

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
Doutor em Ciências de Alimentos.

CAMPINAS, SP, 1988

COMPARAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA ÁCIDOS BENZOÍCO E SÓRBICO
EM ALIMENTOS.

HELOISA MÁSCIA CECCHI

Engenheira de Alimentos

Mestre em Ciências de Alimentos

Profa. Dra. DÉLIA RODRIGUEZ-AMAYA

Orientadora

Parecer
Este exemplar corresponde a redação
final da tese desenvolvida por Heloisa Máscia
Cecchi e aprovada pela Comissão
Julgadora em 28.09.88.
Campinas, 28 de setembro de 1988

Aos meus filhos,
Felipe, Raul e Taís.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Délia Rodriguez-Amaya, pela orientação e constante apoio durante este trabalho, que muito contribuiu no desenvolvimento científico e crítico do mesmo, além do grande relacionamento de amizade.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de pesquisador concedida para a realização deste trabalho.

Aos Profs. Maria Cecília de Figueiredo Toledo, Marilene de Vuono Camargo Penteado, Eldiomar Angelucci, João Shojiro Tango e Olavo Russig, pelas sugestões apresentadas na redação final da tese.

Ao Prof. Cesar Francisco Giacco, diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos, que indiretamente contribuiu para a execução deste trabalho.

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

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

A minha família, Caio, Felipe, Raul e Tafs, pelo apoio e compreensão, principalmente na parte final do trabalho.

ÍNDICE

Página

Índice de Tabelas	v
Índice de Figuras	vii
Resumo	ix
Summary	xi

1. INTRODUÇÃO	01
---------------------	----

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
-------------------------------	----

2.1. Aditivos - Considerações gerais, legislação e segurança	05
---	----

2.2. Conservadores	09
--------------------------	----

2.2.1. Conservadores - Considerações gerais	09
---	----

2.2.2. Ácido benzóico	11
-----------------------------	----

2.2.3. Ácido sórbico	17
----------------------------	----

2.3. Métodos Analíticos para Conservadores	22
--	----

2.3.1. Métodos qualitativos	22
-----------------------------------	----

2.3.2. Métodos quantitativos para determinação individual de ácido benzóico e ácido sórbico	23
---	----

2.3.2. Métodos quantitativos para determinação simultânea dos ácidos benzóico e sórbico	25
--	----

2.3.3.1. Métodos espectrofotométricos	25
---	----

2.3.3.2. Métodos por cromatografia em camada delgada	28
---	----

2.3.3.3. Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência	32
2.3.3.4. Métodos por cromatografia gasosa	42
2.3.4. Confirmação da Identidade	42
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 49
3.1. Amostragem	50
3.2. Reagentes e Solventes	51
3.3. Extração	51
3.4. Separação dos Conservadores	55
3.4.1. Espectrofotometria de absorção ultra- violeta (UV)	55
3.4.2. Cromatografia em camada delgada	56
3.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência	57
3.5. Identificação dos Conservadores	60
3.5.1. Espectrofotometria de absorção ultra- violeta (UV)	60
3.5.2. Cromatografia em camada delgada (CCD-UV)	62
3.5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (GLAE-UV)	64
3.6. Quantificação dos Conservadores	65
3.6.1. Espectrofotometria de absorção ultra- violeta (UV)	65
3.6.2. Cromatografia em camada delgada (CCD-UV)	65
3.6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (GLAE-UV)	66

3.7. Estudo de Recuperação	68
3.8. Determinação da Quantidade Mínima Detectável dos Conservadores	68
3.9. Avaliação de Tempo e Custo dos três Métodos de Análise	69
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1. Padronização dos Métodos	70
4.1.1. Extração	70
4.1.1.1. Amostras líquidas	70
4.1.1.2. Amostras sólidas e pastosas	71
4.1.2. Condições ótimas para o método por GGD ...	74
4.1.3. Condições ótimas para o método por CLAE	75
4.1.4. Porcentagem de recuperação	75
4.1.5. Limite de detecção da técnica	80
4.1.6. Confirmação de identidade	82
4.2. Comparação dos Três Métodos	91
4.2.1. Análise do refrigerante de limão.....	91
4.2.2. Análise do suco de caju	93
4.2.3. Análise do catchup	97
4.2.4. Análise da margarina	100
4.2.5. Análise do iogurte	104
4.2.6. Análise da geléia de uva	107
4.2.7. Análise da goiabada	111
4.2.8. Análise da maionese	115
4.3. Custo e Tempo de Análise	118

4.4 Comentários sobre os Teores de Conservadores nos	
Produtos Analisados	123
5. CONCLUSÕES	128
6. BIBLIOGRAFIA	131

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
1. Atividade antimicrobiana do ácido benzóico	15
2. Atividade antimicrobiana do ácido sórbico	19
3. Determinação de conservadores por espectrofotometria por absorção UV	26
4. Determinação de conservadores por cromatografia em camada delgada	29
5. Determinação de conservadores por cromatografia líquida de alta eficiência	33
6. Determinação de conservadores por cromatografia gasosa	44
7. Estudo da resolução, recuperação e confirmação da identidade dos ácidos benzóico e sórbico nos três métodos estudados	46
8. Avaliação da extração para amostras sólidas	71
9. Comparação quantitativa entre os procedimentos de extração 4 (desenvolvido nesta pesquisa) e 5 (Tjan e Konter, 1972)	73
10. Separação entre ácidos benzóico e sórbico por GLAE em coluna de AMINO - SIL - X - I	76
11. Porcentagem de recuperação dos conservadores nos três métodos	79
12. Mínimo detectável dos conservadores pelas três técnicas de quantificação	81

13. Conteúdo de ácido benzóico (%) em refrigerante de limão	92
14. Conteúdo de ácido benzóico (%) em suco de caju	96
15. Conteúdo de ácido benzóico (%) em catchup	99
16. Conteúdo de ácido benzóico (%) em margarina	103
17. Conteúdo de ácido sórbico (%) em iogurte	106
18. Conteúdo de ácido sórbico (%) em geléia de uva	110
19. Conteúdo de ácido sórbico (%) em goiabada	113
20. Conteúdo de ácido sórbico (%) em maionese (referente ao primeiro lote) por GCD-UV	117
21. Relação dos melhores métodos para os produtos analisados	120
22. Custo das análises (por amostra) nas três técnicas (maio/88)	121
23. Limites máximos permitidos de ácidos benzóico e sórbico em alimentos	150

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

1. Estruturas dos conservadores.....	13
2. Espectro UV para os padrões de ácidos benzóico e sorbico	51
3. Cromatograma do método por CLAE-UV dos padrões, refrigerante de limão e suco de caju	77
4. Reprodução da camada delgada na Revelação 2 (Ministério da Agricultura)	83
5. Reprodução da camada delgada na Revelação 1 (Pinella et al., 1966)	84
6. Espectro IV do ácido benzóico padrão	86
7. Espectro IV do ácido sorbico padrão	87
8. Espectro IV do ácido benzóico em refrigerante de limão	88
9. Espectro IV do ácido benzóico em suco de caju	89
10. Espectro IV do ácido sorbico em geléia de uva	90
11. Espectro UV do ácido benzóico em refrigerante de limão	94
12. Reprodução da camada delgada revelada por lâmpada UV 254 nm	95
13. Espectro UV do ácido benzóico em suco de caju	98
14. Espectro UV do ácido benzóico em catchup	101
15. Cromatograma do método por CLAE-UV para catchup, margarina e malonese	102

16. Espectro UV do ácido benzóico em margarina	105
17. Espectro UV do ácido sórbico em iogurte	108
18. Cromatograma do método por CLAE-UV para iogurte, geléia de uva e golabada	109
19. Espectro UV do ácido sórbico em geléia de uva	112
20. Espectro UV do ácido sórbico em golabada	114
21. Espectro UV do ácido sórbico em malonese	116

RESUMO

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

Neste trabalho foram comparados três métodos de análise, utilizando absorção na região ultra-violeta (UV), cromatografia em camada delgada - UV (CCD-UV) e cromatografia de alta eficiência - UV (CLAE-UV). Foram analisados oito produtos: refrigerante de limão, suco de caju, catchup, maionese, margarina, iogurte, geléia de uva e goiabada.

Os métodos foram inicialmente testados, padronizados e modificados, definindo-se as condições ótimas de operação. Para a determinação dos conservadores em alimentos sólidos e pastosos, um método mais simples e econômico por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido na sua íntegra.

A análise estatística dos resultados demonstrou que

a escolha do método depende da natureza do produto. O método por UV é o mais preciso, simples, econômico e rápido, mas não é apropriado para produtos contendo os ácidos benzóico e sórbico simultaneamente, e/ou substâncias interferentes. Para estes produtos, o método por CLAE-UV é o mais adequado, embora o método por GCD-UV possa ser também utilizado para certos produtos. O método por CLAE-UV é o mais versátil, sendo aplicável para todas as amostras analisadas.

Em nenhum dos produtos analisados foram detectados ambos os conservadores, apesar de constar no rótulo de alguns deles. Os teores de conservadores encontrados estavam no limite máximo permitido pela legislação brasileira para suco e catchup, e bem abaixo para os demais produtos. Em alguns produtos, as quantidades encontradas de conservadores estavam abaixo do necessário para uma atuação efetiva contra os microrganismos, segundo os estudos desenvolvidos em meios de cultura. Entretanto, não é possível chegar a uma conclusão definitiva a este respeito, já que nos alimentos, outros fatores podem estar influenciando o desenvolvimento dos microrganismos.

SUMMARY

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

In this study, three methods of analysis utilizing absorption in the ultraviolet region (UV), thin layer chromatography (TLC) - UV and high performance liquid chromatography (HPLC) - UV, were compared. Eight products were analysed: lemon soft drink, cashew-apple juice, catchup, mayonnaise, margarine, yoghurt, grape jam and "golabada" (guava paste).

The methods were first tested, standardized and modified, defining the optimum operating conditions. For the determination of the preservatives in solid and pasty foods, a simpler and more economical HPLC method was developed.

Statistical analysis of the results showed that the choice of the method will depend on the nature of the samples. The UV method is more precise, simple, economical

and rapid, but it is not appropriate for products containing both preservatives, benzoic and sorbic acid, and/or interfering substances. For these products, the HPLC-UV method is more adequate, although the TLC-UV method could also be used for some products. The HPLC-UV method is the most versatile, being applicable to all products analysed.

None of the samples analysed contained both preservatives, although the labels declared both. The percentages of the preservatives encountered were at the limit for the juice and catchup, and much lower for the other products. In some products, the amounts obtained were below the minimum found necessary for an effective action against microorganisms in studies performed in culture media. No definitive conclusions could be reached in this respect, however, since other factors could influence microbial development in foods.

I N T R O D U Ç Ã O

1. INTRODUÇÃO

A utilização de conservadores em alimentos tem sido de grande importância desde que o homem começou a estocar suas colheitas. Antigamente, os alimentos eram conservados com ácidos, sal, açúcar e fumaça de madeira. Nos dias de hoje, é grande o número de conservadores químicos empregados em alimentos. Tais conservadores protegem os alimentos principalmente contra contaminações por fungos, leveduras e bactérias.

Como todo aditivo químico, os conservadores podem contribuir com sua parcela de toxicidade na alimentação, necessitando uma fiscalização contínua por parte do governo, para garantir que estão dentro dos limites considerados seguros. Por outro lado, as concentrações em produtos processados devem ser suficientes para uma ação efetiva contra os microrganismos.

A fim de 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

I N T R O D U Ç Ã O

comparação de vários métodos analíticos para conservadores. Os conservadores permitidos no Brasil são em número de nove, porém, o ácido benzóico, o ácido sórbico e seus sais são os mais utilizados, atuando na grande maioria de alimentos ácidos processados. Por este motivo o estudo se concentrou apenas nestes dois compostos.

Basicamente, foram estudados e comparados três tipos de análise: espectrofotometria de absorção na região ultra-violeta, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência.

No método por espectrofotometria de absorção ultra-violeta, os conservadores extraídos são quantificados diretamente no espectrofotômetro sem nenhuma etapa de limpeza. É um método bastante simples, rápido e de baixo custo, mas que pode ter seus resultados prejudicados pela presença de interferentes na amostra ou mesmo pela mistura de ambos os conservadores.

O método que utiliza separação em camada delgada antes da determinação por espectrofotometria de absorção ultra-violeta, tem a vantagem da separação dos interferentes da matriz, além da separação entre os dois conservadores, quando ambos estão presentes no alimento. Mas, existe a desvantagem de ser um método demorado e trabalhoso.

I N T R O D U Ç Ã O

O método por cromatografia líquida de alta eficiência, que permite a separação dos interferentes e entre os conservadores, é eficiente, relativamente rápido, porém o mais dispendioso.

Embora, vários métodos de análise possam ser encontrados na literatura, geralmente os conservadores são dosados individualmente, ou um só tipo de alimento é analisado quando a determinação é feita para a mistura.

Como os alimentos são sistemas muito complexos e variados, torna-se difícil a utilização de um único método de análise para todos eles. Portanto, nesta pesquisa, além de se estabelecer métodos analíticos mais aplicáveis as condições nacionais, procurou-se também criar um guia de métodos que melhor se aplique aos diferentes tipos de alimentos.

Vários alimentos processados foram avaliados, englobando bebidas, produtos proteicos, produtos lipídicos, produtos açucarados e produtos derivados de frutas e vegetais. As avaliações compreenderam: estudo da extração dos conservadores dos alimentos, separação entre os conservadores e interferentes provenientes da amostra e dos conservadores entre si, identificação e quantificação dos conservadores.

Espera-se que os resultados auxiliem os órgãos

I N T R O D U Ç Ã O

governamentais de vigilância sanitária na exigência de uma fiscalização e a indústria no controle rotineiro dos conservadores em alimentos, a fim de se chegar a uma maior proteção ao consumidor.

2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Aditivos - Considerações Gerais, Legislação e Segurança.

"Aditivo alimentar é toda substância não consumida normalmente 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 estão incluídas as substâncias denominadas contaminantes ou as que são adicionadas para manter ou melhorar as qualidades nutritivas" (Comissão do Codex Alimentarius, 1973).

Segundo o Decreto Lei No.986 de 21/10/69, da legislação brasileira: "Aditivo intencional é toda substância ou mistura de substâncias, dotadas ou não de valor nutritivo, ajuntada ao alimento com a 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".

De acordo com o item 3 da resolução No.17/76 do mesmo Decreto-lei, "será autorizado o emprego de aditivos intencionais, quando:

- a) necessários para conservar o valor nutritivo do alimento;
- b) contribuir para fornecer os componentes necessários aos alimentos de destinação dietética especial;
- c) aumentar a conservação ou estabilidade do alimento, melhorar suas características organolépticas, desde que não altere a natureza ou qualidade dos mesmos nem contribua para enganar o consumidor;
- d) contribuir como coadjuvante de fabricação, transformação, (preparação), tratamento, embalagem, transporte ou estocagem dos alimentos, e não se preste a encobrir o emprego de matérias-primas inadequadas, de materiais ou técnicas indesejáveis, em qualquer fase dessas atividades".

A toxicidade dos aditivos é um assunto que está atualmente bastante em evidência, quando se fala em defesa do consumidor. A avaliação toxicológica de aditivos para alimentos visa determinar o potencial tóxico de um aditivo e a dose que evidencia este potencial. O estabelecimento desta dose é obtida através da ingestão diária aceitável (IDA) (TOLEDO, 1987). Segundo a resolução No. 17/76 do decreto-lei No. 986 de 21/10/69, a IDA foi definida como: "A quantidade máxima do aditivo ou substância, que ingerida diariamente durante a existência do indivíduo, não ofereça risco aparente

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ou apreciável à saúde, expressa em miligramas de substância por quilograma de peso corpóreo (mg/kg p.c.)."

Os aditivos são agrupados em várias categorias toxicológicas:

Categoria A(1): Aditivos que já foram completamente avaliados pelo JECFA ("Joint Expert Committee on Food Additives") e que já receberam um IDA ou que não tem nenhuma restrição toxicológica. Exemplo: ácido cítrico, ácido ascórbico, β -caroteno, etc..

Categoria A(2): Aditivos cuja avaliação ainda não foi completada mas que são permitidos provisoriamente. Exemplo: amaranço, extrato de urucum, caramelo, etc..

Categoria B: Aditivos cuja avaliação pelo JECFA ainda está pendente. Exemplo: dioctil-sulfosuccinato de sódio(DSS), polifosfato de cálcio, etc..

Categoria C (1): Aditivos que não são considerados seguros para uso alimentício. Exemplo: bórax, amarelo naftol, etc..

Categoria C (2): Aditivos cujo uso está restrito por razões toxicológicas (Comissão do Codex Alimentarius, 1973).

É interessante apresentar um estudo feito por uma equipe de especialistas do IFT ("Institute of Food Technologists") sobre segurança de alimentos, comparando os compostos naturais tóxicos e os aditivos tóxicos (IFT, 1975). Segundo eles, 99% da dieta ingerida pelo homem consistem de

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

compostos naturais e apenas 1% de aditivos químicos. A toxicidade pode existir em ambos, porém testes de toxicidade são feitos apenas nos aditivos químicos, para os quais normas muito mais rígidas são exigidas. São citados como exemplos de produtos naturais conhecidos como tóxicos, as nitrosaminas, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, entre outros. Foi enfatizado o valor de uma dieta variável para assegurar que a ingestão de uma determinada substância seja insuficiente para causar danos. Isto se aplica aos componentes naturais, aditivos, e contaminantes, e serve como base para o conceito de "segurança em números", que diz que uma substância química pode ter efeito antagônico sobre outra numa dieta alimentar variada. Como conclusão, os autores chamaram a atenção ao fato de que dentre todas as substâncias químicas que estão presentes em nossos suprimentos alimentares (componentes naturais, defensivos agrícolas, aditivos químicos, e contaminantes naturais e artificiais) existe um maior desconhecimento quanto aos riscos associados aos compostos naturais.

2.2. Conservadores.

2.2.1. Conservadores - Considerações gerais.

A preservação dos alimentos tem sido uma constante na vida do homem, desde que ele começou a viver em grupos, principalmente para os que habitam certas áreas do globo, onde as colheitas se limitam a alguns meses do ano. Ácidos, sal, açúcar e fumaça de madeira foram utilizados como conservadores há longos anos, mas com a expansão de outros métodos de conservação, tornaram-se obsoletos como antimicrobianos. Os conservadores químicos postos a disposição dos técnicos em alimentos variou muito pouco durante os últimos anos. Compostos antigos ainda vem sendo largamente utilizados (Simão, 1986).

Nos Estados Unidos, o Comitê Departamental sobre Uso de Conservadores e Corantes em Alimentos em 1924 recomendou que os únicos conservadores permitidos em alimentos fossem o dióxido de enxofre e o ácido benzóico. Porém enfatizou-se que, com poucas exceções, o uso de um conservador químico seria desnecessário se fosse dada uma atenção especial à higiene durante o processamento, a estocagem, e o transporte. Entre 1940 e 1958 foram introduzidas regras mais amenas, que permitiram novos

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

conservadores como borax (por tempo limitado), nitrito, difenil e ortofenilfenol em alguns alimentos. Em 1959 e 1960 o Comitê de Padrões Alimentares publicou duas regulamentações que introduziram várias modificações nas já existentes. Em particular foi recomendado que deveria haver uma extensão da lista de conservadores permitidos, e os tipos de alimentos que poderiam contê-los. Em 1962 foram formuladas as regulamentações sobre conservadores em alimentos que existem até hoje (Pearson, 1971).

No Brasil data de 1965 a última definição de conservador sendo "a substância que impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas" (Decreto-lei No. 55871 de 26/03/65).

De acordo com "Food and Drug Administration" (FDA, 1979), os conservadores químicos são "qualquer composto químico que, quando adicionado ao alimento tende a evitar ou retardar a deterioração, não incluindo o sal comum, açúcares, vinagre, condimentos, ou óleos extraídos de condimentos, substâncias adicionadas ao alimento por exposição direta à fumaça de madeira, ou compostos químicos aplicados por suas propriedades inseticidas ou herbicidas".

Existem vários conservadores que podem ser utilizados na conservação dos alimentos. A escolha correta

vai depender de uma série de fatores, tais como: propriedades antimicrobianas e químicas; propriedades e composição do alimento em questão; o tipo de processamento utilizado no alimento; o tipo, características, e número de microrganismos; a segurança e o custo efetivo do conservador (Branen e Davidson, 1983).

Conservadores podem ser efetivos na preservação de alimentos por controle do crescimento dos microorganismos, ou destruindo diretamente todos ou parte deles. Em termos do modo de ação, os conservadores se enquadram em uma das três categorias: (1) reação com a membrana celular, causando aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares. (2) inativação de enzimas essenciais. (3) destruição ou inativação funcional do material genético (Davidson e Branen, 1981).

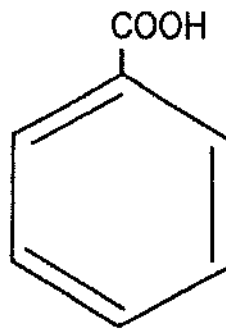
2.2.2. Ácido benzóico.

O ácido benzóico é um dos conservadores químicos mais antigos, utilizado nas indústrias de cosméticos, medicamentos e alimentos. Aparentemente, sua ação conservadora foi descrita inicialmente em 1875, quando se estabeleceu uma relação entre a ação do ácido benzóico e a do fenol (Luck, 1980). Como naquela época, o ácido benzóico não

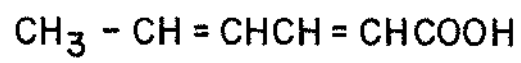
podia ser produzido sinteticamente em grandes quantidades, não foi utilizado como conservador em alimentos até por volta de 1900 (Luck, 1980). As vantagens de seu baixo custo, fácil incorporação nos produtos, falta de cor, e toxicidade relativamente baixa, tornaram-no um dos conservadores mais utilizados em todo o mundo (Chiple, 1983). É largamente empregado nos Estados Unidos, em níveis relativamente altos. Por outro lado, não é permitido em bebidas na Itália e Portugal e a França permite o seu uso somente em coalho (Tooley, 1971).

Devido a baixa solubilidade em água, o ácido benzóico, é normalmente adicionado aos alimentos na forma de sal de sódio. No entanto, no meio ácido dos alimentos, este se transforma em ácido, que é a forma ativa. A molécula não dissociada do ácido benzóico é a responsável pela atividade antimicrobiana (Figura 01a), (Chichester e Tanner, 1968).

O benzoato de sódio é geralmente considerado mais ativo contra as leveduras e bactérias, e menos ativo contra os fungos. Seu intervalo de pH para uma ótima inibição microbiana está entre 2,5 e 4,0, menor que aqueles para o ácido sórbico e propiônico (Chichester e Tanner, 1968). Gabel (1921) foi um dos primeiros a demonstrar que o ácido benzóico era efetivo contra bactérias em meio ácido ao nível de 0,1%, em meio neutro a 0,2%, mas inativo em meio alcalino.



a. ácido benzóico



b. ácido sórbico

Figura 01 - Estrutura dos conservadores.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Resultados similares foram encontrados para fungos e leveduras (Gruess e Richert, 1929). Gruess (1932) afirmou que a pH entre 2,3 e 2,4, somente 0,02 a 0,03% de benzoato de sódio era necessário para evitar o crescimento da maioria dos microorganismos fermentativos estudados e em pH entre 3,5 e 4,0, era necessário entre 0,06 e 0,10%, em sucos de frutas.

Pelo fato do teor de ácido não dissociado decrescer com o aumento do pH, a utilização de ácido benzóico ou benzoato de sódio como conservador para alimentos tem sido limitado a produtos que são naturalmente ácidos. Em princípio, estes compostos são usados como agentes antimicóticos, e a maioria de fungos e leveduras são inibidos com 0,05 a 0,1% do ácido não dissociado. Bactérias são geralmente inibidas com 0,01 a 0,02% de ácido não dissociado, mas algumas bactérias esporuladas são muito mais resistentes. As concentrações mínimas necessárias de ácido benzóico para atividade antimicrobiana, para vários tipos de microorganismos, estão apresentadas na Tabela 01 (Chiple, 1983).

Tabela 01 - Atividade antimicrobiana do ácido benzóico.

Microorganismos	Concentração mínima necessária para a inibição (%).
Bacillaceae	0,02
Enterobacteriaceae	0,01
Micrococcaceae	0,01
Fungos	0,10
Leveduras	0,05
Virus	1,0

Obs: O estudo foi realizado em meios de cultura com as condições ideais para cada microorganismo.

Referências: Branen e Davidson (1983), adaptado de Chichester e Tanner (1972) e Baird-Parker e Koolman (1980).

Nenhum conservador é completamente efetivo contra todos os microorganismos presentes num dado alimento, mas existem meios de contornar este problema. Por exemplo, combinações de ácido benzóico e ácido sórbico inibem várias cadeias bacteriológicas melhor do que apenas um dos dois conservadores (Luck, 1980). O efeito sinérgico também tem sido apresentado pela combinação de benzoato com dióxido de

enxofre, dióxido de carbono, cloreto de sódio, ácido bórico, ou sacarose (Chichester e Tanner, 1972; "The International Commission on Microbiological Specifications for Foods", 1980). Em adição, pode-se combinar os conservadores químicos com métodos físicos de preservação de alimentos, tais como aquecimento, refrigeração, irradiação, ou secagem (Chiple, 1983).

Testes de toxicidade revelaram que o ácido benzóico é relativamente mais tóxico que o ácido sórbico. Após investigações cuidadosas em relação ao homem, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos concluiu que: (1) benzoato de sódio em doses pequenas, 0,5g por dia, não é prejudicial à saúde; (2) benzoato de sódio em grandes doses, acima de 4g por dia, misturado com o alimento, não tem efeito prejudicial sobre a saúde e não é venenoso na acepção do termo; no entanto, altera ligeiramente certos processos biológicos não bem esclarecidos; (3) não altera o valor nutritivo do alimento (Chittenden *et al.*, 1909).

A dose de ingestão diária (IDA) fixado pelo Comitê Misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) é de 0 a 5mg/Kg de peso corpóreo (FAO/OMS, 1973). Sax (1979) citou que a DL₅₀ oral é 3040 mg/kg para ratos e a dose tóxica dérmica é de 6 mg/kg para humanos. Não existe perigo de acumulação de benzoato no organismo. A razão aparente por

esta alta tolerância é o mecanismo de detoxificação, no qual o benzoato é conjugado com a glicina produzindo ácido hipúrico, e assim é excretado na urina (Banfield, 1952).

O ácido benzóico é utilizado em vários alimentos, tais como: refrigerantes, sucos de fruta e derivados, geléias, gelatinas, conservas de doces e vegetais, margarinas, etc.. Tem a vantagem do baixo custo, mas a desvantagem de causar alteração de sabor e odor quando empregado em doses altas em alguns alimentos, tais como sucos de fruta (Chichester e Tanner, 1968).

2.2.3. Ácido sórbico.

Sabe-se que os ácidos monocarboxílicos de cadeia reta possuem ação fungistática. Pesquisadores japoneses relataram, por volta de 1930, que os ácidos insaturados comparados aos saturados de mesmo número de átomos de carbono, apresentavam um maior grau de atividade (Kitajima e Kawamura, 1931; Tetsumoto, 1933).

Em 1945, Gooding conseguiu patentear a utilização dos ácidos graxos insaturados com dupla ligação na posição α , como agentes fungistáticos em alimentos e embalagens para alimentos. Demonstrou que o ácido crotônico e seus homólogos

poderiam ser utilizados. O ácido sórbico, um dieno, mostrou-se particularmente efetivo, superando o ácido benzóico em certas aplicações, além de ser mais insípido e inodoro (Figura 01b).

Além do ácido sórbico, existem o sorbato de potássio e o sorbato de sódio, que possuem diferentes solubilidades em água, respectivamente 0,16g/100ml, 139,2g/100ml e 28g/100ml, à 20 °C (Chichester e Tanner, 1968).

O ácido sórbico e seus sais tem um largo espectro de atividade contra leveduras e fungos e menor atividade contra bactérias. A ação antimicrobiana aumenta com a diminuição do pH do substrato. A semelhança de outros ácidos contendo de 1 a 14 carbonos, a atividade conservadora dos sorbatos tem sido associada com a forma não dissociada do composto, enquanto que o ânion do ácido não é efetivo. O intervalo de pH de maior atividade se estende até pH 6,5, porém, o mais efetivo é ao redor da constante de dissociação do ácido (pKa) que é 4,75. Seu intervalo de ação está bem acima do ácido benzóico que atua em pH até 4,0, mas abaixo dos parabenes que agem em pH até 7,0 ou mais (Chichester e Tanner, 1968; Llewellyn e Marth, 1985; Sofos e Busta, 1983). As concentrações mínimas necessárias para uma ação efetiva do ácido sórbico em vários microorganismos, está apresentada na Tabela D2.

Tabela 02 - Atividade antimicrobiana do ácido sórbico.

Microorganismos	Concentração mínima necessária para a inibição (%).
Bacillaceae	0,02 ¹
Microcaceae	0,02
Enterobacteriaceae	0,01
Fungos	0,04
Leveduras	0,02

¹ O gênero Clostridium é geralmente mais resistente.

Obs: O estudo foi realizado em meios de cultura com as condições ideais para o desenvolvimento de cada microorganismo.

Ref: Chichester e Tanner, (1972).

Existem outros fatores que influenciam a atividade antimicrobiana do ácido sórbico como: atividade de água, temperatura, carga microbiológica inicial, tipo de microflora e certos componentes do alimento. A adição de certas substâncias, como o sal e o açúcar, ao alimento, reduz a atividade de água, melhorando a ação antimicrobiana (Baird-

Parker e Koolman,1980; Kushner,1971: "The International Commission on Microbiological Specifications for Foods",1980). Geralmente temperaturas acima ou abaixo da ótima para crescimento dos microorganismos aumentam o efeito do sorbato (Beuchat e Heaton,1982; Pederson *et al.*,1961; Robinson e Hills,1959). Atmosfera contendo CO₂ também auxilia o sorbato na inibição dos microorganismos. Experiências demonstraram que quanto menor a taxa inicial microbiana, maior o efeito inibidor do sorbato no crescimento dos microorganismos (Gooding *et al.*,1955). Porém, a ação não é generalizada, podendo alguns microorganismos crescer num meio com alto teor de sorbato, enquanto que outros podem metabolizá-lo. Alguns componentes dos alimentos podem aumentar a ação do sorbato como por exemplo, ácido cítrico, ácido láctico, condimentos, etc. (Restaino e outros,1982,1982a; Smittle e Flowers,1982). A combinação de mais de um conservador também vai influir no efeito do sorbato, agindo sinérgica, aditiva ou antagonisticamente a ele. A combinação de ácido sórbico e ácido benzóico, por exemplo, tem um efeito aditivo na inibição dos microorganismos (Baird-Parker e Koolman,1980; Lück,1980).

O ácido sórbico tem menor toxicidade que o ácido benzóico, porque talvez ele seja metabolizado da mesma forma que um ácido graxo pelo homem e animais, através da β - oxidação (Devel *et al.*,1954; Idem 1954a). A ingestão diária

aceitável (IDA) proposta pelo Comitê Misto FAO/OMS é de 0 a 25 mg/Kg de peso corpóreo. Nos Estados Unidos este aditivo é reconhecido como seguro - GRAS ("Generally Recognized as Safe") -, sendo que limites máximos são estipulados somente para certos alimentos com padrões de identidade estabelecidos, como queijos e margarinas (Chichester e Tanner, 1968; Noirfalise e Collinge, 1984). Estudos de toxicidade aguda em ratos, determinaram para sorbatos, valores de DL entre 7,4 e 10,5 g/kg de peso corpóreo (Smyth e Carpenter, 1948; Deuel *et al.*, 1954; Luck, 1976, 1980; Sofos *et al.*, 1979; Sofos e Busta, 1981). Para efeito de comparação a DL para sal comum (NaCl) é de 5 g/kg de peso corpóreo.

50

O sorbato pode ser utilizado como um aditivo direto, como um "spray" ou como banho, ou ainda como capa em embalagens. Ele normalmente pode ser adicionado aos seguintes alimentos: queijos e derivados, produtos de confeitaria, bebidas e xaropes, sucos de fruta e derivados, vinhos, geléias, gelatinas, conservas de frutas e vegetais, frutas secas, pickles, margarinas, carnes e peixes, etc. (Chichester e Tanner, 1968).

Segundo Pearson (1971), sua ação nos queijos é muito importante, por controlar o crescimento dos fungos embora não impeça a ação dos lactobacillus.

Liewen e Marth (1985), numa revisão da literatura, citaram estudos de vários autores onde demonstrou-se que o sorbato em níveis de 0,1 à 0,15% também tem efeito importante sobre os fungos que se desenvolvem em grãos, diminuindo assim a contaminação por micotoxinas. Outros estudos afirmaram a ação do sorbato sobre o *Clostridium botulinum*.

O mecanismo pelo qual o sorbato inibe o crescimento de microrganismos ainda não está bem esclarecido. Alguns autores sugerem inibição de vários sistemas enzimáticos, enquanto que outros sugerem a inibição do transporte de substrato para as células, segundo revisão de literatura realizada por Liewen e Marth (1985).

2.3. Métodos Analíticos para Conservadores.

2.3.1. Métodos qualitativos.

Os ácidos benzóico e sórbico são os conservadores mais utilizados em alimentos. No entanto, é difícil encontrar métodos analíticos padronizados, mesmo nos livros de análise de alimentos. A maioria dos métodos são apenas qualitativos, ou, quando quantitativos, determinam cada conservador separadamente.

Os métodos qualitativos devem ser práticos e rápidos, já que eles são utilizados apenas para verificar a presença ou não dos conservadores nos alimentos. Tais métodos podem ser encontrados no manual do A.O.A.C. (1984) para ácido benzóico e no livro de Pearson (1971) para os ácidos benzóico e sórbico.

No Brasil, o método qualitativo adotado pelo Ministério da Agricultura é descrito na apostila da Divisão de Normas Técnicas de Bebidas e Vinagres da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária e Secretaria de Inspeção de Produto Vegetal, onde a avaliação dos ácidos sórbico e benzóico é feita através da cromatografia em papel. No manual de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985), o ácido benzóico é identificado por reações colorimétricas, cromatografia em papel e absorção na região de infravermelho, enquanto que o ácido sórbico é identificado por cromatografia em papel. No entanto, para serem realmente úteis, as determinações devem ser necessariamente quantitativas.

2.3.2. Métodos quantitativos para determinação individual de ácido benzóico e ácido sórbico.

Vários métodos que avaliam cada conservador

separadamente são citados na literatura como os métodos espectrofotométricos para ácido benzóico, de Pearson (1971) para vinhos e refrigerante; da A.O.A.C. (1984) para bebidas e alimentos pastosos, e também para carnes; do Instituto Adolfo Lutz (1985) para bebidas; de Goo et al (1979) em molho de soja, e de Simai e Lopez (1983) em vários alimentos. Existem também, métodos mais sofisticados que utilizam cromatografia líquida de alta eficiência, tais como os métodos de: Smyly et al. (1976) para sucos e refrigerantes, que analisa conjuntamente sacarina e cafeína; Yoshida et al. (1981), para molho de soja; e Modi et al. (1983) que determina também os parabens para alimentos e bebidas.

Em relação ao ácido sórbico, métodos espectrofotométricos são também utilizados em vinhos (Caputi e Stafford, 1977; Ziemliss e Somers, 1978; A.O.A.C., 1984), em produtos lácticos (Maxstadt e Karasz, 1972; Roy et al., 1976; Graham, 1980; A.O.A.C., 1984; Instituto Adolfo Lutz, 1985) e em outros alimentos tais como ameixa seca (Stafford, 1976), salame (Holley e Millard, 1980), e em bebidas (Instituto Adolfo Lutz, 1985). Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência já foram relatados, tais como o de McCalla et al. (1977) em vinhos e o de Park e Nelson (1981) em suco de laranja.

Além desses existem ainda métodos por

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

cromatografia de camada delgada para ácido sórbico e bissulfito em vinhos (Sanchiz e Farre, 1983) e para ácido benzóico pela A.O.A.C. (1984). Nesse encontra-se também um método titulométrico, bastante trabalhoso e demorado para ácido benzóico.

2.3.3. Métodos quantitativos para determinação simultânea dos ácidos benzóico e sórbico.

2.3.3.1. Métodos espectrofotométricos (UV).

As características principais dos métodos espectrofotométricos UV, como tipos de amostra, extração, interferentes, recuperação e resolução estão apresentadas na Tabela 03.

O principal inconveniente destes métodos é a interferência que existe entre os ácidos sórbico e benzóico, como citado nos trabalhos de Gantenbeim e Karasz (1969), Karasz et al (1976) e Cantoni e Longoni (1978). Em outros três artigos, (Wahbi et al., 1977; Lopez e Sima, 1982, Almeida e Lopez-Roca, 1984), os conservadores são determinados através da 1ª. ou 2ª. derivada do espectro de absorção ultra-violeta.

TABELA 03 - Determinação de Conservadores por Espectrofotometria de Absorção U.V.

Amostras	Extração	Interferentes	Observações	Referência
Leituras de Frutas Sem extração		Os ácidos benzoico e sorbico interferem entre si. Este ácido fumárico e vanilina como interferentes	Util para alimentos comendo um único conservador	Santambina e Karasz, 1969
Suaveol, Geléia de Maracujá e Suco de Maçã	Mistura de éter etílico e éter de petróleo	Vanilina e compostos fenólicos são eliminados por extração com dióxido de potássio	Util para conservação simultânea dos ácidos sorbico e benzoico, mas há um risco de perda do ácido sorbico que é oxidado	Zamek, 1973
Suco de Laranja	Destilação a vapor	Faz redução do ácido sorbico para evitar interferência com o ácido benzoico	O ácido sorbico é parcialmente oxidado e convertido em um composto colorido, cuja absorvância é lida a 332 mμ	Bellinger et al., 1974
Carnes saladas	Éter de petróleo	Tem pequena interferência no intervalo de 200 a 300 mμ. Os ácidos benzoico e sorbico interferem entre si	Util para alimentos comendo um único conservador	Karasz et al., 1976
Marmelada, salada de frutas, patê, produtos de confeitaria, geléias, marmeladas, frutas aciduladas, mostarda e peixe	Éter etílico, acidificado com H ₂ SO ₄ 10N	A extração mais a redução com Zn deve eliminar as interferências. Há interferência dos ácidos sorbico e benzoico entre si	Não é útil para determinação simultânea dos ácidos sorbico e benzoico	Cantoni e Longoni, 1978
Sucos de frutas, refrigerantes, geléias e pedras	Éter etílico e éter de petróleo (1:1)	O método não é útil quando existe interferências (identidade não estabelecida)	Conservar medir os ácidos sorbico e benzoico simultaneamente através da determinação do espectro de absorção U.V.	Lowry e Bissel, 1982

continua...

TABELA 03 - Continuação.

Amostras	Extração	Interferentes	Observações	Referência
Sucos de frutas	Clorofórmio	Não cita nada	Determinação simultânea dos ácidos sorbico e benzoico através da 2ª derivada do espectro de absorção U.V.	Albala e Lopez-Roca, 1984

Os melhores artigos encontrados embora com alguns pequenos pontos desfavoráveis, foram o de Zonneveld (1975), onde a recuperação do ácido sórbico foi baixa (85%), devido à oxidação com dicromato de potássio, e o de Gutfinger *et al.* (1976) que utiliza destilação dos conservadores presentes em suco de laranja.

2.3.3.2. Métodos por cromatografia em camada delgada.(CCD-UV)

Há uma variação muito grande entre os métodos por cromatografia em camada delgada, já que estes podem utilizar diversos adsorventes e solventes. Entre todos os trabalhos citados na literatura, existem muitas variações em termos de método de extração, remoção de interferentes, sistemas cromatográficos, resolução, técnicas de detecção e quantificação e porcentagens de recuperação. Um resumo apresentando as principais diferenças entre esses métodos, está na Tabela 04.

A extração, na maioria das vezes, foi feita com solventes orgânicos, como éter etílico, éter de petróleo e clorofórmio (Tjan e Konter, 1972; Sabbagh *et al.*, 1977; Valdehita *et al.*, 1979, 1980; Mandrou e Bressolle, 1980). Flores *et al.* (1980) utilizaram um outro tipo de extração em microforno a alta temperatura.

TABELA 04 - Determinação dos Conservadores por Cromatografia em Fase Delgada.

Amostra	Extração e Limpeza	Fase Estacionária	Fase Móvel	Observações	Referência
Padrões	—	Kieselgel 6 + Kieselgel 6 ou Celulose	Hexano / Ácido Acé- tico (98:1) ou n- Butanol 35% / Acé- tato / Água (70:20:10)	A determinação foi apre- sentada e a de- tecção feita por re- veladores específicos	Dopius - Perrebon e Beekes, 1964
Refrigerantes, chá, geléias, catchup, picles, salmonese, etc.	Destilada à vapor + extração com clorofó- mo e éter etílico, os interferentes foram e- liminados na cromato- grafia	Kieselgel 6 + Sílica gel GF 254	Hexano / Ácido Acé- tico (98:1)	O ácido sorbico é de- tectado pela acção do Bromo. A detecção é por reveladores e pelo es- pectro U.V., que serve também para a quantifi- cação.	Pinella et al., 1966
Padrões	—	Pollanida	Forma testadas e misturas de solven- tes. Melhor foi acé- tato / Ácido acéti- co / água (42:2:4)	A detecção das manchas foi melhor na polianida do que na sílica	Kagansau et al., 1969
Padrões	—	Pollanida + síli- ca-gel + revela- dor de rodina 8	n-Hexano / benzeno / ácido acético (1:1:1) ou água / solução de rodina 20% (20:3)	Deteção foi com ilus- tração de radiação U.V. a 366 nm	Chiang, 1969
Padrões	—	Sílica gel GF 254 + Celulose NF 300 + 254	A fase superior re- saltante da mistura de éter de petró- leo / clorofórmio / CCl ₄ / ácido fóal- co / ácido acético (50:40:20:10:2)	Deteção feita através de vários reveladores e absorção em 254 nm	Bossale, 1971
Refrigerantes, sucos, geléias, vegetais e peles enlatados, marga- rina, salmão, etc.	éter etílico + éter de acetilado (1:1) e trans- ferência para etanol em elementos gordurosos	Sílica gel 6	Tertolun 4 misturas, onde a melhor foi: acetona / etanol / NH ₄ OH 25% (70:5:25)	Deteção feita por ab- sorção em U.V. e por reveladores especifi- cos. Não houve quanti- ficação.	Tjan et al., 1972

continua...

TABELA 04 - Continuação.

Amostra	Extração e Líquora	Fase Estacionária	Fase Móvel	Observações	Referência
Sucos e refrigerantes	Éter etílico + éter de petróleo (1:1)	Silica gel 60 F 254	Acetona / etanol / NaOH 25% (70:5:20)	Deteção feita por absorção U.V. e por reagentes específicos	Sabbagh et al., 1977
Conservas de frutas e vegetais, conservas de carne e peixe, geleias e produtos de confeitaria	Éter etílico ou éter de petróleo	Silica gel 60 ou poliamida, Melhor com poliamida	Vários solventes: o melhor foi: benzeno / acetato de etila / ácido acético (85:10:5)	Deteção por absorção U.V. e quantificação diretamente na placa por densitometria	Valdehita et al., 1980
Sucos	Éter etílico + éter de petróleo, Seguido de várias outras extracções muito longas e complicadas	Silica Gel 6F 254	Clorofórmio / Metanol / água (45:35:2)	Deteção por absorção em 254 nm e quantificação por densitometria	Mandou e Bressolle, 1980
Produtos cárneos	Extração em micro-ondas a altas temperaturas (200°C)	Silica gel 6F 254 + Celulose MN 300 F 254	n-hexano / CCl ₄ / clorofórmio / ácido fórmico / ácido acético (50:40:30:18:2)	Deteção em 254 nm. Atividade das placas controladas	Flores et al., 1980

Três artigos citam a utilização de sílica-gel G 60 com indicador de fluorescência GF-254. Tjan *et al.* (1972) testaram quatro misturas de solventes diferentes em vários tipos de alimentos, como refrigerantes, sucos, geléias, margarinas, etc., e obtiveram uma separação satisfatória entre os ácidos sórbico e benzóico no solvente acetona/etanol/hidróxido de amônia 25% (70:5:20). Já Sabbagh *et al.* (1977), não conseguiram boa separação entre os dois conservadores quando utilizaram exatamente as mesmas condições do trabalho anterior. Outros pesquisadores que utilizaram sílica-gel, porém com clorofórmio/metanol/água (65:35:7) como solvente, foram Mandrou e Bressole (1980). Neste caso, a separação entre os dois conservadores foi regular e a quantificação foi feita através de um densitômetro.

Outros tipos de adsorventes citados na literatura incluem: Kieselgel G /Kieselgur G (Copius-Peereboon e Beekes, 1964; Pinella *et al.*, 1966), poliamida (Nagasawa *et al.*, 1969; Valdehita *et al.*, 1979, 1980), sílica-gel/celulose (Copius-Peereboon e Beekes, 1964; Gossele, 1971; Flores *et al.*, 1980) e sílica-gel/poliamida (Chiang, 1969).

Na maioria dos trabalhos não foi obtida uma boa separação entre os ácidos sórbico e benzóico. As melhores separações foram conseguidas por Valdehita *et al.* (1979),

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

(1980), com poliamida como fase estacionária.

Para a detecção das manchas, em quase todos os casos, foi utilizada a absorção de radiação a 254nm em placas fluorescentes. Porém, alguns autores confirmaram a identificação com o uso de reveladores específicos (Copius-Peereboom e Beekes, 1964; Pinella *et al.*, 1966; Tjan e Konter, 1972; Sabbagh *et al.*, 1977). Quando foram feitas quantificações, estas foram realizadas através de eluição das manchas da camada e posterior leitura da absorção ultravioleta (Pinella *et al.*, 1966) ou leitura diretamente da placa com densitômetro na região ultra-violeta (Valdehita *et al.*, 1980; Mandrou e Bressolle, 1980; Flores *et al.*, 1980).

A avaliação da recuperação relatada em dois (Pinella *et al.*, 1966 e Mandrou e Bressolle, 1980) dos dez trabalhos citados acima variou de 89 à 100% para ambos os conservadores.

2.3.3.3. Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência.(CLAE)

Analisando a Tabela 05 podemos verificar que a determinação dos ácidos sórbico e benzóico por cromatografia líquida de alta eficiência abrangeu quatro tipos de

TABELA 05 - Continuação.

Amostra	Extração e Limpeza	Fase Estacionária	Fase Móvel	Observações	Referência
Iogurte	Muito longa e complicada com uso de muitos reagentes	ODS	Metanol/Tampão fosfático (1:9)	_____	Ito et al., 1983
Maionesa, geléia, ovos, etc.	Extração com mistura de Etanol/2-Propanol/Acetona/Ácido Oxálico. Congelamento e Centrifugação	Spherisorb ODS	Água/Metanol/Tetra-hidrofurano/Ácido Fosfórico (600:310:80:300) ou (900:310:80:300)	Deteção a 230 e 254 nm	Gertz e Herrmann, 1983
Maionesa	Testou dois tipos: (1) destilação à vapor (2) extração com éter etílico O (2) foi o melhor	Lichrosorb RP 18	0,05 M Tampão: acetato de NH_4 /acetoni-trila	_____	Ehlers e Littmann, 1984
Iogurtes	Extração com metanol após precipitação da gordura e proteínas	C-18	Metanol/Tampão Fosfático (15:9)	Deteção a 227 ou 250 nm para ácidos benzoico e sorbico, respectivamente	Stijne e Hirschhuber, 1984
Cerveja	Injeção direta, sem extração	RP 18	20% acetoni-trila/80% de 0,05 M tampão acetato de amônia	Compara o método por CLAE com um outro método do chamado HPLC reverso	Donahue et al., 1984
Refrigerantes e xarope de limão	Tri-n-octilamina 0,01 M a pH = 5,5 e Perclorato de Sódio 0,1 M	Lichrosorb RP 18	Gradiente de cinco tampões com pH entre 3 e 7	Deteção em 254 nm. Não todo longo e complicado	Puttenans et al., 1984
Iogurte	Três etapas: (1) tampão fosfato pH = 5,5 (2) Tri-n-octilamina 0,01 M em clorofórmio (3) Perclorato de sódio aquoso 0,1 M	RP 18	Tampão Fosfato/Metanol (40:60)	Deteção em 254 nm. Extração complicada com recuperação baixa	Puttenans et al., 1985

continua...

TABELA 05 - Determinações de Conservadores por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Amostra	Extração e Limpeza	Fase Estacionária	Fase Móvel	Observações	Referência
Leite adoçadíssimo, marmelada, catchup, picles, iogurte, queijos, etc.	Sem Extração. Colunas de limpeza Estrelut (Merck), boas para sa- logurt, queijos, trizes complexas com emulsão.	Wondapak C-18	Fase fosfato: H_2PO_4^- , 24,0 e KH_2PO_4	Deteção em 235 nm	Leisberger et al., 1979
Refrigerantes e sucos	Injeção direta da amo- stra sem extração. Me- tem limpeza porque os possíveis interferen- tes, sacarina e cafei- na, tem R_f menores	Chromapak 27811 com Lichrosorb 10 RP 18	Solução ácida de 11 de ácido perclórico + 18% de isopropanol	Deteção em 225 nm	Collings e Moirfalise, 1980
Maionesa	Extração com etanol por 5 min e centrifuga- ção. Repouso por 2 h no frio	MIMK com Lichrosorb RP 18	Solvente A: solução ácida de ácido per- clórico 11. Solvente B: 50% da solução A + isopropanol. Pro- gramação de solven- tes A e B	Deteção em 240 nm	Collings e Moirfalise, 1981
Refrigerantes, iogurtes, polme- ta, massas e pro- dutos de confei- taria	Líquidos: injetados sem extração. Sólidos e se- mi-sólidos: extraídos com solução hidroalco- ólica de ácido acético fórico	Lichrosorb RP 18	Fase fosfato: H_2PO_4^- , 24,0 e KH_2PO_4	Deteção em 235 nm	Teifiro et al., 1981
Repolho azedo, suco de cereja, vinhos brancos e tintos	Injeção direta sem ex- tração, somente com mi- crofiltrado	Hypersil-5-ODS	Mixtas misturas de solventes	Deteção em 230 nm	Frollich, 1982
Molho de soja, refrigerantes, bebidas lácteas	Limpeza com Sep-Pack 18 cartridge	Lichrosorb RP 18	-----	Deteção em 225 nm	Tersda et al., 1983

continua...

Amostra	Extração e Limpeza	Fase Estacionária	Fase Móvel	Observações	Referência
Vinho	See extração	C 18	Metanol/Água/Tamão de ácido cítrico pH = 4,0 (4:5:1)	Foi encontrado ácido sórbico em todas as amostras, mas o ácido benzoico não foi encontrado em nenhuma	Kine e Moriuchi, 1985
Margarina	A amostra foi aquecida, centrifugada, filtrada em microseparadora e injetada	Unistil Q - C 18	Fase: Acetato de Sódio 0,03 M / Ácido Acético: Metanol (4:1)	Deteção em 225 nm. Não foi encontrada diferença na recuperação dos conservadores quando comparada com o método que utiliza destilação e separação em cromatografia gasosa	Murakami et al., 1985
Produtos Caseiros	Etanol 70% por 10 minutos	Nova - pack - C 18 RP	(1) Solução Tampão: Solução aquosa de acetato de amônio 1,32 (p/p) (2) Metanol: Foi utilizado gradiente entre (1) e (2)	Compara com o método de acetato de 6C - MS e usa como confirmação de identidade	Ali, 1985
Sucos	Injeção direta sem extração, após filtração	Bondapak CN. Tentou colunas de RP 18 e NH ₂ , que deram resultados piores	Ácido Acético 22/Metanol (19:1)	Deteção em 254 nm. Houve interferência entre os ácidos sórbico e benzoico. A 230 nm a resolução foi boa entre ambos	Carnevale, 1980
Padrões	_____	Cianopropil com Lichrosorb CN	Várias misturas com os seguintes solventes: metanol, acetona, nitrila, tetrahidrofurano, água e ácido acético. Usou gradiente de solventes.	Deteção a 254 nm	Smet et al., 1984

continua...

TABELA 03 - Continuação.

Amostra	Extração e Limpeza	Fase Estacionária	Fase Móvel	Observações	Referência
Bebidas	Sem extração. Injeção direta após filtração	Troca aniônica: Zipax 12	Borato de Sódio 0.01 M (pH = 9.2)	Houve separação dos interferentes como vanilina e benzaldeído. Confirmação de identidade por variação de solventes	Nelson, 1973
Suco de Laranja	Sem extração. Injeção direta após centrifugação, filtração e diluição	Troca aniônica: Partisil - 10 - SAX	KH ₂ PO ₄ 0.025 M	Deteção a 230 nm. Confirmação de identidade por absorção em UV e análise fosforimétrica	Bennett et al., 1977
Suco de Laranja	Sem extração. Foi utilizado centrífugo e limpeza numa pré-coluna C 18	Gel de poliestireno / diâmetro benzeno	Acetonitrila / KH ₂ PO ₄ 0.05 M (40:60)	Deteção a 230 nm	Lee et al., 1986
Melancia, etc.	Coluna de Extralut (Merck) para limpeza	Sílica gel com Lichrosorb SI 60	Heptano / Éter dietílico / Ácido Acético (80:20:0.1) ou (90:10:0.05)	Foi o único método encontrado que utilizou coluna de fase normal	Aitretaulier e Arzberger, 1984

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

cromatografia: (1) fase reversa: colunas de C18, CN e NH₂; (2) troca iônica: colunas de troca aniônica do tipo amônia quaternária (3) exclusão de íons: coluna de poliestireno/divinilbenzeno; (4) fase normal: coluna de sílica-gel SI 60.

A grande maioria dos trabalhos utilizou a cromatografia de fase reversa, com coluna de C18 (sílica octadecil). Foram estudados os mais variados tipos de amostras, tais como: refrigerantes e sucos (Collinge e Noirfalise, 1980; Trifiro *et al.*, 1981; Fröllich, 1982; Puttemans *et al.*, 1984; Terada *et al.*, 1983), produtos lácteos como iogurtes, queijos, etc. (Leuenberger *et al.*, 1979; Trifiro *et al.*, 1981; Puttemans *et al.*, 1985; Ito *et al.*, 1983; Stijne e Hischenhuber, 1984), malonose (Collinge e Noirfalise, 1981; Gertz e Herrmann, 1983; Ehlers e Littmann, 1984), doces e geléias (Leuenberger *et al.*, 1979; Gertz e Herrmann, 1983), catchup, picles e molhos (Leuenberger *et al.*, 1979; Terada *et al.*, 1983), vinhos (Fröllich, 1982; Mine e Horiuchi, 1985), massas e produtos de confeitaria (Trifiro e outros, 1981), produtos cárneos (Ali, 1985), ovos (Gertz e Herrmann, 1983), cerveja (Donhauser *et al.*, 1984), e margarina (Murakami *et al.*, 1985).

A extração dos conservadores das diversas amostras foi também bastante variada. Foram citados desde extrações

mais simples com metanol ou etanol 70% (Stijne e Hilschenhuber, 1984; Ali, 1985), ou com misturas mais complexas de solventes (Puttemans *et al.*, 1984, 1985; Ito *et al.*, 1983; Gertz e Herrmann, 1983; Ehlers e Littmann, 1984; Stijne e Hilschenhuber, 1984; Murakami *et al.*, 1985), até a injeção direta da amostra, após filtração em micromembranas (Collinge e Noirfalise, 1980; Trifiro *et al.*, 1981; Frölich, 1982; Donhauser *et al.*, 1984), ou após a passagem da amostra por sofisticadas colunas de limpeza (Leuenberger *et al.*, 1979; Terada *et al.*, 1983; Aitzetmüller e Arzberger, 1984). A fase móvel utilizada na separação cromatográfica também variou muito, desde eluição isocrática até eluição por gradiente.

Em praticamente todos os trabalhos citados houve boa resolução entre os ácidos sórbico e benzóico. Também não houve problemas com interferentes.

A avaliação de recuperação dos conservadores foi realizada em quase todos os trabalhos e variou de 71 - 110 %, dando uma média de 90%, o que representa uma boa margem de recuperação.

De um modo geral, os trabalhos encontrados, que fizeram uso de fase reversa com colunas C₁₈, possuem boas qualidades nos diversos aspectos, embora alguns tenham certas inconveniências. Puttemans *et al.*, (1984), (1985) utilizaram um

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

método de extração muito longo e complicado, com conclusões difíceis de serem analisadas e, inclusive, com recuperação baixa. Ito et al. (1983) também realizaram uma extração trabalhosa e difícil.

Outros artigos fizeram um estudo mais completo, comparando o método por CLAE com outros métodos. Donhauser e outros (1984) compararam o método por CLAE com um outro método chamado isotacoforese. Os coeficientes de variabilidade foram menores para o método de isotacoforese, mas a recuperação foi semelhante para ambos os métodos. Murakami e outros (1985), por sua vez, compararam CLAE com cromatografia líquida gasosa, e concluíram não haver diferenças substanciais de recuperação entre ambos os métodos.

Apenas dois trabalhos utilizando a coluna CN (ciano) foram encontrados. No primeiro deles, Carnevale (1980) trabalhou com sucos, fazendo injeção direta, sem extração prévia. A coluna utilizada foi Bondapak CN e a fase móvel 2% ácido acético/metanol (19:1). A quantificação dos ácidos sórbico e benzóico foi boa com o detector de UV a 230 nm, mas a 254 nm houve interferência do ácido sórbico sobre o benzóico. A recuperação de ambos foi muito boa (ácido sórbico - 102% e ácido benzóico - 99%). Nas conclusões de seu trabalho, Carnevale (1980) comparou a coluna de CN com a de

RP-18 e a de NH₂ e concluiu que a de RP-18 não apresentava uma boa separação entre os dois conservadores, enquanto que a de NH₂, embora com boa resolução, não servia para o ácido ascórbico que era também de seu interesse. Num segundo trabalho, Smet *et al.* (1984), trabalharam com padrões sintéticos dos conservadores, em coluna Lichrosorb CN (cianopropil), testando vários solventes. A separação com uma boa resolução entre os dois ácidos só foi obtida com gradientes.

Um segundo tipo de coluna utilizado foi a de troca-aniônica. Uma coluna Zipax-1% com uma fase móvel 0,01 M de borato de sódio (pH=9,2) foi utilizada por Nelson (1973) para separar os conservadores de bebidas. As bebidas eram injetadas diretamente na coluna após filtração em micromembranas. Houve boa separação entre os dois ácidos e também dos interferentes, como vanilina e benzoaldeídos. A recuperação, ao redor de 99%, confirmou a eficiência do método. Bennet *et al.* (1977) também utilizaram uma coluna de troca aniônica, Partisil 10-SAX, e 0,225 M de KH₂PO₄ como solvente para separar os conservadores de suco de laranja. Os picos apresentaram-se bem resolvidos e sem interferência com detecção à 230nm. A recuperação foi cerca de 100% para o ácido sórbico e de 99% para o benzóico.

Um outro tipo de cromatografia líquida utilizada

foi a exclusão de íons. O único artigo encontrado foi o de Lee *et al.* (1986) que utilizaram uma coluna de gel de poliestireno/divinilbenzeno, e acetonitrila/0,05 M de KH_2PO_4 (40:60) como solvente. A amostra utilizada foi suco de laranja centrifugado e purificado numa pré-coluna de C-18. A resolução entre os dois aditivos foi de 1,6 ou mais no comprimento de onda de 230 nm. A recuperação de 93% dos conservadores demonstrou a eficiência do método. Porém, este é um método pouco difundido.

O quarto e último tipo de cromatografia utilizada na determinação de conservadores por CLAE foi a de sílicagel-fase normal. Aitzetmüller e Arzberger (1984), trabalharam com malonase entre outros produtos, na coluna de sílicagel (Lichrosorb SI 60) e com a mistura de solventes, heptano/éter diisopropílico/ácido acético (88:12:0,1) ou (90:10:0,05). A extração das amostras, é específica para amostras gordurosas, é feita em uma coluna de limpeza (Extrelut). A porcentagem de recuperação foi cerca de 90% para ambos os conservadores. Outra separação deste tipo, realizada com padrões sintéticos, foi obtida por Wildanger (1973) com uma nova mistura de solventes, iso-octano / éter etílico / ácido propiônico (1000/100/1,1). A separação entre os dois conservadores foi boa, mas não foram apresentados dados sobre a recuperação.

2.3.3.4. Métodos por cromatografia gasosa.

Os trabalhos sobre determinação de conservadores por cromatografia líquida gasosa envolvem principalmente estudos sobre os ácidos benzóico e sórbico e mais os ésteres do ácido - p - hidroxibenzóico, além dos ácidos propiônico e salicílico. Os alimentos utilizados foram os mais variados e estão apresentados na Tabela 06.

A obtenção dos conservadores foi geralmente por extração com éter etílico ou por destilação. Em cromatografia líquida gasosa é geralmente necessário se fazer uma derivação para tornar os conservantes voláteis. Para os conservadores é feita a siliinização, transformando-os em ésteres de trimetilsilil. As colunas utilizadas estão citadas na Tabela 06. A recuperação, quando realizada, variou entre 85% e 109% de um trabalho para outro, dando uma média em torno de 97% de recuperação. Existe um método desenvolvido no Brasil, em 1983, por Coelho *et al.*, que utilizou cromatografia gasosa na determinação dos ácidos sórbico e benzóico em vários tipos de alimentos.

2.3.4. Confirmação da identidade.

A identidade dos ácidos sórbico e benzóico foi

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

confirmada somente na minoria dos trabalhos citados na literatura. Quando utilizados métodos espectrofotométricos não foi realizada a confirmação da identidade em nenhum dos trabalhos. A identificação foi definida apenas pelo comprimento de onda de máxima absorbância. Ao contrário, nos métodos por cromatografia em camada delgada, a identidade dos conservadores foi quase sempre confirmada através de reações colorimétricas específicas. Nos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, foram poucos os autores que realizaram a confirmação da identidade dos conservadores. Esta confirmação foi feita através da comparação dos tempos de retenção em vários tipos de solventes.

A Tabela 07 resume os estudos sobre resolução, recuperação e confirmação de identidade dos ácidos benzóico e sórbico para os três métodos na revisão da literatura.

Amostra	Extração	Derivação	Colunas	Observações	Referência
Marmelada, mostarda, salmone, sardinhas em óleo, margarina, cervejas e vinhos	Éter etílico, acidificado com ácido sulfúrico e transferência para NaOH 0,1N	Hexa metildisilil-sano + ácido trifluoroacético ou H ₂ O - bis (trimetilsilil) acetato	SE - 30, com 100 - 120 mesh, temperatura programada - 90°C/min	Comparou a análise cromatográfica com e sem derivação e encontrou melhores resultados na primeira	Gosselo, 1972
Produtos de Padaria e margarina	Éter etílico acidificado com ácido ortofosfórico	Sem derivação	Carbowax 20 M (5%) - ácido ftálico em Chromosorb W (4M - DMCS)	Método rápido e conveniente para análise de rotina	Graveland, 1972
Refrigerantes e outros gases alifáticos	Éter etílico e Éter de Petróleo (3:1)	Sem derivação	Poropak a 100 - 120 mesh, t = 240°C	Testou mais de um tipo de extração com solventes, e estudou as perdas dos conservadores durante a evaporação do solvente	Fosden, Fryer e Troy, 1974
Bebidas	Éter etílico	Sem derivação	Chrom a 80 - 100 mesh com 5% dietilenglicol succinato + 1% de H ₂ PO ₄	O método pode ser aplicado também em xaropes, sucos, concentrados e extratos de frutas	Bertrand e Sarre, 1978
Molhos	Acetato de Etila	Sem derivação	92 SP - 1.200 e Acido Fosfórico 22 em Chromosorb 80 - 120 mesh, t = 175°C	—	Zigmunt, 1979
Xaropes de frutas, refrigerantes e sucos	Clorofórmio	Sem derivação	DDSP-PS 12 em Chromosorb 80 - 100 mesh t = 175°C	Estudou os possíveis interferentes como: 3,4 - dihidroquinazina e vanilina	Neale e Ridlington, 1978
Reína	3 X com Éter etílico	Metilação com di-azometano	DGA - 152 em Chromosorb W - 4M - DMCS com 80 - 100 mesh t = 130°C	—	Geachan et al., 1979

continua...

TABELA 04 - Continuada

Amostra	Extração	Derivação	Colunas	Observações	Referência
38 tipos de alimentos	Destilação seguida de extração com dicloro-etano	Ses derivação	2 colunas: - 101 PPM - SI 2025 + 12 H_2PO_4 em cromatograma N - 4H.DMS temperatura programada de 140° a 210°C a 3°C/min	Retenção 12 aditivos entre conservadores e antioxidantes	Ishihara et al., 1980
Produtos de Padaria	Destilação	Ses derivação	Cromatob 101	Utilizam programação de temperatura na separação cromatográfica	Petro - Turza et al., 1980
Refrigerantes, geléias e sucos de frutas	Extr. etílico + 40% de metanol (1:1)	Ses derivação	Extremo 6101 Sucinato II com ácido Fosfórico 12 em cromatob N	-----	Loez e Sinal, 1983
Suco, refrigerantes, margarinas, molhos, picles e produtos de confeitaria	Destilação e extração com solventes	Ses derivação	- 101 SE - 30 - SI 2025 + 12 H_2PO_4 - Porapak Q	Não foi encontrado irregularidades na adição dos conservadores na análise dos produtos analisados	Coelho et al., 1983
Vinhos	Extr. etílico	Ses derivação	PPM	-----	Ureta, 1984
Vários alimentos	Extr. etílico e par-ticulado sucessivo com solução de NaOH e dicloroetano	Tratado com N-metil-N-trifluoroacetato	SI 09 - 1 Varapet	-----	Nordic committee on Food Analysis, 1984

Tabela 07 - Estudo de Resolução, Recuperação e Confirmação de Identidade dos Ácidos Benzoico e Sérico nos Três Métodos Estudados.

Método	Resolução	Recuperação	Confirmação de Identidade	Referência
Absorção U.V. direta	-----	Na ordem de 90% para ambos	Só pelo espectro de absorção	Santenbera e Karast, 1969
Absorção U.V. direta	-----	Ácido Benzoico: 95,5 - 103,0% Ácido Sérico: 81,5 - 89,0%	Só pelo espectro de absorção	Zonneveld, 1975
Absorção U.V. direta	-----	Ácido Benzoico: 103% Ácido Sérico: 90%	Só pelo espectro de absorção	Karast et al., 1976
Absorção U.V. direta	-----	Entre 9% - 97% para ambos	Só pelo espectro de absorção	Cantoni e Longoni, 1978
Absorção U.V. direta	-----	Entre 97 - 103% para ambos	Só pelo espectro de absorção	Almeida e Lomença, 1984
Canais Delgada	A separação entre ambos foi melhor quando foi feita a brominação do ácido sérico	-----	Confirmação pelo espectro U.V. e reveladores específicos na camada delgada	Pisella et al., 1966
Canais Delgada	A separação foi regular de acordo com o cromatograma	-----	Confirmação por reveladores específicos na camada delgada e espectro U.V.	Gossale, 1973
Canais Delgada	A separação foi regular com os seguintes Rf's: Ácido Benzoico: 0,63 Ácido Sérico: 0,59	-----	Confirmação por reveladores específicos na camada delgada. Não foi feita quantificação	Tian et al., 1972
Canais Delgada	Separção insatisfatória	-----	Confirmação por reveladores específicos na camada delgada	Sabbagh et al., 1977
CLAE	Boa resolução	Ácido Benzoico: 87,4 - 99,8% Ácido Sérico: 80,0 - 98,3% padrão	Só pela comparação com Tr do ácido	Leuenberger et al., 1979

continua...

TABELA 07 - Continuação.

Método	Resolução	Recuperação	Confirmação da Identidade	Referência
CLAE	A resolução foi boa com os seguintes Irs: Ácido Benzoico: 9,75 min Ácido Sódico: 8,30 min	Ácido Benzoico: 99,32 ± 1,05% Ácido Sódico: 101,49 ± 1,39% padrão	Só pela comparação com Ir do padrão	Dallinger e Garfinkel, 1980
CLAE	A separação não foi discutida	Ácido Benzoico: 94,16 ± 4,31% Ácido Sódico: 94,21 ± 3,34% padrão	Só pela comparação com Ir do padrão	Zollinger e Meirfildner, 1981
CLAE	Boa resolução	Ácido Benzoico: 99,8 - 100,0% Ácido Sódico: 85,6 - 110,0% padrão	Só pela comparação com Ir do padrão	Wittke et al., 1981
CLAE	Boa resolução	_____	Confirmação pela separação cromatográfica em quatro solventes diferentes	Frolich, 1982
CLAE	_____	Ácido Benzoico: 98,2 - 101% Ácido Sódico: 94,2 - 101% padrão	Só pela comparação com Ir do padrão	Vereda et al., 1983
CLAE	_____	Ácido Benzoico: 93,3 - 96,7% Ácido Sódico: 94 - 98% padrão	Só pela comparação com Ir do padrão	Ito et al., 1983
CLAE	_____	Ácido Benzoico: 90,7% Ácido Sódico: 94,7% padrão	Só pela comparação com Ir do padrão	Berti e Marzani, 1983
CLAE	Os Irs foram: Ácido Benzoico: 5,3 min Ácido Sódico: 7,0 min	_____	Só pela comparação com Ir do padrão	Stilke e Hirschhäuser, 1984
CLAE	_____	Para ambos os casos entre: 90,2 - 103,2%	_____	Landauer et al., 1984
CLAE	Boa resolução	Ácido Benzoico: 71 - 74% Ácido Sódico: 84 - 90% padrão	_____	Pittetans et al., 1985

continua...

TABELA 07 - Continuação.

Método	Resolução	Recuperação	Confirmação da Identidade	Referência
CLAE	_____	Para sabões variou entre: 90,8 - 100,3%	_____	Min e Horuchi, 1985
CLAE	Os 3rs foram: Ácido Benzoico: 3,90 min Ácido Sulfônico: 7,05 min	Para sabões os ácidos foi ao redor de 92%	Por comparação com GC-MS	Alt, 1985
CLAE	Dos resultados a 230 nm	Ácido Benzoico: 97% Ácido Sulfônico: 102%	_____	Correale, 1980
CLAE	Dos resultados	No redor de 92% para sabões	Confirmação por variação de solventes na cromatografia	Nelson, 1973
CLAE	Os 3rs foram: Ácido Benzoico: 3,25 min Ácido Sulfônico: 7,33 min	Ácido Benzoico: 96,6 - 101% Ácido Sulfônico: 95,5 - 104,2%	Confirmação por absorção U.V. e análise fosforométrica	Bennett et al., 1977
CLAE	A resolução entre sabões foi de 1,6 ou mais	No redor de 92% para sabões	_____	Lee et al., 1986
CLAE	_____	Para sabões os ácidos foi en- tre: 83 - 97%	_____	Aitret Meller e Arzberger, 1984

3. MATERIAL E MÉTODOS.

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

Cinco tipos de amostras foram analisadas, totalizando oito produtos:

A. bebidas - refrigerante de limão e suco de caju

B. produtos açucarados - geléia de uva e golabada

C. molhos - catchup

D. produtos lipídicos - maionese e margarina

E. produtos protéicos - iogurte.

Foram estudados três diferentes métodos para determinação dos ácidos sórbico e benzóico:

A. espectrofotometria de absorção ultra-violeta (UV).

B. cromatografia em camada delgada (CCD-UV).

C. cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).

M A T E R I A L E M É T O D O S

3.1. Amostragem.

Os produtos foram comprados em supermercados em diferentes épocas do ano. Os pesos das amostras submetidas à análise variaram entre 25 e 50 g, dependendo do produto, em função dos teores existentes dos conservadores. Cada produto foi analisado em duplicata em cinco lotes diferentes da mesma marca, sendo que cada lote foi obtido misturando-se dois frascos de cada produto.

Para certos produtos, foi necessário um tratamento prévio das amostras, antes da extração propriamente dita. O refrigerante de limão foi degaseificado, através de agitação mecânica. O suco de caju foi filtrado à vácuo, a fim de se obter o suco clarificado. A margarina foi aquecida até a fusão, para facilitar sua dissolução em etanol durante a extração. A geléia foi homogeneizada com um pouco de água até formar uma pasta fina e fluida para melhorar a dissolução no solvente extrator. A golabada foi triturada a mão com uma espátula em almofariz, e homogeneizada com água até formar uma pasta como a geléia.

Uma comparação das quantidades de ácido benzóico em amostras de suco de caju com ou sem polpa foi realizada. A polpa foi separada do suco por filtração à vácuo em papel de filtro comum. A quantificação foi realizada seguindo-se a

MATERIAL E MÉTODOS

extração descrita no item 3.3.2, com posterior separação em camada delgada e leitura de absorção em UV, de acordo com os itens 3.4.2, 3.5.2 e 3.6.2.

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.

Inicialmente foram comparados três procedimentos de extração provenientes da literatura, (Cantoni e Longoni, 1978; Sabbagh e outros, 1977; Tjan e Konter, 1972). A partir deste estudo, chegou-se a um quarto procedimento, considerado o melhor para alimentos sólidos e pastosos e a um quinto, para alimentos açucarados.

3.3.1.Procedimento 1 - para amostras líquidas (Sabbagh *et al.*, 1977).

A.Pesar 50 g de amostra e transferir para um funil de separação.

B.Adicionar 25 mL da mistura de éter etílico e éter de

M A T E R I A L E M É T O D O S

petróleo (1:1).

G. Agitar por um minuto.

D. Separar a fase aquosa e extrair novamente com 25 mL da mistura de solventes. Reservar a fase orgânica.

E. Juntar as duas fases orgânicas e descartar a fase aquosa.

F. Secar com sulfato de sódio anidro.

G. Evaporar à vácuo até mais ou menos 2 mL, em evaporador rotatório, à aproximadamente 40 °C.

H. Transferir para um erlenmeyer e evaporar à temperatura ambiente até secar.

I. Dissolver o resíduo num volume conveniente de etanol 96%.

J. Fazer as determinações espectrofotométricas ou cromatográficas.

3.3.2. Procedimento 2 - para amostras líquidas (Tjan et al., 1972).

A. Pesar 50 g de amostra e transferir para um funil de separação.

B. Adicionar 50 mL de água e 4 mL de H_3PO_4 4N.

C. Adicionar 50 mL da mistura de éter etílico e éter de petróleo (1:1).

D. Agitar por um minuto.

E. Separar a fase aquosa e extrair novamente com mais 50 mL da mistura dos éteres. Reservar a fase orgânica.

F. Juntar as duas fases orgânicas e descartar a fase aquosa.

M A T E R I A L E M É T O D O S

G.Secar com sulfato de sódio anidro.

H.Evaporar em evaporador rotatório a vácuo até cerca de 2 ml, a 40 °C.

I.Transferir para frascos pequenos e com tampa e evaporar à temperatura ambiente até secar.

J.Dissolver o resíduo em etanol 96% até um volume conveniente.

L.Analisar por cromatografia ou espectrofotometria.

3.3.3.Procedimento 3 - para amostras líquidas (Cantoni et al., 1978).

A.Pesar 50 g de amostra e transferir para um funil de separação.

B.Adicionar 30 mL de água e 2 mL de H₂SO₄ 25%.

C.Adicionar 40 mL de éter etílico e agitar por um minuto.

D.Separar a fase aquosa e extrair novamente com 40 mL de éter etílico agitando por um minuto.

E.Juntar as duas fases orgânicas e descartar a fase aquosa.

F.Evaporar a vácuo até mais ou menos 2 mL, em evaporador rotatório a 40 °C.

G.Transferir para um frasco pequeno com tampa e deixar secar.

H.Dissolver o resíduo em etanol 96% até um volume conveniente.

I.Analisar por cromatografia ou espectrofotometria.

M A T E R I A L E M É T O D O S

3.3.4.Procedimento 4 - desenvolvido nesta pesquisa para aplicação em alimentos sólidos e pastosos.

A.Pesar 50 g de amostra num erlenmeyer .

B.Adicionar 100 mL de etanol 96%.

C.Agitar num agitador mecânico por 30 minutos.

D.Filtrar.

E.Tomar uma alíquota de 50 mL do filtrado e evaporar num evaporador rotatório a 40 °C até o volume desejado.

F.Analisar por cromatografia ou espectrofotometria.

3.3.5.Procedimento 5 - desenvolvido nesta pesquisa para amostras açucaradas

A.Pesar 50 g de amostra num erlenmeyer.

B.Adicionar 100 mL de etanol 96%.

C.Agitar num agitador mecânico por 30 minutos.

D.Filtrar.

E.Tomar uma alíquota de 50 mL do filtrado e evaporar num evaporador rotatório a vácuo, a 40 °C, até cerca de 25 mL.

F.Adicionar 25 mL de água destilada e 4 mL de H_3PO_4 4N e colocar num funil de separação.

G.Extrair com 50 mL da mistura de éter etílico e éter de petróleo (1:1). Reservar a fase orgânica.

H.Extrair novamente a fase aquosa com mais 50 mL da mistura etérea. Reservar a fase orgânica e descartar a fase aquosa.

M A T E R I A L E M É T O D O S

I. Juntar as duas fases orgânicas e evaporar até cerca de 2 ml a vácuo.

J. Transferir para um frasco pequeno e deixar evaporar a temperatura ambiente até secar.

L. Dissolver em etanol até volume conveniente.

M. Analisar por cromatografia ou espectrofotometria.

Foi necessária a utilização do procedimento 5, porque os produtos açucarados, além de formarem emulsão na extração com a mistura de éteres (procedimento 2), formavam um concentrado viscoso (de açúcares) quando extraídos pelo procedimento 4.

3.4. Separação dos Conservadores e Interferentes.

3.4.1. Espectrofotometria de absorção ultra-violeta (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 PYE-UNICAM, modelo S.P. 8000.

3.4.2. Cromatografia em camada delgada. (CCD-UV)

A separação dos conservadores e interferentes foi efetuada através da aplicação do extrato etanólico numa placa cromatográfica que foi desenvolvida num determinado solvente.

A fim de encontrar as melhores condições de separação, foram realizados estudos preliminares para escolha dos adsorventes e solventes mais convenientes.

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

A. acetona / etanol / NH₄ OH 25% (70:5:20), (Tjan e Konter, 1972).

B. n - propanol / NH₄ OH 25% / água (7:1:2).

C. benzeno / acetato de etila / ácido acético (85:10:5), (Valdehita et al., 1980).

D. hexano / ácido acético (96:4), (Pinella et al., 1966).

Escolhida a combinação hexano / ácido acético, foi avaliada a variação nas proporções entre ambos: (96:4), (92:8), (90:10), (88:12), (86:14), (82:18) e (80:20). Tais testes foram efetuados em placas de sílica-gel GF 254, utilizando-se padrões dos ácidos sórbico e benzoico, e a mistura de ambos.

M A T E R I A L E M É T O D O S

Dois tipos de adsorventes foram testados: (1) sílica gel GF 254, (2) sílica gel GF 254 + Kieselgur (1:1). Poliamida, que se revelou um ótimo adsorvente na separação dos ácidos benzóico e sórbico, segundo os trabalhos de Valdehita *et al.* (1979), não foi utilizada devido ao custo muito alto no Brasil, sendo muito mais cara que a sílica gel GF 254.

As placas de sílica-gel GF 254 foram preparadas em nosso laboratório, com um equipamento Desaga em placas de vidro de 20x20 cm. A ativação foi a 110 °C por 2 horas.

A separação final se deu aplicando-se 5 à 10 µL de amostra e padrões na camada de sílica-gel GF 254, desenvolvida com hexano / ácido acético (90:10), até cerca de 12 cm.

Os seguintes padrões foram preparados em etanol: (1) ácido benzóico P.A. (Carlo Erba) - 5 mg/mL, (2) ácido sórbico P.A. (J. B. Baker) - 1 mg/mL, (3) mistura de ambos, mantendo-se as mesmas proporções.

3.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência. (GLAE-UV)

Os extratos dos conservadores diluídos em etanol

M A T E R I A L E M É T O D O S

foram filtrados em micromembrana de $0,45\ \mu\text{m}$, antes de serem injetados no cromatógrafo através de uma seringa de $50\ \mu\text{L}$.

As condições de separação no cromatógrafo líquido foram determinadas através de estudos preliminares sobre fases estacionárias, fases móveis e fluxos das fases móveis.

Foram testados vários sistemas de solventes e sete colunas disponíveis em nosso laboratório, que apresentavam características compatíveis com a separação dos ácidos benzóico e sórbico, e que estão apresentados abaixo:

(A) Sílica - $13\ \mu\text{m}$ (B) Alumina neutra - $13\ \mu\text{m}$:

- 1% de ácido acético em hexano
- 5% de ácido acético em hexano
- 10% de ácido acético em hexano
- hexano:éter etílico:ácido acético (100:10:0,1)
- hexano:éter etílico:ácido propiônico (100:10:0,1)
- hexano:éter etílico:ácido acético (100:10:1)
- hexano:éter etílico:ácido acético (100:20:1)
- hexano:éter etílico:ácido acético (100:10:5)
- hexano:éter etílico:ácido acético (100:20:5)
- hexano:éter etílico:ácido acético (100:5:1)

(C) Troca aniônica - 30 - $44\ \mu\text{m}$:

- KH_2PO_4 0,0225M
- KH_2PO_4 0,1125M
- KH_2PO_4 0,225M

M A T E R I A L E M É T O D O S

- Na B O .10H O 0,01M
2 4 7 2
- Na B O .10H O 0,01M com NaNO 0,1M
2 4 7 2 3
- (D) Troca catiônica - 30 - 44 μ m:
 - H O deionizada
2
 - HCl 0,001N
- (E) C-18 SIL-X-1 - 13 μ m:
 - 5% de ácido acético em água
 - 0,1% de ácido acético em água
 - 10% de metanol em ácido acético 0,1%
 - 12% de acetonitrila em ácido acético 0,1%
 - 1% de ácido perclórico em água
 - 18% de isopropanol em ácido perclórico 1%
 - 20% de acetonitrila em água com tampão acetato pH=4,5
 - 55% de metanol em água com tampão fosfato pH=7,0
- (F) CN SIL-X-1 - 13 μ m (7) AMINO SIL-X-1 - 13 μ m:
 - ácido acético 2% / metanol (19:1)
 - ácido acético 1% / metanol (19:1)
 - ácido acético 0,5% / metanol (19:1)
 - ácido acético 0,2% / metanol (19:1)

Para as várias colunas e solventes foram estudados os seguintes fluxos: 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 2,00; 3,00 e 4,00 mL/min.

Após a conclusão dos testes preliminares, chegou-se às condições finais de operação do equipamento, nas quais

M A T E R I A L E M É T O D O S

houve uma boa resolução entre os ácidos sórbico e benzóico:

-CROMATÓGRAFO: marca Perkin-Elmer, modelo 1220, com detector de filtros UV/visível.

-COLUNA: AMINO - SIL - X - 1, 0,26 X 25 CM, Perkin-Elmer

-SOLVENTE: ácido acético 0,5% / metanol (19:1)

-FLUXO: 0,75 mL /min

-TEMPERATURA: ambiente

-COMPRIMENTO DE ONDA DO FILTRO NO DETECTOR: 254 nm

-QUANTIDADE DE AMOSTRA: de 20 a 50 μ L em seringa de 100 μ L.

3.5. Identificação dos Conservadores.

3.5.1. Espectrofotometria de absorção ultra-violeta (UV).

A detecção e identificação dos conservadores extraídos de cada amostra foi realizada tomando-se o espectro UV de 200 à 325 nm, em cubetas de 10 mm.

O comprimento de onda de máxima absorbância observado foi de 227 nm para o ácido benzóico e 255 nm para o ácido sórbico. Os espectros das amostras foram comparados com os espectros dos respectivos padrões (Figura D2).

A identificação através do comprimento de onda de

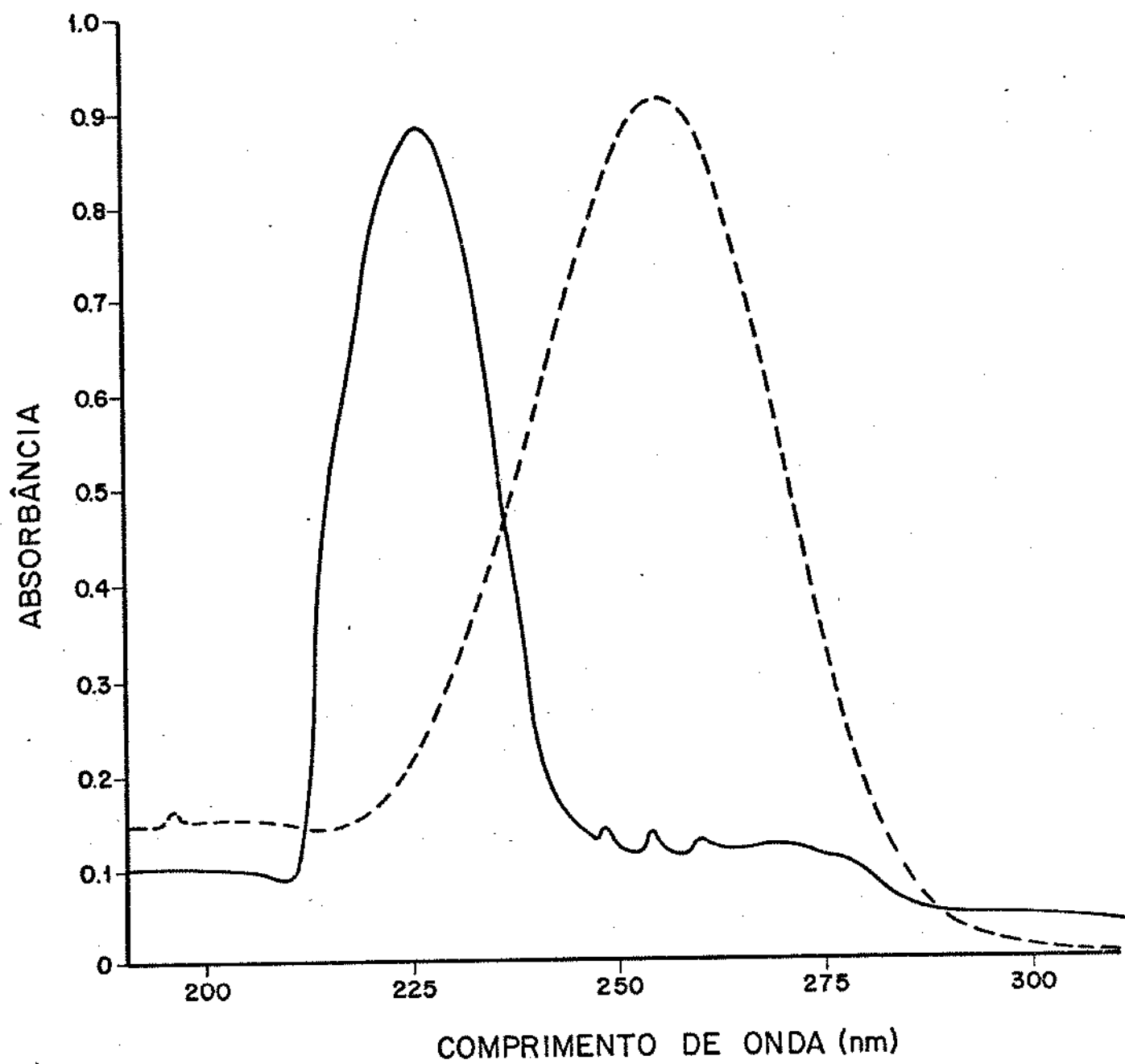


Figura 02 - Espectros de absorção UV dos padrões: ácido benzóico (—) e ácido sórbico (---).

M A T E R I A L E M É T O D O S

máxima absorção e do perfil do espectro pode ser não conclusivo pela presença de substâncias interferentes. Portanto, o espectro infra-vermelho(IV) foi também utilizado. Antes da preparação das pastilhas de KBr, os extratos etéreos foram evaporados até a secura e os extratos alcóolicos transferidos para a mistura etérea e depois evaporados, para a eliminação completa da água da amostra, Os espectros das amostras foram obtidos utilizando-se o espectrofotômetro infra-vermelho marca Perkin-Elmer, modelo 267.

3.5.2.Cromatografia em camada delgada.(CCD-UV)

Na camada delgada, as manchas invisíveis na luz natural foram localizadas por lâmpada com radiação ultravioleta curta (254 nm), em uma cabine de luzes UV, marca Heraeus, modelo fluotest. Os conservadores apareceram como manchas azuis arroxeadas sobre um fundo fluorescente. Foram comparados também os valores dos R_fs entre as amostras e padrões, como tentativa de identificação.

A identificação foi confirmada através do espectro de absorção UV e por revelação com reagentes específicos. As manchas foram raspadas e eluídas com etanol 96% da camada delgada, os espectros de absorção UV obtidos e comparados com

MATERIAL E MÉTODOS

os dos padrões.

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

3.5.2.1.Revelação 1 - Pinella *et al.* (1986).

A.Pulverizar intensivamente com uma solução de H_2O_2 3%, a placa com as amostras e padrões já separados.

B.Aquecer a placa em estufa à 90 °C por 5 min.

C.Pulverizar novamente com uma solução de $FeCl_3$ 2%.

D.O ácido benzóico torna-se uma mancha rosa clara, enquanto que o ácido sórbico, uma mancha amarela clara.

A separação cromatográfica realizada antes da revelação foi feita de acordo com o ítem 3.4.2, que utiliza sílica-gel GF 254 como adsorvente e hexano/ácido acético (90:10) como solvente.

3.5.2.2.Revelação 2 - Ministério da Agricultura.

A.Aplicar cerca de 10 μ L de amostras e padrões na camada de sílica-gel. (No método original a cromatografia foi realizada em papel).

B.Separar em cuba cromatográfica, utilizando como solvente n-

M A T E R I A L E M É T O D O S

butanol saturado com água e atmosfera saturada com hidróxido de amônio 4N.

G.Secar a placa e pulverizar com a mistura dos reveladores I e II, citados abaixo:

Revelador I: dissolver 0,75 g de verde de bromocresol e 0,25 g de azul de bromofenol em 1000 mL de etanol.

Revelador II: dissolver 2,5 g de permanganato de potássio e 5,0 g de carbonato de sódio decahidratado em 1000 mL de água destilada.

Observação: os dois reveladores devem ser misturados na proporção de (1:1) no momento da aplicação na camada.

D.A mancha do ácido benzóico fica amarela clara, e a do ácido sórbico, azul escura.

3.5.3.Cromatografia líquida de alta eficiência.(CLAE-UV)

Após a obtenção de um cromatograma onde houve uma boa resolução entre os ácidos sórbico e benzóico, a identificação se deu através da comparação de seus tempos de retenção com os tempos de retenção dos padrões injetados nas mesmas condições que as amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

3.8. Quantificação dos Conservadores.

3.8.1. Espectrofotometria de absorção ultra-violeta (UV).

Os valores das absorbâncias máximas nos espectros UV dos conservadores em cada amostra foram interpolados na curva padrão Absorbância X Concentração. Tal curva padrão foi construída a partir das seguintes concentrações de cada um dos dois conservadores: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg em 100 mL de etanol.

3.8.2. Cromatografia em camada delgada. (CCD-UV)

Após separação, os conservadores foram raspados da placa cromatográfica para um balão volumétrico de 10 mL com o auxílio de uma espátula de aço inoxidável. De uma porção não utilizada da placa, foi raspada uma área aproximadamente igual à da amostra, para servir como branco na leitura espectrofotométrica, como sugerido por Pinella *et al.* (1966). Tal procedimento se fez necessário uma vez que nos espectros obtidos utilizando-se etanol como branco, apareceram picos de interferentes provenientes da sílica gel.

Após diluição com 7 mL de etanol 96%, o balão foi

M A T E R I A L E M É T O D O S

tampado e agitado por 30 segundos e o volume foi completado. A solução foi centrifugada a uma velocidade média de 2.000 rpm por 5 min., para separação da sílica-gel. O sobrenadante foi decantado numa cubeta de quartzo de 1 cm, e foi registrado o espectro entre 200 e 325 nm.,

A partir da absorção máxima obtida no espectro, a concentração dos conservadores foi calculada de acordo com o descrito no item 3.6.1.

Foi tentada também a retirada das manchas com o auxílio de um aspirador a vácuo. Houve, porém, contaminação de uma amostra com outra, uma vez que a eluição do conservador do aspirador com etanol não foi completa.

3.6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência. (CLAE-UV)

A quantificação foi feita por comparação das alturas dos picos das amostras com as alturas dos picos dos padrões dos ácidos sórbico e benzóico. Os cálculos de quantificação foram realizados também através das áreas dos picos do cromatograma. Como os resultados foram bastante semelhantes aos cálculos por alturas, utilizou-se este último por ser o mais simples.

M A T E R I A L E M É T O D O S

As amostras e os padrões foram injetados no cromatógrafo, separadamente. Considerando-se que a injeção foi manual (por seringa), cada padrão ou amostra foi injetado no mínimo três vezes, a fim de se obter uma altura média representativa dos picos, embora uma boa reprodutibilidade tenha sido observada entre as injeções. As concentrações dos padrões utilizadas foram 0,02% para o ácido sórbico e 0,05% para o ácido benzóico.

Foi necessária a verificação da linearidade da resposta do detector em relação a concentração dos conservadores. Para tanto, foram preparados os seguintes padrões dos dois conservadores: 0,01%; 0,02%; 0,03%; 0,04% e 0,05% em etanol. Foram feitas injeções em triplicatas de cada padrão para se obter a altura média representativa dos picos no cromatograma. Construiu-se a curva padrão de altura (cm) contra concentração (%), para cada um dos dois ácidos. Demonstrada a linearidade na faixa das concentrações dos conservadores, o cálculo para cada amostra foi feita através da fórmula: $C_x = h_x \cdot C_p / h_p$, onde :

C_x - concentração do composto sendo quantificado

h_x - altura do composto sendo quantificado

C_p - concentração do padrão (ácidos benzóico e sórbico em concentrações conhecidas)

h_p - altura do padrão.

3.7. Estudo de Recuperação.

Os testes de recuperação foram realizados em todas as amostras, com a adição de soluções padrões dos ácidos sórbico e benzóico. Estas adições foram de 50% e 100% do teor do conservador encontrado em cada alimento. Todas as determinações foram feitas em duplicatas.

3.8. Determinação da quantidade mínima detectável dos conservadores.

O estudo foi realizado com padrões dos dois conservadores em várias concentrações, diluídos em etanol. Foi verificada a quantidade mínima detectável para os conservadores nos três métodos em estudo (UV, GCD-UV e CLAE-UV). O mínimo detectável seria a quantidade mínima do conservador, que se consegue observar.

Cabe lembrar que as avaliações feitas, foram em torno da técnica cromatográfica utilizada e não do método completo. Considerando que as recuperações foram boas, julga-se desnecessária a avaliação demorada e trabalhosa dos métodos completos.

M A T E R I A L E M É T O D O S

3.9. Avaliação de Tempo e Custo dos três 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. O cálculo foi feito separadamente para material permanente e material de consumo, pois em alguns casos o investimento inicial em equipamentos pode ser alto, mas a manutenção em material de consumo baixa, ou vice-versa.

3.9. Análise Estatística.

Os resultados das porcentagens dos conservadores foram expressos como médias, desvios-padrão e coeficientes de variação entre duplicatas.

A comparação entre os três métodos de determinação dos conservadores foi efetuada através da análise de variância para verificação se existia diferença entre eles. O resultado desta análise determinou a existência de diferença em pelo menos um dos métodos. 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.

4.1.1.1.Amostras líquidas.

Para a extração das amostras líquidas foram seleccionados e comparados os três procedimentos retirados da literatura e descritos em Material e Métodos como procedimentos 1, 2 e 3. A Tabela D8 apresenta as percentagens do ácido benzóico em refrigerante e suco obtidas por métodos UV e CCD-UV.

Embora a análise estatística não tenha mostrado diferença significativa entre os procedimentos 1 e 2, o último foi escolhido por apresentar sempre maiores percentagens do ácido benzóico, e geralmente, menores coeficientes de variação.

O suco de caju foi analisado sem polpa para facilitar o manuseio da amostra durante a extração no funil

Tabela 08 - Avaliação da extração para amostras líquidas.

Amostra	Método de quantificação	Concentração de ácido benzoico (%) ¹		
		Procedimento 1	Procedimento 2	Procedimento 3
Refrigerante de	UV	0,022 0,001 b	0,024 0,001 ab	0,023 0,002 a
líquido	CED-UV	0,017 0,002 a	0,018 0,001 a	0,019 0,002 a
Suco de	UV	0,088 0,003 a	0,091 0,002 a	0,077 0,006 b
caju	CED-UV	0,064 0,003 ab	0,070 0,002 a	0,056 0,004 b

¹ Médias = desvios-padrão de análises de cinco lotes em duplicata.

Procedimento 1 - Extração com a mistura de éter etílico e éter de petróleo (1:1), sem acidificação.

Procedimento 2 - Extração com a mistura de éter etílico e éter de petróleo (1:1), acidificado com HFO 4N.

Procedimento 3 - Extração com éter etílico puro, acidificado com H2SO4 0,5%.

Valores que não apresentam o mesmo subscrito são significativamente diferentes (P ≤ 0,01%).

de separação. Além disso, a retirada da polpa evitou a formação de emulsão durante a extração com a mistura etérea. Precisava-se, no entanto, garantir que tal remoção não resultava em perda do próprio conservador. Portanto, amostras com e sem polpa foram analisadas em duplicatas, por CCD-UV, obtendo-se quantidades de ácido benzóico de 0,105% na primeira e 0,117% na segunda amostra. A maior quantidade no suco sem polpa, pode até implicar em que a polpa estivesse dificultando a extração do conservador, talvez pela formação de emulsão.

4.1.1.2. Amostras sólidas.

O procedimento 2 de extração empregado nas amostras líquidas, não pôde ser utilizado na extração das amostras sólidas e pastosas, pois houve formação de muita emulsão. Tjan e Konter (1972), que desenvolveram o procedimento 2, sugeriram que amostras sólidas e gordurosas fossem extraídas primeiramente com etanol, e os conservadores posteriormente transferidos para uma mistura de éter de petróleo e éter etílico, e novamente para etanol após a completa evaporação. Devido às várias etapas envolvidas neste procedimento, possibilitando maiores perdas do conservador e maior tempo de análise, testou-se a extração direta com etanol 96% (procedimento 4). Esta extração simples mostrou-se eficiente como demonstra a Tabela 09, para margarina e catchup.

Tabela 09 - Comparação quantitativa entre os procedimentos de extração 4 (desenvolvido nesta pesquisa) e 5 (Tien e Kontar, 1972).

Amostra	Método de quantificação	Concentração de ácido benzoico (Z) ¹	
		Procedimento 4	Procedimento 5
Cachup	CCD-UV	0,093 0,001	0,080 0,002
	CLAE-UV	0,125 0,001	0,085 0,002
Margarina	CCD-UV	0,051 0,002	0,046 0,003
	CLAE-UV	0,066 0,001	0,045 0,002

¹ Médias e desvios-padrão de análises feitas em duplicata.

Procedimento 5 - Extração com etanol 96%, seguida de partição na mistura de éter etílico e água de petróleo (1:1).

Procedimento 4 - Extração com etanol 96%.

O alto teor de açúcar presente na geléia e na golabada, resultou num extrato muito viscoso e de difícil manipulação quando da extração pelo procedimento 4. Portanto, foi empregado o procedimento 5 que utiliza na extração etanol 98%, seguido por partição para uma mistura de éter etílico e éter de petróleo (1:1).

4.1.2. Condições ótimas para o método por CCD.

A técnica de CCD revelou ser vantajosa pois promove a separação entre os ácidos benzóico e sórbico, além de separá-los e dos possíveis interferentes. A resolução entre os conservadores foi demonstrada apenas através de padrões, já que os mesmos não foram encontrados juntos nas amostras analisadas, apesar da coexistência declarada nos rótulos de algumas amostras como suco e margarina.

Após os testes com quatro fases móveis e duas fases estacionárias, descritas no ítem 3.4.2., as condições ótimas finais foram as seguintes:

- fase estacionária: sílica gel GF 254
- fase móvel: hexano/ácido acético (90:10)
- volume de aplicação da amostra: 5 a 10 μ l
- altura do solvente: cerca de 12 cm.

4.1.3. Condições ótimas para o método por GLAE-UV.

O método que utiliza GLAE-UV tem a vantagem de efetuar a separação dos interferentes e dos conservadores, ao mesmo tempo que realiza a identificação tentativa e quantificação. Para se chegar às condições ideais de trabalho, testou-se várias fases móveis e estacionárias (descritas no item 3.4.3.).

A separação entre os dois conservadores foi obtida somente na coluna de Amino-Sil-X-1. As condições ideais de separação foram conseguidas após a tentativa com quatro proporções diferentes do solvente e vários fluxos, que estão resumidas na Tabela 10, através da análise dos tempos de retenção de cada conservador, dos fatores de separação, e das resoluções entre ambos. Foi escolhido o sistema de solvente ácido acético 0,5% / metanol (19:1), com fluxo de 0,75 ml/min pelo maior fator de separação (α) e maior resolução (R). A Figura 03a mostra o cromatograma de separação dos dois conservadores obtido com padrões, já que nenhuma amostra continha os dois conservadores.

4.1.4. Porcentagem de recuperação.

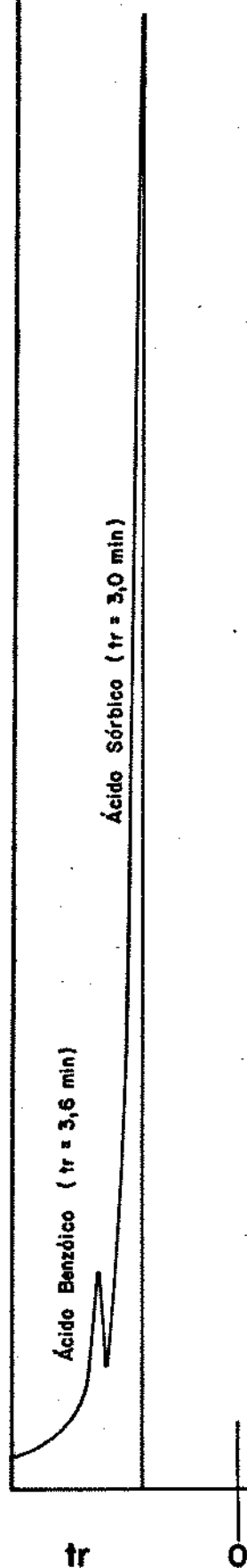
Numa tentativa de analisar a possibilidade de perdas dos conservadores durante a análise, as porcentagens

Tabela 10 - Separação entre ácido benzóico e ácido sórbico por CLAE em coluna de AMINO - SIL - X - I.

Solvente	Fluxo (ml/min)	Tempos de Retenção (cm)		Fator de Separação (α)	Resolução (R)
		Ácido sórbico	Ácido benzóico		
Ácido acético 2% / Metanol (19:1)	2 1	1.30 2.00	1.70 2.30	1.31 1.33	0.67 0.67
Ácido acético 1% / Metanol (19:1)	2 1 0.5	1.60 2.50 4.65	2.20 3.55 6.60	1.38 1.42 1.42	1.09 1.10 1.30
Ácido acético 0.5% / Metanol (19:1)	3 2 1 0.75 0.5	1.35 1.93 3.10 3.80 6.00	2.05 3.00 4.65 5.90 9.20	1.52 1.54 1.50 1.53 1.53	1.27 1.27 1.41 1.75 1.73
Ácido acético 0.2% / Metanol (19:1)	2 1	3.40 6.00	5.60 9.80	1.63 1.63	1.57 1.62

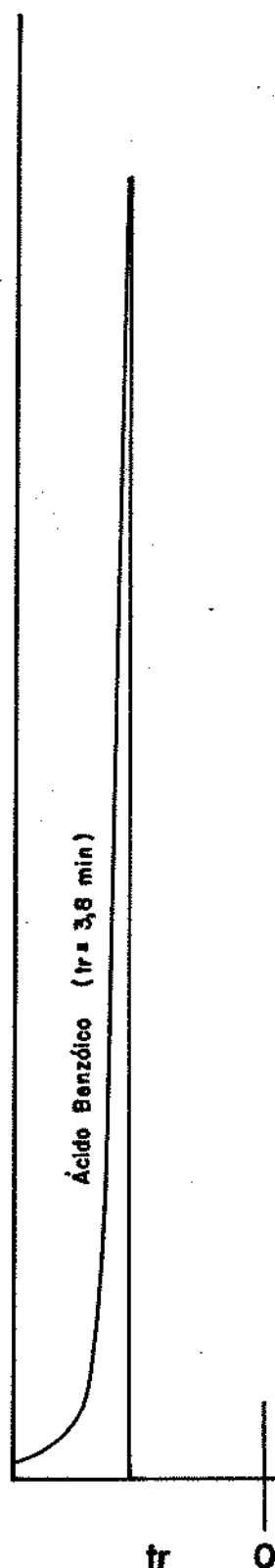
1 Médias de três medidas.

SINAL



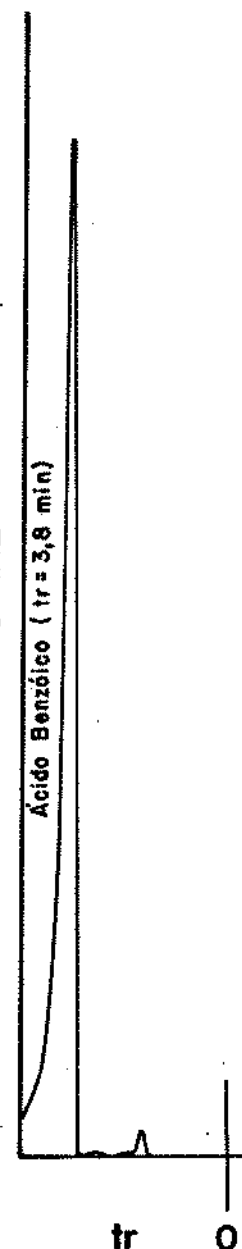
a

SINAL



b

SINAL



c

Figura 03 - Cromatogramas obtidos pelo método CLAE - UV - coluna: AMINO SIL - X - I, solvente ácido acético 0,5% / metanol (19:1), detector UV: 254 nm; AUFS: 0,1; fluxo: 0,75 ml/min. (a) mistura padrão, (b) refrigerante de limão, (c) suco de caju.

de recuperação foram determinadas e os resultados resumidos na Tabela 11.

O método por UV mostrou uma recuperação média entre todos os produtos de cerca de 97%, e foi o método que apresentou maior porcentagem de recuperação. Em seguida veio o método por CLAE-UV com aproximadamente 96% de recuperação, e por último, o método por CCD-UV com 94%. As diferenças entre eles foram pequenas, mas os resultados estão de acordo com o grau de complexidade de cada método. Isto é, o método por CCD-UV, que envolveu uma maior manipulação, obteve a menor taxa de recuperação, enquanto que o método por UV que é o mais simples, obteve a maior. A menor porcentagem de recuperação foi de 89%, o que demonstra que não houveram perdas apreciáveis durante a análise nos três métodos.

Nos três métodos, os dois produtos que apresentaram as maiores porcentagens de recuperação foram a geléia de uva, com uma média de 103%, e o iogurte com 97% de recuperação média. Os demais produtos obtiveram médias de recuperação acima de 90%.

Tabela 11 - Percentagem de recuperação dos conservadores pelos três métodos.

Amostra	Conservador	% de recuperação ¹					
		Método UV		Método CCl ₄ -UV		Método CLAE-UV	
		50% ²	100% ³	50% ²	100% ³	50% ²	100% ³
refrigerante de limão	ácido benzóico	90	99	90	94	97	96
suco de caju	ácido benzóico	97	97	97	96	94	93
catchup	ácido benzóico	93	93	92	82	95	92
margarina	ácido benzóico	96	97	84	91	97	93
iogurte	ácido sorbico	101	101	93	96	97	97
geléia de uva	ácido sorbico	107	111	98	96	107	97
goiabada	ácido sorbico	94	94	92	92	94	94

¹ Médias das análises em duplicatas.

² Adição de 30% a mais da quantidade do conservador encontrado na amostra.

³ Adição de 100% a mais da quantidade do conservador encontrado na amostra.

4.1.5. Limite de detecção da técnica.

O nível mínimo detectável para cada técnica UV, CCD-UV e CLAE-UV, está apresentado na Tabela 12.

A técnica que resultou nos menores limites para ambos os conservadores foi a de CLAE-UV, demonstrando a sua maior sensibilidade. O mínimo detectável foi menor na técnica de CCD-UV do que na de UV, pois o primeiro depende apenas de uma visualização direta na placa, enquanto que a segunda depende da percepção de um pico do composto no espectro UV que numa concentração muito baixa pode ser confundido com os ruídos do equipamento.

As diferenças obtidas nos mínimos detectáveis entre os ácidos sórbico e benzóico estão relacionadas com o comprimento de onda de absorção máxima. A lâmpada UV utilizada para a visualização na camada delgada tem comprimento de onda de 254 nm, e o filtro do detector do cromatógrafo líquido está ajustado neste mesmo comprimento de onda. Portanto, a sensibilidade foi muito maior para o ácido sórbico que absorve em 255 nm do que para o ácido benzóico que absorve em 227 nm em etanol. No método por UV a diferença de sensibilidade entre os dois conservadores não foi tão grande porque a leitura foi feita em 254 e 227 nm, respectivamente.

Tabela 12 - Mínimo detectável dos conservadores pelas três técnicas de quantificação.

Método	Acido Benzoico	Acido Sórbito
UV (AUF5=1)	3.0 ug	1.5 ug
CCD-UV	2.0 ug	0.5 ug
CLAE-UV (AUF5=0,1)	1.0 ug	0.05 ug

De qualquer forma, os três métodos possuem sensibilidade suficiente para a determinação de ambos os conservadores, nos níveis que são normalmente adicionados em alimentos.

4.1.8. Confirmação de identidade.

A confirmação da identidade foi realizada através de três parâmetros: (1) espectro UV, (2) revelação dos conservadores com reagentes específicos na camada delgada, e (3) espectro infra-vermelho.

A revelação recomendada pela apostila de métodos de análise da Secretaria de Defesa Agropecuária e Inspeção de Produto Vegetal do Ministério da Agricultura apresentou manchas com cores fortes, quando o cromatograma foi desenvolvido por n-butanol saturado com água destilada, condições cromatográficas que não resultaram em boa separação dos dois conservadores (Figura 04). Portanto, esta técnica de revelação não pode ser utilizada em amostras com os dois conservadores. A revelação descrita por Pinella *et al.* (1966) apresentou uma diferenciação boa e específica entre as cores das manchas dos dois conservadores, sendo que a coloração do ácido benzóico foi menos intensa (Figura 05).

Confirmou-se na camada delgada a presença de ácido

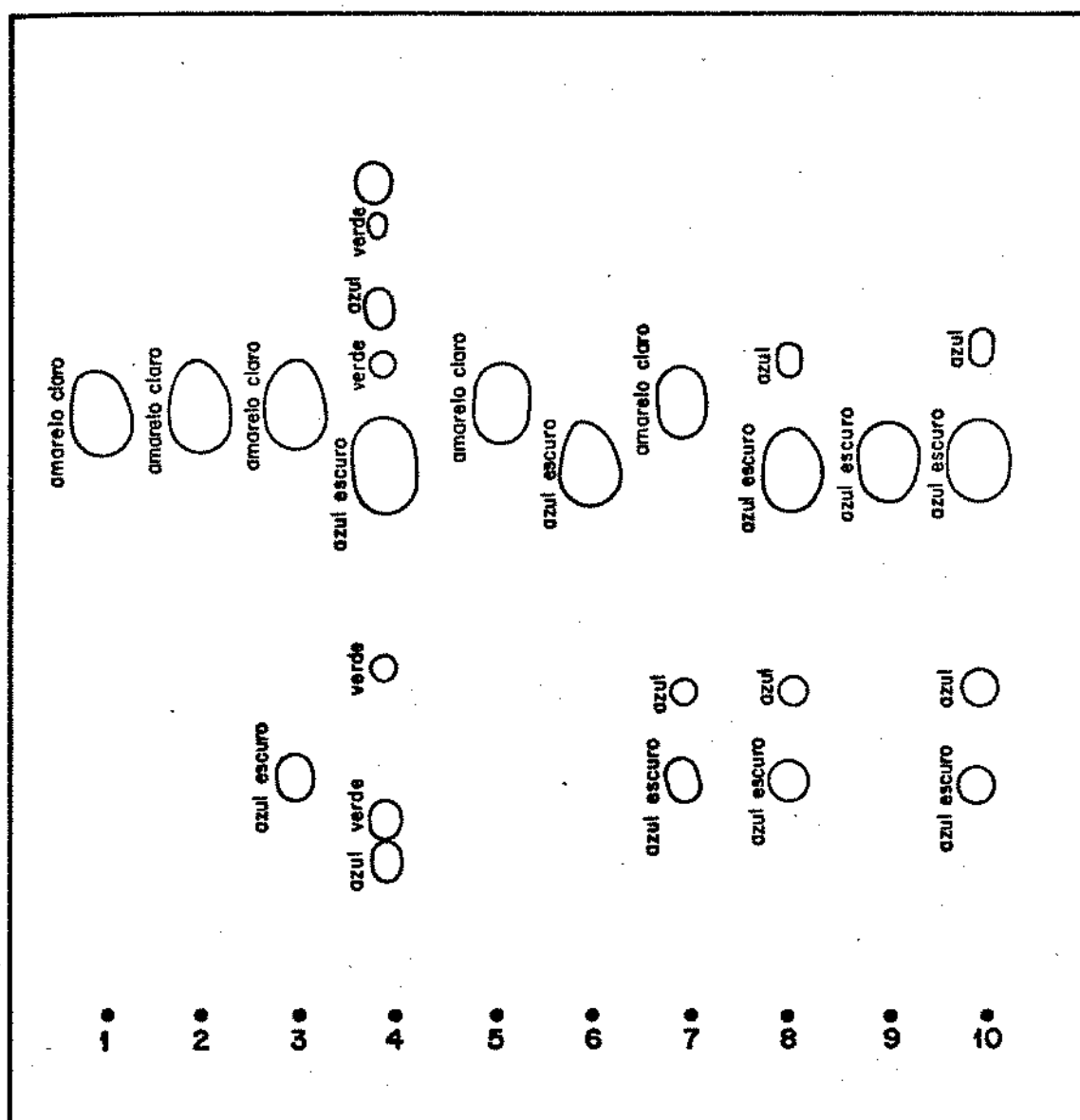


Figura 04 - Reprodução da camada delgada revelada pela mistura 1:1 do reagente 1: 0,075g de verde de bromocresol e 0,025g de azul de bromofenol em 100 ml de etanol, e reagente 2: 0,25g KMnO_4 e 0,50g carbonato de sódio decahidratado, dissolvido em 100ml de água (Ministério da Agricultura) nos seguintes produtos: 1.refrigerante de limão, 2.suco de caju, 3.cat chup, 4.maionese (referente ao primeiro lote), 5. ácido benzóico, 6.ácido sôrbico, 7.margarina, 8.iogurte, 9.geléia de uva, 10.goiabada.

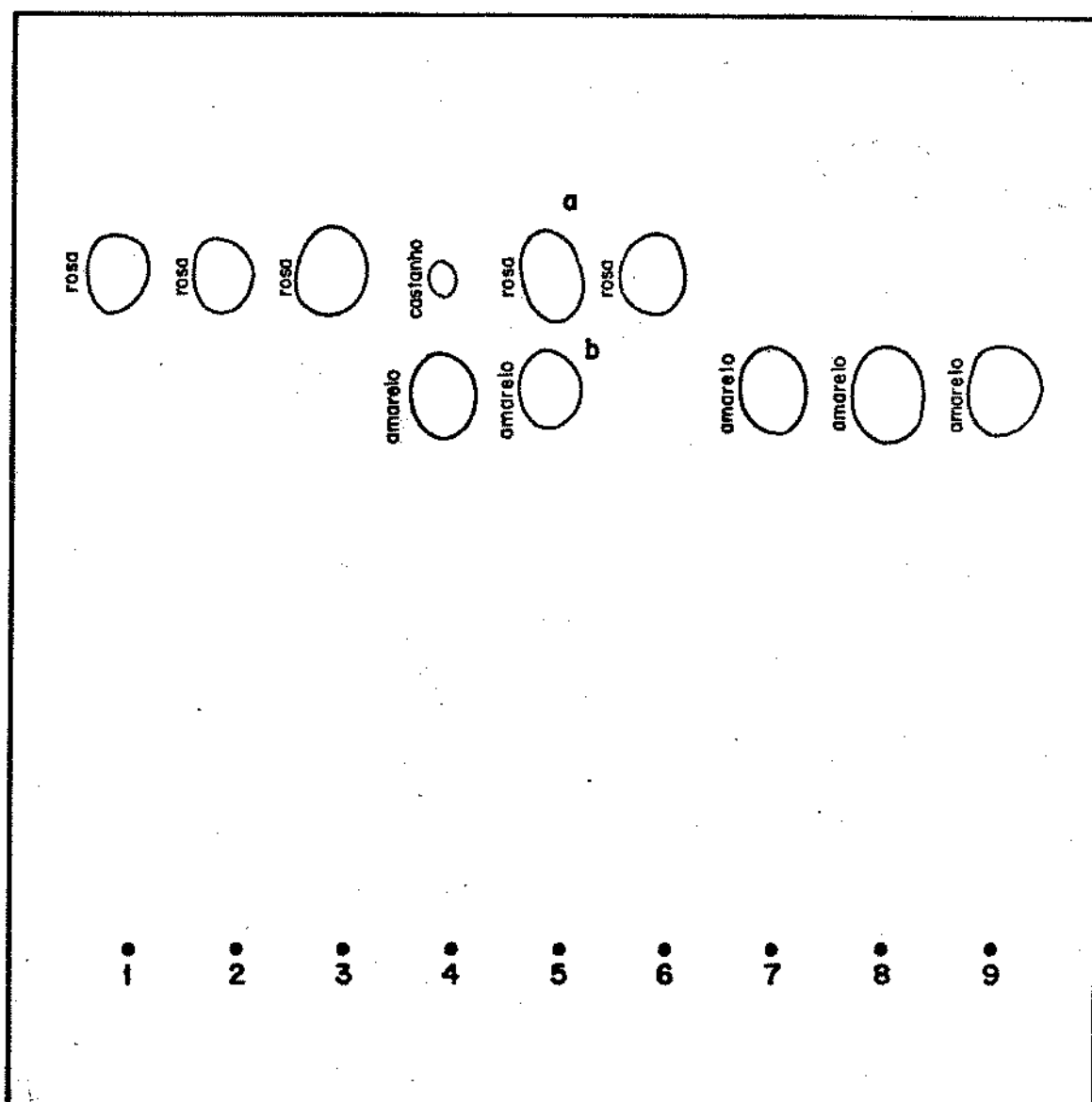


Figura 05 - Reprodução da camada delgada revelada por H_2O_2 3%, $FeCl_3$ 2% (Pinella et al., 1966) nos seguintes produtos: 1.refrigerante de limão, 2.suco de caju, 3.catchup, 4.maionese (referente ao primeiro lote) 5a. ácido benzóico, 5b.ácido sórbico, 6.margarina, 7.iogurte, 8.geléia de uva, 9.goiabada.

benzóico em refrigerante de limão, suco de caju, catchup e margarina e a de ácido sórbico em iogurte, geléia de uva e gelabada.

Duas amostras de maionese adquiridas em épocas diferentes foram analisadas. Na primeira delas, foi confirmada a presença do ácido sórbico. Na amostra adquirida posteriormente, uma mancha com Rf próximo ao do ácido sórbico foi visualizada na exposição da placa a radiação UV. Porém, as revelações pelas duas técnicas citadas nos itens 3.5.2.1. e 3.5.2.2 apresentaram resultados negativos, salientando a necessidade da confirmação de identidade.

Nos métodos por UV, a confirmação da identidade realizada através do espectro de absorção IV só foi possível em amostras que não apresentavam interferentes como o refrigerante de limão, suco de caju e geléia de uva. Os espectros IV referentes aos padrões dos dois conservadores e das amostras, estão apresentados nas Figuras 06, 07, 08, 09 e 10. A análise detalhada destes espectros pôde nos confirmar a identidade dos conservadores nos três produtos. Nos demais produtos, que apresentaram interferentes na camada delgada, a confirmação foi realizada através dos reveladores específicos na própria camada.

A identificação no método por CLAE-UV foi feita apenas pelos tempos de retenção, não sendo conclusiva. Porém,

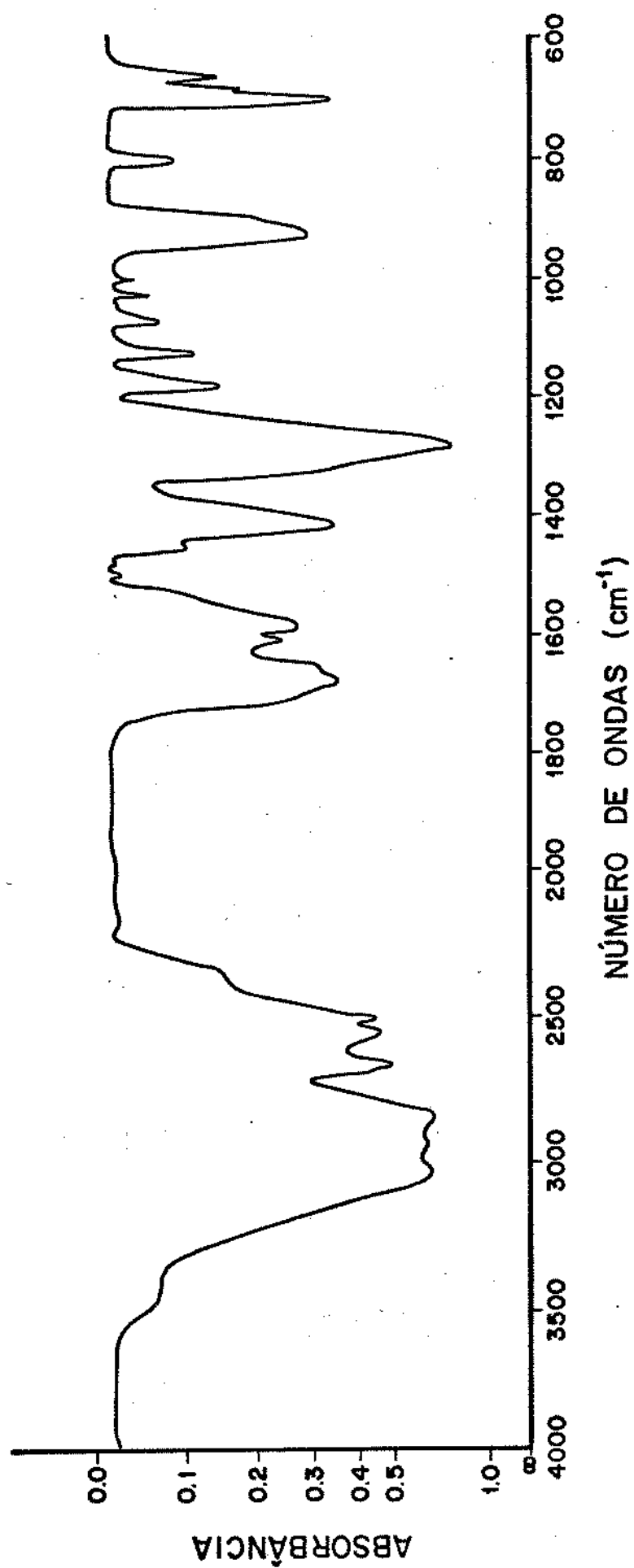


Figura 06 - Espectro de absorção IV do ácido benzóico padrão.

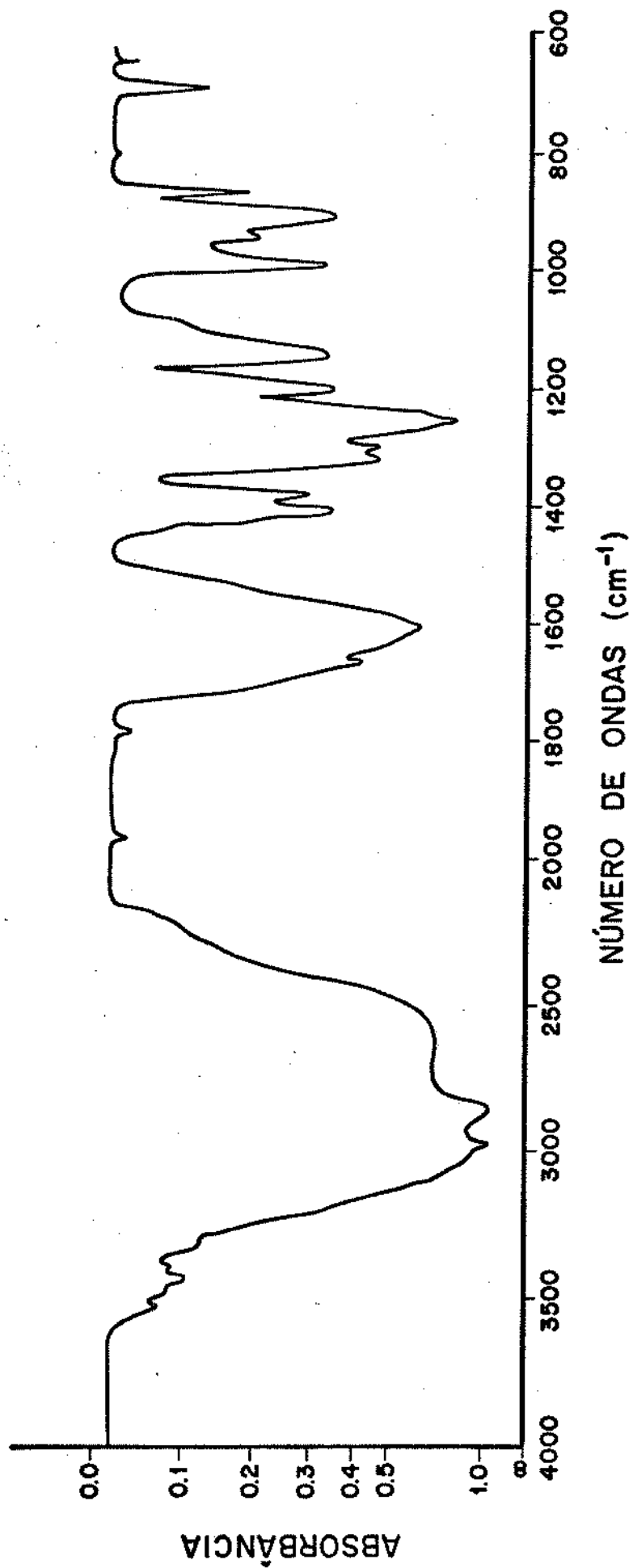


Figura 07 - Espectro de absorção IV do ácido sórbico padrão.

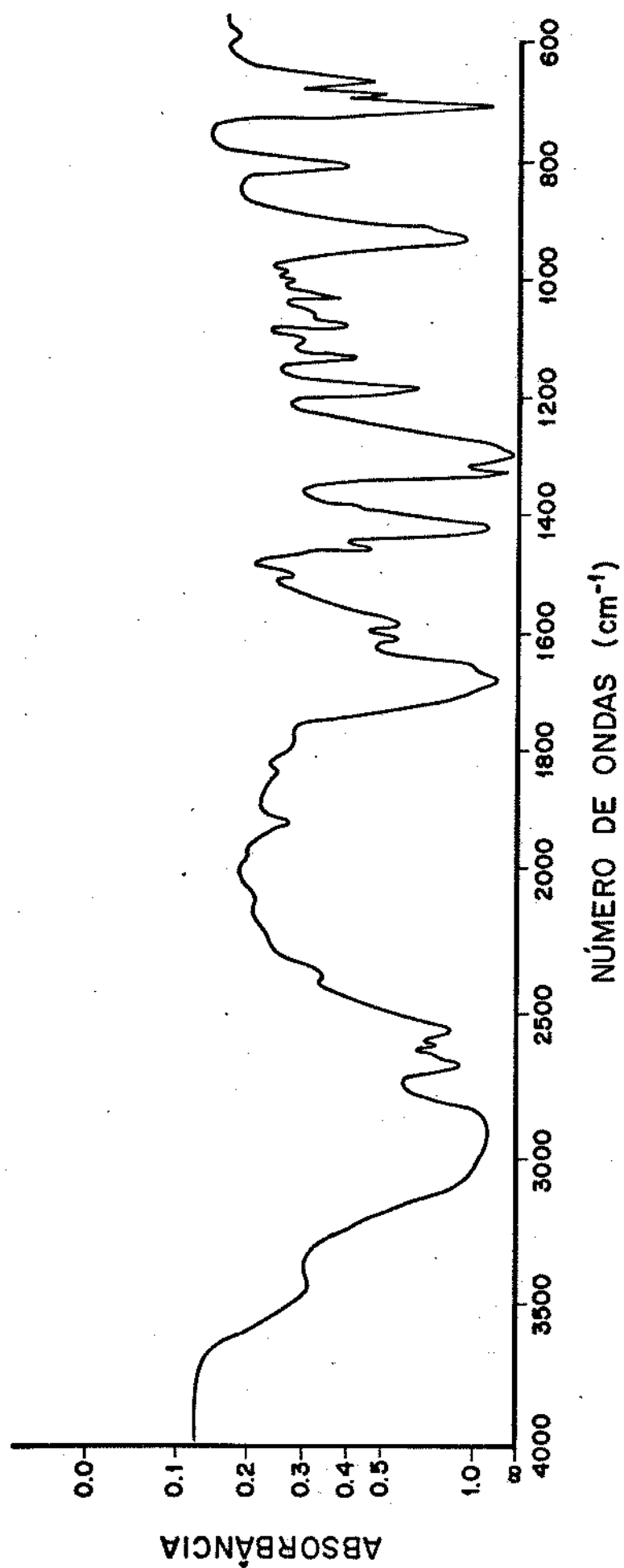


Figura 08 - Espectro de absorção IV do ácido benzóico no refrigerante de limão.

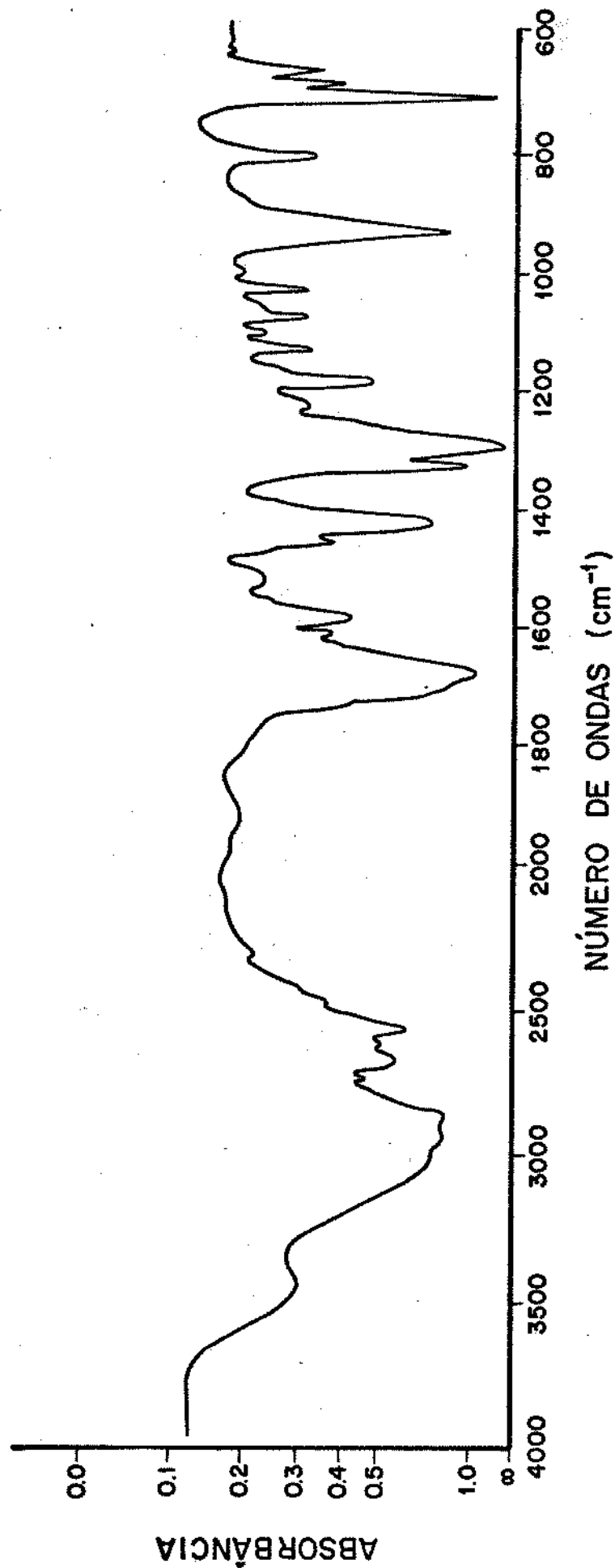


Figura 09 - Espectro de absorção IV do ácido benzóico no suco de caju.

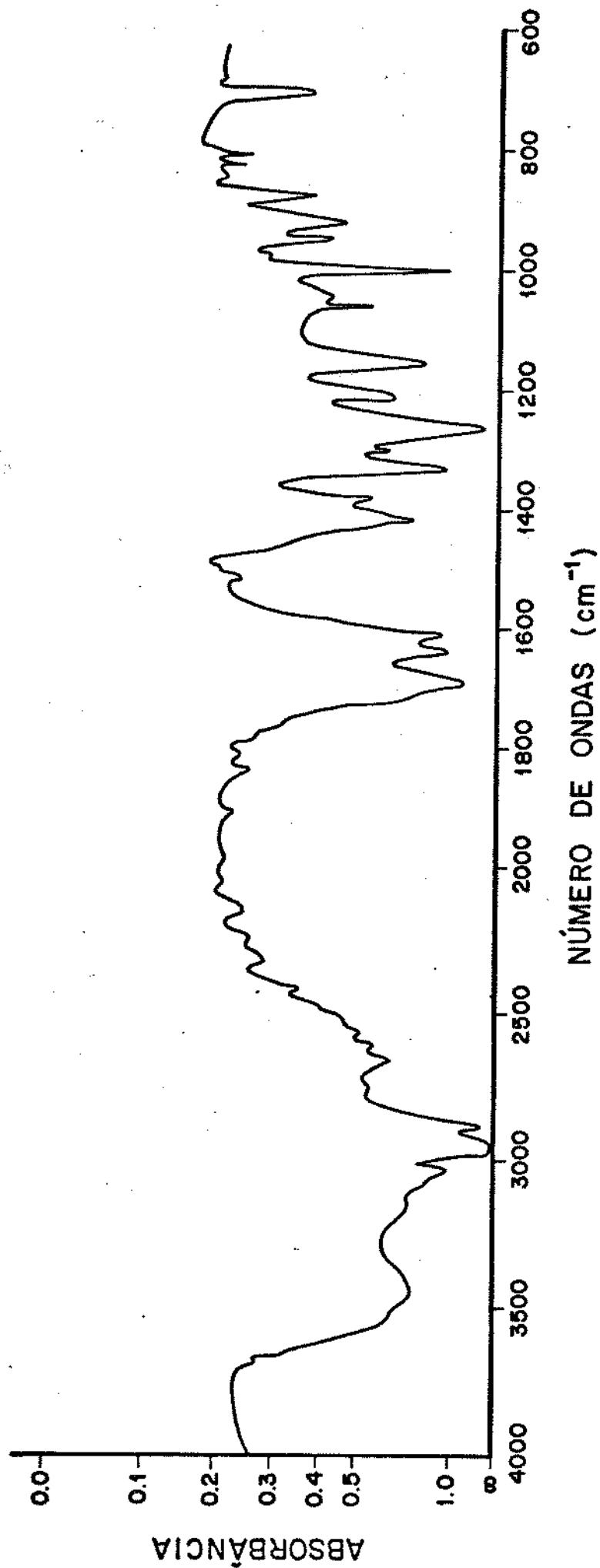


Figura 10 - Espectro de absorção IV do ácido sórbico na geléia de uva.

a confirmação não foi efetuada, uma vez que esta foi realizada nos outros dois métodos. Na eventualidade deste método ser escolhido como o único, a confirmação deve ser feita através das seguintes técnicas: (1) razões de absorção, na qual a absorção é registrada no próprio cromatograma em dois comprimentos de onda; (2) espectro IV e (3) revelação por reagentes específicos na camada delgada. Para as duas últimas técnicas, as frações correspondentes aos conservadores, separadas por CLAE são coletadas na saída do cromatógrafo e acumuladas até a quantidade necessária.

4.2.Comparação dos Três Métodos.

4.2.1.Análise do refrigerante de limão.

As quantidades de ácido benzóico em amostras de refrigerante de limão, determinadas pelos três métodos estão apresentados na Tabela 13. A repetitibilidade foi boa nos três métodos como pode ser verificado pelos valores dos coeficientes de variação (CV), que foram sempre abaixo de 10%. O menor coeficiente de variação foi verificado no método UV, seguido pelo CLAE-UV e CCD-UV. Este resultado está de acordo com a complexidade de cada um dos métodos.

Por outro lado, houve diferença significativa nas

Tabela 13 - Conteúdo de ácido benzóico(X) em refrigerante de limão.

amostras	Método UV		Método CCD-UV		Método CLAE-UV	
	Média/Desvio-padrão ¹	CV(%)	Média/Desvio-padrão ¹	CV(%)	Média/Desvio-padrão ¹	CV(%)
1	0.022 ± 0.000	0.0	0.019 ± 0.001	3.8	0.023 ± 0.001	6.1
2	0.021 ± 0.001	3.4	0.021 ± 0.001	6.7	0.024 ± 0.001	5.4
3	0.023 ± 0.001	3.1	0.018 ± 0.001	7.9	0.025 ± 0.001	5.7
4	0.021 ± 0.001	6.7	0.016 ± 0.001	8.8	0.024 ± 0.000	0.0
5	0.023 ± 0.000	0.0	0.017 ± 0.001	8.3	0.024 ± 0.001	5.4
Média geral	0.022 ± 0.001 b	2.6	0.018 ± 0.001 c	7.1	0.025 ± 0.001 e	4.5

¹ Médias e desvios-padrão de análises em duplicatas.
 Valores que não apresentam o mesmo subscrito são significativamente diferentes (P ≤ 0.01%).

porcentagens de ácido benzóico ($P \leq 0,01$) entre os três métodos. O método por CLAE-UV apresentou a maior quantidade do conservador, seguido pelo UV e CCD-UV. Uma explicação para tais resultados estaria ligada a maior sensibilidade do método por CLAE-UV, como pode ser verificado pelos limites mínimos de detecção. As porcentagens menores obtidas no método por CCD podem ser explicados pelo maior número de etapas envolvidas no método, cada uma das quais podendo acarretar em perda do conservador. Nenhum interferente foi detectado no espectro UV (Figura 11), na camada delgada (Figura 12) e no cromatograma do CLAE-UV (Figura 03b).

4.2.2. Análise do suco de caju.

Como no caso do refrigerante, a repetibilidade também foi boa para os três métodos na análise do suco de caju (Tabela 14). Novamente o método por UV mostrou menor o CV.

O conservador encontrado foi apenas o ácido benzóico, apesar do rótulo do produto apresentar os códigos dos dois conservadores. As quantidades obtidas pelos três métodos de análise foram significativamente diferentes ($P \leq 0,01$), e o método que obteve a maior porcentagem foi novamente o método por CLAE-UV seguido pelo método por UV e por CCD-UV. No espectro obtido pelo método UV, apareceram

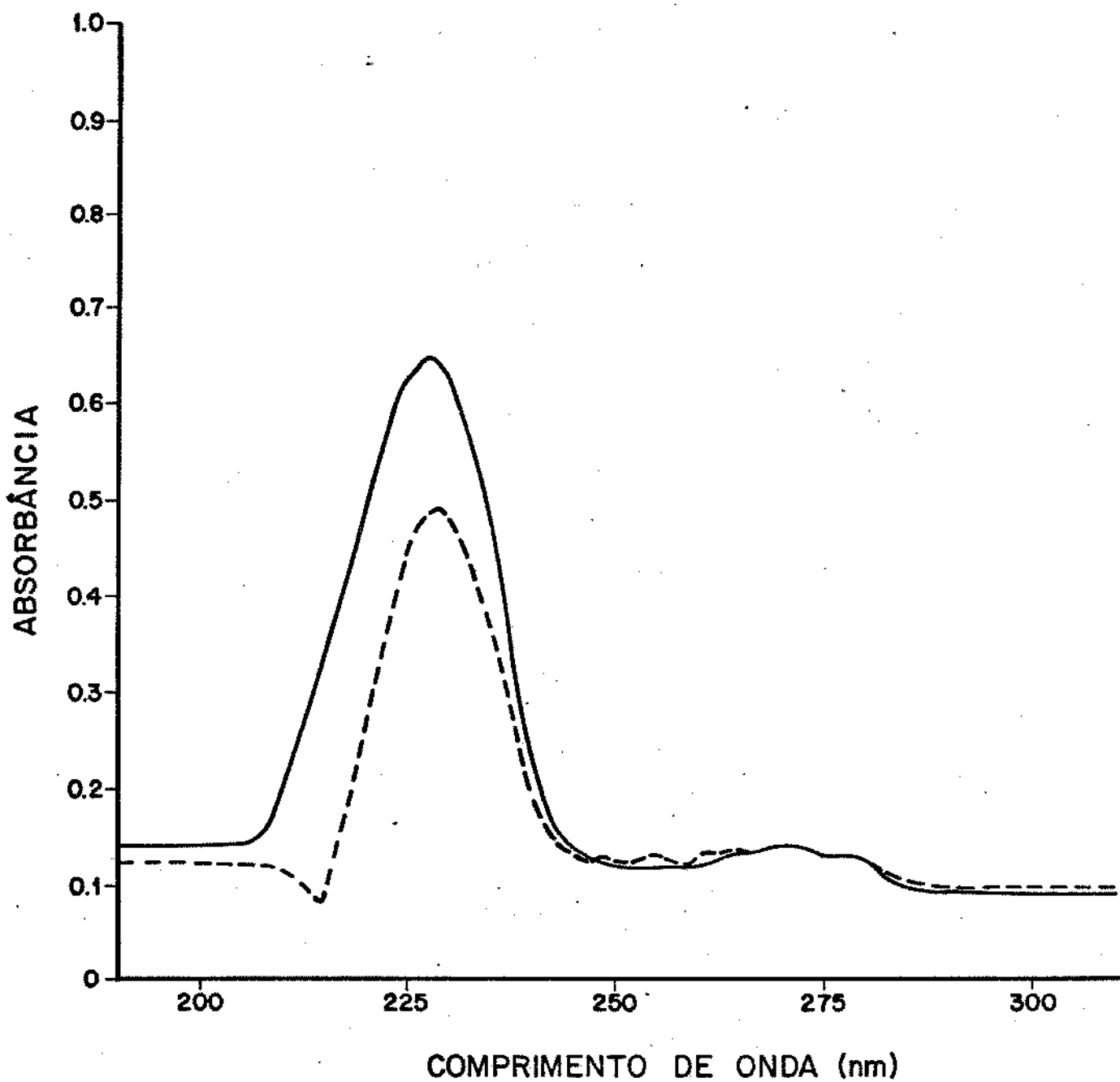


Figura 11 - Espectros de absorção UV do refrigerante de limão pelos métodos por UV (—) e CCD-UV (---).

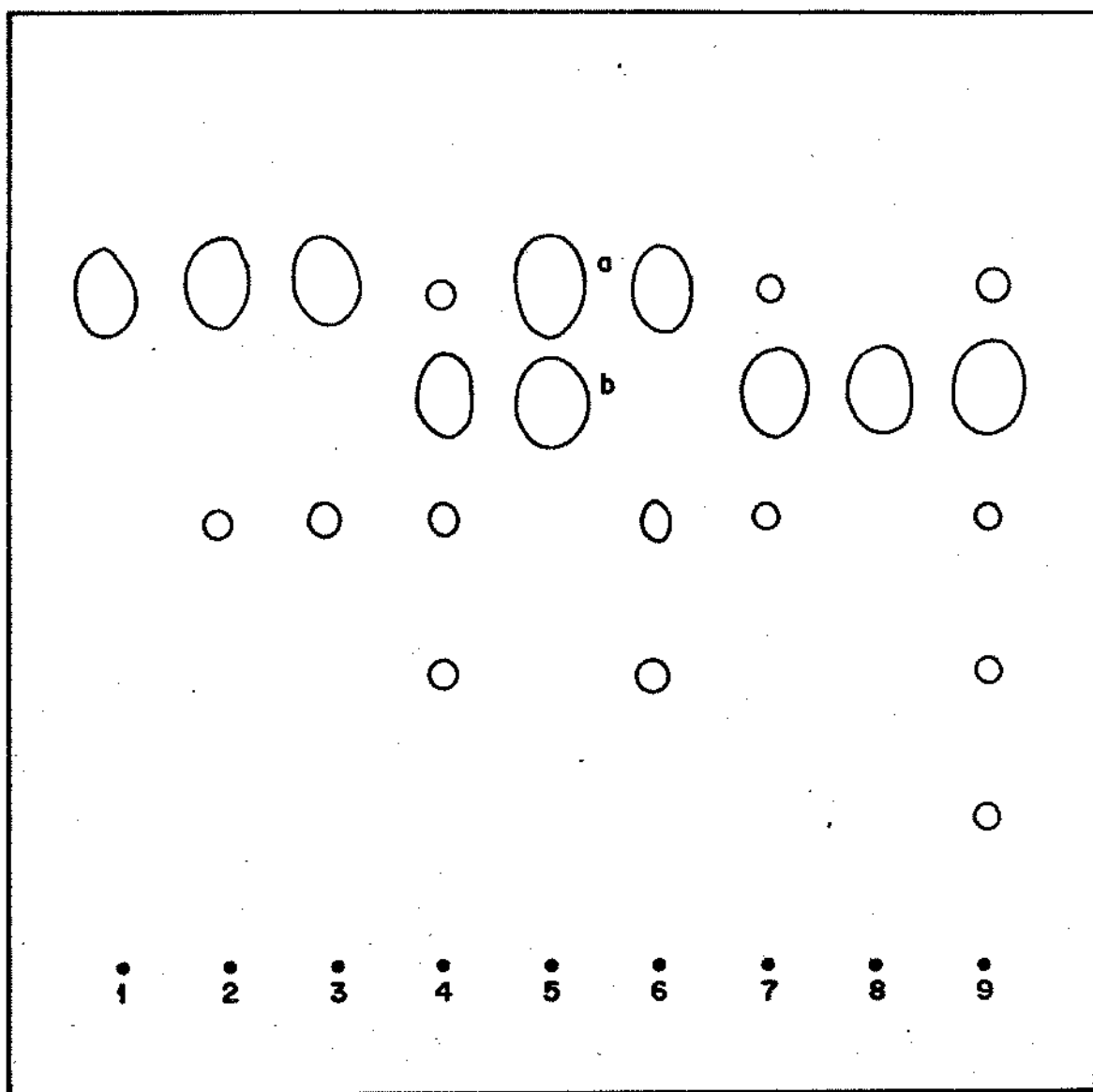


Figura 12 - Reprodução da camada delgada revelada por radiação UV à 254 nm (sílica gel fluorescente GF 254 desenvolvida por hexano/ácido acético (90:10)) nos seguintes produtos: 1.refrigerante de limão 2.suco de caju, 3.catchup, 4.maionese (referente ao primeiro lote) 5a.ácido benzóico, 5b.ácido sôrbico, 6.margarina, 7. iogurte, 8.gelêia de uva, 9.goiabada.

Tabela 14 - Conteúdo de ácido benzóico (%) em suco de caqui.

Amostras	Método UV		Método CCl ₄ -UV		Método CLAE-UV	
	Média/Desvio-padrão ¹	CV(%)	Média/Desvio-padrão ²	CV(%)	Média/Desvio-padrão ¹	CV(%)
1	0.094 ± 0.003	3.0	0.072 ± 0.006	8.3	0.131 ± 0.005	3.8
2	0.092 ± 0.000	0.0	0.054 ± 0.004	7.4	0.113 ± 0.010	9.4
3	0.093 ± 0.001	0.7	0.088 ± 0.004	1.1	0.113 ± 0.010	9.0
4	0.094 ± 0.001	1.1	0.062 ± 0.001	1.6	0.139 ± 0.003	2.0
5	0.083 ± 0.000	0.0	0.076 ± 0.001	0.9	0.114 ± 0.010	6.8
Média geral	0.091 ± 0.001 b	1.0	0.070 ± 0.002 =	3.9	0.121 ± 0.006 a	5.4

¹ Médias e desvios-padrão de análises em duplicata.

valores que não apresentam o mesmo subscrito são significativamente diferentes ($P \leq 0,01\%$).

dois picos, o do ácido benzóico em 227 nm e um outro em 205, bem separado e menor que o primeiro (Figura 13). Na camada delgada foi detectada uma outra mancha além do ácido benzóico (Figura 12), que pode ser correspondente ao segundo pico no espectro. O cromatograma do CLAE-UV apresentou um pequeno pico além do referente ao ácido benzóico (Figura 03b). Não houve problemas de interferentes neste produto.

4.2.3. Análise do catchup.

A Tabela 15 apresenta as porcentagens do ácido benzóico nos três métodos, mais uma vez com os valores de CV todos abaixo de 10%, e os valores mais altos pertencentes ao método por CGD-UV. Os CVs do método por CLAE-UV foram ligeiramente maiores que do método por UV.

Não houve diferença significativa ($P \leq 0,01$) entre os teores de ácido benzóico encontrados por UV e por CLAE-UV. A diferença foi significativa entre estes dois e o método por CGD-UV, que foi outra vez o que apresentou menor quantidade de conservador. Também no catchup, não foram encontrados interferentes que pudessem aumentar os resultados pelo método por UV. Em seu espectro apareceram apenas o pico do ácido benzóico em 227 nm e um outro em 205 que não interferiu no resultado quantitativo do conservador (Figura 14). Na placa cromatográfica foram detectas duas

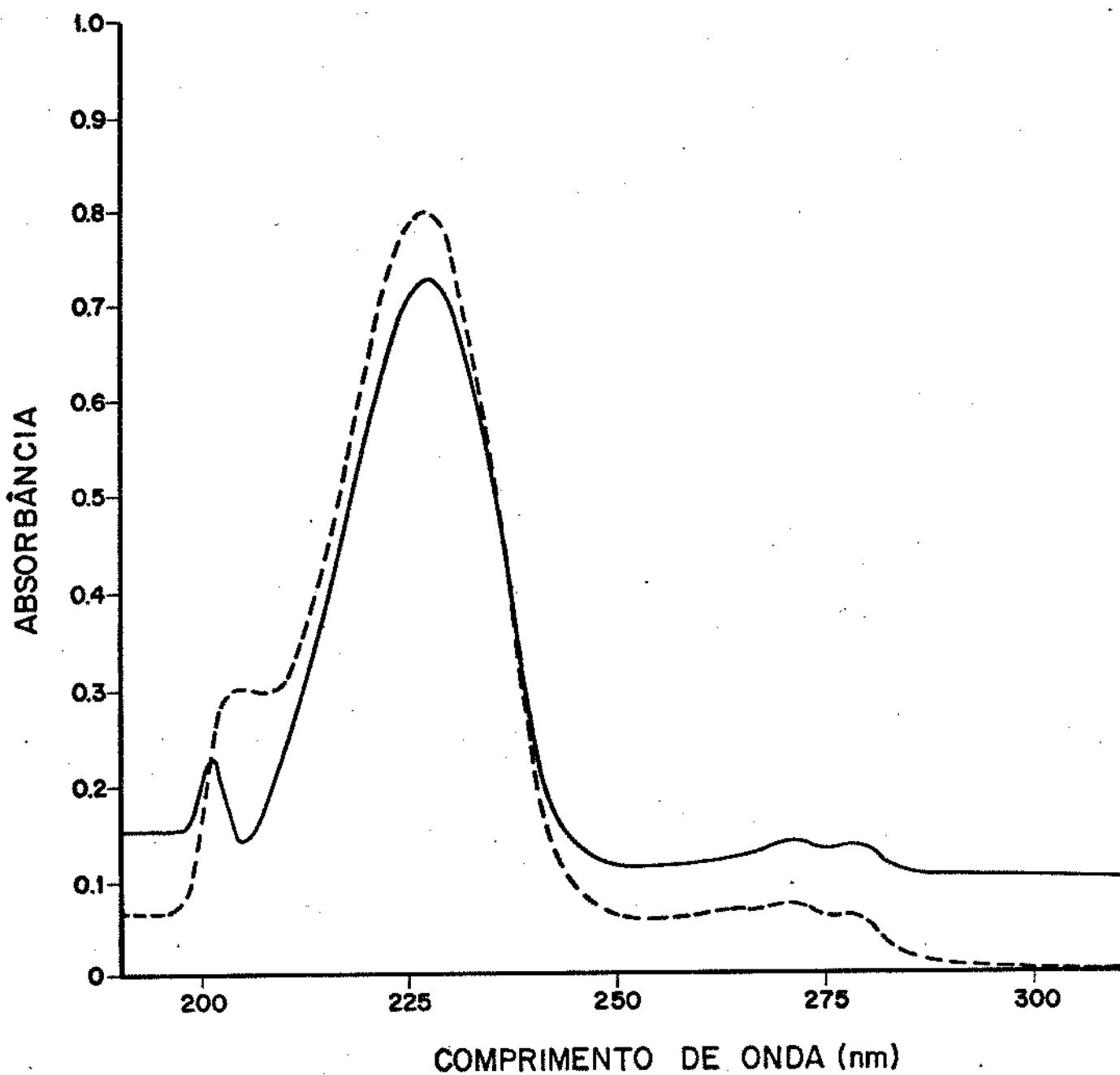


Figura 13 - Espectros de absorção UV do suco de caju pelos métodos por UV (—) e CCD-UV (---).

Tabela 15 - Conteúdo de ácido benzóico (Z) em catchup.

Amostras	Método UV		Método CCD-UV		Método CLAE-UV	
	Média/Desvio-padrão ¹	CV(Z)	Média/Desvio-padrão ¹	CV(Z)	Média/Desvio-padrão ¹	CV(Z)
1	0.105 ± 0.002	2.0	0.095 ± 0.006	6.7	0.111 ± 0.001	0.6
2	0.103 ± 0.003	2.8	0.087 ± 0.003	3.7	0.111 ± 0.001	1.3
3	0.105 ± 0.001	1.3	0.087 ± 0.003	3.7	0.109 ± 0.001	1.3
4	0.094 ± 0.003	3.3	0.095 ± 0.006	6.7	0.108 ± 0.004	3.9
5	0.113 ± 0.004	3.5	0.091 ± 0.004	4.7	0.103 ± 0.003	4.7
Média geral	0.105 ± 0.003 a	3.2	0.091 ± 0.003 b	3.9	0.109 ± 0.002 a	2.4

¹ Médias e desvios-padrão de análises em duplicatas.

Valores não apresentam os mesmos subscritos são significativamente diferentes ($P \leq 0,01\%$).

manchas, sendo uma delas identificada como sendo do ácido benzóico (Figura 12). O cromatograma do método por CLAE-UV apresentou três picos bem resolvidos, sendo o pico do meio identificado como ácido benzóico (Figura 15a).

4.2.4. Análise da margarina.

Os resultados da análise da margarina estão apresentados na Tabela 16. Os valores dos CVs foram todos bem abaixo de 10%, com o método por UV apresentando mais uma vez o menor valor.

O conservador encontrado na margarina foi o ácido benzóico, porém num lote mais antigo, analisado somente pelos métodos por UV e CCD-UV, utilizando o procedimento de extração 5 (Tjan e Konter, 1972), foi detectado o ácido sórbico. No rótulo do produto foram encontrados os códigos de ambos os conservadores com os dizeres e/ou.

As diferenças encontradas no conteúdo de ácido benzóico foram significativas ($P \leq 0,01$) para os três métodos, com o método por UV apresentando a maior quantidade e o método por CCD-UV a menor. A discrepância pode ser explicada pela presença de substâncias interferentes, como indica o espectro obtido pelo método UV (Figura 16). Na camada delgada apareceram três manchas, sendo uma relativa

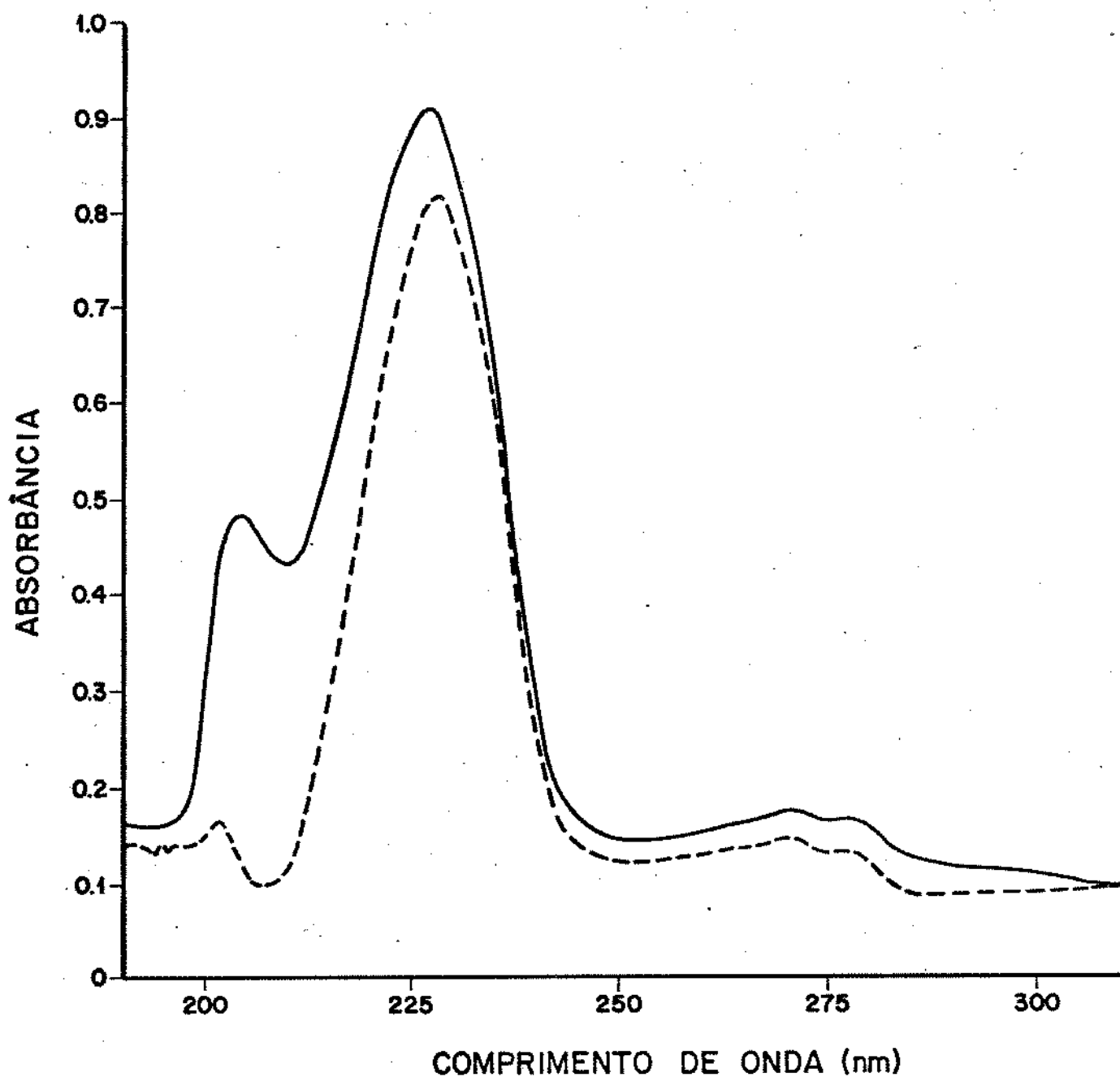


Figura 14 - Espectros de absorção UV do catchup pelos métodos por UV (—) e CCD-UV (---).

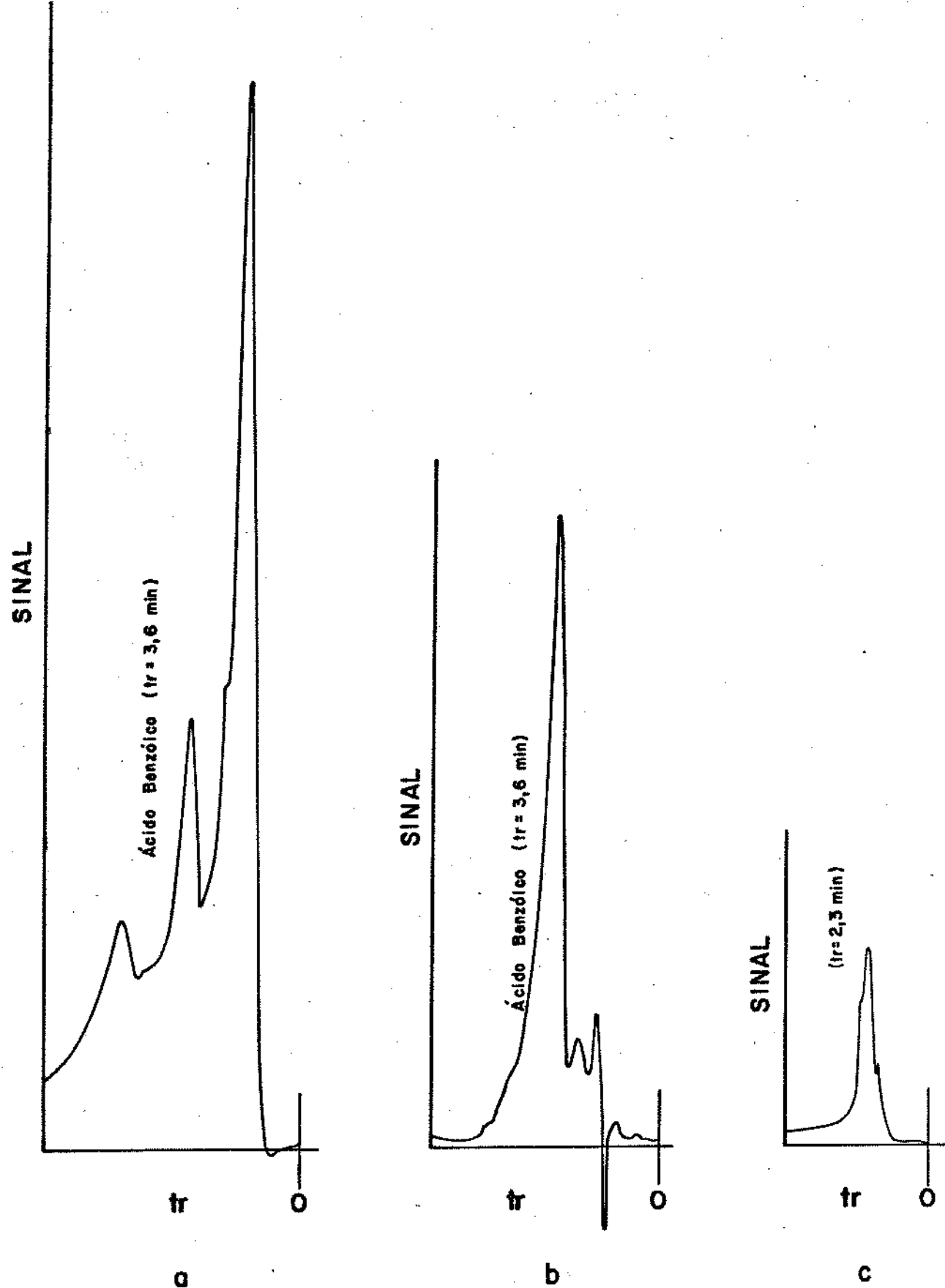


Figura 15 - Cromatogramas obtidos pelo método CLAE-UV - coluna: AMINO-SIL-X-I, solvente: ácido acético 0,5% / metanol (19:1), detector UV: 254 nm, AUFS: 0,1, fluxo: 0,75 mL / min. (a) catchup, (b) margarina, (c) maionese.

Tabela 16 - Conteúdo de ácido benzóico (X) em margarina.

Amostras	Método UV		Método CCD-UV		Método CLAE-UV	
	Média/Desvio-padrão ¹	CV(%)	Média/Desvio-padrão ¹	CV(%)	Média/Desvio-padrão ¹	CV(%)
1	0.070 ± 0.001	1.2	0.055 ± 0.001	2.6	0.071 ± 0.002	3.1
2	0.071 ± 0.000	0.0	0.051 ± 0.001	3.0	0.075 ± 0.002	3.8
3	0.071 ± 0.000	0.0	0.055 ± 0.001	2.6	0.071 ± 0.002	3.4
4	0.074 ± 0.003	4.5	0.052 ± 0.000	0.00	0.064 ± 0.001	1.1
5	0.068 ± 0.001	1.7	0.052 ± 0.001	1.3	0.056 ± 0.003	5.0
Média geral	0.071 ± 0.001 a	1.3	0.053 ± 0.001 c	1.9	0.067 ± 0.002 b	2.9

¹ médias e desvios-padrão de análises em duplicatas.
 Valores que não apresentam os mesmos subscritos são significativamente diferentes (P ≤ 0.01%).

ao ácido benzóico apresentando um espectro UV com uma única absorbância, característica do ácido (Figura 12). As outras duas manchas absorveram em 210 e 213 nm. No cromatograma do CLAE-UV foi encontrado um pico referente ao ácido benzóico e mais dois picos pequenos (Figura 15a).

4.2.5. Análise de logurte.

O logurte continha somente o ácido sórbico, e as quantidades obtidas pelos três métodos estão apresentadas na Tabela 17. Os valores de CV também foram todos abaixo de 10%, e o menor CV foi para o método por UV, seguido pelo CLAE-UV e CCD-UV, como era de se esperar de acordo com a complexidade dos três métodos.

As diferenças entre as quantidades do conservador foram significativas ($P \leq 0,01$) entre o método por UV e os demais métodos, entre os quais não houve diferença significativa. Este resultado (semelhança entre CLAE-UV e CCD-UV) diferiu dos demais produtos, pois o CCD-UV apresentou sempre o menor valor. O método por UV resultou em uma quantidade muito maior do conservador talvez pela presença de interferentes, embora não tenha sido muito evidente no espectro obtido pelo método por UV (Figura 17). No entanto, a camada delgada apresentou três manchas, sendo uma identificada como do ácido sórbico (Figura 12). Uma mancha

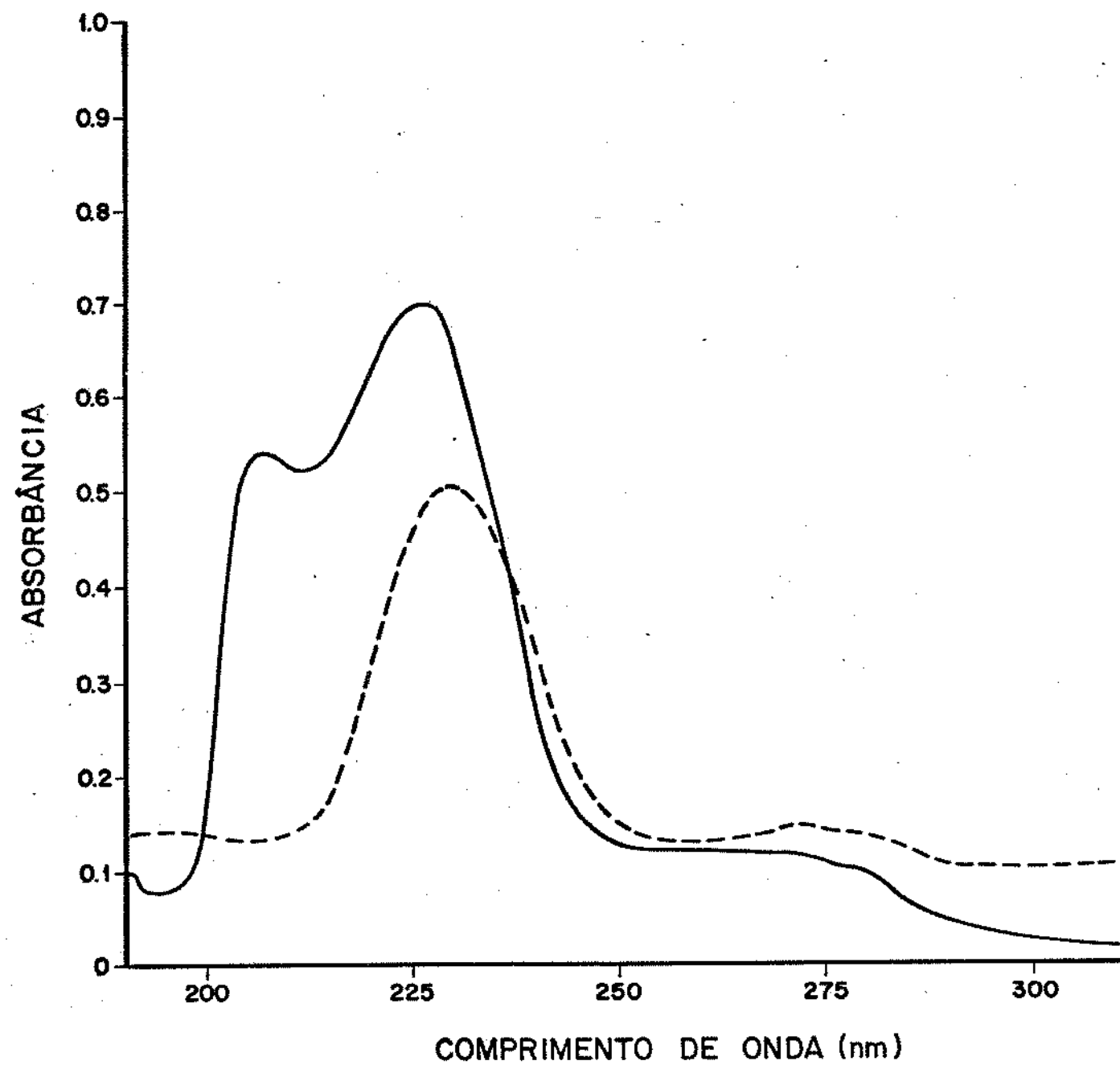


Figura 16 - Espectro de absorção UV da margarina pelos métodos por UV (—) e CCD-UV (----).

Tabela 17 - Conteúdo de ácido sorbico (Z) em leite.

Amostras	Método UV		Método CCB-UV		Método CLAE-UV	
	Média/Desvio-padrão ¹	CV(Z)	Média/Desvio-padrão ¹	CV(Z)	Média/Desvio-padrão ¹	CV(Z)
1	0.023 ± 0.001	6.1	0.029 ± 0.001	5.6	0.026 ± 0.001	5.4
2	0.047 ± 0.001	3.0	0.038 ± 0.003	7.4	0.036 ± 0.000	0.0
3	0.064 ± 0.000	0.0	0.043 ± 0.004	9.9	0.049 ± 0.004	8.7
4	0.042 ± 0.003	4.6	0.038 ± 0.000	0.0	0.043 ± 0.001	3.3
5	0.054 ± 0.000	0.0	0.038 ± 0.003	7.4	0.039 ± 0.001	3.6
Média geral	0.050 ± 0.001 *	2.7	0.036 ± 0.002 b	6.1	0.039 ± 0.001 b	4.2

¹ Médias e desvios-padrão de análises em duplicatas.
 *valores que não apresentam os mesmos subscrito são significativamente diferentes (P ≤ 0.01Z).

com Rf próximo ao do ácido benzóico foi observada, mas não apareceu nenhum pico no espectro UV em 227 nm. Além disso, nenhuma mancha correspondente ao ácido sórbico foi observada após revelação pelos dois procedimentos citados no Material e Métodos (Figuras 04 e 05). No espectro UV obtido após cromatografia em camada delgada, apareceu somente o pico puro relativo ao ácido sórbico (Figura 18a).

4.2.6. Análise da geléia de uva.

O conservador encontrado na geléia de uva foi o ácido sórbico como consta no rótulo do produto. A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos nos três métodos de análise, onde novamente os valores dos CVs foram muito menores que 10%. O menor CV foi obtido no método por UV, seguido pelos métodos por CLAE-UV e CCD-UV.

Não houve diferença significativa entre os resultados do método por UV e CLAE-UV. As diferenças foram significativas ($P \leq 0,01$) entre estes e o método por CCD-UV. Os resultados praticamente iguais obtidos nos métodos por UV-direta e CLAE se deve ao fato de que a geléia não apresentou nenhum interferente. Apareceu um único pico no espectro UV com absorção máxima em 255 nm (Figura 19), uma única mancha na camada delgada, identificada como ácido sórbico (Figura 12) e um único pico no cromatograma obtido por CLAE-UV

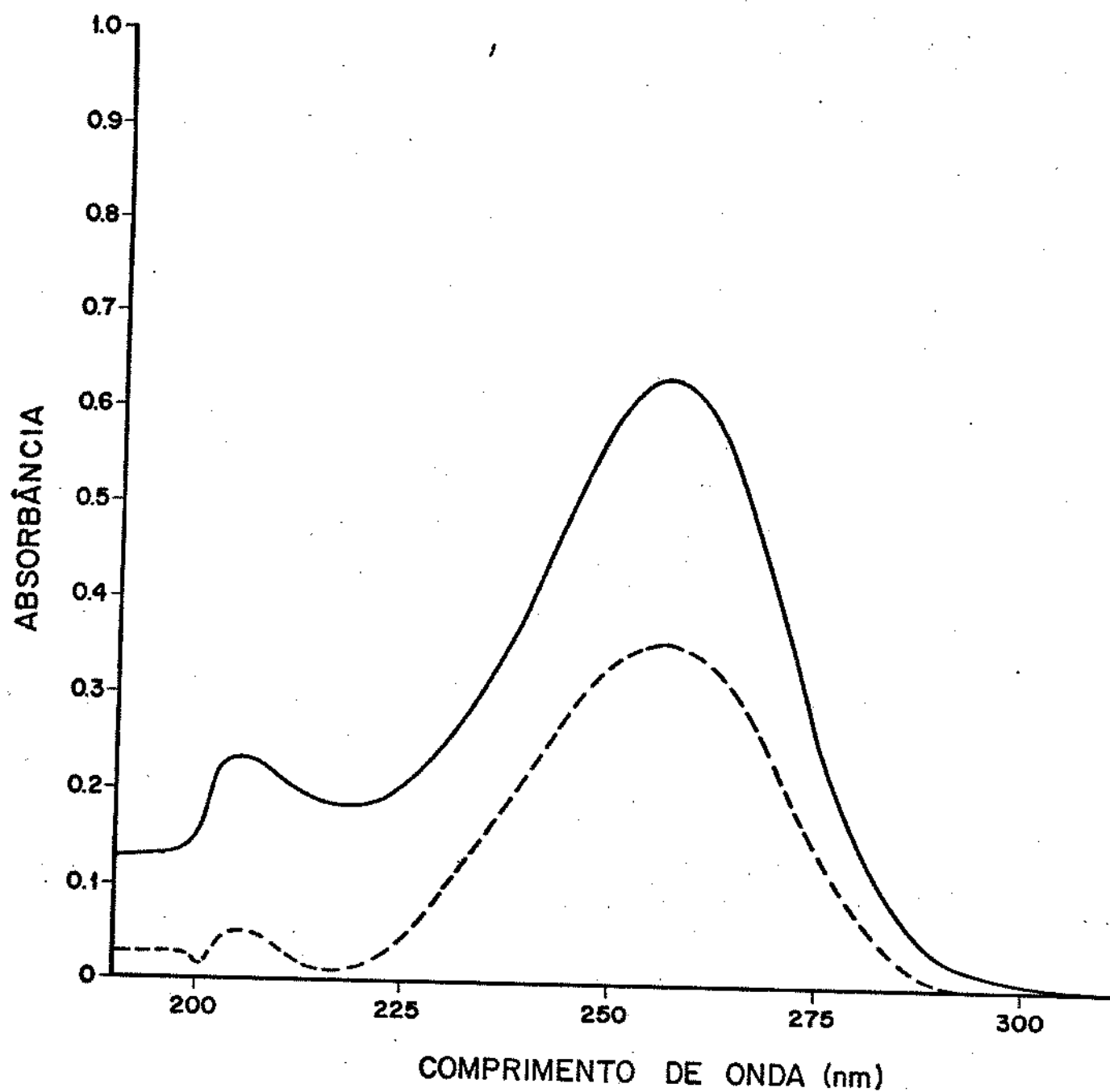


Figura 17 - Espectros de absorção UV do iogurte pelos métodos por UV (—) e CCD-UV (---).

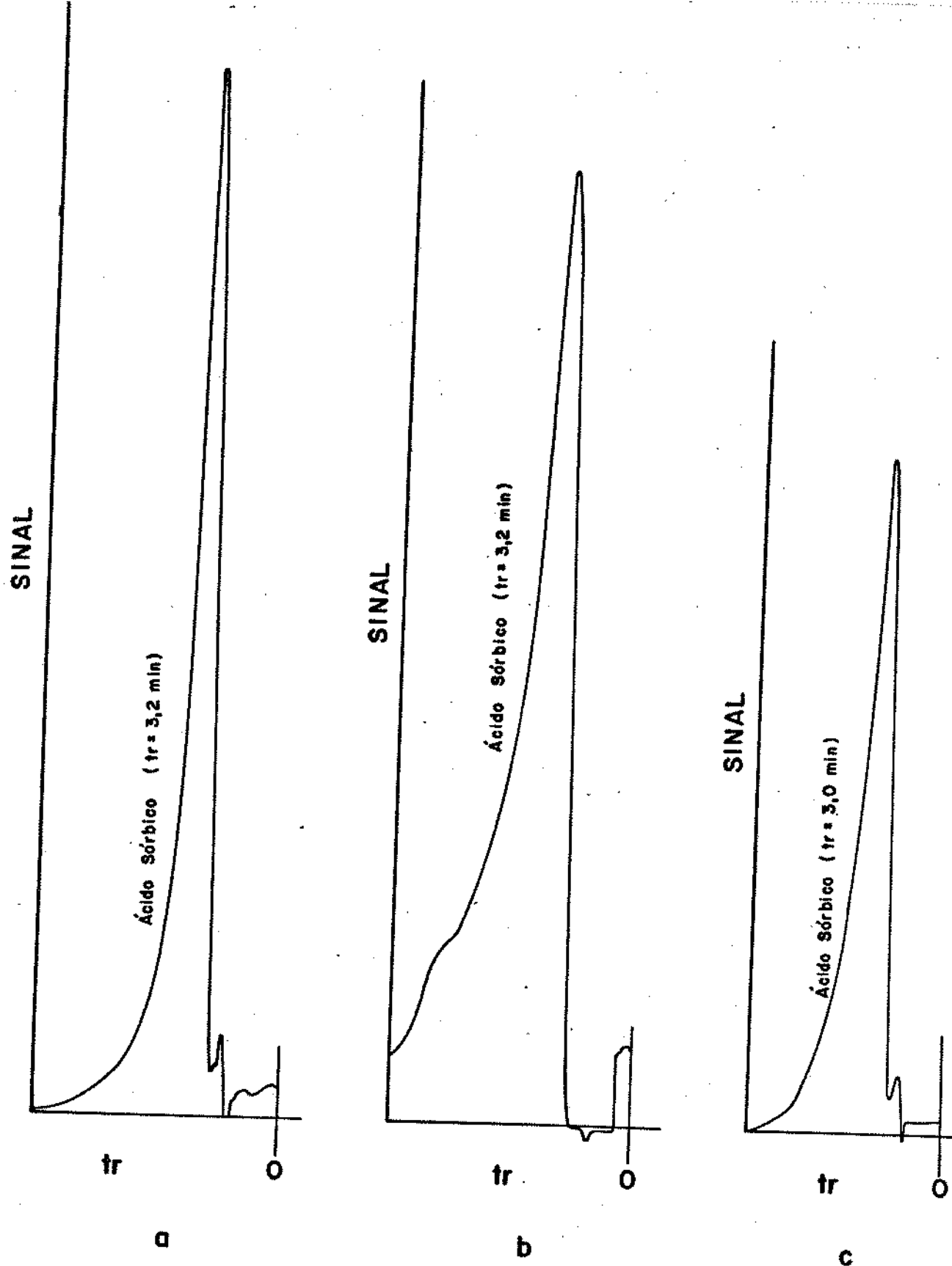


Figura 18 - Cromatogramas obtidos pelo método CLAE-UV - coluna: AMINO-SIL-X-I, solvente: ácido acético 0,5% / metanol (19:1), detector UV: 254 nm, AUFS: 0,1, fluxo: 0,75 mL / min. (a) iogurte, (b) geléia de uva, (c) goiabada.

Tabela 18 - Conteúdo de ácido sórbico (%) em geleia de uva.

Amostras	Método UV		Método CCD-UV		Método CLAE-UV	
	Média/Desvio-padrão ¹		Média/Desvio-padrão ³		Média/Desvio-padrão ⁴	
	CV(%)		CV(%)		CV(%)	
1	0.036 ± 0.001	2.0	0.030 ± 0.000	0.0	0.034 ± 0.000	0.0
2	0.040 ± 0.001	1.9	0.035 ± 0.002	6.1	0.037 ± 0.001	3.8
3	0.045 ± 0.001	3.1	0.044 ± 0.001	3.2	0.040 ± 0.000	0.0
4	0.034 ± 0.000	0.0	0.030 ± 0.000	0.0	0.036 ± 0.001	2.0
5	0.032 ± 0.000	0.0	0.032 ± 0.002	6.6	0.035 ± 0.001	4.0
Média geral	0.038 ± 0.001 a	1.4	0.034 ± 0.001 b	3.2	0.037 ± 0.001 a	2.0

¹ Médias e desvios-padrão de análises em duplicatas.

Valores que não apresentam os mesmos subscritos são significativamente diferentes ($P \leq 0.01\%$).

(Figura 18b).

4.2.7. Análise da gotabada.

Os resultados quantitativos para os três métodos de análise estão resumidos na Tabela 19. Como descrito no rótulo do produto, o conservador encontrado foi o ácido sórbico. Os valores dos CVs foram sempre abaixo de 10% e o menor deles foi novamente o do método por UV seguido por CLAE-UV e por CCD-UV.

As diferenças entre as porcentagens de ácido sórbico foram significativas entre o método por UV e os outros dois métodos, sendo não significativa entre os dois últimos. Pelo método de UV obteve-se a maior quantidade do ácido sórbico por causa de vários interferentes como pode ser verificado no espectro UV (Figura 20). Pelo método de CCD-UV, foram detectadas cinco manchas, sendo uma referente ao ácido sórbico e as outras demonstrando absorbância em comprimentos de onda de 233, 221 e 209 nm. A quinta mancha apresentou um R_f próximo ao do ácido benzóico, mas mostrou-se negativa na confirmação (Figuras 04 e 05). O espectro da fração referente ao ácido sórbico apresentou um único pico com absorção máxima em 255 nm (Figura 20). No cromatograma do CLAE-UV, além do pico do ácido sórbico, apareceu apenas um outro pico muito menor, e com tempo de retenção também menor (Figura 18c).

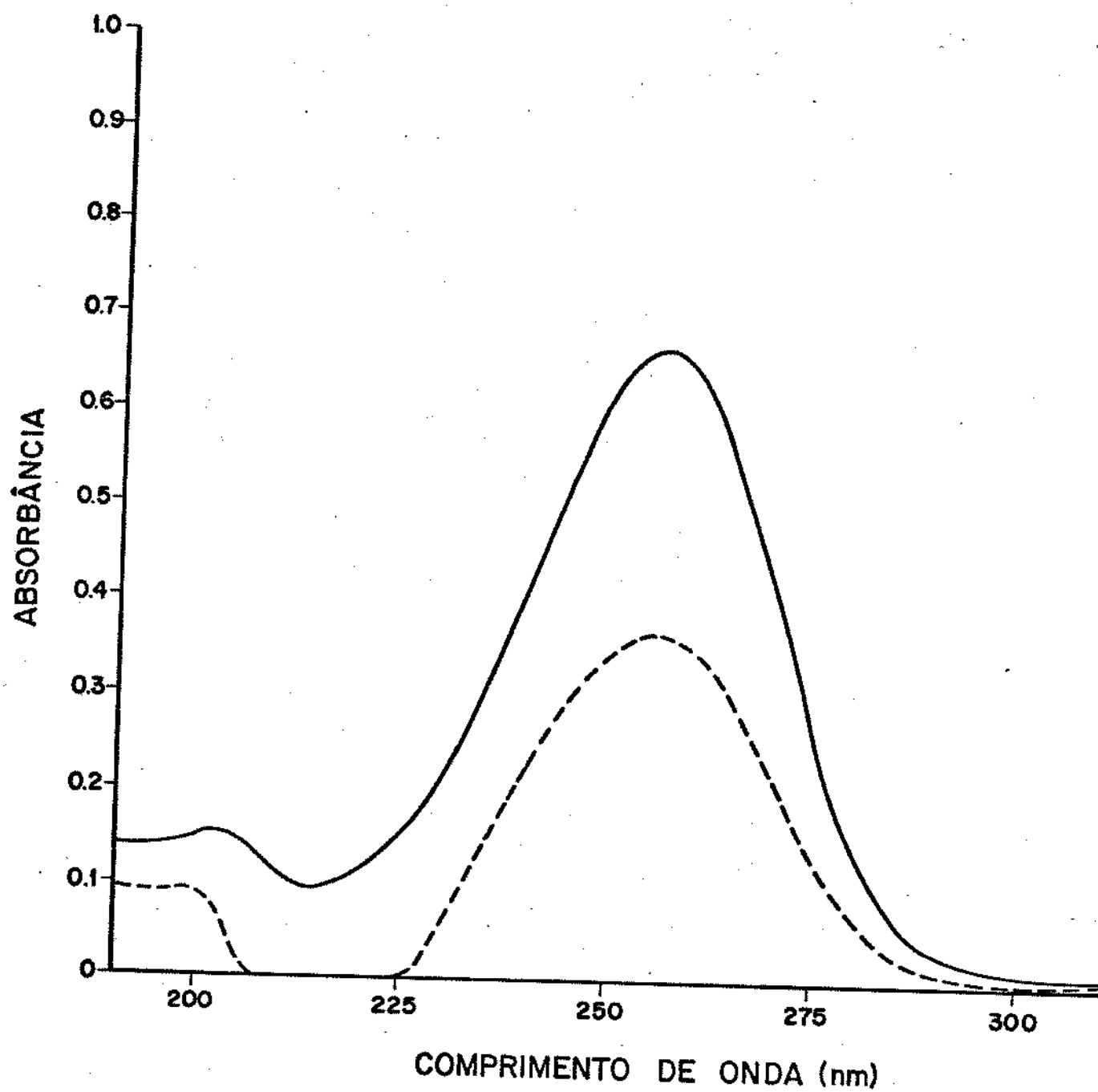


Figura 19 - Espectros de absorção UV da geléia de uva pelos métodos por UV (—) e CCD-UV (---).

Tabela 19 - Conteúdo de ácido sórbico (%) em goiabada.

Amostras	Método UV		Método DCU-UV		Método CLAE-UV	
	Média/Desvio-padrão ¹	CV(%)	Média/Desvio-padrão ¹	CV(%)	Média/Desvio-padrão ¹	CV(%)
1	0.012 ± 0.001	6.1	0.007 ± 0.001	10.9	0.008 ± 0.001	9.4
2	0.012 ± 0.000	0.0	0.010 ± 0.001	7.1	0.009 ± 0.000	0.0
3	0.012 ± 0.000	0.0	0.010 ± 0.001	7.1	0.009 ± 0.001	7.4
4	0.012 ± 0.001	5.6	0.007 ± 0.001	10.9	0.008 ± 0.001	9.4
5	0.012 ± 0.001	5.6	0.011 ± 0.001	6.7	0.010 ± 0.001	6.7
Média geral	0.012 ± 0.001 a	3.5	0.007 ± 0.001 b	8.5	0.009 ± 0.001 b	6.6

¹ Médias e desvios-padrão de análises em duplicatas.

Valores que não apresentam os mesmos subscrito são significativamente diferentes ($p \leq 0.01\%$).

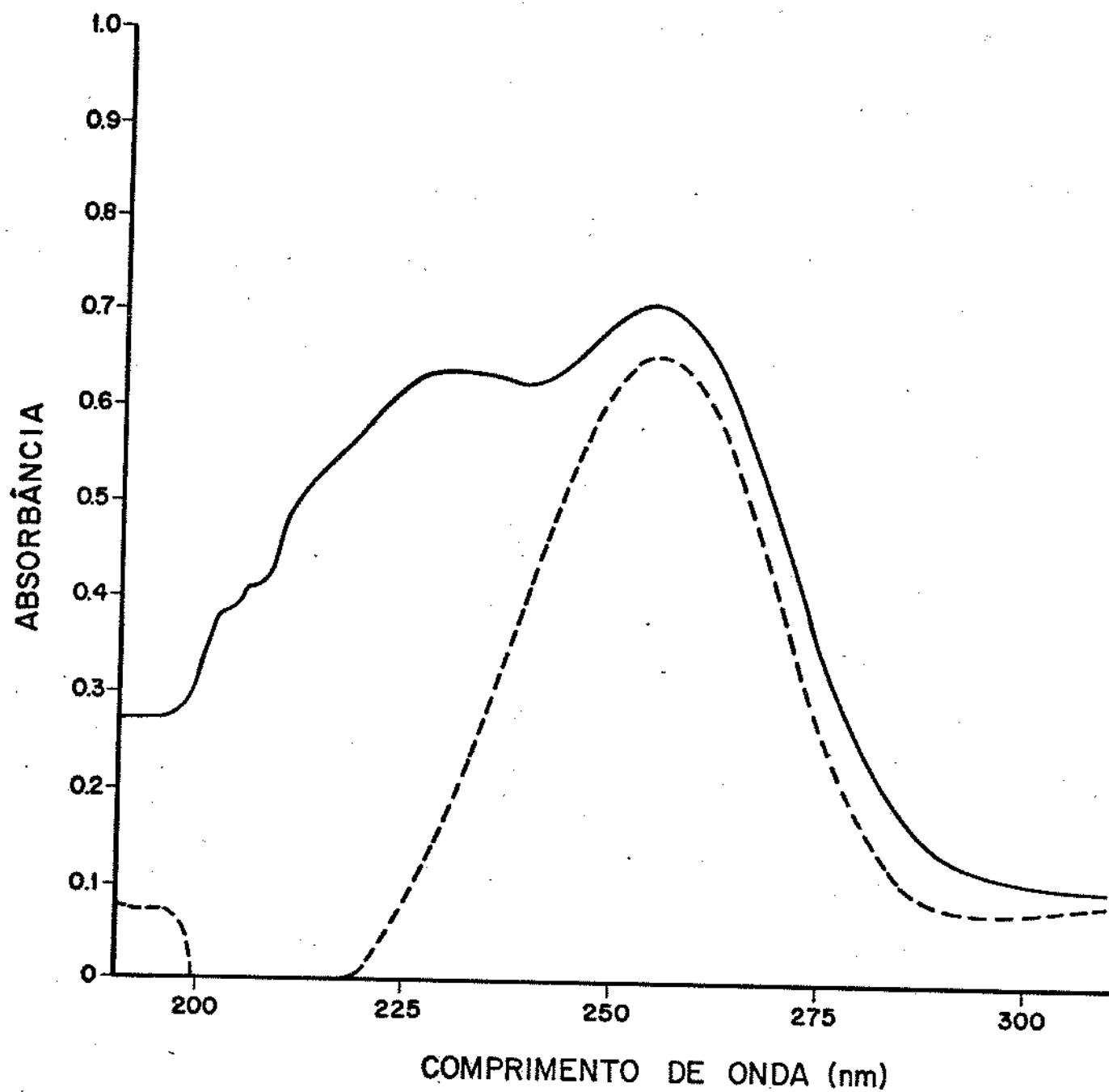


Figura 20 - Espectros de absorção UV da goiabada pelos métodos por UV (—) e CCD-UV (---).

4.2.8. Análise da malonese.

A malonese foi analisada em duas épocas diferentes. Na primeira época, foi encontrado o ácido sórbico, conforme descrito no rótulo do produto, que foi avaliado somente pelos métodos por UV e por CCD-UV. O espectro do UV ficou indefinido pela presença de vários interferentes, impossibilitando a sua quantificação (Figura 21). A camada delgada comprovou o resultado do espectro UV, com o aparecimento de mais três manchas além da do ácido sórbico (Figura 12). No espectro UV da fração relativa ao ácido sórbico, apareceu um pico puro com absorção em 255 nm (Figura 21). A quantificação do ácido sórbico só foi realizada pelo método por CCD-UV e os resultados estão apresentados na Tabela 20.

Na segunda amostra, adquirida cerca de um ano depois, não foi detectado o ácido sórbico, apesar de ainda vir especificado no rótulo. O cromatograma do CLAE-UV apresentou um pico com tempo de retenção próximo ao do ácido sórbico (Figura 15c). Foi realizada uma co-cromatografia (spiking) com o padrão de ácido sórbico e no cromatograma assim obtido, apareceu um pico a mais com o tempo de retenção exatamente igual ao do padrão de ácido sórbico. Na confirmação por CCD não foi detectada nenhuma mancha com R_f próximo ao do ácido sórbico, na revelação com a lâmpada UV de 254 nm. Os testes com reveladores específicos, também deram

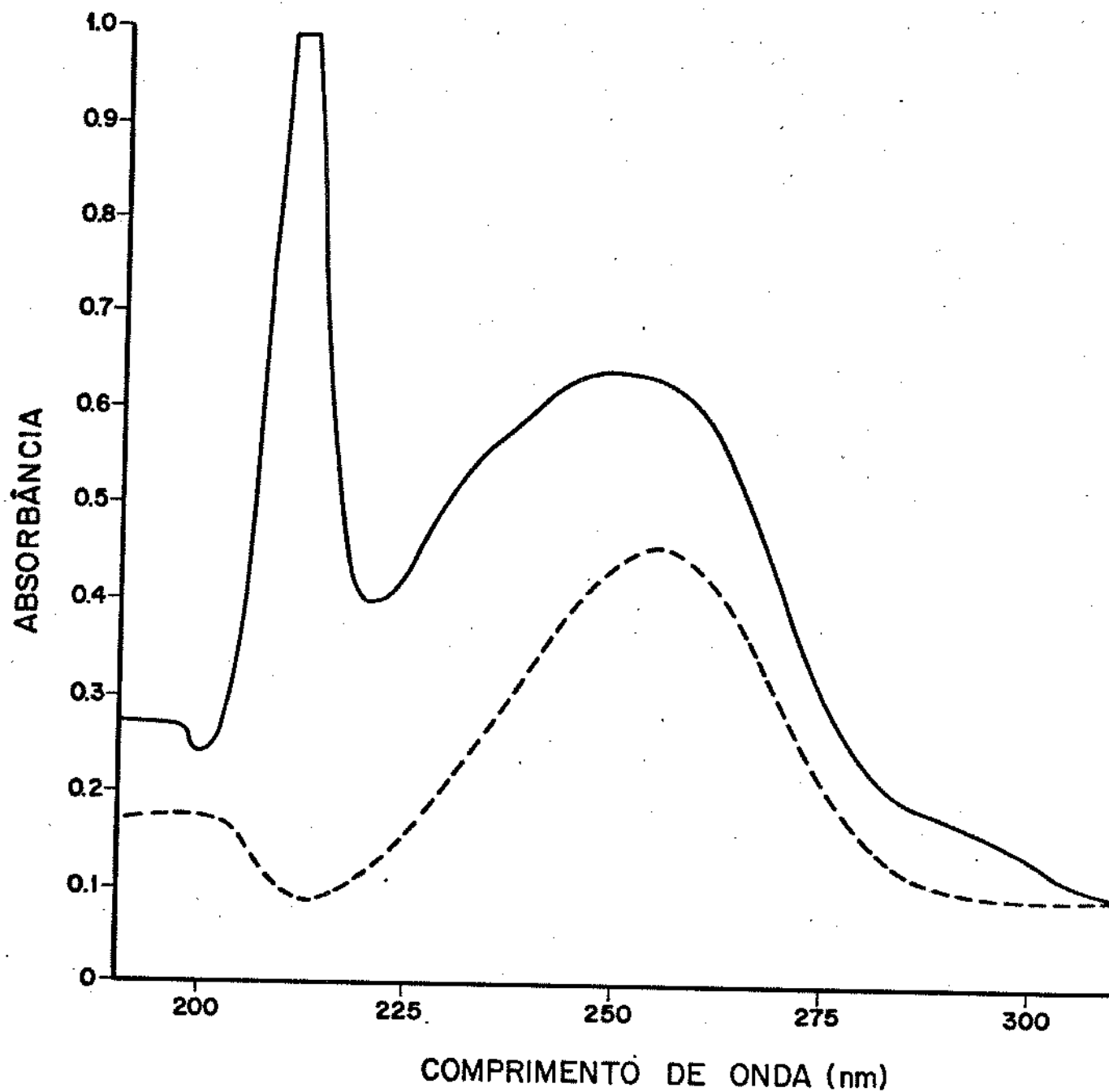


Figura 21 - Espectros de absorção UV da maionese pelos métodos por UV (—) e CCD-UV (---).

Tabela 20 - Conteúdo de ácido sórbico (%) em maionese
 (referente ao primeiro lote), por CCR-UV.

Amostras	Média/Desvio-padrão ¹	CV(%)
1	0.029 ± 0.000	0.0
2	0.026 ± 0.000	0.0
3	0.031 ± 0.003	9.1
4	0.027 ± 0.000	0.0
5	0.028 ± 0.001	2.5
Média geral	0.028 ± 0.001	2.3

¹ Médias e desvios-padrão de análises em duplicatas.

resultados negativos. Pode-se concluir portanto que não havia nem o ácido sórbico nem o benzóico nas amostras de maionese, coletadas na segunda época.

O comportamento dos oito tipos de produtos no estudo da metodologia analisada para conservadores serviu para demonstrar a grande influência da natureza da amostra em qualquer análise. Verificou-se que o melhor método para um produto pode ser inapropriado para outro. Em termos de exatidão e precisão, pode-se relacionar o melhor método para cada produto (Tabela 21). O método por UV pode ser utilizado para o refrigerante de limão, suco de caju, catchup e geléia de uva, enquanto que o método por CCD-UV apresentou bons resultados apenas para iogurte e goiabada. O método por CLAE-UV foi o mais amplo dos três pois seus resultados foram bons para todos os produtos.

4.3.Custo e Tempo de Análise.

O custo (Malio/BB) e o tempo envolvidos na extração dos conservadores dependeram do tipo de amostra analisada. Para amostras líquidas, utilizou-se o procedimento 2 e o seu custo foi em torno de Cz 30,00 por amostra. O procedimento 4, utilizado para amostras sólidas e pastosas, teve um custo de aproximadamente Cz 10,00 por amostra. Nas amostras açucaradas, o custo do procedimento 5, ficou em torno de Cz

40,00 por amostra.

O tempo gasto em cada procedimento de extração foi de 20 min para o procedimento 2, 40 min para o 4, e 60 min para o 5.

Os custos das determinações propriamente ditas, nos três métodos de análise estão apresentados na Tabela 22. Pode-se verificar que na execução da análise, o método por UV teve o menor custo, enquanto que não houve diferença entre CCD-UV e CLAE-UV. A confirmação da identidade foi equivalente nos três métodos. O que variou mais foi o investimento inicial (equipamento) e neste aspecto, o método por CLAE-UV teve um custo três vezes maior que os outros dois.

O tempo de análise foi medido para quatro amostras simultaneamente, pois no método por CCD-UV podemos determinar pelo menos quatro amostras em duplicatas na mesma placa. Os tempos utilizados nas análises foram de 30 min, 60 min e 40 min para os métodos por UV, CCD-UV e CLAE-UV, respectivamente, não incluindo o tempo gasto no preparo das placas e também na degaseificação de solventes e equilíbrio do aparelho na CLAE.

Por ser, o mais econômico, simples, rápido e preciso, o método por UV é o mais recomendado para refrigerante de limão, suco de caju, catchup, e geléia de

Tabela 21 - Relação dos melhores métodos para cada produto.

Produto	Métodos
refrigerante de limão	UV ou CLAE-UV
suco de caju	UV ou CLAE-UV
catchup	UV ou CLAE-UV
margarina	CLAE-UV
iogurte	CLAE-UV ou CCD-UV
goiabada	CLAE-UV ou CCD-UV
geléia de uva	UV ou CLAE-UV

Tabela 22 - Custo das análises (por amostra) nas três técnicas (Maio/88):

UV		CCD-UV	CLAE-UV
Material de consumo	Cz \$ 100.00	Cz \$ 150.00	Cz \$ 150.00
Equipamentos	Espectrofotômetro UV-Visível (Cz \$ 4.000.000,00)	Kit para fabricação de placas. Lâmpada UV de 254 nm com filtro. Espectrofotômetro UV-Visível. (Cz \$ 4.300.000,00)	Cromatógrafo líquido de alta eficiência. (Cz \$ 12.000.000,00)

uva, desde que apenas um dos dois conservadores esteja presente. Por sua vez, o método por CLAE-UV demonstrou a sua versatilidade, sendo aplicável para todas as amostras analisadas (Tabela 21), portanto, preenchendo os pré-requisitos de um método geral. Para laboratórios de pesquisa ou controle de qualidade (indústrias) que trabalham com uma grande variedade de produtos, seria o método mais apropriado. A grande desvantagem é o alto custo do equipamento e de serviços de manutenção. Nos laboratórios sem recursos para comprar ou manter um cromatógrafo líquido de alta eficiência, o método por UV pode ser complementado por CCD-UV para amostras contendo substâncias interferentes (ex. iogurte e gelabada).

4.4. Comentários sobre os Teores de Conservadores nos Produtos Analisados.

Embora o número de produtos avaliados não atinja a grandeza de um levantamento, algumas observações úteis podem ser feitas.

Houve diferenças pequenas, mas estatisticamente significativas, entre os lotes da mesma marca de suco, margarina, iogurte, geléia e goiabada. Portanto, a adição dos conservadores foi homogênea somente no refrigerante e catchup.

A grande preocupação em relação ao uso de conservadores e outros aditivos se deve a possíveis efeitos tóxicos que possam estar associados a estes compostos. Portanto, análises devem ser realizadas para garantir que as quantidades nos alimentos estejam dentro dos limites permitidos. No entanto, é igualmente necessário verificar se os teores de aditivos são suficientes para exercer as suas funções, razão pela qual, foram adicionados em primeiro lugar.

A quantidade máxima de ácido benzóico encontrada no refrigerante de limão está abaixo do permitido pela legislação vigente no país (Tabela 23 em anexo).

Segundo "The International Commission on Microbiological Specifications of Food" (1980), fungos e leveduras são os principais contaminantes destes produtos, que tem pH e atividade de água baixos, enquanto que as bactérias, com exceção das lácticas, não deveriam crescer. Os fungos principalmente, são mais resistentes ao calor e podem permanecer após a pasteurização.

O limite permitido pelo Ministério da Saúde (0,1%) coincide com a quantidade mínima considerada necessária para uma ação efetiva contra fungos e leveduras (Tabela 01), enquanto que o limite estipulado pelo Ministério da Agricultura (0,035%) é muito menor. Cabe lembrar, no entanto, que os valores mínimos efetivos foram obtidos em condições ideais para o desenvolvimento dos microorganismos nos meios de cultura. No refrigerante, podem existir efeitos sinérgicos ao conservador, como presença de dióxido de carbono, açúcar, pH baixo e tratamento térmico.

A porcentagem de ácido benzóico encontrada no suco de caju pelo método por CLAE-UV, ficou um pouco acima do permitido na legislação vigente (Tabela 23), enquanto que os resultados obtidos pelos outros dois métodos indicaram valores abaixo do limite máximo de tolerância. Embora, neste caso, a diferença seja pequena, este tipo de resultado enfatiza o papel fundamental dos métodos analíticos em qualquer trabalho de fiscalização.

O ácido benzóico nos níveis encontrados no suco de caju deve apresentar efeito antimicrobiano completo, superando os níveis efetivos contra fungos, leveduras e bactérias (Tabela 01).

A quantidade de ácido benzóico encontrada no catchup situa-se no limite permitido por lei (Tabela 23) e acima do necessário para o efeito antimicrobiano contra fungos, leveduras e bactérias (Tabela 01).

A quantidade de ácido benzóico, obtida na margarina, está abaixo do permitido por lei (Tabela 23), e acima do necessário para uma ação antimicrobiana contra bactérias e leveduras, mas não contra fungos (Tabela 01).

Segundo "The International Commission on Microbiological Specifications on Foods" (1980), a margarina constitui-se num meio seletivo para fungos e leveduras, sendo que a sua conservação contra estes microorganismos depende não somente do conservador, mas também da quantidade de sal, pH da fase aquosa e da embalagem.

O teor de ácido sórbico remanescente no iogurte está abaixo de 30% do limite permitido para a polpa utilizada como matéria prima na sua fabricação (Tabela 23). Esta quantidade é suficiente para evitar o desenvolvimento dos fungos, leveduras e bactérias, segundo a Tabela 02.

As porcentagens de ácido sórbico encontradas na geléia de uva estão muito abaixo da permitida por lei (Tabela 23). Neste produto, o tratamento térmico utilizado para desnaturação enzimática e também o enchimento a quente da embalagem devem eliminar a contaminação por fungos, leveduras e bactérias. A fim de evitar a recontaminação, após a abertura da embalagem, costuma-se utilizar ácido sórbico e/ou benzóico entre 0,020 e 0,050% ("The International Commission on Microbiological Specifications for Foods", 1980). As quantidades de ácido sórbico nas amostras analisadas estão dentro do intervalo sugerido.

A quantidade de ácido sórbico encontrada na golabada está também muito abaixo da permitida por lei para doces em massa (Tabela 23). O tratamento térmico, a alta concentração de açúcar e o pH baixo teriam efeito conservadore na golabada, e os teores de ácido sórbico devem, portanto, variar também entre 0,020 e 0,050% para evitar a recontaminação, como na geléia ("The International Commission on Microbiological Specifications for Foods", 1980).

A adição de ácido sórbico na maionese é prevista na legislação (Tabela 23). De fato, foi detectado na primeira época de análise, mas não na segunda, apesar de ainda constar do rótulo.

A contaminação por microorganismos na maionese é

RESULTADOS E DISCUSSÃO

difícil de ocorrer devido a seu pH baixo, proveniente da adição de ácido acético. Entretanto, é possível uma contaminação com *Lactobacillus* e leveduras ("The International Commission on Microbiological Specifications for Foods", 1980).

C O N C L U S Õ E S

6. CONCLUSÕES.

1. Foi desenvolvido, para determinação simultânea dos ácidos benzóico e sórbico, um método eficiente por CLAE-UV para amostras sólidas e pastosas, que é mais simples e econômico do que os citados na literatura, e que utiliza na etapa de extração um solvente barato e comum no país, o etanol.
2. Os três métodos empregando as técnicas de UV, CCD-UV e CLAE-UV, adaptados ou desenvolvidos e padronizados no presente trabalho, mostraram exatidão satisfatória pelas porcentagens de recuperação, tanto para ácido benzóico como para ácido sórbico.
3. Os três métodos também apresentaram boa repetitibilidade para os dois conservadores, com coeficientes de variação abaixo de 10 %, sendo o método por UV o mais preciso.
4. A natureza da amostra é um fator fundamental na escolha do método analítico. O método por UV é o mais preciso, simples, econômico e rápido, mas apropriado apenas para produtos com somente um dos dois conservadores e sem substâncias interferentes.

CONCLUSÕES

5. Para produtos que possuem ambos os conservadores ou substâncias interferentes, o método por CLAE-UV é o mais adequado, embora o método por CCD-UV possa ser também utilizado para certos produtos.

6. O método por CLAE-UV é o mais versátil, sendo aplicável para todas as amostras analisadas, embora necessite de um investimento inicial mais alto.

7. Em nenhum dos produtos analisados foram detectados ambos os conservadores simultaneamente, apesar de constarem nos rótulos de alguns deles (suco e margarina). A importância da confirmação da identidade dos conservadores, raramente realizada nos trabalhos descritos na literatura, foi mais uma vez comprovada.

8. As porcentagens de conservadores encontradas estavam no limite máximo permitido na legislação para suco e catchup, e bem abaixo para os demais produtos.

9. Em alguns produtos analisados, as quantidades encontradas de conservadores estavam abaixo do necessário para uma atuação efetiva contra os microorganismos, segundo os estudos desenvolvidos em meios de cultura. Porém não foi possível se chegar a uma conclusão definitiva a este respeito, já que nos alimentos, outros fatores como gás

C O N C L U S Õ E S

carbônico, açúcar, sal e aquecimento podem estar influenciando no desenvolvimento dos microorganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- AITZETMÜLLER, K. e ARZBERGER, E. 1984. HPLC analysis of preservatives in fatty foods. Z. Lebensmittelunters Forsch 178: 279.
- ALI, M. SHER. 1985. Rapid quantitative method for simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid and 4 parabens in meat and nonmeat products by liquid chromatography. J. Assoc. Off Anal. Chem. 68: 488.
- ALMELA, L. e LOPEZ-ROCA, J. M. 1984. Détermination simultanée des acides sorbique et benzoïque par spectrophotométrie ultra-violette différentielle-application aux jus de fruits. Sci Aliment 4: 37.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. 1984. Official Methods of Analysis, 14a. ed. Arlington, Virginia, Capítulo 20.
- BAIRD-PARKER, A. C. e KOOIMAN, W. J. 1980. Soft drinks, fruit juices, concentrates and fruit preserves. Em International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microbial ecology of foods, vol.2. Academic Press, New York.
- BANFIELD, E. H. 1952. Problems arising from the use of

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- chemistry in food. Chem. Ind.: 114.
- BENNETT, M. C. e PETRUS, D. R. 1977. Quantitative determination of sorbic acid and sodium benzoate in citrus juice. J. Food Sci. 42: 1220.
- BERTRAND, A. e SARRE, C. 1978. Content of benzoic acid in carbonated beverages and other liquid food products by gas chromatography. Anal. Falsif. Expert. Chem. 71: 35.
- BEUCHAT, L. R. e HEATON, E. K. 1982. Sensory qualities of canned peaches and pears as affected by thermal process, sorbate and benzoate. J. Food Prot. 45: 942.
- BRANEN, A. L. e DAVIDSON, P. M. 1983. Antimicrobials in Foods. Marcel Dekker Inc., New York e Basel.
- CANTONI, G. e LONGONI, G. M. 1978. Determinazione rapida di acido benzoico, acido sorbico ed esteri p. ac. p. ossibenzoico. Ind. Aliment. 17: 25.
- CAPUTI, A. Jr. e STTAFORD, P. A. 1977. Ruggedness of official colorimetric method for sorbic acid in wine. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60: 1044.
- CARNEVALE, J. 1980. Determination of ascorbic, sorbic, and

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- benzoic acids in citrus juices by high-performance liquid chromatography. Food Technol. in Australia 32: 302.
- CHIANG, H-C. 1969. Polyamide-silica gel thin-layer chromatography of food preservatives. J. Chromatogr 44: 201.
- CHICHESTER, D. F. e TANNER, F. W. 1968. Antimicrobial foods additives. Em FURIA, T. (ed.). 1968. Handbook of Food Additives, The Chemical Rubber Co., Ohio.
- CHICHESTER, D. F. e TANNER, F. W. 1972. Antimicrobial food additives. Em FURIA, T. (ed.). 1972. Handbook of Food Additives, 2a. ed., Chemical Rubber Publishing Co., Ohio.
- Citado em LIEWEN, M. B. e MARTH, E. H. 1985. Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid: A review. J. Food Prot. 48: 364.
- CHIPLEY, J. R. 1983. Sodium benzoate and benzoic acid. Em BRANEN, A. L. e DAVIDSON, P. M. (eds.). 1983. Antimicrobials in Foods, Marcel Dekker Inc., New York e Basel.
- CHITTENDEN, R. H.; LONG, J. H. e HERTER, C.A. 1909. U.S. Dept. Agric. Bull. 88. Citado em FURIA, T. (ed.). 1968. Handbook of Food Additives, Chemical Rubber Publishing Co., Ohio.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 1973. List of additives

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

evaluated for their safety-in-use in food. Food and Agricultural Organization of the United Nations World Health Organization, Italy.

COELHO, R. G.; NELSON, D.L. e JOHL, L. 1983. Determinação de conservadores em alguns alimentos industrializados brasileiros por cromatografia em fase gasosa. *Ciência Tecnol Aliment* 3: 1.

COLLINGE, A. e NOIRFALISE, A. 1980. Dosage simultane par chromatographie liquide a haute performance de l'acid benzoique et de l'acide sorbique. *Anal. Chim. Acta* 121: 337.

COLLINGE, A. e NOIRFALISE, A. 1981. Determination of seven food preservatives by HPLC. *Anal. Chim. Acta* 132: 201.

COPIUS-PEERBOOM, J.W. e BEEKES, H. W. 1964. Thin-layer chromatography of preserving agents. *J. Chromatogr* 14: 417.

CRUESS, W. V. e RICHERT, P. H. 1929. *J. Bacteriol.* 17: 363. Citado em FURIA, T.(ed.). 1968. *Handbook of Food Additives*. The Chemical Rubber Co., Ohio.

CRUESS, V. W. 1932. Hydrogen-ion concentration in preservative action. *Ind. Eng. Chem.* 24: 648.

DAVIDSON, P. M. e BRANEN, A. L. 1981. Antimicrobial activity

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- of non-halogenated phenolic compounds. *J. Food Prot* **44**: 623.
- DEUEL, H. J., Jr.; ALFIN-SLATER, R.; WEIL, C. S. e SMYTH, H. F., Jr. 1954. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. I. Harmlessness of sorbic acid as a dietary component. *Food Res.* **19**: 1.
- DEUEL, H. J., Jr.; CAIRFRI, G. E.; ANISFELD, L.; McKEEHAN, H. e BLUNDEN, H. D. 1954a. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. II. Metabolism of α,β -unsaturated fatty acids with emphasis on sorbic acid. *Food Res.* **19**: 13.
- DIÁRIO OFICIAL DA UNIAO. Dec. Lei 54.541 de 22/10/1964, Dec. Lei 55.871 de 1965, Dec. Lei 986 de 21/10/1969.
- DONHAUSER, S.; GLAS, K. e GRUBER, B. 1984. Detection of preservatives in beer by HPLC and isotacophoresis. *Monatsh. Brauwiss.* **37**: 252.
- EHLERS, D. e LITTMANN, S. 1984. Preservatives in delicatessen salads and mayonnaise. Sample preparation by direct extraction in comparison with steam distillation - possibilities of introduction of preservatives via ingredients. *Deutsch. Lebensmittel Rundsch.* **80**: 44.
- FLORES, J.; MICRALLES, M. e GINER, V. 1980. Rapid detection

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- of preservatives in meat products by thermal extraction and TLC. *Rev. Agroqu. Tecnol. Aliment.* 20: 537.
- FOGDEN, E.; FRYER, M. e URRY, S. 1974. The detection and determination of some food preservatives by gas chromatography. *J. Assoc. Publ. Anal.* 12: 93.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 1979. Specific food labeling requirements. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Paragraph 101, 22(a).
- FRÖHLICH, D. H. 1982. Optimized separation of benzoic and sorbic acid as preservatives in foodstuffs by reversed-phase HPLC. *J. of High Resol. Chromatogr. and Chromatogr. Commun.* 5: 158.
- GABEL, L. F. 1921. The relative action of preservatives in pharmaceutical preparations. *J. Am. Pharm. Assoc.* 10: 767. Citado em BRANEN, A. L. e DAVIDSON, P. M. (eds). 1983. *Em Antimicrobiais in Foods*. Marcel Dekker Inc., New York e Basel.
- GANTENBEIN, W. M. e KRASZ, A. B. 1969. Rapid screening procedure for determination of benzoic acid and sorbic acid in fruit beverages. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 52: 738.
- GEAUGHAN, A.; PIERSON, M. e CHAMBON, P. 1979. Gas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- chromatographic determination of preservatives in rennet. J. of Chromatogr. 176: 123.
- GERTZ, C. e HERRMANN, K. 1983. Determination of sorbic, benzoic acid and p-hydroxybenzoic acid esters in food by HPLC. Dtsch. Lebensm. Rundsch. 79: 331.
- GOO, R. K. S.; WAKATSUKI, H. e KANAI, H. 1979. Ultraviolet spectrophotometric determination of benzoic acid in soy sauce. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62: 119.
- GOODING, G. M. 1945. U.S. 2.379.294. Citado em FURIA, T. (ed.). 1968. Em Handbook of Food Additives. The Chemical Rubber Co., Ohio.
- GOODING, G. M.; MELNICK, D.; LAWRENCE, R. L. e LUCKMANN, F. H. 1955. Sorbic acid as fungistatic agent for foods. IX. Physicochemical considerations in using sorbic acid to protect foods. Food Res. 20: 639.
- GOSSELE, J. A. W. 1971. Modified thin-layer chromatographic separation of preservatives. J. Chromatogr. 63: 433.
- GOSSELE, J. A. W. 1971a. Gas chromatographic determination of preservatives in food. J. Chromatogr. 63: 429.
- GRAHAM, H. D. 1980. Determination of sorbic acid in cheese

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- and other food products by the phenol-H₂SO₄ reagent. *J. Dairy Sci.* **63**: 41.
2 4
- GRAVELAND, A. 1972. Gas chromatographic determination of propionic, sorbic, and benzoic acids in rye bread and margarine. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **55**: 1024.
- GUTFINGER, T.; ASHKENAZY, R. e LETAN, A. 1976. Determination of benzoic and sorbic acids in orange juice. *Analyst* **101**: 49.
- HOLLEY, R. A. e MILLARD, G. E. 1980. Ultraviolet spectrophotometric determination of sorbic acid in dry fermented sausage. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **63**: 1332.
- INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS' EXPERT PANEL ON FOOD SAFETY AND NUTRITION. 1975. Naturally occurring toxicants in foods. *J. Food Sci.* **40**: 215.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 1985. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Volume 1. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos.* Instituto Adolfo Lutz, Brasil.
- ISSHIKI, K.; TSUMURA, S. e WATANABE, T. 1980. Determination of preservatives, butylhydroxyanisole and dibutylhydroxytoluene. *Agric. and Biol. Chem.* **44**: 1601.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ITO, Y.; TONOGAI, Y.; OGAWA, S.; YOKOTAMA, T.; HONDA, T. e IWAIDA, M. 1983. Rapid simultaneous determination of benzoate and sorbate in yoghurt by use of high-performance liquid chromatography. Japan. J. Dairy Food Sci. 32: A89.
- KARASZ, A. B.; MAXSTADT, J. J.; REHER, J. e DECOCCO, F. 1976. Rapid screening procedure for the determination of preservatives in ground beef: Sulfites, benzoates, sorbates and ascorbates. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59: 766.
- KITAJIMA, K. e KAWAMURA, J. 1931. Bull. Imp. Forestry Sta., Tokyo, 31.108. Citado em FURIA, T. (ed.). 1968. Em Handbook of Food Additives. The Chemical Rubber Co., Ohio.
- KUSHNER, D. J. 1971. Influence of solutes and ions on microorganisms. Em HUGO, W. B. (ed.). Inhibition and Destruction of the Microbial Cell. Academic Press, New York.
- LEE, H. S.; ROUSELF, R. L. e FISHER, J. F. 1986. Determination of food preservatives in orange juice by reversed-phase liquid chromatography. J. Food Sci. 51: 568.
- LEUENBERGER, U.; GAUCH, R. e BAUMGARTNER, E. 1979. Determination of food preservatives and saccharin by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 172: 343.
- LIEWEN, M. B. e MARTH, E. H. 1985. Growth and inhibition of

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- microorganisms in the presence of sorbic acid: a review. J. Food Prot. **48**: 364.
- LOPEZ, J. e SIMAL J. 1982. Determinacion de acido sorbico y benzoico mediante la segunda derivada del espectro ultravioleta. An. Bromat. **34**: 113.
- LOPEZ, J. e SIMAL, J. 1983. Determination of sorbic and benzoic acids in foods by gas chromatography. An. Bromatol. **34**: 123.
- LUCK, E. 1976. Sorbic acid as food preservative. Int. Flavors Food Addit. **2**: 122. Citado em LIEWEN, M. B. e MARTH, E. H.. 1985. Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid: A review. J. Food Prot. **48**: 364.
- LUCK, E. 1980. Antimicrobial food additives, Springer-Verlag, New York. Citado em BRANEN, A. L. e DAVIDSON, P. M. (eds.). 1983. Antimicrobials in Foods. Marcel Dekker Inc., New York e Basel.
- MANDROU, B. e BRESSOLLE, F. 1980. Thin layer chromatography reflectometric. Determination of benzoic and sorbic acids in fruit beverages. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **63**: 675.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MAXSTADT, J. J. e KARASZ, A.B. 1972. Rapid spectrophotometric method for the determination of sorbic acid in fresh dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 55: 7.
- MC CALLLA, M. A.; MARK, F. G. e KIPP, W. H. 1977. High performance liquid chromatographic determination of sorbic acid in wine. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60: 71.
- MINE, T. e HORIUCHI, M. 1985. Simultaneous rapid determination of sorbic acid and benzoic acid in wine by high performance liquid chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 26: 61.
- MODI, G.; BIFFOLI, R. e FIORENTINO, P. G. 1983. HPLC determination of benzoic acid and parabens in foods and pharmaceutical products. *Boll. Chim. Unione Ital. Lab. Prov.* 34: 307. Citado em INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE, 1985. *Food Science and Technology Abstracts* 5 A52.
- MURAKAMI, G.; MARUYAMA, T. e NIIYA, I. 1985. Determination of benzoic acid, sorbic acid and dehydroacetic acid in margarine by high performance liquid chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 26: 385.
- NAGASAWA, K.; YOSHIDOME, H. e TAKESHITA, R. 1969. Chromatography of food preservatives on polyamide layers and

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- columns. J. Chromatogr. 43: 473.
- NEALE, M. E. e RIDLINGTON, J. 1978. A rapid GLC method for the determination of benzoic acid in soft drinks and similar products. J. Assoc. Publ. Anal. 16: 135.
- NELSON, J. J. 1973. Quantitation of sodium saccharin, sodium benzoate and other food additives by high speed liquid chromatography. J. Chromatogr. 11: 28.
- NOIRFALISE, A e COLLINGE, A. 1984. Sorbic and benzoic acid in some foods consumed in Belgium. Rev. Ferment. et Ind. Aliment. 39: 3.
- NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS METHOD. 1984. Benzoic acid and sorbic acid in foods. Quantitative determination by gas chromatography. Nordic Comm. Food Anal. Method 103: 6.
- PARK, G. L. e NELSON, D. B. 1981. HPLC analysis of sorbic acid in citrus fruit. J. Food Sci. 46: 1629.
- PEARSON, D. 1971. General methods for additives and contaminants, em The Chemical Analysis of Foods, 6a. ed., Chemical Publishing Co. Inc., New York.
- PEDERSON, M.; ALBURY, N. e CHRISTENSEN, M. D. 1961. The growth of yeasts in grape juice stored at low temperatures.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- IV. Fungstatic effects of organic acids. *Appl. Microbiol.* 9: 162.
- PETRO-TURZA, M.; PALOSI-SZANTHO, V. e JAKAB-HARASZTI, M. 1980. Simultaneous quantitative determination of sorbic and propionic acids by gas chromatography in preservative-containing bakery products. *Acta Aliment.* 9: 277.
- PINELLA, S. J.; FALCO, A. D. e SCHWARTZMAN, G. 1966. Determination of benzoates and hydroxybenzoates in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 49: 829.
- PUTTEMANS, M. L.; DRYON, L. e MASSART, D. L. 1984. Extraction of organic acids by ion-pair formation with tri-n-octylamine. V. Simultaneous determination of synthetic dyes in soft drinks and lemonade syrups. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67: 880.
- PUTTEMANS, M. L.; BRANDERS, C.; DRYON, L. e MASSART, D. L. 1985. Extraction of organic acids by ion-pair formation with tri-n-octylamine. VI. Determination of sorbic acid, benzoic acid and saccharin in yoghurt. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68: 80.
- RESTAINO, L.; KOMATSU, K. K. e SYRACUSE, M. J. 1982. Effect of acids on potassium sorbate inhibition of food related

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- microorganisms in culture media. *J. Food Sci.* 47: 134.
- RESTAINO, L.; LENOVICH, L. M. e BILLS, S. 1982a. Effect of acids and sorbate combinations on the growth of four osmophilic yeasts. *J. Food Prot.* 45: 1138.
- ROBINSON, J. F. e HILLS, C. H. 1959. Preservation of fruit products by sodium sorbate and mild heat. *Food Technol.* 13: 251.
- ROY, R. B.; SAHN, M. e CONETTA, A. 1976. Automated analysis of sorbic acid in food products. *J. Food Sci.* 41: 372.
- SABBAGH, N. K.; COELHO, R. G. e YOKOMIZO, Y. 1977. TLC identification of sorbic and benzoic acids. *Colet. Inst. Tecnol. Aliment.* 8: 19.
- SANCHIZ SEGURA, M. C. e FARRE ROVIRA, R. 1983. Preservatives in wines. Investigation and determination of SO₂ and sorbic acid. *Alimentaria* 147: 55. Citado em INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE. 1985. *Food Science and Technology Abstracts* 12 HB.
- SAX, M. I. 1979. Dangerous Properties of Industrial Material, 5a. ed., Van Nostrand Reinhold, New York.
- SIMAL, J. e LOPEZ, J. 1983. Application of second derivative

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- spectroscopy for determination of benzoic acid in foods. Anal. Bromatol. 34: 103.
- SIMÃO, A. M. 1986. Aditivos para Alimentos sob o Aspecto Toxicológico, 2a. ed., Livraria Nobel S. A., Brasil.
- SMITTLE, R. B. e FLOWERS, R. S. 1982. Acid-tolerant microorganisms involved in spoilage of salad dressings. J. Food Prot. 45: 977.
- SMET, M. DE; HOOGEWIJS, G.; PUTTEMANS, M. e MASSART, D. L. 1984. Separation strategy of multicomponent mixtures by liquid chromatography phase and a limited number of mobile phase solvents. Anal. Chem. 56: 2662.
- SMYLY, D. S.; WOODWARD, B. B. e CONRAD, E. C. 1976. Determination of saccharin, sodium benzoate and caffeine in beverages by reversed-phase high-pressure liquid chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59: 14.
- SMYTH, H. F. e CARPENTER, C. P. 1948. Further experience with the range finding test in the industrial toxicological laboratory. J. Ind. Hyg. Toxicol. 30: 63. Citado em BRANEN, A. L. e DAVIDSON, P. M., 1983, em Antimicrobials in foods, Marcel Dekker Inc., New York e Basel.
- SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F. e ALLEN, C. E. 1979. Botulism

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- control by nitrate and sorbate in cured meats: A review. J. Food Prot. 42: 739.
- SOFOS, J. N. e BUSTA, F. F. 1981. Antimicrobial activity of sorbate. J. Food Prot. 44: 614.
- SOFOS, J. N. e BUSTA, F. F. 1983. Sorbates. Em BRANEN, A. L. e DAVIDSON, P. M. (eds). 1983. Antimicrobials in Foods, Marcel Dekker Inc., New York e Basel.
- STAFFORD, A. E. 1976. Rapid analysis of potassium sorbate in dried prunes by ultraviolet or colorimetric procedures. J. Agric. Food Chem. 24: 894.
- STIJNE, T. e HISCENHUBER, C. 1984. High performance liquid chromatographic determination of low levels of benzoic acid and sorbic acid in yoghurts. Deutsch. Lebensmittel Rundsch. 80: 81.
- TERADA, H.; HISADA, K.; MARUYAMA, Y. e SAKAKE, Y. 1983. Studies on the analysis of food additives by high performance liquid chromatography. III. The application of ion-pair chromatography to determination of saccharin, benzoic acid and sorbic acid in foods. J. Hyg. Chem. 29: 297. Citado em INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE. 1985. Food Science and Technology Abstracts 6 159.
- TETSUMOTO, S. 1933. J. Agric. Chem. Soc. Japan 9: 388. Citado

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- em FURIA, T. (ed.). 1968. Handbook of Food Additives. The Chemical Rubber Co., Ohio.
- THE INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. 1980. Microbial Ecology of Foods. Vol. I e II. Academic Press. N. York.
- TJAN, G. H. e KONTER, T. 1972. Thin layer chromatographic identification of preservatives in food. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 55: 1223.
- TOOLEY, P. 1971. Chemistry in Industry: Food and Drugs. John Murray (ed.), London.
- TOLEDO, M. C. F. 1987. Aditivos para Alimentos: Aspectos Toxicológicos. I Simpósio sobre Aditivos para Alimentos (Setembro, 1987), Ital, Campinas, S. P.
- TRIFIRO, A.; BLIGLIARDI, D.; BAZZARINI, R. e GHERARDI, S. 1981. Determination of benzoic and sorbic acids in food by high-pressure liquid chromatography. Ind. Conserve 56: 22.
- URETA, C. F. 1984. Determination of sorbic and benzoic acids in wines by gas chromatography. Aliment. Cienc. Tecnol. Ind. 9: 29.
- VALDEHITA, M. T.; CARBALLIDO, A. e GARCIA-MORENO DEL RIO, M.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- G. 1979. Preservatives in foods. I. Extraction, separation and identification by TLC. *Anal. Bromatol.* 31: 31.
- VALDEHITA, M. T.; CARBALLIDO, A. e CORDOBA RODRIGUEZ, M. A. 1980. Preservatives in foods. II. UV densitometric determination by TLC. *Anal. Bromatol.* 32: 93.
- WAHBI, A. A. M.; ABDINE, H. e BLAIH, S. M. 1977. Spectrophotometric determination of some preservatives in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60: 1175.
- WILDANGER, W. A. 1973. Trennung einiger Konservierungsmittel durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie. *Chromatographia* 8/9: 381.
- YOSHIDA, S.; OGURA, M.; HASEGAWA, Y. e YOSHINO, H. 1981. Determination of organic acids in soy sauce by high pressure liquid chromatography. IV. Benzoic acid. *J. Japan Soy Sauce Res. Inst.* 2: 251. Citado em INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE. 1983. *Food Science and Technology Abstracts* 10 I575.
- ZIEMELIS, G. e SOMERS, T. C. 1978. Rapid determination of sorbic acid in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 29: 217.
- ZONNEVELD, H. 1975. Spectrophotometric estimation of benzoic and sorbic acids. *J. Science Food Agric.* 26: 879.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ZUGMUNT, L. C. 1979. Gas-liquid chromatographic determination of sorbic acid and sodium benzoate in table sirup. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62: 939.

ANEXO

Tabela 33 - Limites máximos permitidos de ácido benzóico e ácido sórbico em alimentos.

Aditivo	Código	Ministério de Saúde ¹		Ministério da Agricultura ²	
		Alimentos em que são tolerados	Limites máximos(%)	Alimentos em que são tolerados	Limites máximos(%)
Ácido Benzóico (Benzoato de Sódio)	P.I	Concentrados de frutas para refrigerantes	0.10	Refrrescos e Refrigerantes	0.035
		Conservas vegetais em meio láctico-acético(exceto as que sejam submetidas a esterilização)	0.10	Xaropes de frutas	0.030 ⁴
		Emulsagens de queijos fundidos	0.20	Sucos de frutas	0.10
		Margarinas	0.10		
		Solhos	0.10		
		Refrigerantes	0.10		
		Chocolates	0.10	Xaropes de frutas	0.01 ^{4,5}
		Concentrados de frutas para refrigerantes	0.10	Suco de frutas	0.10 ⁴
		Conservas de vegetais (exceto as que sejam submetidas a esterilização)	0.10	Refrrescos e Refrigerantes	0.01 ⁴
				Vinho	0.02 ⁴
Ácido Sórbico (e seus sais)	P.IV			Sidra	0.03 ⁴
				Filtrado doce	0.05 ⁴

Tabela 23 - Continuação.

Ministério da Saúde			
Aditivo	Código	Alimentos em que são tolerados	Limites Máximos(%)
Ácido Sódico (e seus sais)	P.IV	Conservas de carne exclusivamente nos revestimentos dos embutidos)	0,10
		Doce em massa	0,20
		Doceias	0,20
		Leite de coco	0,10
		Maiônese	0,10
		Margarinas	0,05
		Produtos de confeitaria	0,20
		Preparados de polpa, sucos, pastas ou pedaços de morango, passas e abacaxi quando empregados como ingredientes na elaboração de licores	0,20
		Queijos (nos revestimentos)	0,10
		Queijos (ralados e em fatias expostos ao consumo em pacotados)	0,10

Tabela CE - Continuação.

Aditivo	Código	Ministério da Saúde	
		Alimentos em que são tolerados	Limites máximos(%)
Ácido Sorbico (e seus sais)	P.IV	Refrigerantes	0.01
		Sucos de frutas e seus xaropes	0.10
		Vinhos	0.02
		Xaropes	0.10

1 Decreto lei 34.541 de 02-10-64.

2 Decreto lei 73.267/73 de 19-09-74 para bebidas, substitui o decreto lei 34.541.

3 Permitido o resíduo de 30% no produto final. resolução No. 13/72 da Comissão de Normas e Padrões para Alimentos (CINPA).

4 No produto a ser consumido.

5 Calculado em ácido sorbico.

13/72 da Comissão de Normas e Padrões para Alimentos