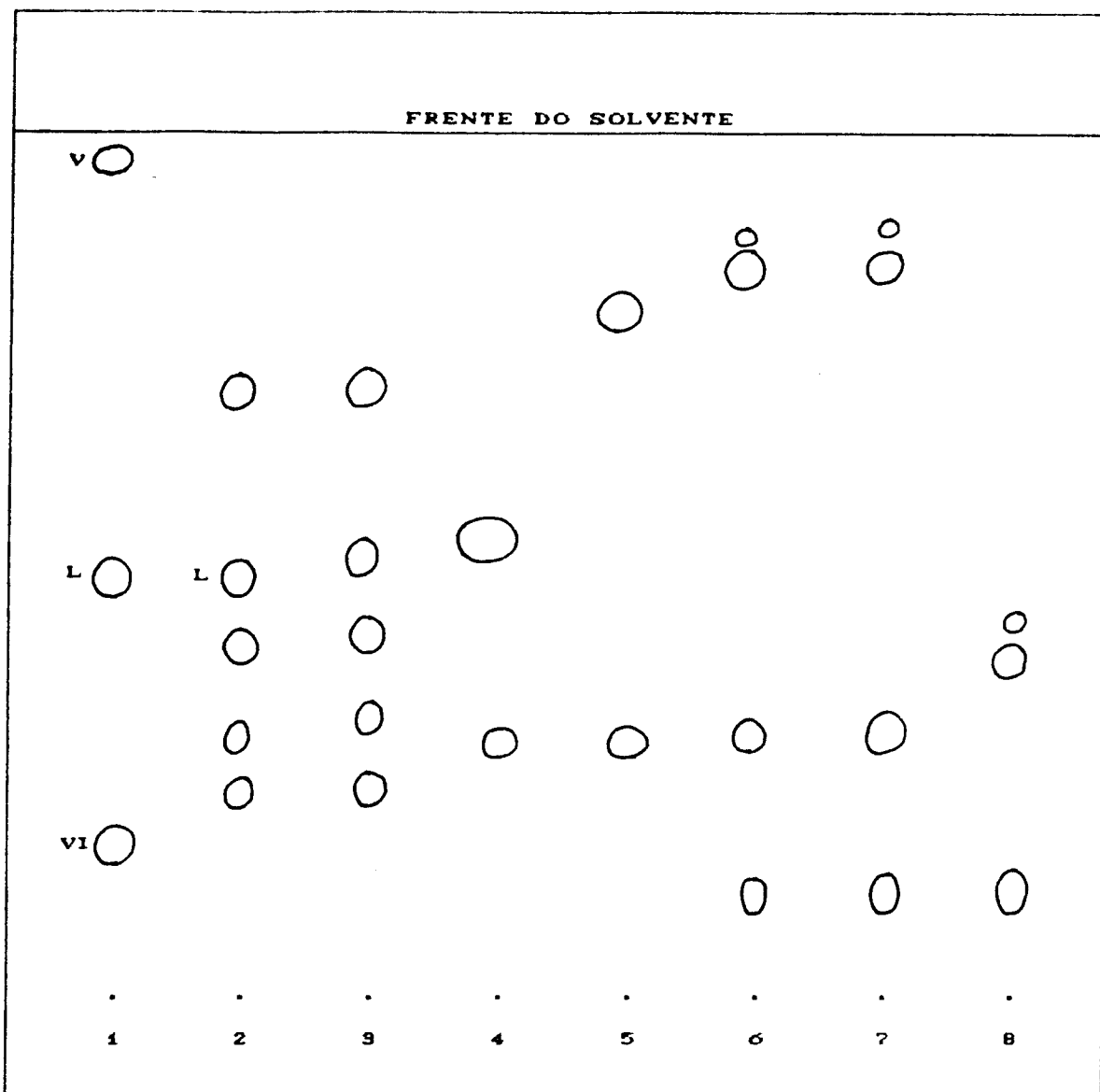
4.1.5. QUANTIFICAÇÃO

A etapa de quantificação não foi completada porque, ao se fazer a análise pelos quatro métodos (absorção no UV, CCD-UV, colorimetria e CCD-colorimetria), não foi encontrado nenhum produto com algum dos três antioxidantes. Portanto, esta etapa do método só foi realizada na gordura vegetal hidrogenada, na primeira amostra (amostra preliminar), pois foi o único onde foi



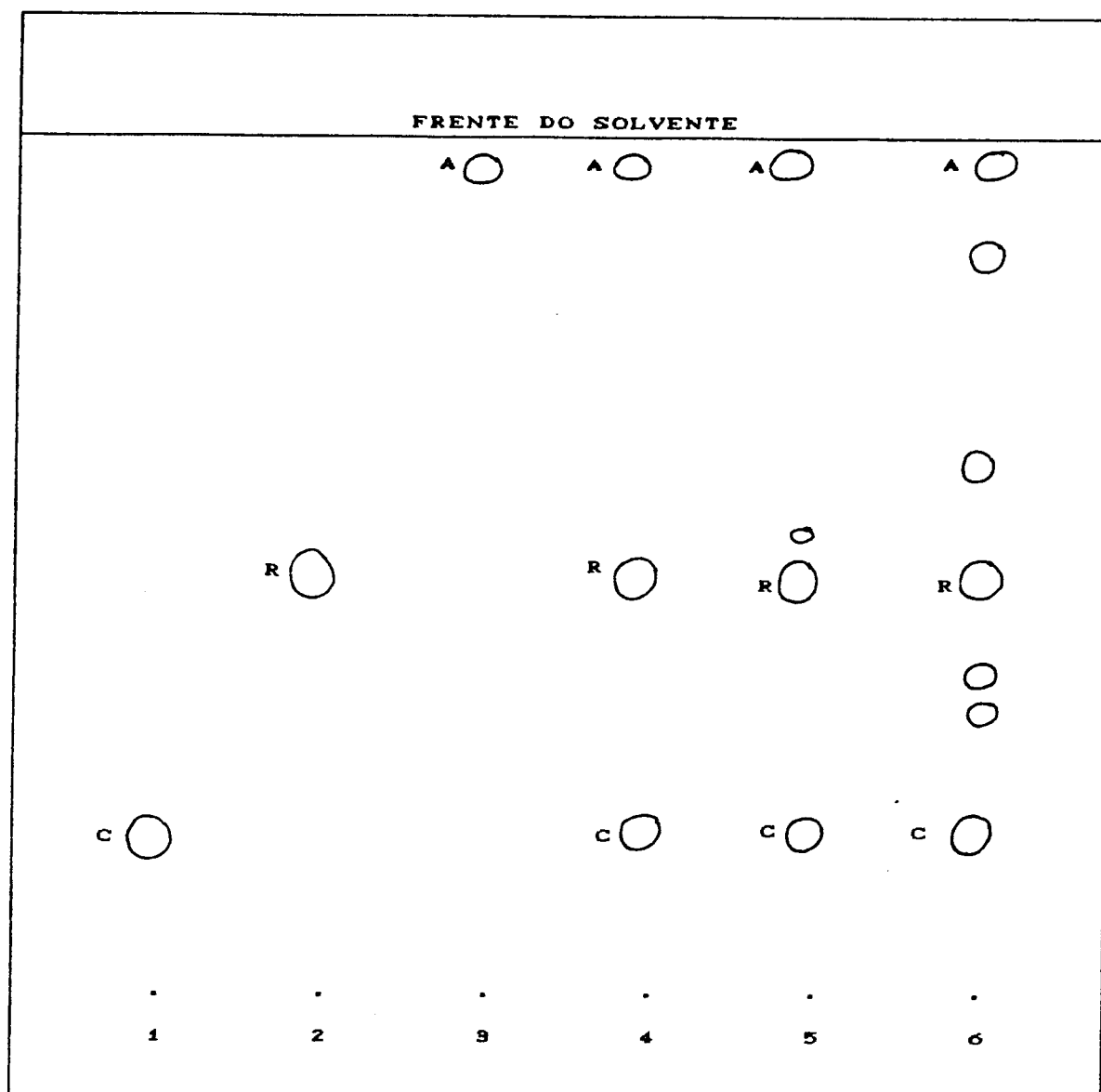
V - VERMELHO; L - LARANJA; VI - VINHO

FIGURA 11 - Reprodução da cromatografia em camada delgada (desenvolvida em éter de petróleo / éter etílico / ácido acético (80:10:10)) revelada com cloreto férrico / 2,2' bipyridina nos seguintes produtos: 1. PG, 2. BHA, 3. BHT, 4. mistura dos três antioxidantes, 5. Óleo de milho (mais os três antioxidantes), 6. banha (mais os três antioxidantes).



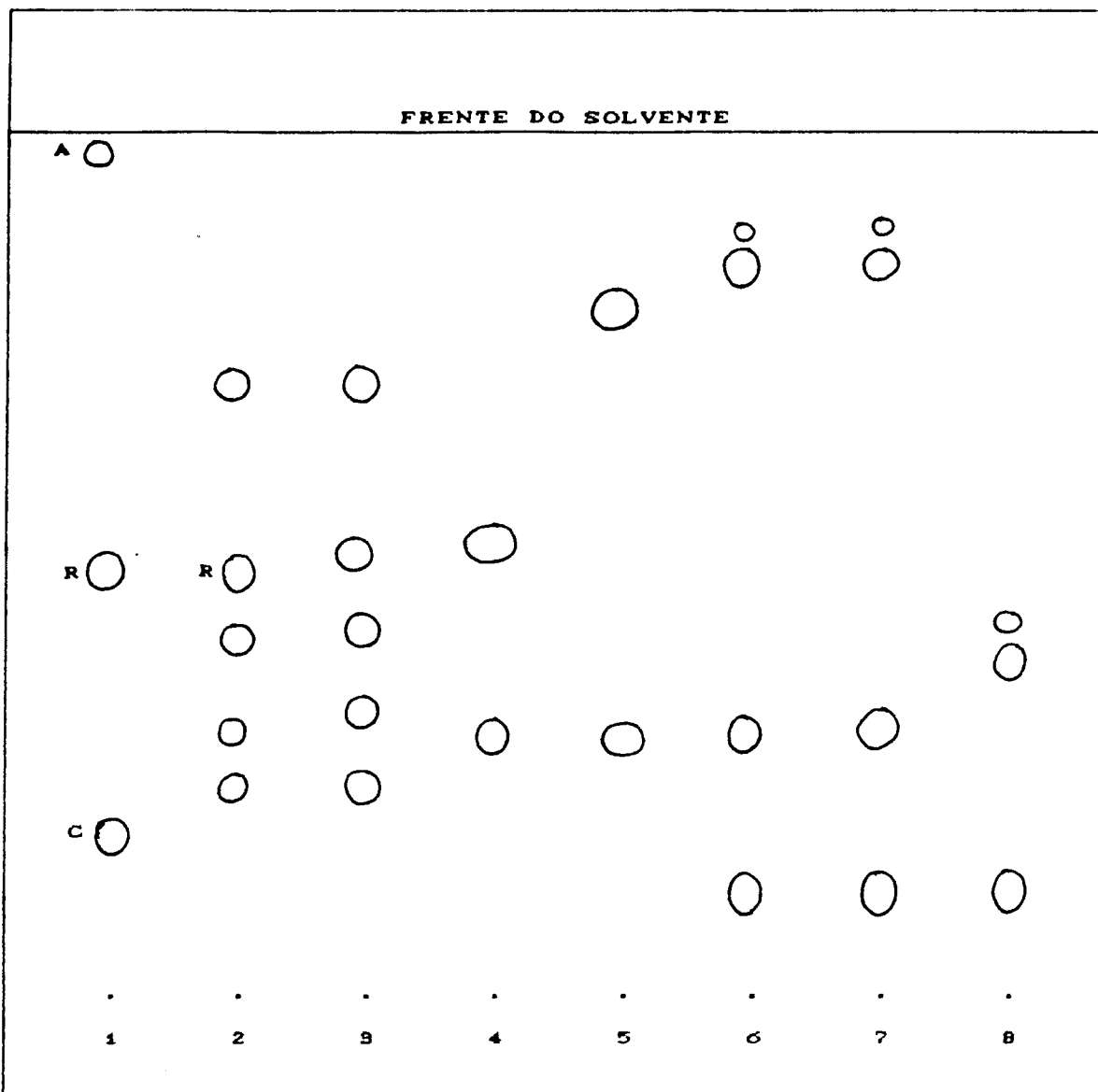
V - VERMELHO; L - LARANJA; VI - VINHO

FIGURA 12 - Reprodução da cromatografia em camada delgada (desenvolvida em éter de petróleo / éter etílico / ácido acético (80:10:10)) revelada com cloreto férrico / 2,2' bipyridina nos seguintes produtos: 1. Mistura dos três antioxidantes, 2. Gordura vegetal hidrogenada (primeira amostra), 3. Gordura vegetal hidrogenada (amostras posteriores), 4. Margarina, 5. Sopa, 6. Caldo de Galinha, 7. Caldo de Carne, 8. Mistura para Patês.



C - CINZA; R - ROXO; A - AMARELO

FIGURA 13 - Reprodução da cromatografia em camada delgada (desenvolvida em éter de petróleo / éter etílico / ácido acético (80:10:10)) revelada com reagente de Gibb nos seguintes produtos: 1. PG, 2. BHA, 3. BHT, 4. mistura dos três antioxidantes, 5. Óleo de milho (mais os três antioxidantes), 6. banha (mais os três antioxidantes).



C - CINZA; R - ROXO; A - AMARELO

FIGURA 14 - Reprodução da cromatografia em camada delgada (desenvolvida em éter de petróleo / éter etílico / ácido acético (80:10:10)) revelada com reagente de Gibb nos seguintes produtos: 1. Mistura dos três antioxidantes, 2. Gordura vegetal hidrogenada (primeira amostra), 3. Gordura vegetal hidrogenada (amostras posteriores), 4. Margarina, 5. Sopa, 6. Caldo de Galinha, 7. Caldo de Carne, 8. Mistura para Patês.

detectada a presença de antioxidante. A quantidade de BHA encontrada, pelo método UV, foi 177,3 ppm; teor abaixo do limite máximo permitido pela legislação brasileira, que é de 200 ppm.

4.1.6. ESTUDO DE RECUPERAÇÃO

As porcentagens de recuperação foram determinadas numa tentativa de se avaliar a possibilidade de perdas dos antioxidantes durante a análise.

A recuperação foi testada apenas no método UV (Tabela 6). A porcentagem de recuperação do BHA foi de 98,0 % e 96,9 % para a adição de 25 % e 50 % da quantidade encontrada na amostra, respectivamente. A repetitibilidade dos resultados foi boa, pois os valores do coeficiente de variação (CV) foram sempre abaixo de 10% (3,4 para uma adição de 25% e 0,8 para 50%).

4.1.7. LIMITE DE DETECÇÃO

O nível mínimo detectável para cada técnica (absorção UV, colorimetria e CCD) está apresentado na Tabela 7. Como a detecção dos antioxidantes nos métodos que utilizam separação em camada delgada (CCD-UV e CCD-Colorimetria) é realizada da mesma forma, através da utilização de lâmpada UV de comprimento de onda de 254 nm, os níveis mínimos detectáveis para as duas técnicas são iguais.

**TABELA 6 - PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DE BHA EM GORDURA VEGETAL
HIDROGENADA, ANALISADA PELO MÉTODO UV, APÓS ADIÇÃO DE
25 % E 50% DO TEOR ENCONTRADO NA AMOSTRA (177,3 ppm).**

PERCENTUAL ADICIONADO	VALOR CONHECIDO (ppm)	VALOR OBTIDO (ppm)	% RECUPERAÇÃO	CV
25	221,6	217,2	98,0	3,4
50	265,9	257,6	96,9	0,8

TABELA 7 - MÍNIMO DETECTAVEL DOS ANTIOXIDANTES

MÉTODO	ANTIOXIDANTE		
	PG	BHA	BHT
CCD	0,3 µg	0,8 µg	4,0 µg
UV	20,0 µg	30,0 µg	80,0 µg
COLORIMETRIA	40,0 µg	4,0 µg	15,0 µg

O mínimo detectável foi menor na Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do que na absorção UV e na Colorimetria, pois o primeiro método depende apenas de uma visualização direta na placa, enquanto que a absorção UV depende da percepção de um pico do composto no espectro UV que, numa faixa muito baixa, pode ser confundido com os ruídos do equipamento; já o método colorimétrico depende da sensibilidade das reações de cor.

As diferenças obtidas nos mínimos detectáveis na região ultravioleta (UV) entre o galato de propila (PG), o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT) estão relacionados com a absorvidade molar do composto. O PG apresenta o menor mínimo detectável devido à presença de três hidroxilas conjugadas no anel benzênico. Por outro lado, o PG apresenta o mais alto mínimo detectável quando analisado pela técnica colorimétrica, devido à baixa intensidade da cor do composto formado após a reação com o sulfato ferroso. Devido aos substituintes no anel benzênico, o BHT é o que possui a menor absorvidade e, portanto, o mais alto mínimo detectável quando analisado na região UV. Mas quando analisado na região visível, após reação com a dianisidina, o limite de detecção é reduzido em aproximadamente 82 %. Para o BHA, também foi observado que a colorimetria apresentou um mínimo detectável muito menor que o método por absorção UV, isto é, uma redução de aproximadamente 87%.

4.2. COMPARAÇÃO DOS QUATRO MÉTODOS

4.2.1. ANÁLISE DA BANHA APÓS ADIÇÃO DE GALATO DE PROPILA

As quantidades de PG, determinadas pelos quatro métodos, estão apresentadas na Tabela 8. A repetitibilidade foi boa nos quatro métodos, como pode ser verificado pelos valores dos coeficientes de variação (CV) que foram sempre abaixo de 10 %.

As diferenças encontradas no conteúdo de galato de propila foram significativas, ao nível de 1 %, entre UV / Colorimetria, UV / CCD-UV, UV / CCD-Colorimetria e Colorimetria / CCD-Colorimetria, com o método colorimétrico apresentando a maior quantidade e os métodos com camada delgada as menores. A discrepância pode ser explicada pela presença de substâncias interferentes, as quais reagem com o sulfato ferroso, aumentando a intensidade da cor. Segundo Anglin, Mahon & Chapman, 1956, o antioxidante NDGA pode interferir na análise, mas como ambos tem propriedades antioxidantes similares, geralmente não são encontrados juntos.

No método UV, a quantidade encontrada esteve acima da adicionada. Isto pode ser explicado também pela presença de substâncias interferentes, como indica o espectro na Figura 15.

Não houve diferença significativa, ao nível de 5 %, entre o método CCD-UV e o método CCD-Colorimetria, demonstrando que após a separação dos interferentes na camada delgada, a quantificação realizada por ambos apresentou bons resultados. Porém, a determinação por absorção no UV é menos dispendiosa por

TABELA 8 - RESULTADOS DA ANÁLISE EM TRIPLICATA DO GALATO DE PROPILA ADICIONADO NUMA RAZÃO DE 100 mg / kg DE BANHA (100 ppm), OBTIDOS PELOS QUATRO MÉTODOS.

	MÉTODS			
	UV ^b	COLORIMETRIA ^a	CCD-UV ^c	CCD-COLORIMETRIA ^c
CONCENTRAÇÃO MÉDIA (ppm)	120,0	267,0	97,5	97,5
PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO	120,0	267,0	97,5	97,5
DESVIO PADRÃO	3,1	4,0	0,8	0,6
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)	2,6	1,5	0,8	0,6

a,b,c - Métodos que não apresentam a mesma letra são significativamente diferentes, ao nível de 1 %.

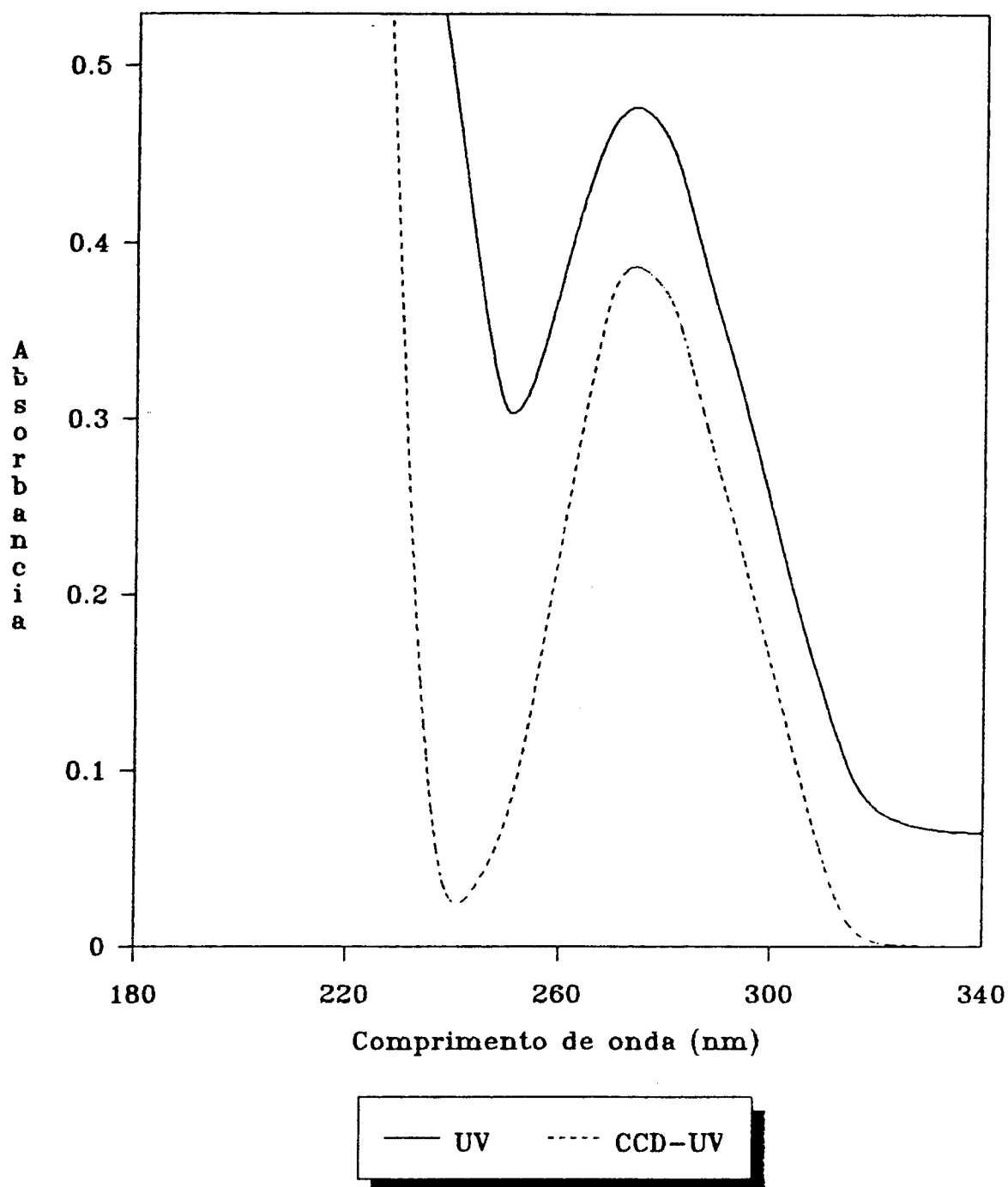


FIGURA 15 - Espectros de absorção do extrato obtido a partir da banha (PG).

não necessitar de reagentes colorimétricos, mas sim uma simples dissolução em etanol, além de ser mais sensível.

4.2.2. ANÁLISE DA BANHA APÓS ADIÇÃO DE BUTILHIDROXIANISOL

Os resultados quantitativos para os quatro métodos de análise estão resumidos na Tabela 9. Os valores dos CVs encontrados foram sempre abaixo de 10 %, indicando boa repetitibilidade dos resultados.

As diferenças entre as porcentagens de BHA foram significativas, ao nível de 1 %, entre o método UV e os outros três métodos, sendo não significativa, ao nível de 5 %, entre os três últimos. Pelo método UV, obteve-se uma maior concentração do antioxidante devido à presença de interferentes também quantificados, como pode ser verificado no espectro UV (Figura 16). No método colorimétrico, o reagente de Gibb demonstrou ser específico para o BHA, não reagindo com os interferentes. Nos métodos com separação por CCD, várias foram as manchas detectadas (Figura 5); o espectro da fração referente ao BHA apresentou um único pico com absorção máxima a 292 nm (Figura 16) e, após reação colorimétrica, apresentou máxima absorção a 620 nm.

Através dos resultados estatísticos, pode-se perceber que, apesar dos métodos CCD-UV e CCD-Colorimetria serem mais complexos, isto é, terem mais etapas, as perdas não foram significativas, quando comparadas com o método Colorimétrico.

**TABELA 9 - RESULTADOS DA ANÁLISE EM TRIPLICATA DE BHA ADICIONADO
 NUMA RAZÃO DE 100 mg / kg DE BANHA (100 ppm), OBTIDOS
 PELOS QUATRO MÉTODOS.**

	MÉTODS			
	UV ^a	COLORIMETRIA ^b	CCD-UV ^b	CCD-COLORIMETRIA ^b
CONCENTRAÇÃO MÉDIA (ppm)	163,3	96,3	91,3	92,3
PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO	163,3	96,3	91,3	92,3
DESVIO PADRÃO	5,5	0,3	1,5	0,8
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)	3,4	0,3	1,7	0,8

a,b - Métodos que não apresentam a mesma letra são significativamente diferentes, ao nível de 1 %.

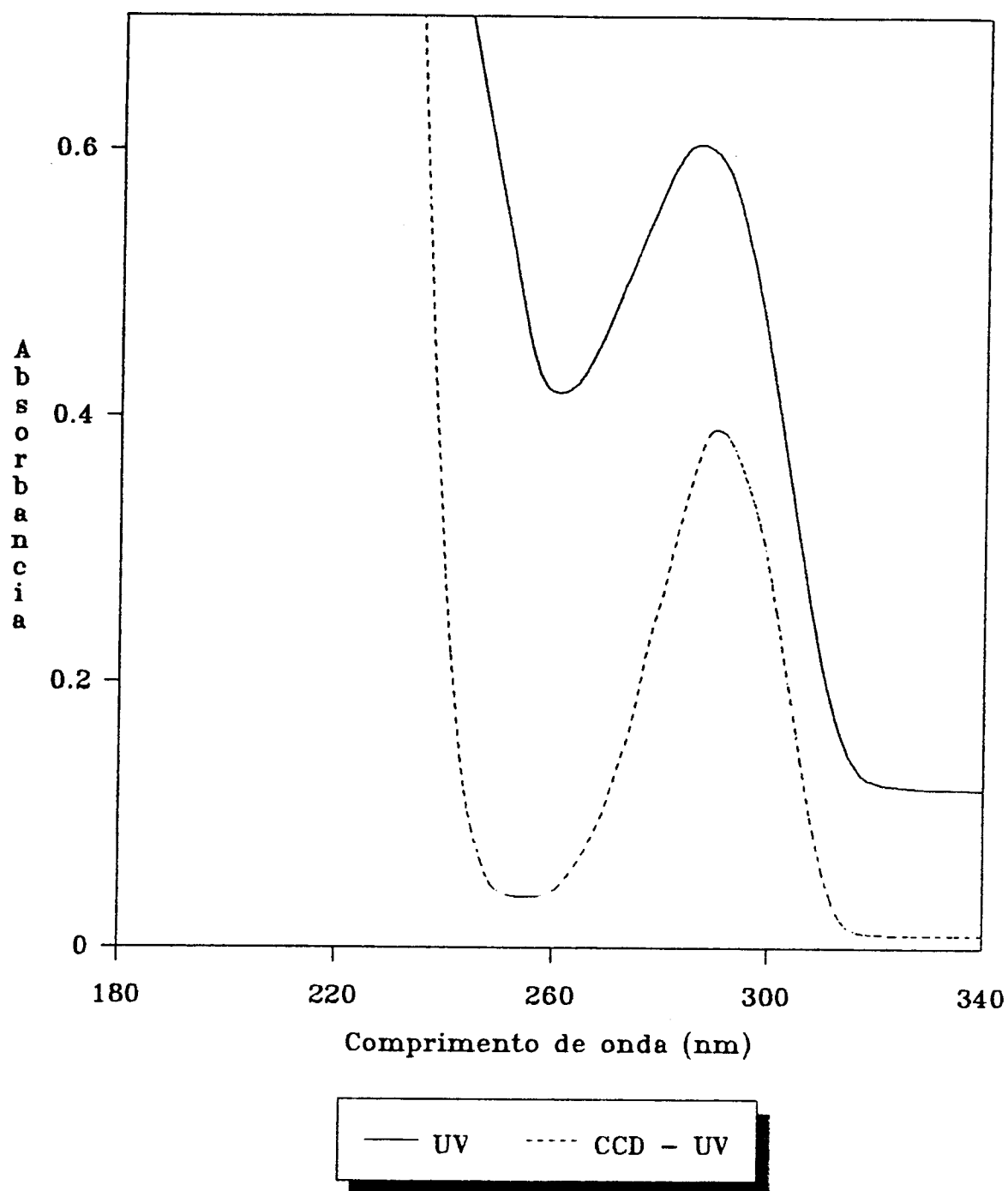


FIGURA 16 - Espectros de absorção do extrato obtido a partir da banha (BHA).

4.2.3. ANÁLISE DA BANHA APÓS ADIÇÃO DO BUTIL HIDROXITOLUENO

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos nos quatro métodos de análise. Novamente os valores dos CVs foram muito menores que 10 %, indicando boa repetitibilidade dos resultados.

Não houve diferença significativa, ao nível de 5 %, entre os resultados do método Colorimétrico, CCD-UV e CCD-Colorimetria, indicando que a dianisidina é um reagente específico para o BHT, não reagindo com os interferentes da amostra (Figura 5). As perdas nos métodos com separação dos interferentes por cromatografia em camada delgada também não foram significativas, ao nível de 5 %. As diferenças foram significativas, ao nível de 1 %, entre os métodos acima citados e o método por UV direto, devido à absorção na região ultravioleta dos compostos interferentes (Figura 17).

4.2.4. ANÁLISE DA BANHA APÓS ADIÇÃO DOS TRÊS ANTIOXIDANTES

Como os três antioxidantes apresentam máximo de absorção muito próximos na região ultravioleta, o método UV direto não pôde ser utilizado para quantificação dos antioxidantes pois apenas um pico foi registrado com máximo a 280 nm (Figura 18).

A Tabela 11 apresenta as porcentagens de PG, BHA e BHT nos três métodos (Colorimetria, CCD-UV e CCD-Colorimetria). A repetitibilidade dos resultados foi boa em todos os métodos, como pode ser observado pelos valores de CVs, que novamente foram bem

**TABELA 10 - RESULTADOS DA ANÁLISE EM TRIPLICATA DE BHT ADICIONADO
 NUMA RAZÃO DE 100 mg / kg DE BANHA (100 ppm), OBTIDOS
 PELOS QUATRO MÉTODOS.**

	MÉTODS			
	UV ^a	COLORIMETRIA ^b	CCD-UV ^b	CCD-COLORIMETRIA ^b
CONCENTRAÇÃO MÉDIA (ppm)	253,2	85,7	83,3	82,8
PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO	253,2	85,7	83,3	82,8
DESVIO PADRÃO	8,7	2,0	1,4	1,0
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)	3,4	1,4	1,7	1,2

a,b - Métodos que não apresentam a mesma letra são
 significativamente diferentes, ao nível de 1 %.

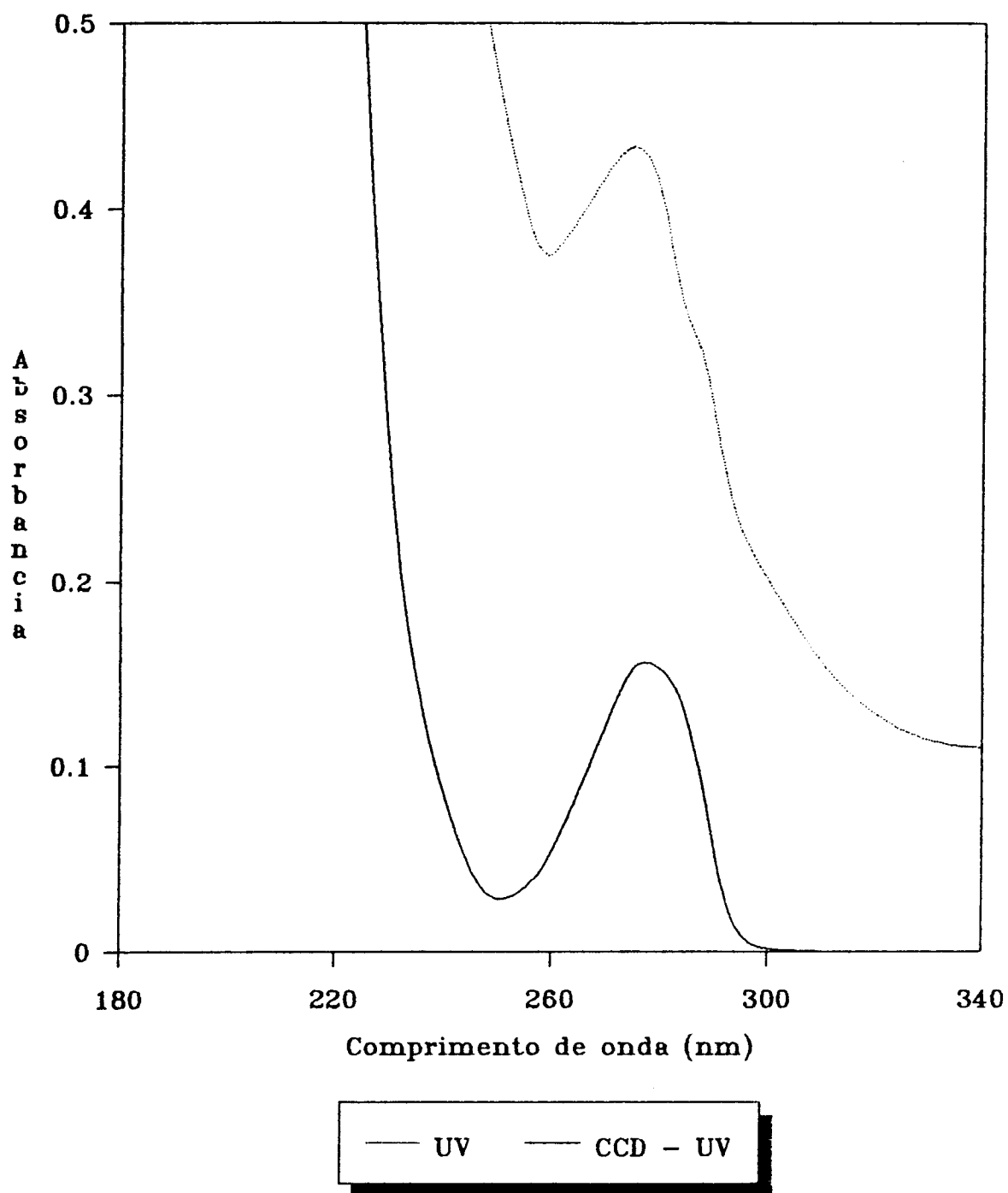
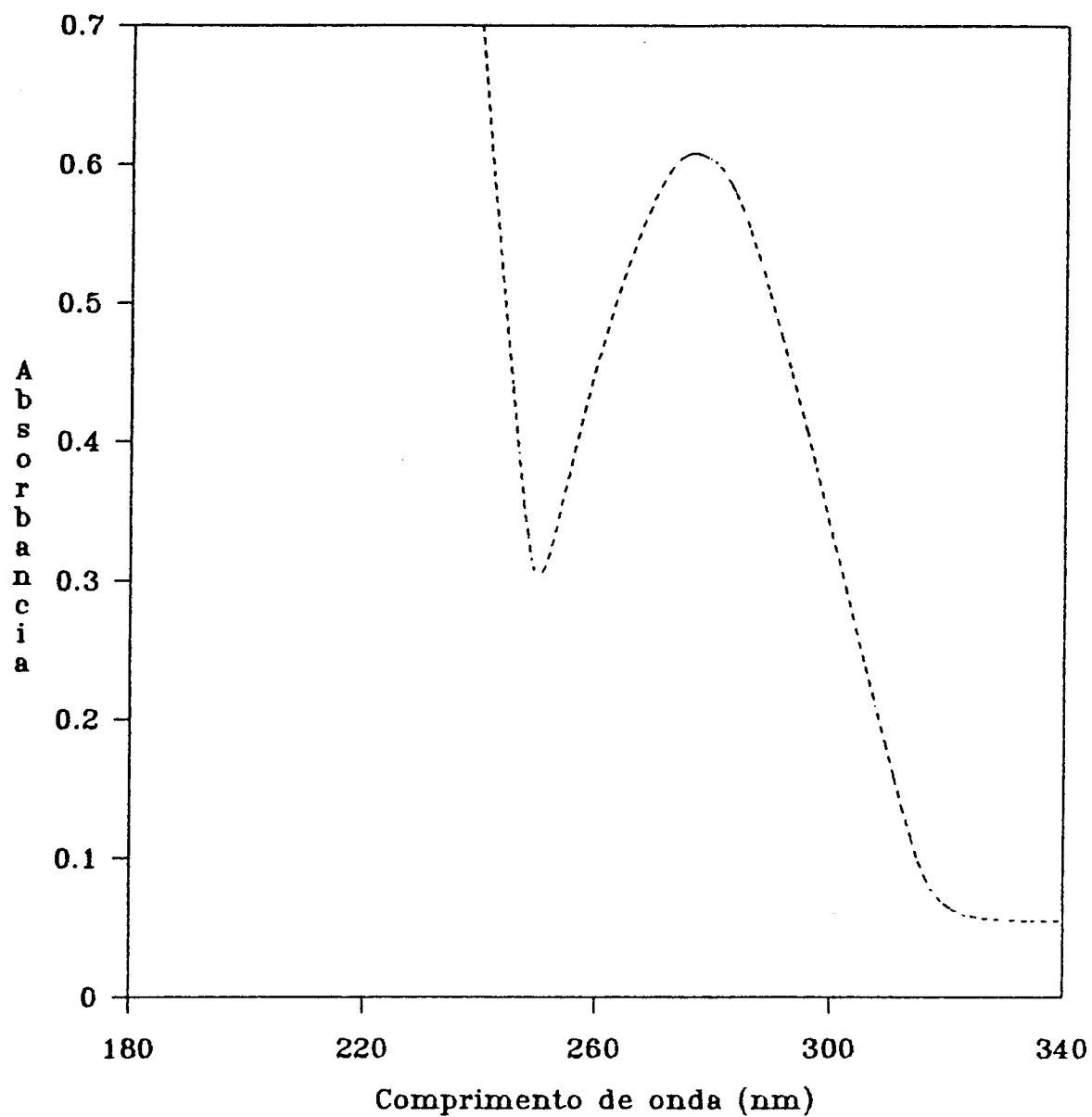


FIGURA 17 - Espectros de absorção do extrato obtido a partir da banha (BHT).



----- BHA, BHT e PG

FIGURA 18 - Espectro de absorção no UV do extrato obtido a partir da banha após adição dos três antioxidantes.

TABELA 11 - RESULTADOS NA ANÁLISE EM TRIPLICATA DE PG, BHA E BHT ADICIONADOS NUMA RAZÃO DE 100 mg / kg DE BANHA (100 ppm), OBTIDOS PELOS TRÊS MÉTODOS.

	COLORIMETRIA			CCD-UV			CCD-COLORIMETRIA		
	PG ^a	BHA ^b	BHT ^b	PG ^a	BHA ^b	BHT ^b	PG ^a	BHA ^b	BHT ^b
CONCENTRAÇÃO MÉDIA (ppm)	255,2	96,0	85,3	96,9	91,6	83,5	95,4	92,4	83,1
PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO	255,2	96,0	85,3	96,9	91,6	83,5	95,4	92,4	83,1
DESVIO PADRÃO	6,2	0,3	1,2	0,3	1,3	0,6	0,5	0,7	0,8
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	2,4	0,3	1,4	0,3	1,5	0,7	0,6	0,8	0,9

a, b - Métodos que não apresentam a mesma letra são significativamente diferentes, ao nível de 1 %.

abaixo de 10 %.

Para determinação do galato de propila, novamente foi observado diferença significativa, ao nível de 1 %, entre o método colorimétrico e os outros dois (CCD-Colorimetria e CCD-UV). Para o BHA e o BHT não houve diferença significativa, ao nível de 5 %, entre os três métodos. Portanto, os antioxidantes não agem como interferentes entre si, nas reações colorimétricas específicas.

4.3. CUSTO E TEMPO

O custo (dezembro / 90) e o tempo envolvidos na extração dos antioxidantes foram iguais para os quatro métodos, ficando em torno de Cr\$ 200,00 e 45 minutos, respectivamente, por amostra analisada em triplicatas. Estes valores foram incluídos nos cálculos dos custos e dos tempos gastos para cada método e estão listados na Tabela 12.

Pode-se verificar que, na execução da análise, o método por UV teve os menores custo e tempo gasto, e o CCD-colorimetria os maiores. Entretanto, isto não é suficiente para determinar a escolha do método.

É importante salientar que o custo da confirmação da identidade não foi incluído nos valores da tabela 12. Os custos da confirmação da identidade usando o revelador 1 e o revelador 2 (itens 3.5.5.1 e 3.5.5.2.) são aproximadamente Cr\$ 2021,00 e Cr\$ 1616,00, respectivamente, aumentando consideravelmente os custos para os quatro métodos. Entretanto, isto pode ser minimizado no caso de se analisar grandes quantidades de amostras de uma só vez.

TABELA 12 - CUSTO E TEMPO DAS ANALISES PELOS QUATRO MÉTODOS

MÉTODO	CUSTO (cruzeiro)	TEMPO (minutos)
UV	205,00	50
COLORIMETRIA		
PG	208,33	60
BHA	267,84	70
BHT	680,00	80
CCD - UV	1595,70	125
CCD - COLORIMETRIA		
PG	1599,03	140
BHA	1658,54	150
BHT	2070,70	160

5. CONCLUSÕES

- Uma etapa de extração comum aos quatro métodos e que extrai simultaneamente os três antioxidantes e utiliza um solvente barato e comum ao país, o etanol, foi adaptada e avaliada.
- Foram desenvolvidos, para determinação simultânea do galato de propila, butil hidroxianisol e butil hidroxitolueno, métodos eficientes por cromatografia em camada delgada (CCD-UV e CCD-Colorimetria) que são mais simples e econômicos do que os citados na literatura, por separarem os antioxidantes e interferentes por cromatografia unidimensional.
- Os quatro métodos, empregando as técnicas de UV, CCD-UV, Colorimetria e CCD-Colorimetria, adaptados ou desenvolvidos e padronizados no presente trabalho, apresentaram boa repetitibilidade para os três antioxidantes, com coeficientes de variação abaixo de 10%.
- Os quatro métodos também mostraram exatidão satisfatória, como observado através das porcentagens de recuperação, para os três antioxidantes, desde que o método empregado seja adequado para o tipo de amostra.

- A natureza da amostra é um fator fundamental na escolha do método analítico. O método UV não é apropriado para produtos contendo mais de um antioxidante e / ou substâncias interferentes. Para estes produtos, os métodos CGD-UV e CCD-Colorimetria são mais adequados; o método Colorimétrico também pode ser utilizado, dependendo das substâncias interferentes existentes na amostra e da especificidade do reagente colorimétrico.

- Como método UV não foi apropriado para análise da banha, o método colorimétrico tornou-se o menos dispendioso, mais rápido e o melhor para determinação do BHA e BHT; porém não foi bom para determinação do PG, sendo necessária uma separação prévia em camada delgada.

- A importância da confirmação da identidade dos antioxidantes, raramente realizados nos trabalhos citados na literatura, foi mais uma vez comprovada.

- Apesar de constarem nos rótulos dos seis produtos analisados, foi detectada a presença de antioxidantes apenas na primeira amostra da gordura vegetal hidrogenada (BHA).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO, K. M.; HUFF, J. E.; HASEMAN, J. K.; DIETER, M. P.; BOORMAN, G. A.; HILDEBRANDT, P.; PREJEAN, J. D. & FARNELL, D. R.. 1983. Carcinogenesis bioassay of propyl gallate in F344 rats and B6C3F1 mice. *J. Am. Coll. Toxicol.* 2, 425.

ABRAHAM, R.; BENITZ, K. F.; PATIL, G. & LYON, R.. 1986. Rapid induction of forestomach tumors in partially hepatectomized Wistar rats given butyllated hydroxyanisole. *Expl. Molec. Path.*, 44, 14.

ACZEL, A.; SELMECI, G.; NOSKE, O. & MARIK, M.. 1972. Detection and determination of butylhydroxytoluene in lard. *Husipar*, 21, 222.

ALCINO, N. J.; KLEIN, H. C.; QUATTRONE, J. J. & CHOY, T. K.. 1963. Determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene in hydrocarbon-soluble samples. *J. Agric. Food Chem.*, 11, 496.

ALTMANN, H. J.; WESTER, P. W.; MATTHIASCHK, G.; GRUNOW, W. & VAN DER HEYDEN, C. A.. 1985. A 13 week feeding study of butyl hydroxyanisole: the subsequent regression of the induced lesions in male Fischer 344 rat forestomach epithelium. *Fd Chem. Toxic.*, 23, 723.

ALVAREZ-PINO, M. I.; VINAGRE LEIRO, J. & SCHMIDT-HEBBEL, H.. 1969. A comparative study of colorimetric and chromatographic methods for investigation of phenolic antioxidants in edible fats. *Grasas Aceites*, 20, 129.

ANGLIN, C.; MAHON, J. & CHAPMAN, R.. 1956. Determination of antioxidants in edible fats. *J. Agric. Food Chem.*, 4, 1018.

ANTUNES, J. A. & CANHOS, V. P. 1983. *Aditivos em Alimentos*, 87-124, Editora: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia (FTPT), Campinas, Brasil.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTERS. A.O.A.C.. 1990. 15^a edição, , Washigthon, DC, 2, 1137.

AUSTIN, J. J.. 1954. Analysis of butylated hydroxyanisole in paper and paperboard. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 31, 424.

BEAULIEU, F. & HADZIYEV, D.. 1982. Determination of BHA and BHT in dehydrated mashed potatoes. *J. Food Sci.*, 47, 589.

BERGER, K. G.; SYLVESTER, N. D. & HAINES, D. M.. 1960. The determination of chemical antioxidants in fats after separation by partition chromatography. *Analyst*, 85, 341.

BOLLAND, J. L.. 1947. Kinetic studies the chemistry of rubber and related materials. IV. The inhibitory effect of hidroquinone on the thermal oxidation of ethyl linoleate. *Trans Faraday Soc.* 43, 201.

BOOTH, A.; MASRI, M.; ROBBINS, D.; EMERSON, O.; JONES, F. & DE EDS, F.. 1959. The metabolic fate of gallic acid and related compounds. *J. Biol. Chem.* 234, 3014.

BRASIL - DIARIO OFICIAL DA UNIAO - Dec. 55.871 de 25/03/1965, Dec. 63.526 de 04/11/1968 e Dec. 986 de 21/10/1969.

CODEx ALIMENTARIUS COMMISSION. 1973. List of additives evaluated for their safety-in-use in food. Food and Agricultural Organization of the United Nations World Health Organization, Italy.

COLIPA. 1983. Propyl gallate COLIPA antioxidant n^o 10. COLIPA Monograph CSC/386/83.

COPIUS-PEEREBOOM, J. W.. 1964. Thin-layer chromatography on poliamide layers: separation of fat antioxidants. *Nature*, 204, 748.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - Regulation of potencial Cancinogens in food Supply: The Delaney Clause. Report n^o 89, June 1981. DACRE, J. C. 1960. *Jl. N. Z. Inst. Chem.*, 24, 161.

DACRE, J. C. 1960. Metabolic pathways of the phenolic antioxdants. *J. N. Z. Inst. Chem.*, 24, 161.

DACRE, J. C. 1974. Long-term toxicity study of n-propyl gallate in mice. *Fd. Cosmet.Toxicol.* 12, 125.

DAVIDEK, J. & POKORNY, J.. 1961. Detection of antioxidants in fats by thin-layer chromatography on polyamide powder. *Lebensm-Unters-Forsch.*, 115, 113.

DUGAN, L. R.; HOFFERT, E.; BLUMER, G. P.; DABKIEWICZ, I. & KRAYBILL, H. R.. 1951. The antioxidants behavior of the isomers of butylated hydroxyanisole. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 28, 493.

EASTMAN, KODAK Co.. 1963. Eastman guide to fat and oil antioxidant technology. *Eastman Kodak Company*, 150p.

FERNANDEZ, P. P.. 1984. BHA e BHT - Antioxidantes em alimentos. *Anais do Seminário Latino Americano sobre Toxicologia de Alimentos*, 192p.

FILIPIC, V. J. & OGG, C. L.. 1960. Determination of butyl hydroxyanisole and butyl hydroxytoluene in potato flakes. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 43, 795.

FINLEY, J. W. & GIVEN, P. Jr.. 1986. Technological necessity of antioxidants in the food industry. *Food Chem. Toxic.*, 24, 999.

FRANKEL, E. N.. 1980. Lipid oxidation. *Progress in Lipid Research*. 19, 1-22.

GLAVIND, J. & HOLMER, G.. 1967. Thin-layer chromatographic determination of antioxidants by the stable free radical α, α' -diphenil- β -picryldrazyl. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 44, 539.

GULDBORG, M.. 1981. Collaborative study of a qualitative TLC-method for detection (BHA, BHT, Gallates and NDGA) in food. *Anal. Chem.*, 39, 117.

GUVEN, K. C. & GUVEN, N.. 1973. Thin-layer chromatography for identifying and quinine and quinidine. *Eczacilik Bul.*, 15, 46. Em

ROBARDS, K. & DILLI, S.. 1987. Analytical chemistry of sytentic food antioxidants. A review. *Analyst*, 112, 933.

HANSEN, P.V.; KAUFFMAN, F. S. & WIEDERMANN, L. H.. 1959. A direct spectrophotometric determination of butylated hydroxyanisole in lard and hardened lard. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 36, 193.

HEIDRICK, P. L. & CONROY, H. W.. 1962. Antioxidants in oil, fats and waxes. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 45, 244.

HIROSE, M.; INOUE, T; ASAMOTO, M; TAGAWA, Y. & ITO, N.. 1986. Comparison of effects of 13 phenolic ferative lesions of the forestomach and increase in the labelling indices of glandular stomach and urinary bladder epithelium of syrian of golden hamsters. *Carcinogenesis*, 7, 1285.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985. Normas Analíticas do Instituto Adolfo lutz. Volume 1. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. Instituto Adolfo Lutz, Brasil.

ISHIKAWA, S. & KATSUI, G.. 1964. Separation and detection of antioxidants in vitamin A oil in vegetable oil by thin-layer chromatography. *Bitamin*, 29, 203. *EM Analytical Abstracts*. 1965. 12, abstracts 3563.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; HAGIWARA, A.; SHIBATA, M. & OGISO, T..1983. Carcinogenicity of butylated hydroxianisole in F344 rats. *J. Natn. Cancer Inst.*, 70, 343.

ITO, N.; HIROSE, M.; KURATA, Y.; IKAWA, E.; MERA, Y. & FUKUSHIMA, S.. 1984. Induction of forestomach hyperplasia by crude butylated hydroxyanisole., a mistura of 3-tert and 2 tert. isomers in Syrian golden hamsters is due to e-tertbutylated hydroxyanisole. *Gann*, 75, 471.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S. & TSUDA, H.. 1985. Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT and other antioxidants. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 15, 109.

JAYARAMAN, S.; VASUNDHARA, T. S. & PARIHAR, D.B.. 1976. Colorimetric Microestimation of antioxidants in edible oils and plastic containers. *Mikrochim. Acta*, II, 365.

JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 1976. Toxicology Evaluation of certain food additives. *WHO Fd Add. Ser.*10, 45.

JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 1986. Specifications for Identity and Purity of Certain Food Additives. *FAO Food and Nutrition Paper*,37, 15 - 21 e 105 - 107.

KAHL, R.. 1984. Synthetic antioxidants biochemical action and interference with radiation, toxic compounds, chemical, mutagens and chemical carcinogens. *Toxicology*, 33, 185.

KAHL, R.. 1986. The dual role of antioxidants in the modification of chemical carcinogenesis. *J. Envir. Sci. Hlth.*, 4, 47.

KOBAYASHI, K.; TONOGAI, Y. & ITO, Y.. 1986. Extraction and colorimetric determination of BHA in food using a binding reaction with 2,6 dichloroquinone-4-chloroimide. *Nippon Shokuhin Kagaku Cakkai-Shi.*,33, 134. Em *Food Science and Technology Abstracts* 1987. 19, 6T3.

KOMAITIS, M. E. & KAPEL, M.. 1985. Spectrophotometric determination of BHA in edible fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62, 1371.

LAZSLO, H. & DUGAN, L. R.. 1961. A new method for quantitative determination of BHA. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 38, 178.

MANCINI, P.; DELTON, V. & GELSOMINI, N.. 1977. Chromatographic behaviour of some phenol and amine type antioxidants. *Rassegna Chimica*, 29, 107. Em ROBARDS, K. & DILLI, S.. 1987. Analytical chemistry of sytentic food antioxidants. A review. *Analyst*, 112, 933.

MAHON, J. H. & CHAPMAN, R. A.. 1951. Butylated Hydroxyanisole in lard and shortening. *Anal. Chem.*, 23, 1116.

MAHON, J. H. & CHAPMAN, R. A.. 1952. Estimation of 2- and 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole isomers. *Anal. Chem.*, 24, 534.

MASUI, T.; HIROSE, M.; IMAIDA, K.; FUKUSHIMA, S.; TAMANO, S. & ITO, N.. 1986. Sequential changes of the forestomach of F344 rats. Syrian golden hamsters and B63F₁ mice treated with butyl hydroxyanisole. *Gann*, 77, 1083.

MATHEW, T. V. & MITRA, S. N.. 1965. Separation and identification of antioxidants in oils and fats by thin-layers chromatography. *Indian J. Technol.*, 3, 102.

McCAULLEY, D. F.; FAZIO, T.; HOWARD, J. W.; DI GUIRCIO, F. & IVES, J.. 1967. The multi-determination of antioxidants in lard. *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 50, 243.

PAGE, B. D.. 1983. High performance liquid chromatographic determination of seven antioxidants in oil and lard: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66, 727.

Pathology Working Group. 1982. Working Document of Pathology Working Group, 4-Country Joint Meeting of Representatives of the US, UK, Canada and Japan, 16 de novembro de 1982.

PHILLIPS, M. A. & HINKEL, R.D.. 1957. Determination of 2,6-di-tert-butyl-p-cresol in edible fats by ultraviolet spectrophotometry. *J. Agric. Food Chem.*, 5, 379.

PHIPPS, A. M.. 1973. Liquid-liquid extraction of BHT from vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 50, 21.

PINELLA, S. J.; FALCO, A. D. & SCHWARTZMAN, G..1966. Determination of benzoates and hydroxybenzoate in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 49, 829. Em CECCHI, H. M.. 1988. Comparação de desenvolvimento de métodos analíticos para ácidos benzoico e sórbico em alimentos. Tese de doutorado - FEA - UNICAMP, Campinas, Brasil.

PRAKASA, C. S.; EKAMBARESWARA RAO, K. & PRASAD, U. V.. 1982. Spectrophotometric determination of some phenols with sodium metaperiodate and aminophenols. *Talanta*, 29, 917.

PRASAD, U. V.; RAO, K. E. & SASTRY, C. S.. 1985. Spectrophotometric determination of some antioxidants with potassium permanganate and metol. *Food Chem.*, 17, 209.

PRASAD, U. V.;DIVAKAR, T. E.; HARIPRASAD, K. & SASTRY, C. S. D.. 1987. Spectrophotometric determination of some antioxidants in oils and fats. *Food Chemistry*, 24, 159.

PUJOL FORN, M..1980. Determinación de antioxidantes en alimentos grasos por fluorimetria o densitometria tras su separación por cromatografia en capa fina. *Grasas Aceites*, 31, 187.

PUJOL FORN, M. e LOPEZ SABATER, M. C.. 1984. *Circ. Farm.*, 42, 3. Em ROBARDS, K. & DILLI, S.. 1987. Analytical chemistry of sytentic food antioxidants. A review. *Analyst*, 112, 933.

RAO, K. E.; MURTHY, K. V. & SASTRY, C. S.. 1982. Spectrophotometric determination of some phenols with aminophenols. *Indian Drugs*, 20, 58.

RODRIGUES, C.; LOK, E.; NERA, E.; IVERSON, F.; PAGE, D.; KARPINISKI, K. & CLAYSON, D. B.. 1986. Short-term effects of various phenols and acids on the Fischer 344 male rat forestomach epithelium. *Toxicology*, 38, 103.

ROSAN, M. & STICH, H.. 1980. Enhancing and inhibiting effect of propyl gallate on carcinogen - induced mutagenesis. *J. Envir. Path. Toxicol.* 4, 159.

ROSENWALD, R. D. & CHENIECK, J. A.. 1951. Alkyl hydroxyanisoles as antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 28, 185.

SAAG, K. 1982. Determination of Food Additives. Em MACRAE, R (eds) 1982. *HPLC in Food Analysis*. Academic Press, Inc.. London.

SANDERS, T. A. B. & COPPEN, P. P.. 1983. Em Allen, J. C. e Hamilton, R. J., "Rancidity in Foods", Applied Science, Barking, pp 67-108.

SAHASRABUDHE, M. R.. 1964. Application of thin-layer chromatography to the quantitative estimation of antioxidants: BHA, BHT PG and NDGA. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 47, 888.

SALAZARMACIAN, R. & DEL POZO, A.. 1963. Determinacion espectrofotometrica UV de antioxidantes. *Galenica Acta*, 16, 45.

SASTPY, C. S.; RAO, K. E. & PRASAD, U. V.. 1982. Spectrophotometric determination of some phenols with sodium metaperiodate and aminophenols. *Talanta*, 29, 917.

SCHEIDT, S. A. & CONROY, H. W.. 1966. Detection of PG, NDGA, BHT and BHA in fats and oils by thin-layer chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 49, 807.

SCHWIEN, W. G. & CONROY, H. W.. 1965. Qualitative analyses of propyl gallate, nordihydroguaiaretic acid, butylated hydroxyanisole and butylated hydrotoluene in fats and oils. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 48, 489.

SCOTT, G.. 1965. *Atmospheric oxidation and antioxidants*. New York Elsevier Publishing Co., NY, 528p.

SHU, C. K. & MOOKHERJEE, B. D.. 1985. Volatile components of the phenolic fraction of cooked bacon. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 1107.

SLOMAN, K. J., ROMAGNOLI, R. J. e CAVAGNOL, J. C.. 1962. Trace Analysis of BHA and BHT in food products. *J Assoc. Off Agric. Chem.*, 45, 76.

SOUCEK, J. & JELINKOVÁ, E.. 1982. Determination of phenolic antioxidants in polypropylene by derivative ultraviolet spectroscopy. *Analyst* 107, 623.

STIJVE, T. & DISERENS, J. M.. 1983. Gas chromatographic determination of butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) and tert-butylhydroquinone (TBHQ) in milk products. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 79, 108. Em *Food Science Technology Abstracts* 1984. 16, 3P566.

STUCKEY, B. N. & OSBORNE, C. E.. 1965. A review of antioxidants analysis in food products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 42, 228.

SUMMIT, N. J.. 1986. *Americam Council on Science and Health - Does Nature Know Best?* E.U.A.. Em GAVA, J. A.. 1987. Controvérsia sobre aditivos. *Alimentos & Tecnologia*, 13, 28.

SZALKOWSKI, C. R. & GARBER, J. B.. 1962. Determination of 2,6-di-ter-butyl-4-hydroxytoluene (BHT): application to edible fats and oils. *J. Agric. Food Chem.*, 10, 490.

TAKAHASHI, O. & HIGARA, K.. 1978. The relationship between hemorrhage induced by butylated hydroxytoluene and its antioxidant properties or structural characteristics. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 46, 811.

VAN DER HEIDE, R. F.. 1966. Reagents for the detection of antioxidants on thin layers of silica. *J. Chromatogr.*, 24, 239.

VAN DER NEUT, J. H. & MAAGDENBERG, A. C.. 1966. Qualitative analyses for antioxidants by thin-layer chromatography. *Plastics*, 31, 66.

VAN DESSEL, L. & CLEMENT, J.. 1969. Thin-layer chromatographic separation of antioxidants. *Lebensm-Unters-Forsch.*, 139, 146. Em *Analytical Abstracts* 1970. 18, abstract 4356.

VAN ESCH G. J. 1955. The toxicity of the antioxidants propyl, octyl and dodecyl gallate. *Voeding* 16, 683.

VAN PETEGHEM, C. H. & DEKEYSER, D. A.. 1981. Systematic identification of antioxidants in lards, shortenings and vegetable oils by thin-layer chromatography. *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 64, 1331.

VALDEHITA, M. T. & VICENTE, M. C.. 1971. Investigacion de antioxidantes en grasas comestibles por cromatografia en capa fina. *An. Bromatol.*, 23, 107.

VERHAGEN, H.; THIJSSEN, H. H. W.; TEN HOOR, F. & KLEINJANS, J. C. S.. 1989. Disposition of single oral doses of butylated hydroxyanisole in man and rat. *Fd Chem. Toxic.*, 27, 151.

WATTENBERG, L. W.. 1980. Inhibitors of chemical carcinogenes. *J. envir. Path. Toxicol.*, 3, 35.

WATTENBERG, L. W.. 1985. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.*, 45, 1.

WHETSEL, K. B.; ROBERSON, W. B. & JOHNSON, K. E.. 1955. Determination of butylated hydroxyanisole and propyl gallate in food antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 32, 493.

WITSCHI, H.; WILLIAMSON, D. & LOCK, S.. 1977. Enhancement of uretham tumorigenesis in mouse lung by butylated hydroxytoluene. *J. Natl. Cancer Inst.*, 58, 301.

WOGGON, H.; UHDE, W. J. & ZYDEK, G. 1968. Testing of plastics, migration of 2,6-di-tertbutyl-p-cresol (BHT) in edible oils. *Lebensm.-Unters-Forsch.*, 139, 146. Em ROBARDS, K. & DILLI, S.. 1987. Analytical chemistry of synthetic food antioxidants. A review. *Analyst*, 112, 933.

A N E X O A:

ANTIOXIDANTES PERMITIDOS PELA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

ANTIOXIDANTES

ADITIVO	CODIGO DE ROTULAGEM	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MAXIMO mg/kg ou g/100ml
ACIDO ASCORBICO (ACIDO L-ASCORBICO E SEUS SAIS DE POTASSIO, SODIO E CALCIO)	A. I	Alimentos infantis	0,05
		Alimentos processados a base de cereais	0,05
		Amargos e aperitivos	0,05
		Azeitonas	0,05
		Batatas cruas descascadas e congeladas	0,20
		Batatas fritas congeladas	0,05
		Batidas	0,03
		Cervejas	0,03
		Cogumelos frescos, secos ou em conserva	0,20
		Condimentos preparados	0,10 no p. s. c.
		Cooler	0,05
		Creme vegetal	0,10
		Doces em pasta	0,05
		Filtrado doce	0,03
		Frutas cristalizadas e glaceadas	0,005
		Frutas em conservas	0,03
		Gomas de mascar	0,03 calculado sobre peso da base gomosa
		Hortalicas em conservas	0,03
		Leite de coco	0,01
		Licores	0,03
		Margarinas	0,30
		Mistela	0,03
		Mistela composta	0,03
		Molhos e coberturas para saladas	0,50 p
		Nectares de frutas	0,03
		Oleos e gorduras	0,03
		Picles	0,03
		Polpa de frutas	0,03
		Preparados desidratados e concentrados para sopas e caldos	0,10 no p. s. c.
		Preparados solidos e liquidos para refrescos e refrigerantes	0,03 no p. s. c.
		Produtos carneos curados	0,20
		Produtos de frutas	0,05
		Refrescos e refrigerantes	0,03
		Sankria	0,03
		Saque	0,01
		Sobremesas, pos para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	0,03 no p. s. c.
		Sucos de frutas	0,03
		Vinhos	0,01
		Vinhos de frutas	0,01
		Xaropes para refrescos	0,10 no p. s. c.

112

ADITIVO	CODIGO DE ROTULAGEM	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MAXIMO g/100g - g/100ml
ACIDO CITRICO	A. II	Coco ralado Condimentos preparados Creme vegetal Gomas de mascar Hortalicas em conservas Leite de coco Margarinas Molhos e coberturas para saladas Oleos e gorduras Picles Produtos carneos curados Produtos de frutas Sopas e caldos concentrados Vegetais em conserva (em meio latico acetico)	q. s. p. q. s. p. q. s. p. q. s. p. q. s. p. q. s. p. q. s. p. q. s. p. q. s. p. q. s. p. 0,20 q. s. p. q. s. p. q. s. p. (0,20)
ACIDO FOSFORICO	A. III	Gorduras e compostos gordurosos Margarinas	0,01 0,01
ACIDO ISOASCORBICO OU ERITORBICO E SEU SAL DE SODIO	A. XIV	Amargos e aperitivos Batatas Cervejas Cogumelos frescos, secos ou em conservas Conservas de carnes e derivados embutidos ou curados Cooler Creme vegetal Filtrado doce Frutas em conservas Geleias de frutas Gomas de mascar Hortalicas em conservas Licores Margarinas Mistela Mistela composta Nectares de frutas Oleos e gorduras Polpa de frutas Preparados solidos e liquidos para refresco e refrigerantes Produtos carneos curados Produtos de frutas	0,01 0,01 0,01 0,03 0,20 0,01 0,20 0,01 0,05 0,05 0,03 calculado sobre peso da base gomosa 0,03 0,01 0,20 0,01 0,01 0,01 0,01 0,03 0,03 0,01 no p. s. c. 0,20 0,03

ANTIOXIDANTES

ADITIVO	CODIGO DE ROTULAGEM	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MAXIMO g/100g - g/100ml
ACIDO ISOASCORBICO OU ERITORBICO E SEU SAL DE SODIO (continuacao)	A. XIV	Refrescos e refrigerantes Saque Sucos de frutas Vinhos Vinhos de frutas Xaropes para refrescos	0,01 0,01 0,01 0,01 0,01 0,01 no p. s. c.
BUTIL HIDROXIANISOL (BHA)	A. V	Alimentos processados a base de cereais Coco ralado Creme vegetal Gomas de mascar Leite de coco Margarinas Oleos e gorduras Produtos de cacau	0,02 sobre o teor de oleo 0,01 calculado sobre o teor da gordura 0,02 0,01 calculado sobre peso da base gomosa 0,01 0,02 0,02 0,02
BUTIL HIDROXITOLUENO (BHT)	A. VI	Alimentos processados a base de cereais Coco ralado Creme vegetal Gomas de mascar Leite de coco Margarinas Oleos e gorduras Produtos de cacau	0,01 sobre o teor de oleo 0,01 calculado sobre o teor da gordura 0,02 0,05 calculado sobre peso da base gomosa 0,01 0,02 0,01 0,02
CITRATO DE MONOGLICERIDEOS	A. XIII	Patidas Creme vegetal Gelados comestiveis Gorduras para coberturas Licores Margarinas Molhos e coberturas para saladas Oleos e gorduras Produtos de confeitaria Sobremesas e pos para sobremesas de flans, pudins e similares	0,02 0,01 0,02 0,02 0,02 0,01 0,02 0,02 0,02 0,02 no p. s. c.

ANTIOXIDANTES

ADITIVO	CODIGO DE ROTULAGEM	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MAXIMO g/100g - g/100ml
CITRATO DE MONOISOPROPILA	A. VII	Biscoitos e similares Creme vegetal Margarinas Oleos e gorduras	0,01 0,01 0,01 0,01
CLORETO ESTANOSO	A. XX	Vegetais em conservas	0,0025
EDTA - ACIDO DISSODICO (ETILENODIAMINOTETRACETATO DIACIDO DISSODICO)	A. XXI	Cogumelos em conservas Gomas de mascar Hortalicas em conservas (batata) Hortalicas em conservas (feijao fradinho) Produtos de frutas	0,02 0,01 calculado sobre peso da base gomosa 0,01 0,015 0,01
EDTA - CALCICO DISSODICO (ETILENODIAMINOTETRACETATO CALCICO E DISSODICO)	A. XII	Agua gasificada Cogumelos em conservas Condimentos preparados Creme vegetal Gomas de mascar Gorduras e compostos gordurosos Hortalicas em conservas (batata) Hortalicas em conservas (feijao fradinho) Maconeses Margarinas Molhos e coberturas para saladas Preparados liquidos para refrescos e refrigerantes Refrescos e refrigerantes	0,0033 0,02 0,01 no p. s. c. 0,01 0,01 calculado sobre peso da base gomosa 0,01 0,01 0,015 0,01 0,01 0,01 no p. s. c. 0,0033 no p. s. c. 0,0033
GALATO DE PROFILA, DE DUODECILA OU DE OCTILA	A. IX	Coco ralado Creme vegetal Gomas de mascar Leite de coco Margarinas Oleos e gorduras Produtos de cacau	0,01 calculado sobre o teor da gordura 0,01 0,01 calculado sobre peso da base gomosa 0,01 0,01 0,01 0,01

ANTIOXIDANTES

ADITIVO	CODIGO DE ROTULAGEM	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MAXIMO g/100g - g/100ml
LECITINAS (FOSFOLIPIDEOS, FOSTATIDEOS E FOSFOLUTEINAS)	A. VIII	Biscoitos e similares Coco ralado Creme vegetal Gelados comestiveis Gomas de mascar Leite de coco Margarinas Oleos e gorduras Pos para coberturas de bolos Produtos de cacau	0,20 0,20 calculado sobre o teor da gordura 0,50 0,10 0,20 calculado sobre peso da base gomosa 0,20 0,50 0,20 0,10 no p. s. c. 1,00
PALMITATO DE ASCORBILA E ESTEARATO DE ASCORBILA	A. XV	Alimentos a base de cereais processados Coco ralado Conservas alimenticias para uso infantil Creme vegetal Gomas de mascar Leite de coco Margarinas Oleos e gorduras	0,02 calculado sobre o teor da gordura 0,02 calculado sobre o teor da gordura 0,02 calculado sobre o teor da gordura 0,05 0,03 calculado sobre peso da base gomosa 0,02 calculado sobre o peso da gordura 0,02 0,05
TERC-BUTIL-HIDROQUINONA (TBHQ)	A. XIX	Alimentos processados a base de cereais Farinhas, extratos e flocos derivados da soja integral Gomas de mascar Oleos e gorduras	0,02 sobre o teor de oleo 0,02 sobre o teor de oleos e gorduras originais do produto 0,02 calculado sobre teor da base gomosa 0,02

ANTIOXIDANTES

ADITIVO	CODIGO DE ROTULAGEM	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MAXIMO g/100g - g/100ml
TOCOFEROIS	A. XI	Alimentos a base de cereais processados Coco ralado Creme vegetal Gomas de mascar Leite de coco Margarinas Oleos e gorduras Produtos de cacau Sopas e caldos	0,03 calculado sobre o teor de oleo 0,03 calculado sobre o teor da gordura 0,03 0,03 calculado sobre peso da base gomosa 0,03 0,03 0,03 0,03 0,05

no p. s. c. - no produto a ser consumido

q. s. p. - quantidade suficiente para obter o efeito desejado