

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos

**AVALIAÇÃO DA INGESTÃO POTENCIAL DOS
ANTIOXIDANTES BUTIL HIDROXIANISOL,
BUTIL HIDROXITOLUENO E *TERC*-BUTIL
HIDROQUINONA**

Gisele C. Maziero C. Bannwart
Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. Maria Cecília F. Toledo
Orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Gisele Cristina Maziero de Campos Bannwart, aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de julho de 2000.

Campinas, 19 de julho de 2000.

CAMPINAS – SP
2000

Profa. Dra. Maria Cecília de F. Toledo
Presidente da Banca

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



200012999

m. cecilia de f. toledo

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/Unicamp
	B227a
V.	Ex.
TOMBO BC/	42132
PROC.	16-278100
C	D
PREC	12500,00
DATA	19/09/00
N.º CPD	

CM-00144217-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

B227a

Bannwart, Gisele Cristina Maziero de Campos

Avaliação da ingestão potencial dos antioxidantes butil hidroxianisol, butil hidroxitolueno e terc-butil hidroquinona /Gisele Cristina Maziero de Campos Bannwart. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Maria Cecília de Figueiredo Toledo
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Antioxidantes. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Legislação. I. Toledo, Maria Cecília de Figueiredo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



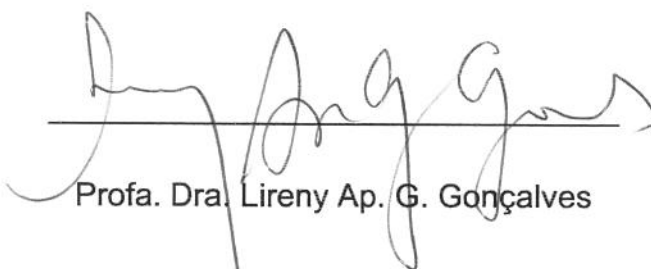
Profa. Dra. Maria Cecília F. Toledo

(orientadora)



Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy

(membro)



Profa. Dra. Lireny Ap. G. Gonçalves

(membro)

Profa. Dra. Adriana Z. Mercadante

(membro)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

*Aos meus amores,
André e Mateus*

AGRADECIMENTOS

- ✓ À Profa. Dra. Maria Cecília F. Toledo, minha orientadora, a quem muito estimo e admiro, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela atenção, dedicação, apoio e compreensão constantes. Agradeço, de forma especial, os valiosos ensinamentos que me transmitiu, como profissional e como amiga.
- ✓ Aos meus queridos pais, pelo amor, incentivo e por todas as boas oportunidades que sempre me proporcionaram.
- ✓ Ao meu marido André, pelo companheirismo, estímulo e apoio em todos os momentos.
- ✓ Ao meu filho Mateus, por toda a alegria que me proporciona.
- ✓ A toda a minha família, em especial aos meus sogros, Aloysio e Célia, pelo carinho e atenção com que acompanharam todas as etapas do trabalho.
- ✓ Às Profas. Dras. Lireny Ap. G. Gonçalves, Helena T. Godoy e Adriana Z. Mercadante, pela paciência e atenção na correção deste trabalho, e pelas sugestões que muito contribuíram para enriquecê-lo.
- ✓ À amiga Mônica, pelas dicas e, sobretudo, pelo apoio e disposição em ajudar, sempre.
- ✓ À Sílvia e à Rita, do laboratório de Toxicologia, pelas contribuições na realização das análises.
- ✓ Ao Marcão, da secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos, pelo auxílio na área de informática.
- ✓ À Eliane, do Instituto de Química, pela boa vontade e pelo capricho com que colaborou com os desenhos dos cromatogramas.
- ✓ A DEUS, por tudo.

ÍNDICE

Pág.

Lista de tabelas	iv
Lista de figuras	vi
Lista de anexos	viii
Resumo	xii
<i>Summary</i>	xiv
Introdução	xv
Objetivo.....	xix
Capítulo 1. Revisão bibliográfica	1
1.1. Oxidação de óleos e gorduras	2
1.2. Antioxidantes	8
1.2.1. Aspectos gerais e modo de ação	8
1.2.2. Características e propriedades físico-químicas	11
1.2.3. Métodos analíticos	19
1.2.3.1. Extração	19
1.2.3.2. Determinação	22
1.3. Ingestão de aditivos alimentares	37
1.3.1. Dados de consumo de alimentos	38

1.3.2. Estimativa da ingestão de aditivos alimentares	42
1.4. Referências bibliográficas	48
Capítulo 2. Aspectos Toxicológicos dos Antioxidantes BHA, BHT e TBHQ	64
Resumo	65
<i>Abstract</i>	65
2.1. Introdução	66
2.2. Aspectos toxicológicos	68
2.2.1. Butil hidroxianisol	68
2.2.2. Butil hidroxitolueno	76
2.2.3. <i>terc</i> -Butil hidroquinona	86
2.3. Considerações finais	94
2.4. Referências bibliográficas	96
Capítulo 3. Estimate of the Daily Intake of BHA, BHT and TBHQ in Brazil	103
<i>Summary</i>	104
3.1. Introduction	105
3.2. Experimental	107
3.2.1. Food consumption data	107
3.2.2. Assessment of potential intake of BHA, BHT and TBHQ	109
3.2.3. Determination of food antioxidants	111

3.3. Results and discussion	113
3.4. Conclusions	117
3.5. References	119
Capítulo 4. Determinação de BHA, BHT e TBHQ em Óleos e Gorduras por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	126
Resumo	127
<i>Summary</i>	128
4.1. Introdução	129
4.2. Metodologia	132
4.2.1. Amostras	132
4.2.2. Extração	132
4.2.3. Procedimentos cromatográficos	133
4.2.4. Recuperação do método	135
4.2.5. Limites de detecção	135
4.3. Resultados e discussão	136
4.4. Conclusões	141
4.5. Referências bibliográficas	155
Conclusão	160
Anexos	162

LISTA DE TABELAS

Pág.

Capítulo 1

Tabela 1 - Utilização dos antioxidantes fenólicos BHA, BHT e TBHQ em alimentos	13
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ	17
Tabela 3 - Utilização da cromatografia gasosa na determinação analítica de antioxidantes fenólicos	34
Tabela 4 - Utilização da cromatografia líquida de alta eficiência na determinação analítica de antioxidantes fenólicos	36
Tabela 5 - Métodos para obtenção de dados de consumo de alimentos	39

Capítulo 3

Table 1- Assessment of national maximum significant levels of BHA, BHT and TBHQ through the Budget Method	121
Table 2- Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI) of BHA	122
Table 3 - Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI) of BHT	123
Table 4 - Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI) of TBHQ	124

Table 5 - Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI) of BHA, BHT and TBHQ in Brazil (mg/kg body weight)	125
--	-----

Table 6 - Levels of BHT and TBHQ in selected food categories	125
--	-----

Capítulo 4

Tabela 1 – Tempo de retenção de BHA, BHT e TBHQ em diferentes fases móveis	142
--	-----

Tabela 2 - Recuperação de antioxidantes em óleos e gorduras.....	143
--	-----

Tabela 3 - Concentração de TBHQ em óleos vegetais	144
---	-----

Tabela 4 - Concentração de BHT em gordura vegetal	145
---	-----

Tabela 5 - Concentração de BHT em margarina	146
---	-----

Tabela 6 - Concentração de BHT em creme vegetal	147
---	-----

Tabela 7 - Concentração de BHT em halvarina	148
---	-----

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Capítulo 1

Figura 1 - Estrutura química dos antioxidantes fenólicos BHA, BHT e TBHQ	16
--	----

Capítulo 2

Figura 1 - Estrutura química dos antioxidantes fenólicos BHA, BHT e TBHQ	67
--	----

Capítulo 4

Figura 1 - Cromatogramas por CLAE - padrões analíticos. (a) BHA, TBHQ, (b) BHT. Condições cromatográficas: fases móveis (I) acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (25:25:50, v/v), (II) acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v), coluna C ₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), fluxo 1 mL/min., detector UV-vis fixado a 280 nm. BHA = butil hidroxianisol, BHT = butil hidroxitolueno, TBHQ = <i>terc</i> - butilhidroquinona	149
--	-----

Figura 2 - Cromatogramas por CLAE - padrões analíticos. (a) BHA, TBHQ, (b) BHA, BHT. Indicativo da confirmação dos picos. Condições cromatográficas: fases móveis (III) acetonitrila:água:metanol (36:60:4, v/v), (IV) acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v), coluna C ₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), fluxo 1 mL/min., detector UV-vis fixado a 280 nm. BHA = butil hidroxianisol, BHT = butil hidroxitolueno, TBHQ = <i>terc</i> - butilhidroquinona.	150
--	-----

Figura 3 - Cromatogramas por CLAE. (a) óleo de soja (marca B), (b) óleo de milho (marca A). Condições de análise: fase móvel **(I)**: acetonitrila: metanol: ácido acético 5% (25:25:50, v/v), coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), fluxo 1 ml/min., detector UV-vis fixado a 280 nm. TBHQ = *terc*-butilhidroquinona. 151

Figura 4 - Cromatogramas por CLAE. (a) gordura vegetal hidrogenada (marca F), (b) margarina (marca G). Condições de análise: fase móvel **(II)**: acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v), coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), fluxo 1 mL/min, detector UV-vis fixado a 280 nm. BHT = butil hidroxitolueno. 152

Figura 5 - Cromatogramas por CLAE. (a) creme vegetal (marca G), (b) halvarina (marca G₁). Condições de análise: fase móvel **(II)**: acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v), coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), fluxo 1 mL/min, detector UV-vis fixado a 280 nm. BHT = butil hidroxitolueno. 153

Figura 6 - Cromatogramas por CLAE – indicativo da confirmação dos picos. (a) óleo de soja (marca B), (b) gordura vegetal hidrogenada (marca F). Condições de análise: fases móveis: **(III)**: acetonitrila:água:metanol (36:60:4, v/v) (a) e **(IV)** acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v) (b), coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), fluxo 1 mL/min, detector UV-vis fixado a 280 nm. BHT = butil hidroxitolueno, TBHQ = *terc*-butil hidroquinona. 154

LISTA DE ANEXOS

Pág.

Anexo 1 – Antioxidantes declarados nos rótulos das amostras analisadas	163
Anexo 2 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de óleo de soja (marca A). Condições de análise: fase móvel (I) acetonitrila:metanol: ácido acético 5% (25:25:50, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C ₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). TBHQ: <i>terc</i> -butil hidroquinona.	
	164
Anexo 3 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de óleo de soja (marca C). Condições de análise: fase móvel (I) acetonitrila:metanol: ácido acético 5% (25:25:50, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C ₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). TBHQ: <i>terc</i> -butil hidroquinona.	
	165
Anexo 4 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de gordura vegetal hidrogenada (marca E). Condições de análise: fase móvel (II) acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C ₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.	
	166
Anexo 5 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de margarina (marca F). Condições de análise: fase móvel (II) acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C ₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.	
	167

Anexo 6 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de creme vegetal (marca F). Condições de análise: fase móvel **(II)** acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm).

BHT: butil hidroxitolueno. 168

Anexo 7 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de halvarina (marca F). Condições de análise: fase móvel **(II)** acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm).

BHT: butil hidroxitolueno. 169

Anexo 8 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de halvarina (marca G₂). Condições de análise: fase móvel **(II)** acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm).

BHT: butil hidroxitolueno. 170

Anexo 9 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de óleo de soja (marca A) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel **(III)** acetonitrila:água:metanol (36:60:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). TBHQ: *terc*-butil hidroquinona. 171

Anexo 10 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de óleo de soja (marca C) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel **(III)** acetonitrila:água:metanol (36:60:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). TBHQ: *terc*-butil hidroquinona. 172

Anexo 11 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de óleo de milho (marca A) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel (III) acetonitrila:água:metanol (36:60:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C ₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). TBHQ: <i>terc</i> -butil hidroquinona.	173
Anexo 12 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de gordura vegetal hidrogenada (marca E) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel (IV) acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C ₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.	174
Anexo 13 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de margarina (marca F) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel (IV) acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C ₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.	175
Anexo 14 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de margarina (marca G) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel (IV) acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C ₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.	176
Anexo 15 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de creme vegetal (marca F) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel (IV) acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C ₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.	177

Anexo 16 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de creme vegetal (marca G) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel **(IV)** acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno. 178

Anexo 17 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de halvarina (marca F) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel **(IV)** acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno. 179

Anexo 18 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de halvarina (marca G₁) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel **(IV)** acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno. 180

Anexo 19 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de halvarina (marca G₂) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel **(IV)** acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno. 181

RESUMO

A ingestão potencial dos antioxidantes fenólicos butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT) e *terc*-butil hidroquinona (TBHQ) foi estimada com base em dados de consumo nacional de alimentos e nos níveis máximos destes aditivos permitidos pela legislação brasileira. Em uma primeira etapa, a segurança dos limites máximos de cada antioxidante, estabelecidos pela legislação vigente na época do estudo, foi avaliada através do Método de "Budget". Os resultados obtidos indicaram a necessidade de um estudo de ingestão mais detalhado, principalmente para o BHA e o BHT. Foi então estimada a ingestão diária máxima teórica (IDMT) para os três compostos, que resultou em valores inferiores à Ingestão Diária Aceitável (IDA) recomendada pelo JECFA para cada um dos antioxidantes. Com base nos resultados obtidos e no fato de que ambos os métodos utilizados geralmente conduzem a superestimativas, concluiu-se que a ingestão dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ pelo consumidor brasileiro médio não evidencia preocupação.

Com o objetivo de verificar se os níveis reais de uso dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ estão de acordo com a legislação brasileira, algumas categorias de alimentos foram selecionadas para análise. Os alimentos analisados foram: óleos de soja e milho, gordura vegetal hidrogenada, margarina, creme vegetal e halvarina, que foram considerados como a principal fonte de exposição aos três antioxidantes estudados, através da dieta. Amostras de diferentes marcas e lotes foram coletadas nos principais hipermercados da cidade de Campinas, SP. A técnica analítica utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção na região ultra-violeta.

Os resultados analíticos obtidos indicaram que o TBHQ e BHT são os antioxidantes fenólicos mais utilizados, respectivamente, em óleos vegetais e em gorduras e derivados. O antioxidante BHA não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. De acordo com os dados analíticos, o uso do BHT e do

TBHQ encontra-se de acordo com a legislação vigente no Brasil na época do estudo, já que em 95% das amostras analisadas os níveis destes compostos foram inferiores aos respectivos limites máximos permitidos. Estes resultados reforçam a conclusão do estudo de ingestão realizado, através do qual se concluiu que a ingestão dos antioxidantes fenólicos BHA, BHT e TBHQ no Brasil encontra-se de acordo com as recomendações do JECFA, não representando riscos à população.

SUMMARY

The potential intake of the phenolic antioxidants butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) and tert-butyl hydroquinone (TBHQ) was estimated based on national food consumption data and on national maximum permitted additive levels. In a first step, the safety aspects of the maximum permitted levels of each antioxidant were assessed using the Budget Method. The results indicated the need of a more detailed intake study, mainly for BHA and BHT. Their Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI) was then estimated, resulting in values lower than the Acceptable Daily Intake (ADI) recommended by JECFA for each compound. Based on the results and on the fact that both the used methods tend to produce superestimates, it was concluded that the intake of the antioxidants BHA, BHT and TBHQ do not indicate any worry for mean Brazilian consumers.

To confirm that the use levels of BHA, BHT and TBHQ are in accordance with the current legislation, some categories of food were selected for analysis. The analysed food were: soybean and corn oil, hydrogenated vegetable fat, margarine, vegetable cream and halvarina, which were considered as the main exposure source to the three studied antioxidants through the diet. Samples of different brands and batches were collected in the main supermarkets of the city of Campinas, SP. The used analytical technique was high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection.

The analytical results indicate that TBHQ and BHT are the most used phenolic antioxidants in vegetable oils and in fats and derived products, respectively. The antioxidant BHA was not detected in any of the analysed samples. According to the analytical data, the use of BHT and TBHQ is in line with the current legislation, as the antioxidant levels were below their respective maximum permitted levels for 95% of the analysed samples. These results reinforce the conclusion of the intake study, when it was concluded that the intake of BHA, BHT and TBHQ in Brazil are in accordance with JECFA's recommendations and do not represent health risks to the population.

INTRODUÇÃO

O uso de aditivos alimentares em diferentes países é regulamentado por legislação específica, estabelecida nacionalmente com base em aspectos de segurança de uso e necessidade tecnológica. Muitos países, incluindo o Brasil, adotam em suas tomadas de decisões recomendações de Comitês Internacionais, como o JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives), comitê conjunto FAO/OMS de peritos em aditivos alimentares e contaminantes, bem como normas publicadas pelo Codex Alimentarius, que é um código internacional de normas para alimentos.

O Codex Alimentarius opera através de diferentes comitês, entre eles o Comitê do Codex para Aditivos Alimentares e Contaminantes (CCFAC), que é responsável pela elaboração de normas relativas ao emprego de aditivos e à presença de contaminantes (excluídos os pesticidas e as drogas veterinárias) em alimentos.

Para que um determinado aditivo tenha seu uso regulamentado pelo Codex, são necessários estudos toxicológicos detalhados que comprovem sua segurança de uso, em geral conduzidos com animais experimentais. A avaliação dos dados resultantes destes estudos é de responsabilidade do JECFA que, após examinar os dados toxicológicos disponíveis, estabelece, quando possível, um limite de ingestão para o aditivo. Este valor é representado pela IDA (Ingestão Diária Aceitável), expressa em mg do aditivo/kg de peso corpóreo, e é obtido através da aplicação de um fator de segurança a um nível experimental sem efeito tóxico observado (NOEL) em animais de laboratório. O conceito de IDA implica na ingestão diária do aditivo por toda vida, sem risco apreciável à saúde humana, à luz dos conhecimentos toxicológicos disponíveis na época da avaliação.

A ingestão real de um aditivo por uma determinada população, por sua vez, sofre modificações constantes, conforme o surgimento de novos produtos, novos aditivos com a mesma função tecnológica e novas tendências nos hábitos

alimentares da população. Por esta razão, o Codex Alimentarius recomenda aos países a realização periódica de estudos de ingestão potencial dos diferentes aditivos, com base na sua utilização tecnológica e em dados nacionais de consumo de alimentos, confrontando-se os valores estimados com as respectivas IDAs destes compostos.

Atualmente, está sendo elaborada pelo CCFAC uma norma geral para o emprego de aditivos com IDA numérica estabelecida pelo JECFA, bem como uma metodologia para avaliação da sua ingestão, de forma a garantir que os limites a serem recomendados pelo Codex não resultem em ingestões acima da IDA para os consumidores de diferentes países.

Antioxidantes e conservadores foram as primeiras classes de aditivos para as quais foram elaboradas pelo CCFAC propostas de normas, baseadas em dados nacionais do uso destas substâncias. Estudos preliminares de ingestão desses aditivos, realizados por grupos de trabalho deste Comitê e utilizando os princípios do Método de Budget, desenvolvido na Dinamarca (CAC, 1995), e na “dieta de quantidades unitárias” (CAC, 1996), indicaram que de 29 antioxidantes e conservadores avaliados, entre os quais os antioxidantes BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno) e TBHQ (terc-butil hidroquinona), 24 apresentaram ingestão potencial acima da IDA.

A ingestão potencial destes 24 aditivos foi calculada individualmente, considerando-se como nível de uso o maior entre os limites máximos permitidos pelos países que enviaram informações ao Codex. Estes cálculos foram refeitos para 18 dos 24 aditivos avaliados, considerando-se neste caso o valor mediano dos níveis máximos permitidos para cada um deles. Novamente, os valores de ingestão encontrados para todos estes aditivos foram maiores que as respectivas IDAs, que correspondem a 0,7, 0,3 e 0,5 mg de aditivo/kg de peso corpóreo, para TBHQ, BHT e BHA, respectivamente (CAC, 1996).

Foi então manifestada pelo CCFAC uma preocupação especial com relação aos antioxidantes acima mencionados, já que, além dos sulfitos, o TBHQ, o BHT e

o BHA foram os aditivos cuja ingestão estimada mais ultrapassou a IDA, correspondendo, respectivamente, a 2.458, 1.978 e 1.167% na primeira avaliação e a 1.950, 1.489 e 673%, na segunda avaliação (CAC, 1996).

Em contrapartida, estudos de ingestão de sulfitos e benzoatos, realizados na Inglaterra, considerando níveis reais de uso e dados nacionais de consumo de alimentos, resultaram em valores abaixo das IDAs. Estes resultados indicaram a possibilidade de que os estudos preliminares de ingestão realizados pelo Codex estejam super-estimando a ingestão real de aditivos, não só na Inglaterra, mas também em outros países.

Desta forma, o Codex Alimentarius solicitou aos países membros que realizassem estudos nacionais de ingestão destes aditivos e enviassem informações detalhadas, para que se pudesse verificar qual é a correlação entre os dados obtidos nos estudos preliminares, pelo método de Budget e a “dieta de quantidades unitárias”, e os resultados de estudos mais refinados, considerando-se as condições reais de uso de aditivos e os hábitos nacionais de consumo de alimentos.

Na 51ª reunião do JECFA (1998), foram avaliados os dados de ingestão dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ e dos conservantes benzoato e sulfito, enviados por 11 países, incluindo o Brasil. Estimativas de ingestão dos três antioxidantes baseadas nos limites estabelecidos pelo GSFA (*General Standard for Food Additives*) e em dados nacionais de consumo de alimentos resultaram em valores acima da IDA, nos três países que enviaram dados deste tipo. Estimativas de consumo médio nacional dos antioxidantes resultaram em valores abaixo das respectivas IDAs em 10 países, para BHA e BHT, e em 6 países, no caso do TBHQ. Concluiu-se que a IDA dos antioxidantes BHA e TBHQ pode ser excedida por grandes consumidores destes aditivos, porém as informações disponíveis na ocasião foram insuficientes para estimar tanto o número de grandes consumidores como a duração e a magnitude do consumo superior à IDA.

No presente trabalho, foi estimada a ingestão potencial dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ no Brasil, com base nos respectivos níveis máximos permitidos pela legislação brasileira e em dados de consumo nacional de alimentos, comparando-se os valores obtidos com as respectivas IDAs recomendadas pelo JECFA. Foram também determinadas analiticamente as concentrações destes compostos nos alimentos mais representativos em que são permitidos, a fim de verificar se os respectivos níveis reais de uso estão de acordo com a legislação.

OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi estimar a ingestão diária potencial dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ no Brasil, com base em dados médios de consumo nacional de alimentos e nos respectivos níveis máximos permitidos pela legislação brasileira, comparando-se os valores obtidos com os respectivos valores de IDA recomendados para estes aditivos. Posteriormente, a determinação analítica da concentração destes aditivos nos alimentos mais representativos em que são permitidos foi conduzida com o objetivo de verificar se os níveis reais de uso destas substâncias encontram-se de acordo com a legislação brasileira.

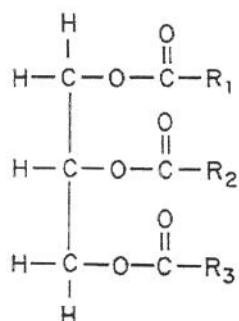
CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Oxidação de óleos e gorduras

Óleos e gorduras estão presentes em quase todos os alimentos, nos quais desempenham importantes funções nutricionais, como o suprimento de calorias, ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K). Além disso, atuam no aspecto sensorial, contribuindo para a palatabilidade e a sensação de saciedade proporcionadas pelo alimento. São também auxiliares de processamento em diversos tipos de alimentos, como é o caso dos óleos para fritura e dos *shortenings* (SHERWIN, 1990; BUCK, 1991). Os óleos e as gorduras podem ocorrer na forma pura, como é o caso dos óleos para salada, ou como parte de outros alimentos, onde sua proporção é variável, desde muito baixa (Ex.: lipídios em grãos e vegetais) até altas porcentagens (Ex.: alimentos fritos e nozes) (SHERWIN, 1990). Com exceção da água, a maioria dos alimentos que compõem a dieta contém uma certa quantidade, mesmo que bastante baixa, de lipídios (LÖLIGER, 1991).

Os lipídios constituem um grupo de moléculas orgânicas que podem ser divididas em três classes: lipídios simples (triacilgliceróis, esteril ésteres e ceras), lipídios compostos (fosfolipídios, glicolipídios, esfingolipídios e lipoproteínas) e lipídios derivados (ácidos graxos, vitaminas lipossolúveis e pró-vitaminas, esteróis, terpenóides, éteres e álcoois) (JADHAV et al, 1997). Quimicamente, óleos e gorduras são triacilgliceróis, ou seja, ésteres de glicerol e ácidos graxos de cadeias longas, cuja estrutura básica é a seguinte (SHERWIN, 1990):



Na estrutura apresentada, R_1 , R_2 e R_3 representam as cadeias de ácidos graxos, que podem ser iguais ou diferentes entre si. A maioria dos ácidos graxos encontrados em alimentos contém de 12 a 18 átomos de carbono, podendo ser saturados (quando estão presentes ligações simples entre carbonos) ou insaturados (quando apresentam duplas ligações entre carbonos). O comprimento da cadeia, o grau de insaturação e a posição dos ácidos graxos esterificados com glicerol determinam as características físicas e químicas de óleos e gorduras (BUCK, 1991).

As substâncias lipídicas, sejam elas óleos e gorduras na forma pura ou constituintes de alimentos complexos, podem sofrer diferentes formas de deterioração durante as etapas de processamento, armazenamento e utilização (SHERWIN, 1990). De acordo com STUCKEY (1968), a deterioração de óleos e gorduras pode ser dividida em 4 tipos: oxidação, reversão e polimerização.

- ♦ *Hidrólise*: reação reversível, catalisada por ácidos, temperaturas elevadas e enzimas lipolíticas, resultando em ácidos graxos livres e glicerol;
- ♦ *Rancidez*: autooxidação de ácidos graxos insaturados, resultando em uma mistura de compostos voláteis, que conferem odores e sabores estranhos ao produto original;
- ♦ *Reversão*: degradação de aroma e sabor, usualmente associada a óleos altamente insaturados, como óleos vegetais e óleos de peixe, geralmente atribuída à oxidação de ácido graxos semelhantes ao linolênico;
- ♦ *Polimerização*: reação cruzada entre dois átomos de carbono de cadeias de ácidos graxos insaturados, ou ligação de oxigênio entre duas cadeias de ácidos graxos, nas insaturações, resultando na formação de polímeros, que podem conter estruturas cíclicas.

A oxidação é uma das maiores causas da deterioração de alimentos, sendo responsável por alterações de odor, sabor, textura, consistência e aparência,

assim como perda de valor nutricional, devido à destruição de ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis. Por isso, intervenções são necessárias, a fim de minimizar estas alterações indesejáveis (SIMS & FIORITI, 1990; BUCK, 1991; CHARTERIS, 1995).

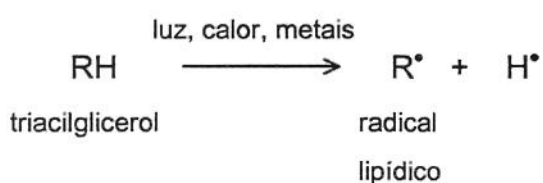
Várias tentativas têm sido feitas pelas indústrias de alimentos no sentido de prevenir ou retardar a oxidação, incluindo a utilização de embalagens à vácuo ou com atmosferas modificadas, melhores condições de processamento e embalagens, refrigeração, etc. Entretanto, estas medidas são insuficientes, além de limitadas a certos tipos de alimentos (LAURIDSEN & SCHULTZ, 1993; BECKER, 1993; GIESE, 1996). A adição de agentes antioxidantes, por outro lado, é um meio eficiente e geralmente mais econômico de se retardar o processo oxidativo, prolongando a vida útil de diversos tipos de alimentos e apresentando menor efeito na estrutura do alimento que os métodos físicos e podendo ainda ser utilizada em conjunto com estes (COPPEN, 1994). Segundo DURÁN e PADILLA (1993), a adição de antioxidantes aumenta a vida útil de muitos produtos alimentícios em 15 a 200%.

A oxidação de óleos e gorduras ocorre devido às insaturações presentes nos triglicerídeos, que são seus blocos construtores, constituindo uma reação em cadeia autocatalizada, que pode ser dividida em três diferentes etapas: iniciação, propagação e terminação. Os produtos da oxidação, uma vez formados, catalizam a reação, de maneira que a taxa de ocorrência aumenta com o tempo (DZIEZAK, 1986). Autooxidação é o termo geralmente utilizado para descrever a reação oxidativa espontânea que ocorre entre o oxigênio e as moléculas de lipídios, em condições ambiente ou próximo destas, resultando na deterioração de alimentos (SIMS & FIORITI, 1990; JADHAV et al, 1997).

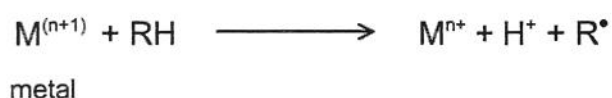
De acordo com GRIFFITHS & McDONALD (1985) e BUCK (1991), os principais fatores que afetam a taxa de oxidação de lipídios são: composição do óleo ou gordura, presença de luz, aumento de temperatura, presença de metais

pró-oxidantes, como ferro e cobre, condições alcalinas, presença de pigmentos ou substâncias fotossensibilizadoras, como a clorofila em óleos vegetais, e disponibilidade de oxigênio. Além destes fatores, é importante citar: atividade de água, área superficial e estado físico do lipídio envolvido.

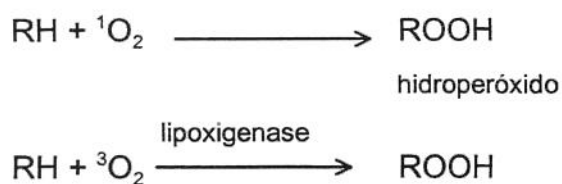
A oxidação de lipídios constitui um mecanismo em cadeia de radicais livres. A primeira etapa, ou iniciação, consiste na formação de radicais livres, resultantes da abstração de átomos de hidrogênio dos carbonos adjacentes às ligações insaturadas dos ácidos graxos presentes na molécula de triacilglicerol (SHERWIN, 1978; GIESE, 1996):



Existem dois processos mais prováveis a serem considerados na formação de radicais livres. O primeiro deles envolve a reação direta entre um metal catalista e uma molécula de lipídio (GORDON, 1997):



O segundo processo consiste na reação de uma molécula de lipídio com uma molécula de oxigênio em seu estado excitado (singlete), sendo o local de ataque a dupla ligação, ou numa reação catalizada pela enzima lipoxigenase (GORDON, 1997):



A conversão do oxigênio do estado triplete ao estado singlete pode ocorrer de várias formas, sendo a mais importante a que ocorre através da fotossensibilização de pigmentos naturais presentes em alimentos, como clorofila a, feofitina a, mioglobina, hematóporfirina, flavina e riboflavina, além do corante sintético eritrosina, que também pode atuar como um fotossensibilizador ativo (SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992).

Os radicais lipídicos livres resultantes da primeira etapa do mecanismo reagem com oxigênio, formando radicais peróxi livres, que atuam como potentes iniciadores ou catalistas de reações de oxidação posteriores, envolvendo a extração de um átomo de hidrogênio de uma outra molécula de triacilglicerol, disparando assim a etapa de propagação da reação em cadeia. Nesta etapa, os radicais peróxi removem átomos de hidrogênio das moléculas do lipídio, dando origem aos hidroperóxidos, que são relativamente estáveis, e a novos radicais lipídicos, instáveis, que irão então reagir com oxigênio, formando novos radicais peróxi reativos (GANDARA & GANDARA, 1994; GIESE, 1996):



A reação entre radicais peróxi e moléculas de lipídio, originando hidroperóxidos e novos radicais lipídicos, quando repetida várias vezes, produz um acúmulo de hidroperóxidos. A reação de propagação torna-se um processo contínuo, prolongando-se até que existam moléculas de lipídios insaturados ou de ácidos graxos disponíveis (JADHAV et al, 1997).

Quando ocorre uma redução da quantidade de lipídios insaturados ou ácido graxos presentes, os radicais se ligam uns aos outros, formando compostos estáveis (não-radicais); desta forma, as reações de terminação levam à

interrupção da sequência repetitiva que ocorre na etapa de propagação da reação em cadeia (GANDARA & GANDARA, 1994; MADHAVI & SALUNKHE, 1997; JADHAV et al, 1997):



Os hidroperóxidos, produtos primários da autooxidação, não possuem odor ou sabor (LÖLIGER, 1991; MADHAVI & SALUNKHE, 1997). Na última etapa do mecanismo de autooxidação, a terminação, os hidroperóxidos são decompostos em compostos orgânicos de cadeias menores, como aldeídos, cetonas, álcoois e ácidos, que resultam na liberação de odor e sabor característicos de óleos e gorduras rancificados (SHERWIN, 1978; GIESE, 1996). Podem ocorrer, também, reações de dimerização e polimerização, resultando em compostos amarelos de alto peso molecular, aumento do pH, da viscosidade e do índice de refração (NAWAR, 1996).

A terminação pode ser antecipada pela presença de antioxidantes naturais ou sintéticos, que inibem ou interferem na formação de radicais livres, graças à sua estrutura fenólica, atuando através da doação de um átomo de hidrogênio ao radical lipídico livre, recuperando a molécula de lipídio original, ou a um radical peróxi livre, formando um hidroperóxido e um radical de antioxidante estável (DOUGHERTY, 1993; DORKO, 1994). Antioxidantes podem ser componentes naturalmente presentes nos alimentos, substâncias intencionalmente adicionadas aos mesmos ou ainda serem resultantes de etapas anteriores do seu processamento (COPPENS, 1985).

1.2. Antioxidantes

1.2.1. Aspectos gerais e modo de ação

Antioxidantes são definidos como substâncias que retardam o aparecimento de alteração oxidativa no alimento (Brasil, Portaria nº 540, de 27/10/97).

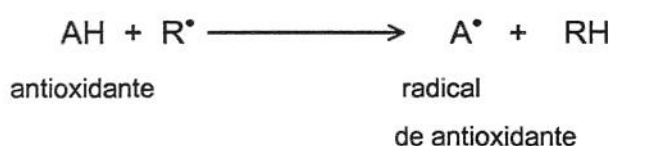
Antioxidantes são efetivos nas reações de oxidação e polimerização, mas não afetam a hidrólise e a reversão (STUCKEY, 1968). Para que sejam efetivos, devem ser adicionados tão cedo quanto possível durante o processamento do alimento ou ao produto final, já que não possuem a capacidade de reverter a oxidação de óleos ou gorduras já rancificados, nem de compensar a utilização de ingredientes de baixa qualidade (SHERWIN, 1978; COPPENS, 1985; GIESE, 1996).

Segundo MADHAVI & SALUNKHE (1997), os antioxidantes são classificados, com base em sua forma de atuação, em primários (ou bloqueadores de cadeia), sinergistas e secundários. Antioxidantes primários interrompem a reação em cadeia de radicais livres, atuando como doadores de hidrogênio ou de elétrons aos radicais livres, resultando na formação de produtos mais estáveis; pertencem a este grupo os antioxidantes fenólicos, como butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), *terc*-butil hidroquinona (TBHQ), tocoferóis, galatos, ácido nordihidroguaiarético (NDGA) e 2,6-di-*terc*-butil-4-hidroximetilfenol (Ionox-100).

Os compostos sinergistas são amplamente classificados como quelantes (Ex.: EDTA, ácidos cítrico e tartárico, polifosfatos e lecitina) e sequestrantes de oxigênio (Ex.: ácidos ascórbico e eritórbito, sulfitos e ascorbil palmitato), sendo que os primeiros formam complexos com metais pró-oxidantes, como ferro e cobre, aumentando consideravelmente a energia de ativação das reações de

iniciação, e os segundos reagem com oxigênio livre, removendo-o do sistema. Antioxidantes secundários (Ex.: ácido tiodipropiônico, dilauril e diestearil ésteres) funcionam através da decomposição de peróxidos a produtos finais mais estáveis (MADHAVI & SALUNKHE, 1997).

Antioxidantes primários podem tanto retardar ou inibir a etapa de iniciação, reagindo com um radical lipídico livre, como inibir a etapa de propagação, reagindo com radicais peróxi ou alcóxi (MADHAVI & SALUNKHE, 1997; RAJALAKSHMI & NARASIMHAN, 1997):



O radical de antioxidante livre formado pode posteriormente interferir nas reações de propagação da cadeia de oxidação, formando peróxidos (RAJALAKSHMI & NARASIMHAN, 1997):



Uma molécula funciona como antioxidante primário quando possui a capacidade de doar rapidamente um átomo de hidrogênio a um radical lipídico, e quando resulta em um radical mais estável que o radical lipídico ou é convertida a produtos mais estáveis; o fenol, por si só, é inativo como antioxidante, mas a substituição por grupos alquílicos nas posições 2,4 ou 6 aumenta a densidade

eletrônica do grupo hidroxílico, potencializando, desta forma, sua reatividade com os radicais lipídicos (SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992; GORDON, 1997).

De acordo com DZIEZAK (1986), nenhum antioxidante funciona de maneira efetiva para todos os tipos de alimentos. A seleção do antioxidante apropriado é determinada pela sua compatibilidade com um determinado óleo ou gordura e sua efetividade no alimento em questão. Segundo GRIFFITHS & McDONALD (1985) e COPPEN (1994), um antioxidante ideal deve preencher os seguintes requisitos:

- ◆ Apresentar segurança de uso, ou seja, sua utilização não deve apresentar riscos à saúde humana.
- ◆ Obedecer a todos os requerimentos legais do país no qual o alimento que o contém será consumido.
- ◆ Ser completamente solúvel e de fácil incorporação no produto onde será adicionado.
- ◆ Não causar alterações de cor, sabor ou odor no alimento onde será adicionado.
- ◆ Ser efetivo a baixas concentrações.
- ◆ Permanecer efetivo no alimento, mesmo após processos como assamento e fritura.
- ◆ Apresentar disponibilidade e viabilidade econômica

Além disto, segundo MADHAVI & SALUNKHE (1997) e RAJALAKSHMI & NARASIMHAN (1997), um antioxidante deve manter sua efetividade por pelo menos 1 ano a 25-30°C.

Antioxidantes podem ser encontrados na forma sólida ou como formulações líquidas; estas últimas podem conter um ou mais antioxidantes, um sinergista ácido, propilenoglicol, óleo vegetal, monoglicerídeos e/ou álcool etílico.

Antioxidantes podem ser incorporados aos alimentos pela adição direta a óleos ou gorduras, através da adição a aromatizantes ou especiarias presentes na formulação do alimento, por aspersão ou através dos materiais de embalagem (DORKO, 1994).

Segundo SHERWIN (1978), as principais dificuldades encontradas no uso de antioxidantes estão relacionados a técnicas de utilização impróprias, como por exemplo:

- ◆ Dispersão incompleta do antioxidante no óleo ou gordura
- ◆ Concentração inadequada de antioxidante
- ◆ Incompatibilidade de certas formulações de antioxidantes com determinados óleos e gorduras
- ◆ Ocorrência de alterações (separação, cristalização, etc.) na formulação de antioxidante utilizada
- ◆ Tipo incorreto de antioxidante
- ◆ Adição do antioxidante na etapa incorreta do processo

O uso de antioxidantes em alimentos é governado por leis específicas de cada país ou por padrões internacionais. Encontram-se na Tabela 1 os alimentos onde é permitido o uso dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ, com os respectivos códigos de rotulagem e limites máximos de adição, de acordo com a legislação vigente no Brasil até o final de 1998 (Resolução Nº 04/88 - CNS/MS, de 24 de Novembro de 1988).

1.2.2. Características e propriedades físico-químicas

A maioria das substâncias que possuem atividade antioxidante, tanto naturais quanto sintéticas, são compostos fenólicos, apresentando em sua

estrutura química um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila que provêm

Tabela 1 - Utilização dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ em alimentos

Antioxidante	Código de rotulagem	Alimentos em que podem ser adicionados	Limite máximo (g/100 g - g/100 mL)
BHA	A.V	alimentos processados a base de cereais	0,02 (sobre o teor de óleo)
		coco ralado	0,01 (sobre o teor de gordura)
		creme vegetal	0,02
		gomas de mascar	0,01 (sobre o peso da base gomosa)
		leite de coco	0,01
		margarinas	0,02
		óleos e gorduras	0,02
		produtos de cacau	0,02
		produtos desidratados de batata	50 mg/kg*
BHT	A.VI	alimentos processados a base de cereais	0,01 (sobre o teor de óleo)
		coco ralado	0,01 (sobre o teor de gordura)
		creme vegetal	0,02
		gomas de mascar	0,05 (sobre o peso da base gomosa)
		leite de coco	0,01
		margarinas	0,02
		óleos e gorduras	0,01
		produtos de cacau	0,02
		produtos desidratados de batata	50 mg/kg*
TBHQ	A.XIX	alimentos processados a base de cereais	0,02 (sobre o teor de óleo)
		farinhas, extratos e flocos derivados da soja integral	0,02 (sobre o teor de óleos e gorduras originais do produto)
		gomas de mascar	0,02 (sobre o peso da base gomosa)
		óleos e gorduras	0,02

* ou limite máximo de 50 mg/kg para somatória de BHA + BHT

Fonte: Resolução Nº 04/88 - CNS/MS, de 24 de Novembro de 1988

elétrons ou átomos de hidrogênio para a reação com radicais livres. A diferença entre estas substâncias como antioxidantes se deve fundamentalmente à sua estrutura química e às suas propriedades físicas, como volatilidade, solubilidade e estabilidade térmica (GANDARA & GANDARA, 1994).

O uso de antioxidantes fenólicos em alimentos teve início nos anos 40, quando foi observada a efetividade do BHA como antioxidante em alimentos gordurosos, e comprovada, através de estudos toxicológicos, a sua segurança para uso em alimentos. Pouco tempo depois, vários ésteres alquílicos do ácido gálico, incluindo o n-propil, foram investigados e aprovados como antioxidantes para uso em alimentos em diversos países. Em pouco tempo, tornou-se evidente a possibilidade da utilização combinada do BHA e galato de propila (PG) em óleos e gorduras, devido ao seu efeito sinérgico. Até 1954, várias combinações de BHA, PG e ácido cítrico preencheram a maioria das necessidades de uso de antioxidantes, quando então o BHT foi aprovado nos Estados Unidos e passou a ser amplamente utilizado, além dos antioxidantes já disponíveis (SHERWIN, 1990).

O antioxidante sintético mais recentemente desenvolvido para aplicação em óleos e gorduras foi o TBHQ, introduzido nos Estados Unidos em 1972, especialmente para a estabilização de óleos altamente insaturados, como soja, girassol, óleos de peixe e outros (SHERWIN, 1990; LAVERS, 1991). Nos anos 80, antioxidantes naturais, principalmente os tocoferóis, ganharam popularidade, como uma opção para a conservação de alimentos (BECKER, 1993).

Dentre as inúmeras substâncias naturais e sintéticas já investigadas quanto ao seu potencial antioxidante em alimentos, apenas algumas delas tiveram seu uso aprovado e poucas apresentam uso significativo. Quatro são as substâncias que preenchem a maioria das necessidades em óleos, gorduras e alimentos gordurosos: BHA, BHT, TBHQ e PG (SHERWIN, 1990 e DORKO, 1994).

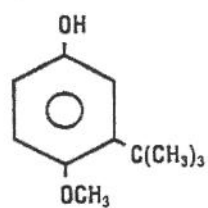
São descritas, a seguir, as principais características, propriedades e a forma de obtenção dos antioxidantes fenólicos BHA, BHT e TBHQ, cujas estruturas químicas e propriedades físico-químicas encontram-se, respectivamente, na Figura 1 e na Tabela 2.

Butil hidroxianisol (BHA):

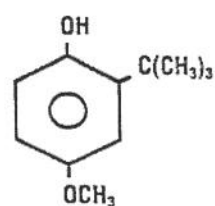
Butil hidroxianisol (BHA; *terc*-butil-4-hidroxianisol) é um dos antioxidantes mais extensivamente utilizados em alimentos. É obtido através da alquilação do *p*-metoxifenol com isobutileno ou álcool *terc*-butilico, catalizada por ácido fosfórico. Quimicamente, constitui uma mistura de dois isômeros, 2-*terc*-butil-4-hidroxianisol (2-BHA) e 3-*terc*-butil-4-hidroxianisol (3-BHA), comercialmente encontrados numa proporção de 90% 3-BHA, que possui maior potencial antioxidante, e 10% 2-BHA (BUCK, 1991; MADHAVI et al, 1997).

O BHA é um sólido branco ceroso de baixo ponto de fusão, geralmente encontrado na forma de tabletes, o que minimiza sua aglomeração durante a estocagem. É solúvel em glicerídios e em solventes orgânicos e insolúvel em água; apresenta um odor fenólico distinto que, embora não seja aparente na maioria dos casos, pode tornar-se perceptível a altas temperaturas, como no caso de produtos fritos e forneados. O BHA pode reagir com metais alcalinos, dando origem a uma coloração rosa, como é o caso de gorduras animais, onde a soda utilizada no refino não é completamente removida pela lavagem (SHERWIN, 1990).

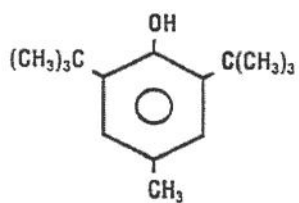
BHA é efetivo em gorduras animais e relativamente ineficiente em óleos vegetais insaturados. Apresenta boa resistência a processos de forneamento e fritura, podendo assim atuar no produto final. É volátil e destilável sob vapor, o que o torna adequado para a adição a materiais de embalagem (BUCK, 1991).



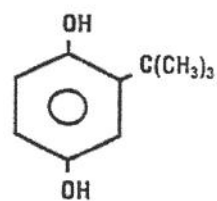
2-butil hidroxianisol



3-butil hidroxianisol



butil hidroxitolueno



terc-butil hidroquinona

Figura 1 - Estrutura química dos antioxidantes fenólicos BHA, BHT e TBHQ.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ

Propriedade	BHA	BHT	TBHQ
Peso molecular	180,25	220,00	166,22
Aparência física	tabletes ou flocos brancos cerosos	cristal granular branco	cristais brancos ou beges
Ponto/ faixa de ebulição (°C)	264-270 (733 mm Hg)	265 (760 mm Hg)	300 (760 mm Hg)
Ponto/ faixa de fusão (°C)	48,0-63,0	69,7	126,5-128,5
Odor	fraco	muito fraco	muito fraco
Solubilidade em água	0 (0-50°C)	0 (0-60°C)	< 1 (25°C) 5 (95°C)
Solubilidade em glicerol (25°C)	1	0	n.e.
Solubilidade em etanol (25°C)	> 50	25	60
Solubilidade em óleo de soja (25°C)	50	30	10
Solubilidade em óleo de milho (25°C)	40	30	10

n.e.: não especificado

Fonte: BUCK, 1991

O BHA é particularmente efetivo na estabilização de ácidos graxos de cadeias curtas, como os que estão presentes em óleo de côco e de palma, geralmente utilizados em produtos à base de cereais e produtos de confeitaria (DZIEZAK, 1986). Pode ser também utilizado em gorduras animais, produtos à base de batata, aromas, bases para gomas de mascar, óleos essenciais, produtos cárneos embutidos, emulsões, confeitos, *snacks*, produtos forneados, vitaminas e cosméticos (COULTER, 1988). Funciona sinergisticamente com outros antioxidantes primários e sinergistas, como os galatos, tocoferóis, BHT, TBHQ, ácido tiodipropiônico, ácido cítrico e ácido fosfórico (MADHAVI et al, 1997).

Butil hidroxitolueno (BHT):

Butil hidroxitolueno (BHT; 2,6-di-*terc*-butil-*p*-cresol ou 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) é similar ao BHA em muitas de suas propriedades. É obtido através da reação entre *p*-cresol anidro puro com isobutano, catalizada por ácido sulfúrico concentrado, ou por condensação de 2,6-di-*terc*-butilfenol com formaldeído. Apresenta-se como um sólido branco cristalino, com um odor fenólico fraco; é mais volátil sob vapor que o BHA e apresenta menor resistência a processos de assamento e fritura. Na presença de íons ferro, encontrados em alguns alimentos ou materiais de embalagem, o BHT pode dar origem a uma coloração amarela, devido à formação de estilbenequinona (SHERWIN, 1990; MADHAVI et al, 1997).

O BHT é utilizado em aplicações similares às do BHA, sendo também mais efetivo em gorduras animais que em óleos vegetais (SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992; MADHAVI et al, 1997). O BHT é também utilizado em produtos com baixo teor de gordura, produtos de peixe, materiais de embalagem, parafina e óleos minerais (MADHAVI & SALUNKHE, 1997), apresentando um custo relativamente baixo (BUCK, 1991). Atua sinergisticamente com BHA, TBHQ e agentes quelantes, como ácido cítrico, mas não apresenta sinergismo com galatos (MADHAVI et al, 1997). Ao contrário do BHA, o BHT é insolúvel em

propilenoglicol, o que acarreta alguns problemas na introdução de formulações contendo BHT e ácido cítrico (COPPEN, 1994).

terc-Butil hidroquinona (TBHQ):

terc-Butil hidroquinona (TBHQ; 2-(1,1-dimetiletil)-1,4-benzenediol) é encontrada na forma de um sólido cristalino de coloração branca a bege (COULTER, 1988). TBHQ pode ser obtida pela reação entre hidroquinona e álcool *terc*-butilico ou hidroquinona e isobutileno, ambas na presença de ácido fosfórico. É bastante efetiva na estabilização de óleos e gorduras, especialmente óleos vegetais polinsaturados; é estável a altas temperaturas e menos volátil sob vapor que o BHA e o BHT (MADHAVI et al, 1997). Não forma complexos com ferro ou cobre, como o PG, portanto não apresenta problemas de descoloração nos produtos onde é adicionado (SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992). Existem indicações de que a TBHQ pode interagir com aminas livres, dando origem a uma coloração vermelha, o que pode limitar seu uso em alimentos proteicos (SHERWIN, 1990).

TBHQ apresenta excelente resistência a processos de fritura, mas baixa resistência a processos de forneamento (BUCK, 1991); é geralmente referido como o melhor antioxidante para a proteção de óleos para fritura (DZIEZAK, 1986). Sua atividade antioxidante é equivalente ou superior à do BHA, BHT ou PG, apresentando características de solubilidade similares às do BHA e superiores às do BHT e do PG. Atua sinergisticamente com outros agentes antioxidantes e quelantes, como PG, BHT, BHA, tocoferóis, palmitato de ascorbila, ácido cítrico e EDTA. Sua mais interessante propriedade é provavelmente sua efetividade em vários óleos e gorduras nos quais outros antioxidantes fenólicos são relativamente ineficazes, como por exemplo os óleos de soja e algodão (MADHAVI et al, 1997). A adição de agentes quelantes, como ácido cítrico e citrato de monoglicerídio, realçam ainda mais as propriedades antioxidantes da TBHQ (SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992).

1.2.3. Métodos analíticos

A grande preocupação em relação ao uso de antioxidantes e outros aditivos está relacionada aos possíveis efeitos tóxicos associados a estes compostos. Desta forma, a determinação analítica das quantidades de antioxidantes presentes nos alimentos industrializados é fundamental para garantir que os limites estabelecidos pela legislação estejam sendo obedecidos e, ao mesmo tempo, verificar se estas quantidades são suficientes para evitar a oxidação e as alterações de qualidade associadas à sua ocorrência (MINIM & CECCHI, 1996).

Os métodos de detecção e quantificação de antioxidantes sintéticos em alimentos foram extensivamente revisados por STUCKEY & OSBORNE (1965), ENDEAN (1976), FORN (1981), ROBARDS & DILLI (1987), KOCHAR & ROSSEL (1997) e RAJALAKSHMI & NARASIMHAN (1997). Tais métodos compreendem desde a detecção qualitativa, através de reações colorimétricas, até métodos semiquantitativos e quantitativos, como espectrofotometria, voltametria, polarografia e métodos cromatográficos (cromatografia em papel - CP, em camada delgada - CCD, de permeação em, gel-CPG, gasosa - CG, gás-líquido - CGL e líquida de alta eficiência - CLAE) (RAJALAKSHMI & NARASIMHAN, 1997). Geralmente, antes da análise qualitativa ou quantitativa dos antioxidantes, é necessária a sua extração da matriz.

1.2.3.1. Extração

A extração satisfatória de antioxidantes presentes em alimentos, os quais são geralmente matrizes de natureza complexa, não é uma tarefa simples, principalmente quando estão presentes em baixas quantidades (STUCKEY & OSBORNE, 1965). Os problemas encontrados estão geralmente associados à extração incompleta dos antioxidantes ou à co-extração de substâncias interferentes. Em determinações quantitativas, cuidados devem ser tomados

durante etapas de concentração sob vácuo, a fim de prevenir perdas de antioxidantes como BHA, BHT e TBHQ, por evaporação. O uso de solventes puros para a extração é também fundamental (SAAG, 1982; ROBARDS & DILLI, 1987).

As técnicas de extração de antioxidantes a partir de matrizes alimentícias incluem: destilação por vapor, destilação por solventes, extração por solventes e sublimação a vácuo. A técnica utilizada depende da natureza do alimento e dos antioxidantes presentes (KOCHHAR & ROSSEL, 1997). Um procedimento satisfatório para a extração de antioxidantes deve ser aplicável a uma ampla faixa de concentração, desde níveis traço até os níveis normais de utilização (ROBARDS & DILLI, 1987).

STUCKEY & OSBORNE (1965) sugeriram dois procedimentos para a extração de antioxidantes, de acordo com o teor de gordura da matriz. No caso de alimentos com alto teor de gordura, a primeira etapa consiste em uma extração em Soxhlet com éter de petróleo ou solventes similares, onde a porção gordurosa é extraída e as proteínas de alto peso molecular e os fosfolípidios ficam retidos no extrator. O material extraído pode então ser analisado diretamente ou ser submetido a posterior separação entre os antioxidantes e a gordura. Gorduras puras e alimentos com baixo teor de gordura dispensam esta etapa inicial, podendo ser submetidos diretamente à extração dos antioxidantes da matriz, por destilação ou por solvente, e posteriormente à análise do extrato.

Nos anos 60, a destilação por vapor era a técnica de extração mais utilizada, sendo os antioxidantes vaporizados a partir de uma mistura de água e gordura e transportados por uma corrente de vapor até um condensador de água fria. A adição de determinados sais ao frasco de destilação aumenta a temperatura do vapor e previne a formação de acroleína, que interfere nas análises posteriores (STUCKEY, 1968).

Segundo ROBARDS & DILLI (1987), as técnicas de destilação por vapor e destilação a vácuo apresentam valor limitado, embora tenham sido utilizadas por alguns autores (ANGLIN et al, 1956; FILIPIC & OGG, 1960; SZALKOWSKI & GARBER, 1962). A destilação por vapor apresenta como principais desvantagens o tempo requerido para a extração e o volume de destilado necessário para obter recuperações quantitativas.

A extração por solventes tem sido amplamente utilizada, com ou sem a inclusão de etapas posteriores de limpeza do extrato. Técnicas de partição líquido-líquido e passagem dos extratos através de colunas de limpeza podem ser utilizadas para a remoção de substâncias co-extraídas com os antioxidantes (KOCHHAR & ROSSEL, 1997).

Os solventes normalmente utilizados para a extração de antioxidantes são: acetonitrila, éter de petróleo, dimetilsulfóxido, hexano, álcoois e soluções aquosas de álcoois (ROBARDS & DILLI, 1987). A porção gordurosa é geralmente dissolvida em hexano ou éter de petróleo e os antioxidantes são extraídos pelo solvente polar. As desvantagens da extração com ACN são a baixa recuperação do BHT e os níveis relativamente altos de compostos interferentes co-extraídos. A vantagem da extração com metanol ou soluções aquosas de metanol é a eficiência na eliminação da fase gordurosa, o que evita a turbidez (ENDEAN, 1976; SAAG, 1982). Por outro lado, uma desvantagem da extração com soluções alcoólicas é que a etapa de concentração por evaporação, normalmente necessária quando se detectam baixos níveis de antioxidantes, geralmente acarreta perdas de BHA e BHT por volatilização (ENDEAN, 1976).

A extração com acetonitrila foi utilizada por diversos pesquisadores, entre eles: SENTEN et al (1977), AUSTIN & WYATT (1980), WYATT (1981), PAGE & CHARBONNEAU (1989) e YAMADA (1990). O metanol, por sua vez, foi o solvente utilizado por HAMMOND (1978), ARCHER (1981) e GARCÍA & CAMINO (1983), e o dimetilsulfóxido por YU et al (1984), entre outros.

Outros solventes citados na literatura incluem acetonitrila saturada com pentano (KANEMATSU et al, 1973), misturas de éter de petróleo e metanol a 50 e 80% (KING et al, 1980), sistemas acetonitrila/ 2-propanol/ etanol/ ácido oxálico 0,2% (GERTZ & HERRMANN, 1983), etil acetato (KITADA et al, 1984), acetonitrila/2-propanol/etanol, a 2:1:1 (YAMADA et al, 1993), entre outros. O método oficial da AOAC (Seção 983.15, 1990) para determinação de antioxidantes fenólicos em óleos e gorduras recomenda a dissolução da amostra em hexano, seguida pela extração dos antioxidantes com acetonitrila.

1.2.3.2. Determinação

Métodos Colorimétricos e Espectrofotométricos:

Os métodos colorimétricos e espectrofotométricos eram, no passado, os mais amplamente utilizados para a determinação quantitativa de antioxidantes sintéticos (STUCKEY & OSBORNE, 1965 e STUCKEY, 1968). Devido às suas várias limitações, como o tempo de análise, a não separação de compostos interferentes e, muitas vezes, os altos limites de detecção obtidos e a impossibilidade de determinações simultâneas de antioxidantes, estes métodos foram substituídos, ao longo dos anos, por técnicas cromatográficas, como a cromatografia gás-líquido e a cromatografia líquida de alta eficiência, que são atualmente os mais utilizados (KOCHHAR & ROSSEL, 1997).

As moléculas dos antioxidantes fenólicos absorvem fortemente na região ultra-violeta (UV) e infra-vermelha (IV), podendo também ser convertidas em complexos coloridos, que absorvem fortemente na região visível. Técnicas de absorção em UV e IV são úteis para a identificação de antioxidantes fenólicos ou para a sua quantificação, quando presentes em concentrações relativamente altas, sendo insatisfatórias para a quantificação das baixas concentrações normalmente encontradas em extratos de diversos alimentos (STUCKEY, 1968).

Nas técnicas colorimétricas, um volume conhecido do extrato que contém o antioxidante é tratado com um reagente específico para o desenvolvimento de cor, produzindo absorção máxima na região visível do espectro de absorção. A tonalidade e a intensidade de cor oferecem um indicativo do tipo e da quantidade de antioxidante presente. Compostos fenólicos naturalmente presentes no alimento também apresentam tais reações de cor, o que dificulta a obtenção de resultados acurados quando a concentração de antioxidantes é relativamente baixa (STUCKEY, 1968).

Os reagentes mais utilizados na determinação colorimétrica do BHA são o 2,6-dicloroquinona clorimida (Reagente de Gibbs) e o ácido sulfanílico diazotizado (Reagente de Ehrlich) (STUCKEY & OSBORNE, 1965; ENDEAN, 1976 e ROBARDS & DILLI, 1987). No primeiro caso, o tratamento do extrato contendo o BHA com o reagente resulta em um composto azul, que é quantificado por absorção a 620 nm (STUCKEY & OSBORNE, 1965). O Reagente de Gibbs tem a propriedade de se ligar a substâncias fenólicas nas posições *orto* e *para* e, conseqüentemente, não reage com BHT.

O Reagente de Gibbs foi utilizado por MAHON & CHAPMAN (1951), ANGLIN et al (1956), FILIPIC & OGG (1960), ACZEL et al (1972), SATO & KAWAMURA (1972) e KOBAYASHI et al (1986a; 1986b). A reação com ácido sulfanílico diazotizado, por sua vez, foi utilizada por LAZLO & DUGAN (1961), ARMANDOLA (1971) e FORN & SABATER (1984).

Outras reações colorimétricas para determinação de BHA são a nitroação, que envolve uma reação com nitrito de sódio em presença de ácido hidrolórico (ENDEAN, 1976), a reação com diazo-4-metoxi-2-nitroanilina em presença de dietilamina (AMATO, 1968) e a reação com 1,1'-difetil-beta-picril-hidrazil (DPPH), também utilizada para a determinação de BHT e PG (SPYCHALA & KRZYWICKI, 1972).

A determinação colorimétrica de BHT envolve principalmente dois reagentes, o cloreto férrico-2,2' bipyridina e a 3,3'-dimetoxibenzidina (dianisidina). No primeiro caso, o extrato obtido da amostra é tratado com cloreto férrico - 2,2'-bipyridina, e a absorbância é determinada a 515 nm. A coloração vermelha obtida resulta da redução do reagente pelo antioxidante, com a formação de um complexo ferro-bipyridina (STUCKEY & OSBORNE, 1965; ENDEAN, 1976 e ROBARDS & DILLI, 1987).

Esta reação, também denominada Método de Emmerie e Engel, foi utilizada por ANGLIN et al (1956), FILIPIC & OGG (1960) e por SATO & KAWAMURA (1972), para determinação de BHA e BHT em alimentos gordurosos. A reação de BHT com dianisidina e ácido nitroso, que resulta em uma coloração rosa, foi utilizada por (SZALKOWSKI & GARBER, 1962) e por (KOBAYASHI et al, 1986b), sendo a absorbância medida a 520 nm.

Todos os antioxidantes para uso em alimentos absorvem na região UV, entre 240 e 300 nm, apresentando espectros característicos (ENDEAN, 1976). Quando utilizados para fins quantitativos, os métodos espectrofotométricos na região UV são normalmente associados a procedimentos cromatográficos ou a outros métodos seletivos de extração, evitando a interferência de outros compostos que possam absorver na mesma região (ENDEAN, 1976; ROBARDS & DILLI, 1987).

Procedimentos espectrofotométricos na região UV foram utilizados por vários autores, em trabalhos mais antigos, para a quantificação de antioxidantes em matrizes gordurosas: WHETSEL et al (1955), PHILLIPS & HINKEL (1957), HANSEN et al (1959), KOMAITIS & KAPEL (1959), ALICINO et al (1963), ACZEI et al (1972), SELMECI & ACZEL (1975), CAMURATI & RIZZOLO (1979). A metodologia utilizada na maioria destes trabalhos envolve etapas prévias de extração e separação dos antioxidantes das matrizes, alguns deles incluindo colunas cromatográficas ou placas de sílica.

Um outro método espectrofotométrico para a determinação de alguns antioxidantes foi desenvolvido por PRASAD et al (1985), utilizando permanganato de potássio e metol (*p*-N-metil aminofenol), onde este último é oxidado pelo permanganato de potássio, acoplando-se aos antioxidantes e resultando em uma absorção máxima a 560 nm para PG, 550 nm para ácido gálico e 510 nm para BHA.

PRASAD et al (1987) utilizaram 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona hidrocloreto (MBTH) e sulfato de amônio cérico para a determinação de TBHQ, BHA e ácido gálico, onde o MBTH é oxidado e seus produtos de ressonância ligam-se aos antioxidantes, resultando em espécies coloridas que obedecem a Lei de Beer, com absorção máxima a 500 nm para o TBHQ, 480 nm para o BHA e 440 nm para o ácido gálico. O método, aplicável a óleos e gorduras, foi, segundo os autores, o primeiro procedimento espectrofotométrico proposto para a quantificação de TBHQ.

Mais recentemente, dois métodos espectrofotométricos foram desenvolvidos por SASTRY et al (1992, 1993), para a determinação de BHA e TBHQ em óleos vegetais, com base na formação de cor resultante da reação de BHA com Fe (III)-2,4,6-tripiridil-S-triazina (TPTZ) ou cloreto de trifetil tetrazólio (TTC). Além destes reagentes, os autores utilizaram o IO_4^- /Mo(VI)/ I^- /metol-sulfanilamida e, segundo eles, os três reagentes possibilitaram medidas sensíveis e acuradas.

Métodos Cromatográficos:

Técnicas cromatográficas como a cromatografia em papel (CP), a cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia por permeação em gel (CPG) foram desenvolvidas desde o início dos anos 50, para separação, detecção e quantificação de antioxidantes em alimentos, sendo os resultados quantitativos ou semi-quantitativos obtidos por densitometria ou por eluição das manchas, seguida por técnicas colorimétricas ou espectrofotométricas

(RAJALAKSHMI & NARASIMHAN, 1997). No passado, a CP e a CCD foram extensivamente utilizadas para a separação e a determinação de antioxidantes, principalmente em função da simplicidade de execução e do baixo custo associados a estas técnicas (KOCHHAR & ROSSEL, 1997).

De acordo com ROBARDS & DILLI (1987), a separação obtida por CCD é mais rápida, embora sua reprodutibilidade em termos de R_f (fator de retenção) seja pior que a obtida em separações por CP. Por outro lado, a CCD permite a utilização de reagentes mais corrosivos do que a CP. Na determinação de antioxidantes por CCD, diversas fases absorventes podem ser utilizadas, como sílica gel, alumina, celulose acetilada e poliamida (KOCHHAR & ROSSEL, 1997). Os reagentes utilizados para a detecção de antioxidantes através de técnicas colorimétricas são normalmente aplicados na forma de spray (ROBARDS & DILLI, 1987). Segundo SAHASRABUDHE (1964), a determinação quantitativa de antioxidantes por CCD depende principalmente de 3 fatores: extração efetiva dos compostos da matriz, separação adequada dos mesmos e recuperação quantitativa a partir das placas.

Um método analítico para detecção e determinação simultânea de BHA, BHT e TBHQ em óleos por CCD foi descrito por NAKAZATO et al (1980), com recuperação na faixa de 89-97% para TBHQ, 93-99% para BHA e 87-95% para BHT.

VAN PETEGHEM & DEKEYSER (1981) desenvolveram uma metodologia analítica para a identificação de BHA, BHT, galatos, ascorbil palmitato, NDGA (ácido nordihidroguaiarético), tocoferol e TBHQ por CCD, em óleos e gorduras, na qual sprays de cloreto férrico- 2,2'-bipiridina e 2,6-dibromoquinona-4-clorimida foram aplicados para o desenvolvimento de cor, com posterior determinação espectrofotométrica a 254 e 366 nm. A CCD foi também utilizada em um estudo colaborativo realizado por ALARY et al (1982), para a separação e detecção qualitativa de BHA, BHT, galatos e NDGA.

Apesar das limitações da CCD em relação a outros métodos cromatográficos, como a CGL e a CLAE, particularmente quanto aos limites de detecção, a aplicação da CCD para a identificação e determinação de antioxidantes em alimentos ainda é utilizada em alguns casos, em função de seu baixo custo. Além disto, a CCD de alta eficiência, cuja sigla em inglês é HPTLC, parece apresentar uma aplicação potencial no campo dos antioxidantes (KOCHHAR & ROSSEL, 1997).

A CPG foi utilizada por DOEDEN et al (1979), para a análise rápida de BHA, BHT e TBHQ em óleos e gorduras. O método descrito não requer o isolamento prévio dos antioxidantes da matriz e envolve detecção espectrofotométrica a 280 nm.

Desde o seu desenvolvimento, no início dos anos 50, a CG tornou-se uma das principais ferramentas para a determinação analítica de antioxidantes em alimentos, tendo como uma das principais vantagens a possibilidade de detecção de pequenas quantidades destes compostos (STUCKEY & OSBORNE, 1965). A CG é geralmente considerada mais exata, sensível e rápida para análises quantitativas do que os métodos colorimétricos e espectrofotométricos tradicionais, destacando-se pela sua habilidade em separar, identificar e determinar teores da ordem de nanogramas de misturas complexas, simultaneamente (ROBARDS & DILLI, 1987).

Vários métodos foram desenvolvidos utilizando principalmente a cromatografia gás-líquido (CGL), para a determinação quantitativa de antioxidantes em óleos e gorduras, grânulos de batata, gomas de mascar, cereais, pescados, produtos lácteos e cárneos (KOCHHAR & ROSSEL, 1997). Antioxidantes como BHA, BHT e, a uma menor extensão, TBHQ, exibem excelentes propriedades para a análise por CG, sendo facilmente volatilizados e possibilitando análises diretas, tanto em fases estacionárias polares quanto apolares. Outros antioxidantes mais polares, como PG e NDGA, exigem etapas

prévias de derivação, para conversão em compostos voláteis, visando a redução dos tempos de retenção e melhor performance cromatográfica (ENDEAN, 1976 e ROBARDS & DILLI, 1987).

Os detectores mais utilizados na determinação de antioxidantes por CGL são os de ionização de chama e, entre as colunas mais utilizadas, estão as do tipo SE-30 ou Carbowax- 20M (RAJALAKSHMI & NARASIMHAN, 1997). Análises à temperatura constante foram utilizadas por alguns pesquisadores (BUTTERY & STUCKEY, 1961; SCHWIEN et al, 1966; HARTMAN & ROSE, 1970; AUSTIN e WYATT, 1980; GARCÍA & CAMINO, 1983; MARIANI & FEDELI, 1983; STIJVE & DISERENS (1983), enquanto outros descrevem métodos envolvendo programação de temperatura (McCAULLEY et al, 1967; KANEMATSU et al, 1973; SENTEN et al, 1977; KLINE et al, 1978; WYATT, 1981; MIN e SCHWEIZER, 1982, 1983; YU et al, 1984).

Diferentes padrões internos têm sido utilizados em análises de antioxidantes por cromatografia gasosa, tais como: metil undecanoato (HARTMAN e ROSE, 1970), benzofenona (KANEMATSU et al, 1973), di-BHA (SENTEN et al, 1977), propil para-hidroxibenzeno ou propil parabeno (AUSTIN e WYATT, 1980), butil para-hidroxibenzoato (WYATT, 1981), undecanoato de metila e laurato de etila (MARIANI e FEDELI, 1983). O gás de arraste mais utilizado é o nitrogênio (BUTTERY e STUCKEY, 1961; McCAULLEY et al, 1967; KANEMATSU et al, 1973; SENTEN et al, 1977; AUSTIN e WYATT, 1980; WYATT, 1980; MIN e SCHWEIZER, 1982, 1983; MARIANI e FEDELI, 1983; STIJVE e DESIRENS, 1983; YU et al, 1984) e, com menor frequência, o hélio (HARTMAN e ROSE, 1970; KLINE et al, 1978; GARCÍA e CAMINO, 1983) e o argônio (SCHWIEN et al, 1966).

Na Tabela 3 encontra-se um resumo dos principais trabalhos relatados na literatura envolvendo a determinação de antioxidantes por CG. Outros exemplos são citados por ROBARDS & DILLI (1987) e KOCHHAR & ROSSEL (1997).

Os avanços na instrumentação da cromatografia líquida, a partir dos anos 70, tornaram possível o desenvolvimento de métodos rápidos, não-destrutivos e com separações quantitativas de vários compostos não voláteis, tendo início nesta época a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na separação de antioxidantes (ENDEAN, 1976).

Segundo INDYK & WOOLARD (1986), as vantagens da CLAE em relação a outras técnicas incluem especificidade, sensibilidade, exatidão, precisão, capacidade de determinações simultâneas, automação e eliminação de etapas tediosas de manipulação da amostra. Por outro lado, estão envolvidas desvantagens, tais como a manipulação envolvida na extração por solventes, com consequentes perdas por oxidação e possíveis diferenças de recuperação em análises multi-componentes. Além disto, os lipídios residuais co-extraídos devem ser removidos antes da injeção da amostra na coluna.

A natureza polar dos antioxidantes fenólicos é altamente adequada à cromatografia de fase reversa; em vista disto, vários procedimentos cromatográficos com fase reversa foram desenvolvidos para a análise destes compostos, a maioria utilizando detecção no UV. Separação de antioxidantes em fase normal têm sido utilizada com menor frequência, sendo restritas principalmente a análises de BHA, BHT e TBHQ (ROBARDS & DILLI, 1987). Na maioria dos trabalhos encontrados na literatura são utilizados gradientes de solventes (HAMMOND, 1978; PAGE, 1979, 1983, 1993; ARCHER, 1987, PAGE & CHARBONNEAU, 1989, ANDRIKOPOULOS et al, 1991 e outros), embora eluição isocrática tenha sido utilizada em alguns casos (BHASKAR & BELAVADI, 1980; VAN NIEKERK & DU PLESSIS, 1980; BOCCA E DELISE, 1982; INDYK & WOOLARD, 1986; ANDERSON & VAN NIEKERK, 1987; HALL III et al, 1994).

Detectores amperométricos foram utilizados por KING et al (1980) e KITADA et al (1985), para detecção de antioxidantes como BHA, BHT, TBHQ, PG, NDGA e outros. A utilização de detectores de fluorescência foi descrita por GERTZ & HERRMANN (1983) e YAMADA (1990), para os mesmos tipos de compostos. MASOUD & CHA (1982) investigaram a utilização simultânea de detectores de fluorescência, UV e eletroquímico na determinação de antioxidantes fenólicos. Mais recentemente, YANKAH et al (1998) determinaram BHA, BHT e TBHQ em óleos, alimentos gordurosos e fluidos biológicos por CLAE, com detecção fluorimétrica.

PAGE (1979) propôs um procedimento para a determinação simultânea de 9 antioxidantes fenólicos em óleos e gorduras, no qual os antioxidantes BHA, BHT, TBHQ, Ionox-100 (2,6-di-*terc*-butil-4-hidroximeetilfenol), THBP (2,4,5-trihidroxibutirofenona), PG (propil galato), OG (octil galato), DG (dodecil galato) e NDGA (ácido nordihidroguaiarético) foram extraídos com acetonitrila a partir de uma mistura amostra-hexano, concentrados e determinados por CLAE, em coluna LiChrosorb RP-18 (10 μ m, 250 x 3,2 mm). Foi utilizada eluição por gradiente, com água:ácido acético (95:5, v/v) e acetonitrila:ácido acético (95:5, v/v) e detecção a 280 nm. Este método foi utilizado, com algumas modificações, em um estudo colaborativo para determinação dos mesmos compostos, com exceção do OG e do DG (PAGE, 1983). No primeiro estudo, foram obtidas recuperações médias entre 84 e 87%, para o BHT, e entre 96 e 103%, para os demais antioxidantes; no estudo colaborativo, a recuperação média do BHT foi de 85% e a dos demais antioxidantes variou entre 93,2 e 98,3%. O método foi considerado satisfatório pelos autores e posteriormente adotado pela AOAC como metodologia oficial para a determinação de PG, THBP, NDGA, TBHQ, BHA, BHT e Ionox-100 em óleos e gorduras (AOAC, Seção 983.15, 1990).

Um outro estudo colaborativo foi realizado por PAGE (1993) para a adaptação do método descrito no trabalho anterior (PAGE, 1979) a gordura anidra de leite. Neste estudo, 10 laboratórios investigaram a determinação de PG, OG,

DG, THBP, TBHQ, NDGA, BHA, BHT e Ionox-100 em 10 amostras de gordura anidra de leite. Algumas modificações foram feitas em relação ao método anterior, como o uso de uma coluna mais eficiente (C_{18} com sílica esférica ligada), um sistema eluente não aquoso (acetonitrila:metanol, 1:1) e injeção de um menor volume de amostra (10 μ l ao invés de 20 μ l). As recuperações médias foram superiores a 93%, com exceção do BHT (79%).

Mais recentemente, McCABE & ACWORTH (1998) propuseram um método por CLAE, com detecção eletroquímica, para determinação de 9 antioxidantes fenólicos em manteiga, margarina, *shortening* e gordura animal. Neste caso, as amostras foram dissolvidas em hexano e os antioxidantes foram extraídos com acetonitrila. A coluna utilizada foi Supelcosil LC-18, 5 μ m, utilizando-se gradiente de: (a) solução de acetato de sódio 25mM e ácido cítrico-metanol (95;5, v/v) 25 mM e (b) solução de acetato de sódio 25mM e ácido cítrico-metanol-acetonitrila (20:40:40, v/v) 25 mM. Segundo os autores, as vantagens do método proposto em relação ao recomendado pela AOAC incluem menores limites de detecção, intervalo de respostas lineares mais amplo, menor consumo de solvente e menores custo e tempo por análise.

Outros exemplos da utilização da CLAE na determinação analítica de antioxidantes fenólicos são apresentados na Tabela 4.

Outros Métodos:

Além da colorimetria, espectrofotometria e cromatografia, outros métodos podem ser utilizados na determinação analítica de antioxidantes, como a polarografia e métodos eletroquímicos relacionados, complexometria, fluorimetria, espectrometria no IV, ressonância nuclear magnética (RNM), densitometria e métodos cinéticos (ROBARDS & DILLI, 1987).

As propriedades de luminescência dos antioxidantes BHA, BHT e PG foram estudadas por LATZ & HURTUBISE (1969), que descreveram um método

fluorimétrico para a determinação direta de PG em presença dos outros dois compostos em gordura animal. O clorofórmio, utilizado como solvente, tem a propriedade de extinguir a fluorescência do BHA e do BHT, ressaltando a do PG; quantidades da ordem de 0,005% deste último composto puderam ser determinadas, sem a interferência dos demais. Estes mesmos autores, em publicação posterior (HURTUBISE & LATZ, 1970), descreveram um método fluorimétrico para a determinação de BHA em gordura animal, cereais e materiais de embalagem, através do qual eliminou-se a interferência de BHT e PG.

HURTUBISE (1970, 1975) investigou as propriedades de fluorescência dos antioxidantes BHA, BHT, TBHQ e PG, entre outros. O BHA e o PG mostraram-se fortemente fluorescentes e significativamente fosforescentes; a extinção da fluorescência do BHA e do BHT por clorofórmio foi também comprovada. Em um estudo posterior (HURTUBISE, 1976), o mesmo autor descreveu as propriedades de extinção seletiva de fluorescência do BHA, BHT, PG e TBHQ em solução de etanol:clorofórmio (80:20).

FORN (1980) descreveu um método fluorimétrico e um método densitométrico para a determinação de antioxidantes sintéticos em alimentos gordurosos, após sua extração com acetonitrila ou dimetilsulfóxido e separação por cromatografia em camada delgada. O método fluorimétrico permitiu a determinação de galatos de alquila, BHA, TBHQ e etoxiquina, sendo o método densitométrico adequado à determinação destes mesmos compostos, além do BHT e palmitato de ascorbila.

A voltametria de pulso diferencial foi utilizada por BEAULIEU (1982), para a determinação de BHA ou BHT em grânulos de batata, sendo a técnica comparada com a CGL. Em matrizes semelhantes, RUIZ et al (1994) e AGUI et al (1995) determinaram respectivamente BHA e BHA/BHT, através de voltametria catalítica, utilizando eletrodos de carbono.

Tabela 3 - Utilização da cromatografia gasosa na determinação analítica de antioxidantes fenólicos

Antioxidante	Amostra	Extração	Coluna	Temperatura da coluna (°C)	Fase móvel	Referência
BHA, BHT	grânulos de batata	éter de petróleo	20% Apiezon L sobre terra diatomácea	220	N ₂	Buttery & Stuckey (1961)
BHA, BHT	óleos e gorduras	acetoneitrila/ coluna de alumina ácida	n.e.	160	Ar	Schwien et al (1966)
BHA, BHT, Ionox-100, PG, THBP, TDPA	gordura animal	sublimação a vácuo	3% GE-XE-60 sobre Gas-Chrom Q	100-250 (BHA, BHT, Ionox-100) 100-165 (PG e THBP)	N ₂	McCauley et al (1967)
				90-130 (TDPA)		
BHA, BHT	óleos vegetais	pré-coluna (alumínio ou vidro)	10% DC 200 ou Carbowax 20 M sobre Gas-Chrom Q	160	He	Hartman & Rose (1970)
BHA, BHT	óleos comestíveis	acetoneitrila	10% SE-30 sobre Aeropack 30	150-215	N ₂	Senten et al (1977)
BHA, BHT, TBHQ, Ionox-100, THBP, NDGA, TDPA	óleos, manteiga, shortening, cereais, snacks e outros	pré-colunas de lã de vidro/ metanol 70%	3% OV-17 sobre Gas- Chrom Q 3% OV-225 sobre Gas-Chrom Q	85-175 (BHA, BHT, Ionox-100, TBHQ) 100-250 (TBHQ, TDPA, PG, THBP, NDGA)	He	Kline et al (1978)
TBHQ	óleos de soja e algodão	acetoneitrila	10% Versilube F-50 sobre Gas-Chrom Q	190	N ₂	Austin & Wyatt (1980)

cont.)

Tabela 3 (cont.) - Utilização da cromatografia gasosa na determinação analítica de antioxidantes fenólicos

Antioxidante(s)	Amostra(s)	Extração	Coluna	Temperatura da coluna (°C)	Fase móvel	Referência
BHA, BHT, TBHQ, PG	óleo de algodão	acetoneitrila	10% GE-Versilube F-50 sobre Gas-Chrom Q	150-210	N ₂	Wyatt (1981)
BHA, BHT, TBHQ	óleo de soja	arraste por corrente de N ₂	10% polimetafenoxileno sobre Tenax-GC	140-250	N ₂	Min & Schweizer (1982, 1983)
BHA, BHT	óleos vegetais	metanol ou acetoneitrila	3% SP2250 sobre Supelcoport	160	He	García & Camino (1983)
BHA, BHT, Ionox-100	óleo de côco, óleo de girassol e margarinas	pré-coluna de lã de vidro	10% SE30 sobre Chromosorb W-LA	160	N ₂	Mariani & Fdéli (1983)
BHA, BHT, TBHQ	produtos lácteos	coluna de Florisil/Acetoneitrila	7% Se30 e 3% XE60 sobre Chromosorb W	135	N ₂	Stijve & Diserens (1983)
BHA, BHT, TBHQ, Ionox-100	óleos vegetais	não requerida	coluna capilar de sílica fundida coberta com 5% fenil-metilsilicone	50-280	N ₂	Yu et al (1984)

n.e.: não especificado

BHA: butil hidroxitolueno; BHT: butil hidroxianisol; TBHQ: *tert*-butil hidroquinona; PG: propil galato; NDGA: ácido nordihidroguaiarético; Ionox-100: 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroximetilfenol; THBP: 2,4,5-trihidroxibutirofenona; TDPA: 3,3'-ácido tiopropiônico

Obs.: em todos os trabalhos citados na tabela, foi utilizado detector de ionização de chama

Tabela 4 - Utilização da cromatografia líquida de alta eficiência na determinação analítica de antioxidantes fenólicos

Antioxidante(s)	Amostra(s)	Coluna	Fase móvel	Deteção	Referência
BHA, BHT, PG, OG, DG	óleos e gorduras	Sil x li Ocatadecil (500 x 2,6 mm)	etanol:água (10:0, 9:1, 8:2, 7:3)	UV (254 nm)	Constante (1975)
BHA, BHT	manteiga, extrato de carne e biscoitos	Sil x I-ODS (250 x 2,6 mm)	metanol:água (75:25, 65:35)	UV (280 nm)	Ciraolo et al (1978)
BHA, BHT, PG, OG, DG	óleos e gorduras	C ₁₈ µ-Bondapak (10µm, 300 x 4,0 mm)	ácido acético: metanol: água (gradiente)	UV (280 nm)	Hammond (1978)
TBHQ	óleos vegetais	liChrosorb SI 60 (5µm, 250 x 4,0 mm)	dioxano:n-hexano (24:76)	fluorescência ex. 309 nm em. 340 nm	Van Niekerk & Du Plessis (1980)
BHA, BHT, TBHQ, PG, OG, DG	óleos e gorduras	C ₁₈ µ-Bondapak (300 x 3,9 mm)	A: ácido acético 1% em água B: ácido acético 1% em metanol (gradiente)	UV (280 nm)	Archer (1981)
BHA, BHT	manteiga, margarina, gordura animal, óleos vegetais, batatas fritas	Hibar RP-18 (7 µm, 250 x 4,0 mm)	acetonitrila:ácido acético a 5% (85:15)	UV (280 nm)	Bocca & Delise (1982)
2-BHA, 3-BHA	óleos e gorduras	Pirkle I-A (5 µm, 250 x 4,6 mm)	n-hexano:2-propanol (gradiente)	UV (288 nm)	Ansari (1983)
TBHQ	alimentos gordurosos e peixe desidratado	LiChrosorb RP-8 (5 µm, 150 x 4,0 mm)	acetonitrila: solução de fosfato de potássio monobásico 0,01M (50:50)	UV (282 nm)	Kitada et al (1984)
BHA, PG, OG, DG, TBHQ, NDGA	óleos (soja, amendoim, girassol e outros) e gordura animal	LiChrosorb DIOL (5µm, 250 x 4,6 mm)	hexano:dioxano:acetonitrila (62:28:10)	UV (280 nm)	Anderson & Van Niekerk (1987)

(cont.)

Tabela 4 (cont.) - Utilização da cromatografia líquida de alta eficiência na determinação analítica de antioxidantes fenólicos

Antioxidante(s)	Amostra(s)	Coluna	Fase móvel	Deteção	Referência
BHA	gordura animal	LiChrosorb RP-8 (5 µm, 250 x 4,0 mm)	hexano:dioxano:isopropanol (BHA)	fluorescência (298nm; 325 nm) - BHA	Oishi et al (1990)
BHA	óleo para salada, margarina e manteiga	Shim-pack CLC-ODS (150 x 6,0 mm)	hexano (BHT)	UV (280 nm) - BHT	
PG, TBHQ, NDGA, BHA e BHT	óleos e gorduras	µ-Bondapak C ₁₈ (250 x 4,6 mm)	metanol a 75% em água	Fluorescência ex. 298 nm em. 332 nm	Yamada (1990)
BHA, TBHQ e 11 conservantes	roast-beef, molho de soja,		A: 5% ácido acético B: acetonitrila:metanol (95:5) (gradiente linear)	UV (280 nm)	Yang et al (1993)
BHA, BHT e DG	margarinas	C-18 Spherisorb ODS-2 (3 µm, 150 x 4,0 mm)	acetonitrila: ácido α-hidroxi-isobutírico 50 mM (2,2:3,4 ou 2,4:3,6)	UV (233 nm)	Chen & Fu (1995)
BHA, BHT, TBHQ	Óleos, produtos cárneos e fluidos biológicos	LiChrosorb RP-18 (5 µm, 250 x 4,0 mm)	ácido acético:água:acetonitrila (5:70:25 a 5:5:90) (gradiente)	UV (280 nm)	Irache et al (1997)
			A: água: acetonitrila: ácido acético (66,5:28,5:5) B: acetonitrila:ácido acético (95:5)	Fluorescência ex. 280 nm em. 310 nm	Yankah et al (1998)

BHA: butil hidroxianisol; BHT: butil hidroxitolueno; TBHQ: terc-butil hidroquinona; PG: propil galato; NDGA: ácido nordihidroguaiarético; Ionox-100: 3,5-di-terc-butil-4-hidroximetilfenol; THBP: 2,4,5-trihidroxibutirofenona; OG:octil galato; DG:dodecil galato, HMBP: 2,6-di-terc-butil-4-hidroximetilfenol

1.3. Ingestão de aditivos alimentares

A autorização de uso de um aditivo alimentar exige, em geral, a demonstração da necessidade tecnológica e da segurança de uso. Esta última, por sua vez, envolve a avaliação toxicológica e a estimativa da ingestão potencial da substância. Estimativas da ingestão diária esperada para o aditivo são calculadas no sentido de verificar se existe possibilidade de exposição excessiva dos consumidores à substância, sob as condições de uso propostas (BÄR & WÜRTZEN, 1990).

Para estimar a ingestão de aditivos alimentares são necessárias informações a respeito dos níveis destas substâncias presentes nos alimentos, além de dados de consumo de alimentos pela população. A obtenção destes dois tipos de informação não é uma tarefa simples, já que a determinação de pequenas quantidades de uma determinada substância em uma dieta complexa pode representar grandes dificuldades analíticas e, por outro lado, a disponibilidade de dados de consumo de alimentos é limitada, principalmente no que se refere a alimentos específicos da dieta.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO,1985), dados sobre consumo de alimentos, utilizados para a determinação da ingestão de um componente presente na dieta por uma determinada população, devem refletir os seus verdadeiros hábitos alimentares. Estes hábitos, por sua vez, variam bastante de indivíduo para indivíduo, bem como entre grupos de indivíduos, sem contar a existência de grupos específicos de consumidores, como minorias étnicas e culturais, crianças, gestantes, lactentes, diabéticos, idosos, etc. Em vista disto, ao se avaliar dados de consumo de alimentos, estas possíveis variações entre diferentes grupos da população devem ser consideradas.

1.3.1. Dados de consumo de alimentos

Em geral, dois procedimentos podem ser utilizados para a obtenção de dados de consumo de alimentos, um deles referente ao consumo de alimentos por um grupo da população e o outro compreendendo dados individuais de consumo. Os métodos que podem ser utilizados em ambos os procedimentos são apresentados na Tabela 5. A escolha do método mais adequado está relacionada a fatores como: objetivos da pesquisa, idade, escolaridade e interesse dos indivíduos ou da população, assim como custos e recursos disponíveis (WHO, 1985).

Tabela 5 - Métodos para a obtenção de dados de consumo de alimentos

Procedimento	Métodos
Individual	- Diário de alimentos e pesagem do alimento ingerido - Duplicação da porção - Lembrança da dieta - Frequência dos alimentos
População	- Diário de alimentos e pesagem do alimento ingerido - Lembrança da dieta - Frequência dos alimentos - - "Desaparecimento" de alimentos de um local ou país

Os métodos citados na Tabela 5 estão discutidos em detalhes na publicação da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1985), sendo brevemente descritos a seguir.

Diário de Alimentos/Pesagem do alimento ingerido:

Este método requer que o indivíduo escreva em um diário o tipo e a quantidade dos alimentos consumidos ao longo de um determinado período de tempo, que pode variar de 24 horas até 4 a 10 dias. O método exige um alto grau de colaboração por parte dos participantes, aspecto que deve ser levado em conta ao se avaliar a exatidão dos dados. O método baseado na pesagem do alimento ingerido é similar ao do diário de alimentos, porém exige que estes sejam pesados antes do consumo. Esta técnica exige um esforço maior por parte dos participantes, não sendo apropriada para estudos com populações em grande escala.

Lembrança da dieta:

Neste método, solicita-se aos participantes que se recordem do tipo e quantidade de alimentos que consumiram durante um determinado período, geralmente 24 horas antes da entrevista, podendo a mesma ser realizada até mesmo por telefone. Em alguns casos, o método pode ser estendido a períodos de até 7 dias, como por exemplo no caso de dietas constantes ou quando apenas um ou dois alimentos são de interesse, sendo inadequado para estudos envolvendo dietas variadas. A técnica baseada em um período de 24 horas é a que exige menos esforço dos participantes e, portanto, a que oferece maior número de respostas em estudos de grande escala.

Frequência dos Alimentos:

Por este método, que não exige muito esforço dos participantes, pode-se obter um reflexo dos hábitos de consumo de determinados tipos de alimentos. O questionário sobre frequência de alimentos consiste em uma relação de produtos, onde o entrevistado deve indicar o número de vezes ao dia, semana ou mês que consome cada um deles, podendo também ser solicitadas informações sobre a porção consumida, utilizando-se porções padrão como referência.

Duplicação da Porção:

Consiste em organizar a aquisição e preparação do dobro dos alimentos normalmente consumidos por um indivíduo, normalmente em períodos de 24 horas. As duplicatas dos alimentos são pesadas e reservadas para análise. Em função do custo e do tempo envolvidos, o método é adequado para pesquisas em pequena escala, geralmente para avaliação da exposição de pequenos grupos de risco.

Desaparecimento de Alimentos:

- *Em um local:* dados sobre o consumo de alimentos por um grupo de pessoas (família, hospital, instituições, etc.) podem ser obtidos dividindo-se a quantidade de alimentos que desapareceram da cozinha em um determinado período de tempo, geralmente uma semana, pelo número de pessoas presentes no local.
- *Em um país:* quando não existem recursos suficientes para a realização de pesquisas de consumo nacional de alimentos, pode-se utilizar o saldo de alimento no país, que dividido pelo número de habitantes fornece a quantidade de alimento consumida por indivíduo. Este saldo é calculado pela soma dos alimentos produzidos, importados e retirados de reservas, da qual se subtraem os alimentos exportados, colocados em reservas,

utilizados para rações animais ou outros fins não alimentícios e perdidos durante a distribuição e o transporte. O método não fornece uma medida real do consumo, já que não considera os alimentos desperdiçados e os alimentos produzidos em escala familiar, além de não levar em conta variações sazonais ou a distribuição de alimentos dentro da população de acordo com fatores geográficos, sociais ou econômicos. Pode ser utilizado, entretanto, para a determinação do consumo médio anual nacional de alimentos.

De modo geral, todos os métodos descritos podem ser adaptados aos objetivos de uma determinada pesquisa e às características da população alvo. É muito importante, porém, que os investigadores conheçam a fundo os alimentos típicos e suas formas de preparo, que sejam respeitados os recursos disponíveis para o estudo e que as limitações dos métodos utilizados sejam consideradas na interpretação dos dados obtidos (WHO, 1985).

1.3.2. Estimativa da ingestão de aditivos alimentares

Para que seja avaliada a segurança de uso de um aditivo alimentar, são realizados vários ensaios toxicológicos para identificação de possíveis efeitos adversos decorrentes de seu consumo. Os dados resultantes destes estudos são avaliados pelo JECFA, sendo estabelecido um valor de IDA (Ingestão Diária Aceitável) para esta substância. As recomendações do JECFA são utilizadas pelo CCFAC (Comitê do Codex para Aditivos Alimentares e Contaminantes) no estabelecimento de limites de uso da substância em diferentes alimentos. O uso de aditivos alimentares é regulamentado, portanto, com base na IDA, no sentido de assegurar que esta não será ultrapassada através da ingestão de alimentos pelo consumidor (LARSEN & PASCAL, 1998).

A IDA é definida como a quantidade de uma determinada substância que pode ser ingerida diariamente durante toda a vida de um indivíduo, sem riscos

apreciáveis à sua saúde, sendo expressa em miligramas da substância por quilograma de peso corpóreo (pc). Normalmente, considera-se 60 kg como o peso corpóreo médio da população, embora nos países asiáticos e países em desenvolvimento um valor de 50 kg possa representar melhor a média de peso da população (CAC, 1989). A expressão “sem riscos apreciáveis à saúde” representa a certeza prática de que nenhum dano resultará do consumo da substância em questão, mesmo após a exposição à mesma durante toda a vida (VETORAZZI, 1987).

A IDA é expressa como uma faixa, de zero até um limite superior, considerada como o intervalo de aceitabilidade da substância, de forma a incentivar o uso de limites baixos sempre que isto for tecnologicamente possível (HERRMAN, 1993). Apesar de todo o intervalo de aceitabilidade poder ser utilizado com segurança, obviamente quanto menor a quantidade consumida, menores os riscos (TRUHAUT, 1991).

A IDA é calculada através da divisão do valor do NOEL (nível sem efeito adverso observado), geralmente derivado de estudos de toxicidade crônica com animais experimentais, por um fator de segurança adequado. Para aditivos alimentares, o fator de segurança normalmente utilizado é 100, compreendendo dois fatores multiplicativos de 10 cada, sendo o primeiro referente às diferenças entre o homem e a espécie animal utilizada no estudo e o segundo às possíveis diferenças entre os próprios seres humanos (WHO, 1987). Outras subdivisões dos componentes do fator de segurança são propostas por RENWICK (1991, 1993), considerando dados toxicocinéticos e toxicodinâmicos, quando disponíveis. Existem diferentes categorias de IDA, conforme os dados científicos disponíveis e o grau de toxicidade associado aos diferentes aditivos (VETORAZZI, 1987; POULSEN, 1991; TRUHAUT, 1991).

O NOEL, expresso em mg da substância por kg de peso corpóreo, é baseado na espécie animal mais sensível estudada e corresponde à maior dose

de uma determinada substância que não produziu alterações adversas detectáveis no estudo, em termos de morfologia, capacidade funcional, crescimento, desenvolvimento ou tempo de vida (LARSEN & PASCAL, 1998). O NOEL é, portanto, um valor determinado experimentalmente, não envolvendo extrapolação ou interpolação. Na ausência de outras manifestações de toxicidade, um decréscimo significativo do ganho de peso pode ser considerado como um efeito adverso, embora em alguns casos este seja mais um efeito nutricional do que tóxico (WALKER, 1998).

Cumprе salientar que uma conclusão toxicológica a respeito de uma determinada substância pode sofrer alteração sempre que novos dados experimentais ou epidemiológicos relevantes a justifiquem. Este fato se aplica à todas as categorias de IDA, inclusive a IDAs não especificadas. Desta forma, devido à natureza dinâmica do processo de avaliação e reavaliação de aditivos, algumas substâncias passam por diferentes categorias de segurança ao longo de sua regulamentação (VETORAZZI, 1987).

Denomina-se ingestão potencial de um aditivo alimentar a ingestão provável do composto, decorrente dos limites máximos permitidos para o seu uso em diferentes alimentos ou grupos de alimentos e do modelo de consumo alimentar da população em estudo. Diferentes abordagens existem para a estimativa da ingestão de aditivos alimentares, algumas delas envolvendo custo e tempo elevados, o que dificulta a realização deste tipo de estudo em alguns países.

Várias tentativas têm sido feitas no sentido de se determinar níveis máximos de uso de aditivos a partir de suas respectivas IDAs, não existindo, porém, nenhum procedimento que seja, ao mesmo tempo, simples e exato para este fim. Este tipo de cálculo torna-se um tanto complexo, em função dos seguintes aspectos: (a) diferentes níveis de um determinado aditivo podem ser necessários em diferentes alimentos para se atingir os efeitos tecnológicos desejados, (b) os hábitos alimentares de diferentes indivíduos são diferentes, em

termos da seleção dos alimentos e das quantidades consumidas, (c) existem diferenças de disponibilidade e preferência de certos alimentos em diferentes países ou grupos culturais, e (d) diferentes compostos podem preencher a mesma função tecnológica, de forma que o uso de uma determinada substância reduz o uso dos outros compostos da mesma classe funcional (BÄR & WÜRTZEN, 1990).

Grande parte dos métodos existentes para a determinação da ingestão de aditivos tem por base estatísticas de produção de alimentos ou dados de consumo nacional obtidos por pesquisas específicas. As estimativas mais acuradas de ingestão são geradas pela utilização de dados de consumo de alimentos específicos por indivíduos, os quais geralmente não estão disponíveis (DOUGLASS et al, 1997).

Em resposta às solicitações de diversos países que têm encontrado dificuldades na realização de estudos de ingestão, foram elaboradas pelo CCFAAC algumas orientações para a avaliação da ingestão de aditivos alimentares. Estas orientações são apresentadas na ALINORM 89/12A- Appendix IV, sendo brevemente descritas a seguir (CAC, 1989).

Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT): é calculada pela multiplicação do consumo diário médio *per capita* de um alimento ou grupo de alimentos, pelo nível máximo do aditivo legalmente permitido no alimento, estabelecido por padrões Codex ou por regulamentações nacionais, somando-se então os valores obtidos para cada alimento ou grupo de alimentos. A IDMT fornece apenas uma indicação grosseira da ingestão dietária de um aditivo alimentar, pois não considera os hábitos alimentares de grupos especiais da população. Além disso, assume-se que:

- ◆ todos os alimentos onde um aditivo é permitido o contêm;
- ◆ o aditivo está sempre presente no nível máximo permitido;

- ♦ os alimentos que contêm o aditivo são consumidos pela população todos os dias de suas vidas, em níveis equivalentes ao consumo médio *per capita*;
- ♦ o nível de aditivo presente no alimento não é reduzido pelo cozimento ou outras técnicas de processamento;
- ♦ todos os alimentos onde o aditivo é permitido são totalmente ingeridos, nada é descartado.

A IDMT é adequada quando resulta em um valor de ingestão inferior à IDA, significando que a ingestão do aditivo, caso não haja consumo doméstico, não evidencia preocupação. Quando a IDMT é superior à IDA, estudos mais refinados são necessários para a obtenção de dados mais próximos à ingestão real, o que pode ser feito através do cálculo da ingestão diária estimada.

Ingestão Diária Estimada (IDE): é a quantidade de um aditivo ingerida pelo consumidor médio do alimento, com base no uso real do aditivo pela indústria, de acordo com as boas práticas de fabricação, ou a partir de uma estimativa tão próxima quanto possível do nível real de uso. Se a IDE for menor que o valor da IDA e não houver consumo doméstico do aditivo, pode-se considerar que a ingestão é inferior à IDA. Caso a IDE seja superior à IDA, os níveis de uso do aditivo devem ser questionados junto à indústria.

Um outro procedimento que pode ser utilizado para a avaliação do consumo de aditivos alimentares é o Método de “Budget”, desenvolvido na Dinamarca nos anos 70, que é baseado no consumo total de energia (calorias) e líquidos e tem como princípio o estabelecimento do limite máximo de aditivos em função das respectivas IDAs (BÄR & WÜRTZEN, 1990). O Método de “Budget”, internacionalmente aceito, foi adotado recentemente pelo CCFAC para a avaliação preliminar da ingestão de aditivos alimentares. O Método baseia-se no fato de que existe um limite fisiológico para a quantidade de alimentos sólidos e bebidas, e conseqüentemente de aditivos, que pode ser consumida diariamente e

inclui as seguintes considerações: (a) a ingestão diária máxima de alimentos sólidos é de 25 g/kg pc e (b) a ingestão diária máxima de líquidos é de 100 ml/kg pc (CAC, 1999).

O Método de “Budget” foi desenvolvido como uma maneira simples de avaliação dos níveis máximos de uso propostos para aditivos alimentares, de forma a garantir que as respectivas IDAs não sejam excedidas. Não constitui, entretanto, um método para estimativas de ingestão, pois não reflete exatamente os hábitos alimentares de diferentes indivíduos ou grupos de indivíduos, e não pode substituir cálculos mais precisos de ingestão de alimentos, nos quais informações mais detalhadas são consideradas. O Método foi delineado de forma a refletir a pior situação e, portanto, tende a superestimar o consumo de aditivos (CAC, 1999).

O cálculo do limite máximo admissível para um determinado aditivo é feito de acordo com a proporção da dieta representada pelos alimentos que possam contê-lo. Para aditivos que possuem IDA numérica e são utilizados tanto em alimentos sólidos quanto em bebidas, é necessário que seja alocada uma fração da IDA para cada uma destas aplicações, de forma a acomodar da melhor maneira possível os requerimentos tecnológicos de ambos. Quando o limite máximo estabelecido para um aditivo é maior que o calculado pelo Método de “Budget”, estimativas de ingestão mais exatas devem ser realizadas (CAC, 1999).

1.4. Referências Bibliográficas

- ACZEL, A.; SELMECI, G.; NOSKE, O. e MARIK, M. Detection and determination of butylhydroxytoluene in lard. **Husipar**, v.21, n.5, p.222-224, 1972.
- AGUI, M.L.; REVIEJO, A.J.; SEDENO, Y.P. e PINGARRON, J.M. Analytical applications of cylindrial carbon fiber microelectrodes. Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food. **Analytical Chemistry**, v.67, n.13, p.2195-2200, 1995.
- ALARY, J.; GROSSET, C. e COEUR, A. Identification de molécules antioxydantes par nanochromatographie sur couche mince. **Ann. Pharmaceutiques Françaises**, v.40, n.4, p.301-309, 1982.
- ALICINO, N.J., KLEIN, H.C., QUATTRONE, J.J. e CHOY, T.K. Determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, and ethoxyquin in hydrocarbon-soluble samples. **Agricultural and Food Chemistry**, v.11, n.6, p.496-498, 1963.
- AMATO, F. Qualitative detection of antioxidants in food products and determination of butylhydroxyanisole. **Industrie Alimentari**, v.7, n.12, p.81-83, 1968.
- ANDERSON, J. e VAN NIEKERK, P.J. High-performance liquid chromatographic determination of antioxidants in fats and oils. **Journal of Chromatography**, v.394, n.2, p.400-402, 1987.
- ANDRIKOPOULOS, N.K.; BRUESCHWEILER, H.; FELBER, H. e TAESCHLER, Ch. HPLC analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.68, n.6, p.359-364, 1991.
- ANGLIN, C., MAHON, J.H. e CHAPMAN, R.A. Determination of antioxidants in edible fats. **Agricultural and Food Chemistry**, v.4, n.12, p.1018-1022, 1956.

- ANSARI, G.A.S. High-performance liquid chromatographic separation of the isomers of butylated hydroxyanisole. **Journal of Chromatography**, v.262, p. 393-396, 1983.
- A.O.A.C. - **Official Methods of Analysis**, 15.ed.Arlington, Virginia: Association of Official Analytical Chemists, 1990. seção 983.15.
- ARCHER, A.W. The determination of phenolic anti-oxidants in edible oils and fats by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.128, p.235-237, 1981.
- ARMANDOLA, P. Determination of some antioxidants in oils and fats. **Latte**, v.45, n.9, p.624-626, 1971.
- AUSTIN, R.E. e WYATT, D.M. A rapid method for analysis of refined vegetable oils for TBHQ by gas chromatography. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.57, n.12, p.422-424, 1980.
- BÄR, A. e WÜRTZEN, G. Assessing the use of additives in food: a reappraisal of the Danish Budget Method. **Food Science and Technology**, v.23, n.3, p.193-202, 1990.
- BEAULIEU, F. e HADZIYEV, D. Determination of BHA and BHT in dehydrated mashed potatoes. **Journal of Food Science**, v.47, n.2, p.589-592, 1982.
- BECKER, G.L. Preserving food - and healthy. **Food processing**, v.54, n.12, p.53-57, 1993.
- BHASKAR, A. e BELAVADI, V.K. Determination of BHA and BHT in edible oils and fats using HPLC. **Journal of the Oil Technologists' Association of India**, v.12, n.2, p.23-24, 1980.

BOCCA, A. e DELISE, M. Determinazione di BHA e BHT in alimenti lipidici. **La Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione**, v.11, n.6, p.345-348, 1982.

Brasil. Resolução Nº 04/88 - CNS/MS, de 24 de novembro de 1988, publicada Diário Oficial da União - Seção I - 19/12/88. Em: ABIA - Compêndio da Legislação de Alimentos - Atos do Ministério da Saúde. Revisão nº7, 1998.

Brasil. Regulamento técnico - Aditivos alimentares. Portaria Nº 540, de 27 de outubro de 1997, publicada no Diário Oficial da União.

BUCK, D.F. Antioxidants. In: SMITH, J. **Food Additive User's Handbook**, Blackie, London, p.1-46, 1991.

BUTTERY, R.G. e STUCKEY, B.N. Determination of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in potato granules by gas-liquid chromatography. **Agricultural and Food Chemistry**, v.9, n.4, p.283-285, 1961.

CAC Report of the twenty-first session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Codex Alimentarius Commission, Food and Agriculture Organization of the United Nations, ALINORM 89/12A, Roma, 1989.

CAC Codex risk assessment and management procedures: proposed exposure assessment methods in support of the Codex general standard for food additives. CX/FAC 96/6, novembro de 1995.

CAC Codex risk assessment and management procedures: proposed exposure assessment methods in support of the Codex general standard for food additives. CX/FAC 97/5, outubro de 1996.

CAC Consideration of the Codex General Standard for Food Additives: proposed draft guideline for the development of maximum levels of use for food

additives with numerical daily intakes (Annex A). CX/FAC 99/7, janeiro de 1999.

CAMURATI, F. e RIZZOLO, A. Determination of BHA and BHT in fats. **Rivista Italiana delle sostanze grasse**, v.56, n.9, p.347-348, 1979.

CHARTERIS, W.P. Minor ingredients of edible table spreads. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.48, n.4, p.101-106, 1995.

CHEN, B.H. e FU, S.C. Simultaneous determination of preservatives, sweeteners and antioxidants in foods by paired-ion liquid chromatography. **Chromatographia**, v.41, n.1/2, 1995.

CIRAOLO, L.; CALABRÒ, G. e CLASADONTE, M.T. Determinazione di miscele di butilidrossianisolo e butilidrossitoluolo in prodotti alimentari mediante cromatografia liquida ad alta pressione. **Rassegna Chimica**, v.30, n.3, p.145-149, 1978.

CONSTANTE, E.G. Cromatografía líquida de alta eficacia de los antioxidantes de grasas y aceites. **Grasas y Aceites**, v.26, n.3, p.150-152, 1975.

COPPEN, P.P. The use of antioxidants. In: ALLEN, J.C. e HAMILTON, R.J. **Rancidity in Foods**, Blackie Academic & Professional, p.84-103, 1994.

COPPENS, P. The anti-oxidant advantage. **Food, Flavours, Ingredients, Processing and Packaging**, v.7, n.5, p.49-51, 1985.

COULTER, R.B. Extending shelf life by using traditional phenolic antioxidants. **Cereal Foods World**, v.33, n.2, p.207-210, 1988.

DOEDEN, W.G.; BOWERS, R.H. e INGALA, A.C. Determination of BHA, BHT and TBHQ in edible fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.56, n.1, p.12-14, 1979.

- DORKO, C. Antioxidants used in foods. **Food Technology**, v.48, n.4, p.33, 1994.
- DOUGHERTY, M.E. Effectiveness of natural antioxidants compared to synthetic antioxidants. **International Food Ingredients**, n.3, p.27-32, 1993.
- DOUGLASS, J.S.; BARRAJ, L.M.; TENNANT, D.R.; LONG, W.R. e CHAISSON, C.F. Evaluation of the Budget Method for screening food additive intakes. **Food Additives and Contaminants**, v.14, n.8, p.791-802, 1997.
- DURÁN, R.M e PADILLA, R.B. Actividad antioxidant de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, v.44, n.2, p.101-106, 1993.
- DZIEZAK, J.D. Antioxidants: the ultimate answer to oxidation. **Food Technology**, v.40, n.9, p.94-102, 1986.
- ENDEAN, M.E. The detection and determination of food antioxidants - a literature review. **Scientific and Technical Surveys - Leatherhead Food Research Association**, n.91, p.1-57, 1976.
- FILIPIC, V.J. e OGG, C.L. Determination of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in potato flakes. **Journal of the Association of Official and Agricultural Chemists**, v.43, n.4, p.795-799, 1960.
- FORN, M.P. Determination of antioxidants in fatty foods by fluorimetry or densitometry, after TLC separation. **Grasas y Aceites**, v.31, n.3, p.187-195, 1980.
- FORN, M.P. Antioxidantes alimentarios: su investigación y determinación en alimentos. **Circular Farmacéutica**, n.270, p.5-28, 1981.
- FORN, M.P. e SABATER, M.C.L. Análisis de antioxidantes alimentarios. **Circular Farmacéutica**, n.282, p.3-23, 1984.

- GANDARA, M.J.F. e GANDARA, M.C.F. Antioxidants en alimentos. **Alimentacion, Equipos e Tecnologia**, v.13, n.2, p.31-38, 1994.
- GARCÍA, M.C.D. e CAMINO, M.C.P. Método rápido para la determinación de BHT y BHA en aceites y grasas mediante cromatografía gas-líquido. **Grasas y Aceites**, v.34, n.3, p.183-187, 1983.
- GERTZ, C. e HERRMANN, K. Identification and determination of antioxidants in food. **Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v.177, n.3, p.186-192, 1983.
- GIESE, J. Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. **Food Technology**, v.50, n.11, p.73-81, 1996.
- GORDON, M.H. The Mecanism of antioxidant action *in vitro*. In: HUDSON, B.J.F. **Food Antioxidants**, Elsevier Applied Science, p.1-18, 1997.
- GRIFFITHS, B. e McDONALD, B. Antioxidants: the natural answer. **Food, Flavourings, Ingredients, Processing and Packaging**, v.7, n.5, p.4447, 1985.
- HALL III, C.A.; ZHU, a. E ZEECE, M.G. Comparison between capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography separation of food grade antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.4, p.919-921, 1994.
- HAMMOND, K.J. The determination of butylated hydroxyanisole (B.H.A.), butylated hydroxytoluene (B.H.T.) and individual gallate esters in fats and oils by high performance liquid chromatography. **Journal of the Association of Public Analysts**, v.16, n.1, p.17-24, 1978.
- HANSEN, P.V.; KAUFFMAN, F.L. e WIEDERMANN, L.H. A direct spectrophotometric determination of butylated hydroxyanisole in lard and in

- hardened lard. **The Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.36, n.5, p.193-195, 1959.
- HARTMAN, K.T. e ROSE, L.C. A rapid gas chromatographic method for the determination of BHA and BHT in vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.47, n.1, p.7-10, 1970.
- HERRMAN, J.L. Safety evaluations: the search for a common standard. **Food Technology**, v.47, n.3, p.118-130, 1993.
- HURTUBISE, R.J. Luminescence investigation of food antioxidants. **Dissertation Abstracts International, section B. - The Sciences and Engineering**, v.30, n.9, p.4014, 1970.
- HURTUBISE, R.J. Fluorescence quenching of phenolic antioxidants and selective determination of propyl gallate. **Analytical Chemistry**, v.47, n.14, p.2457-2458, 1975.
- HURTUBISE, R.J. Selective fluorescence quenching and determination of phenolic antioxidants. **Analytical Chemistry**, v.48, n.14, p.2092-2095, 1976.
- HURTUBISE, R.J. e LATZ, H.W. Fluorimetric determination of butylated hydroxy anisole in food products and packaging material. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.18, n.3, p.377-380, 1970.
- INDYK, H. e WOOLLARD, D.C. Antioxidant analysis in edible oils and fats by normal-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.356, p.401-408, 1986.
- IRACHE, J.M.; EZPELETA, I. e VEGA, F.A. Antioxygènes phénoliques dans des margarines: comportement au cours de la conservation. **Sciences des Aliments**, v.17, n.1, p.95-105, 1997.

- JADHAV, S.J.; NIMBALKAR, S.S.; KULKARNI, A.D. e MADHAVI, D.L. Lipid oxidation in biological and food systems. In: MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S. e SALUNKHE, D.K. **Food Antioxidants - Technological, Toxicological, and Health Perspectives**, Marcel Dekker, Inc., p.5-63, 1997.
- JECFA Report of the fifty-first meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Genebra, 9-18 de Junho de 1998.
- KANEMATSU, H., MARUYAMA, T.; KINOSHITA, Y.; NIIYA, I. e IMAMURA, M. Simultaneous determination of antioxidants in edible oil and fat. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v.14, n.4, p.357-363, 1973.
- KING, W.P.; JOSEPH, K.T. e KISSINGER, P.T. liquid chromatography with amperometric detection for determining phenolic preservatives. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.63, n.1, p.137-142, 1980.
- KITADA, Y.; TAMASE, K.; MIZOBUCHI, M.; SASAKI, M.; TANIGAWA, K.; KOMIYAMA, S. e NAZAKAWA, H. Determination of *tert*-Butylhydroquinone in oily foods and dried fish. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v.25, n.2, p.209-213, 1984.
- KITADA, Y.; UEDA, Y.; YAMAMOTO, M.; SHINOMIYA, K. e NAKAZAWA, H. Determination of phenolic antioxidants in edible oil by high-performance liquid chromatography with amperometric detector. **Journal of Liquid Chromatography**, v.8, n.1, p.47-57, 1985.
- KLINE, D.A.; JOE, F.L. e FAZIO, T. A rapid gas-liquid chromatographic method for the multi-determination of antioxidants in fats, oils, and dried food products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.61, n.3, p.513-519, 1978.
- KOBAYASHI, K.; TONOGAI, Y. e ITO, Y. Extraction and colorimetric determination of BHA in food using a binding reaction with 2,6-dichloroquinone

- chlorimide. **Journal of Japanese Society of Food Science and Technology**, v.33, n.2, p.134-139, 1986a.
- KOBAYASHI, K., TSUJI, S.; TONOGAI, Y.; ITO, Y. e TANABE, H. A rapid and separative colorimetric technique for the determination of BHT e BHA in foods. **Journal of Japanese Society of Food Science and Technology**, v.33, n.10, p.720-724, 1986b.
- KOCHHAR, S.P. e ROSSEL, J.B. Detection, estimation and evaluation of antioxidants in food systems. In: HUDSON, B.J.F. **Food Antioxidants**, Elsevier Applied Science, p.1-18, 1997.
- KOMAITIS, M.E. e KAPEL, M. Spectrophotometric determination of BHA in edible fats and oils. **The Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.62, n.9, p.1371-1372, 1959.
- LARSEN, J.C. e PASCAL, G. Workshop on the applicability of the ADI to infants and children: consensus summary. **Food Additives and Contaminants**, v.15, supplement, p.1-9, 1998.
- LASLO, H. e DUGAN, L.R. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.38, p.178, 1961.
- LATZ, H.W. e HURTUBISE, R.J. Luminescence analysis of food antioxidants: determination of propyl gallate in lard. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.17, n.2, p.352-355, 1969.
- LAURIDSEN, J.B e SCHULTZ, A.M. Antioxidants: improving the shelf life of food products. **Food Marketing and Technology**, v.7, n.5, p.6, 9-10, 1993.
- LAVERS, B. Rancidity restrained. **Food Processing**, v.60, n.7, p.11-12, 1991.
- LÖLIGER, J. The use of antioxidants in foods. In: ARUOMA, O.I. e HALLIWELL, B. **Free Radicals and Food Additives**, Taylor & Francis, p.121-150, 1991.

- MADHAVI, D.L. e SALUNKHE, D.K. Antioxidants. In: MAGA, J.A. e TU, A.T. **Food Additive Toxicology**, Marcel Dekker, Inc., p.89-177, 1997.
- MADHAVI, D.L.; SINGHAL, R.S. e KULKARNI, P.R. Technological aspects of food antioxidants. In: MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S. e SALUNKHE, D.K. **Food Antioxidants - Technological, Toxicological, and Health Perspectives**, Marcel Dekker, Inc., p.159-265, 1997.
- MAHON, J.H. e CHAPMAN, R.A. Estimation of antioxidants in lard and shortening. **Analytical Chemistry**, v.23, n.8, p.1116-1120, 1951.
- MARIANI, C. e FEDELI, E. Determinazione gascromatografica di BHA, BHT e Jonox 100. **La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse**, v.60, n.11, p.667-672, 1983.
- MASOUD, A.N. e CHA, Y.N. Simultaneous use of fluorescence, ultraviolet, and electrochemical detectors in high performance liquid chromatography-separation and identification of phenolic antioxidants and related compounds. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v.5, n.6, p.299-305, 1982.
- McCABE, D.R. e ACWORTH, I.N. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food using gradient HPLC with electrochemical array detection. **American Laboratory**, v.30, n.13, 18B, 18D, 1998.
- McCAULLEY, D.F., FAZIO, T., HOWARD, J.W., DICIURCIO, F.M. e IVES, J. The multi-determination of antioxidants in lard. **Journal of the Association of Official and Analytical Chemists**, v.50, n.2, p.243-250, 1967.
- MIN, D.B. e SCHWEIZER, D.S. Analysis of antioxidants in oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.59, n.9, p.378-380, 1982.

- MIN, D.B. e SCHWEIZER, D.S. Gas chromatographic determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and tertiarybutyl hydroquinone in soybean oil. **Journal of Food Science**, v.48, n.1, p.73-74, 1983.
- MINIM, V.P.R. e CECCHI, H.M. Antioxidantes em alimentos. **Revista Nacional da Carne**, n.227, p.37-38, 1996.
- NAKAZATO, M.; KANMURI, M.; ARIGA, T.; FUJINUMA, K. e NAOI, Y. Simultaneous determination of *tert*-Butylhydroquinone, BHA and BHT in edible oil. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v.21, n.1, p.64-69, 1980.
- NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**, Marcel Dekker, Inc., p.225-319, 1996.
- OISHI, M.; ONISHI, K.; NISHIJIMA, M.; NAKAGOMI, K. e NAKAZAWA, H. Synergistic effect of sucrose ester of fatty acids on antioxidants in lard. **Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.36, n.1, p.69-73, 1990.
- PAGE, B.D. High performance liquid chromatographic determination of nine phenolic antioxidants in oils, lards, and shortenings. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.62, n.6, p.1239-1246, 1979.
- PAGE, B.D. High performance liquid chromatographic determination of seven antioxidants in oil and lard: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.66, n.3, p.727-745, 1983.
- PAGE, B.D. Liquid chromatographic method for the determination of nine phenolic antioxidants in butter oil: collaborative study. **Journal of the AOAC International**, v.76, n.4, p.765-779, 1993.

- PAGE, B.D. e CHARBONNEAU, C.F. liquid chromatographic determination of seven antioxidants in dry foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.72, n.2, p.259-265, 1989.
- PHILLIPS, M.A. e HINKEL, R.D. Determination of 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol in edible fats by ultraviolet spectrophotometry. **Agricultural and Food Chemistry**, v.5, n.5, p.379-384, 1957.
- POULSEN, E. Safety evaluation of substances consumed as technical ingredients (food additives). **Food Additives and Contaminants**, v.8, n.2, p.125-134, 1991.
- PRASAD, U.V.; DIVAKAR, T.E.; HARIPRASAD, K. e SASTRY, C.S.P. Spectrophotometric determination of some antioxidants in oils and fats. **Food Chemistry**, v.25, n.2, p.159-164, 1987.
- PRASAD, U.V.; RAO, K.E. e SASTRY, C.S.P. Spectrophotometric determination of some antioxidants with potassium permanganate and metol. **Food Chemistry**, v.17, n.3, p.209-213, 1985.
- RAJALAKSHMI, D. e NARASIMHAN, S. Food Antioxidants: sources and methods of evaluation. In: MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S. e SALUNKHE, D.K. **Food Antioxidants - Technological, Toxicological and Health Perspectives**, Marcel Dekker, Inc., p.65-157, 1997.
- RENWICK, A.G. Safety factors and establishment of acceptable daily intakes. **Food Additives and Contaminants**, v.8, n.2, p.135-150, 1991.
- RENWICK, A.G. Data-derived safety factors for the evaluation of food additives and environmental contaminants. **Food Additives and Contaminants**, v.10, n.3, p.275-305, 1993.
- ROBARDS, K. e DILLI, S. Analytical chemistry of synthetic food antioxidants - a review. **Analyst**, v.112, p.933-943, 1987.

- RUIZ, M.A.; CALVO, M.P. e PINGARRON, J.M. Catalytic-voltammetric determination of the antioxidants tert-butylhydroxyanisole (BHA) at a nickel phthalocyanine modified carbon paste electrode. **Talanta**, v.41, n.2, p.289-294, 1994.
- SAAG, K. Determination of Food Additives. In: Macrae, R. **HPLC in Food Systems**, Academic Press, Inc., p.233-236, 1982.
- SAHASRABUDHE, M.R. Application of thin-layer chromatography to the quantitative estimation of antioxidants: BHA, BHT, PG, and NDGA. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v.47, n.5, p.888-893, 1964.
- SASTRY, C.S.P.; GOPALA, R.S. e SASTRY, B.S. New spectrophotometric methods for the determination of di-tert-butyl hydroquinone. **Food Chemistry**, v.46, n.1, p.101-103, 1993.
- SASTRY, C.S.P.; GOPALA, R.S. e SASTRY, B.S. Spectrophotometric determination of butylated hydroxy anisole (BHA) in oils. **Journal of Food Science and Technology - India**, v.29, n.2, p.101-102, 1992.
- SATO, Y. e KAWAMURA, T. Antioxidants in foods. II. Colorimetric determination of dibutylhydroxytoluene and butylhydroxyanisole. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v.13, n.1, p.53-56, 1972.
- SCHWIEN, W.G.; MILLER, B.J. e CONROY, H.W. Extraction, cleanup, and gas chromatographic determination of BHA e BHT in fats and oils. **Journal of the American Official Agricultural Chemists**, v.49, n.4, p.809-812, 1966.
- SELMECI, G. e ACZEL, A. Determination of butyl hydroxytoluene in edible pork fat. **Elelmiszervizsgalati Koezlemlenyek**, v.21, n.5/6, p.298-305, 1975.
- SENTEN, J.R., WAUMANS, J.M. e CLEMENT, J.M. Gas-liquid chromatographic determination of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in

- edible oils. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.60, n.3, p.505-508, 1977.
- SHAHIDI, F. e WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.32, n.1, p.67-103, 1992.
- SHERWIN, E.R. Oxidation and Antioxidants in fat and oil processing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.55, n.11, p.809-814, 1978.
- SHERWIN, E.R. Antioxidants. In: BRANEN, A.L., DAVIDSON, P.M. e SALMINEN, S. **Food Additives**, Marcel Dekker, Inc., p.139-193, 1990.
- SIMS, R.J. e FIORITI, J.A. Antioxidants. In: GOLDBERG, I. e WILLIAMS, R. **Biotechnology and Food Ingredients**, Van Nostrand Reinhold, p.483-505, 1990.
- SPYCHALA, K. e KRZYWICKI, K. Determination of antioxidants in lard. **Roczniki Instytutu Przemysłu Miesnego**, v.9, n.1, p.57-63, 1972.
- STIJVE, T. e DISERENS, J.M. Gas chromatographic determination of butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) and tert.-butylhydroquinone (TBHQ) in milk products. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v.79, n.4, p.108-111, 1983.
- STUCKEY, B.N. Antioxidants as food stabilizers. In: FURIA, T.E. **Handbook of Food Additives**, The Chemical Rubber Co, p.209-245, 1968.
- STUCKEY, B.N. e OSBORNE, C.E. A review of antioxidant analysis in food products. **The Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.42, n.3, p.228-232, 1965.
- SZALKOWSKI, C.R. e GARBER, J.B. Determination of 2,6-Di-tert-Butyl-4-Hydroxytoluene (BHT): application to edible fats and oils. **Agricultural and Food Chemistry**, v.10, n.6, p.490-495, 1962.

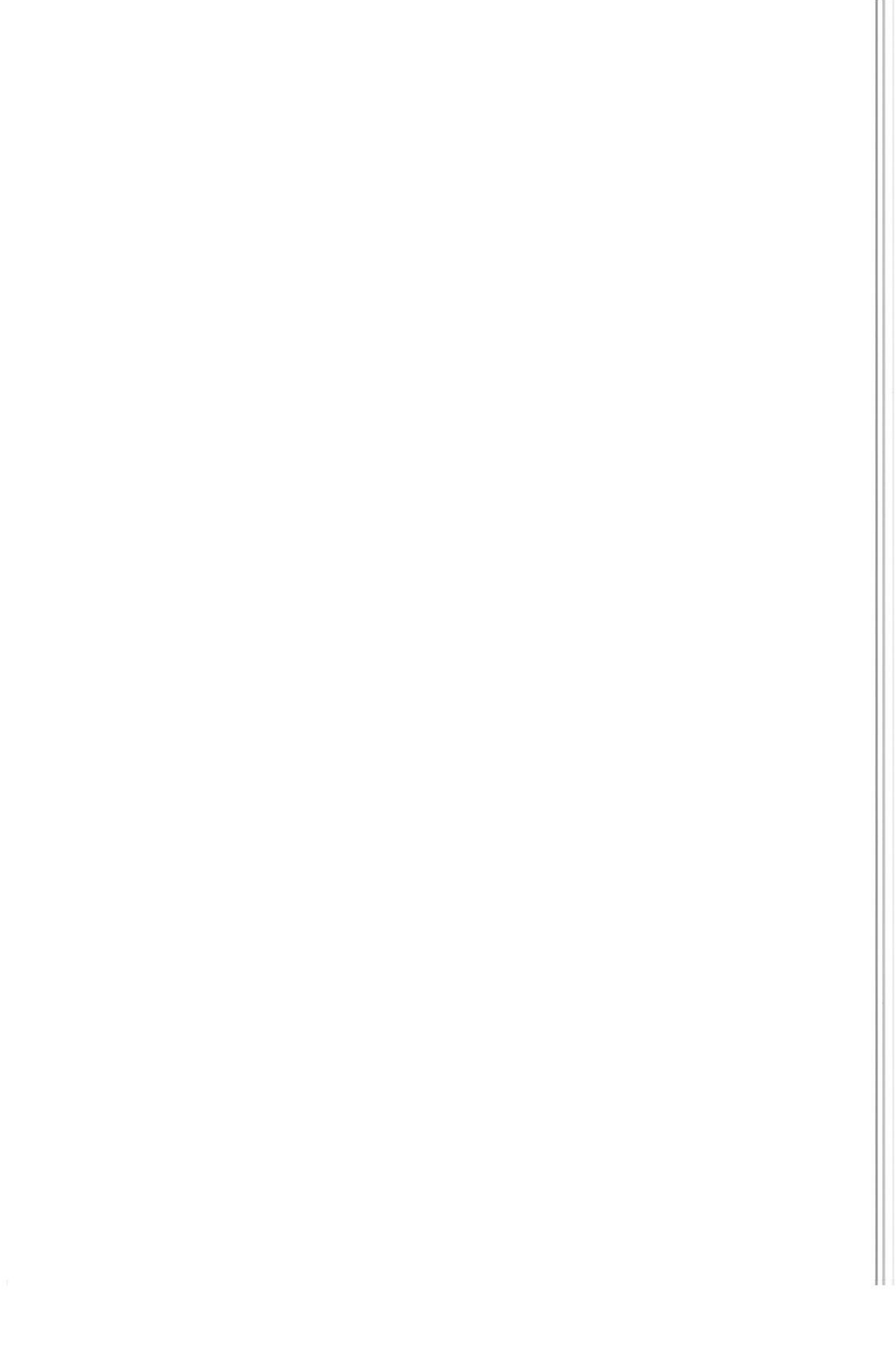
- TRUHAUT, R. The concept of acceptable daily intake: an historical review. **Food Additives and Contaminants**, v.8, n.2, p.151-162, 1991.
- VAN NIEKERK, P.J. e DU PLESSIS, L.M. High performance liquid chromatographic determination of tert-butyl-hydroquinone in vegetable oils. **Journal of Chromatography**, v.187, n.2, p.436-438, 1980.
- VAN PETEGHEM, C.H. e DEKEYSER, D.A. Systematic identification of antioxidants in lards, shortenings, and vegetable oils by thin layer chromatography. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry**, v.64, n.6, p.1331-1335, 1981.
- VETORAZZI, G. Advances in the safety evaluation of food additives - a conceptual and historical overview of the acceptable daily intake (ADI) and acceptable daily intake 'not specified'. **Food Additives and Contaminants**, v.4, n.4, p.331-356, 1987.
- WALKER, R. Toxicity testing and derivation of the ADI. **Food Additives and Contaminants**, v.15, supplement, p.11-16, 1998.
- WHETSEL, K.B.; ROBERSON, W.E. e JOHNSON, F.E. Determination of butylated hydroxy anisole and propyl gallate in food antioxidants. **The Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.32, n.9, p.493-496, 1955.
- WHO Guidelines for the study of dietary intakes of chemical contaminants. **Publication N° 87**. Genebra, 1985.
- WHO Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food. **Environmental Health Criteria N° 70**. Genebra, 1987.
- WYATT, D.M. Simultaneous Analysis of BHA, TBHQ, BHT and propyl gallate by gas chromatography as extracted from refined vegetable oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.58, n.10, p.917-920, 1981.

- YAMADA, T. Determination of butylated hydroxy-anisole in oily foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Bulletin of the National Institute of Hygienic Sciences**, v.108, n.2, p.109-111, 1990.
- YAMADA, M.; MIYATA, M.; KATO, Y.; NAKAMURA, M.; NISHIJIMA, M.; SHIBATA, T. e ITO, Y. Determination of nine phenolic antioxidants in foods by high performance liquid chromatography. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v.34, n.6, p.535-541, 1993.
- YANG, S.; LEE, M.; LEE, S.; SU, S. e CHOU, S. Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in fats and oils. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.1, n.3, p.287-296, 1993.
- YANKAH, V.V.; USHIO, H., OHSHIMA, T. e KOISUMI, C. Quantitative determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, and tert-butyl hydroquinone in oils, foods, and biological fluids by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Lipids**, v.33, n.11, p.1139-1145, 1998.
- YU, L.Z.; INOKO, M. e MATSUNO, T. A gas chromatographic method for rapid determination of food additives in vegetable oils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.32, n.3, p.681-683, 1984.

CAPÍTULO 2

ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DOS ANTIOXIDANTES BHA, BHT E TBHQ

Artigo aceito para publicação no *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA)*.



RESUMO

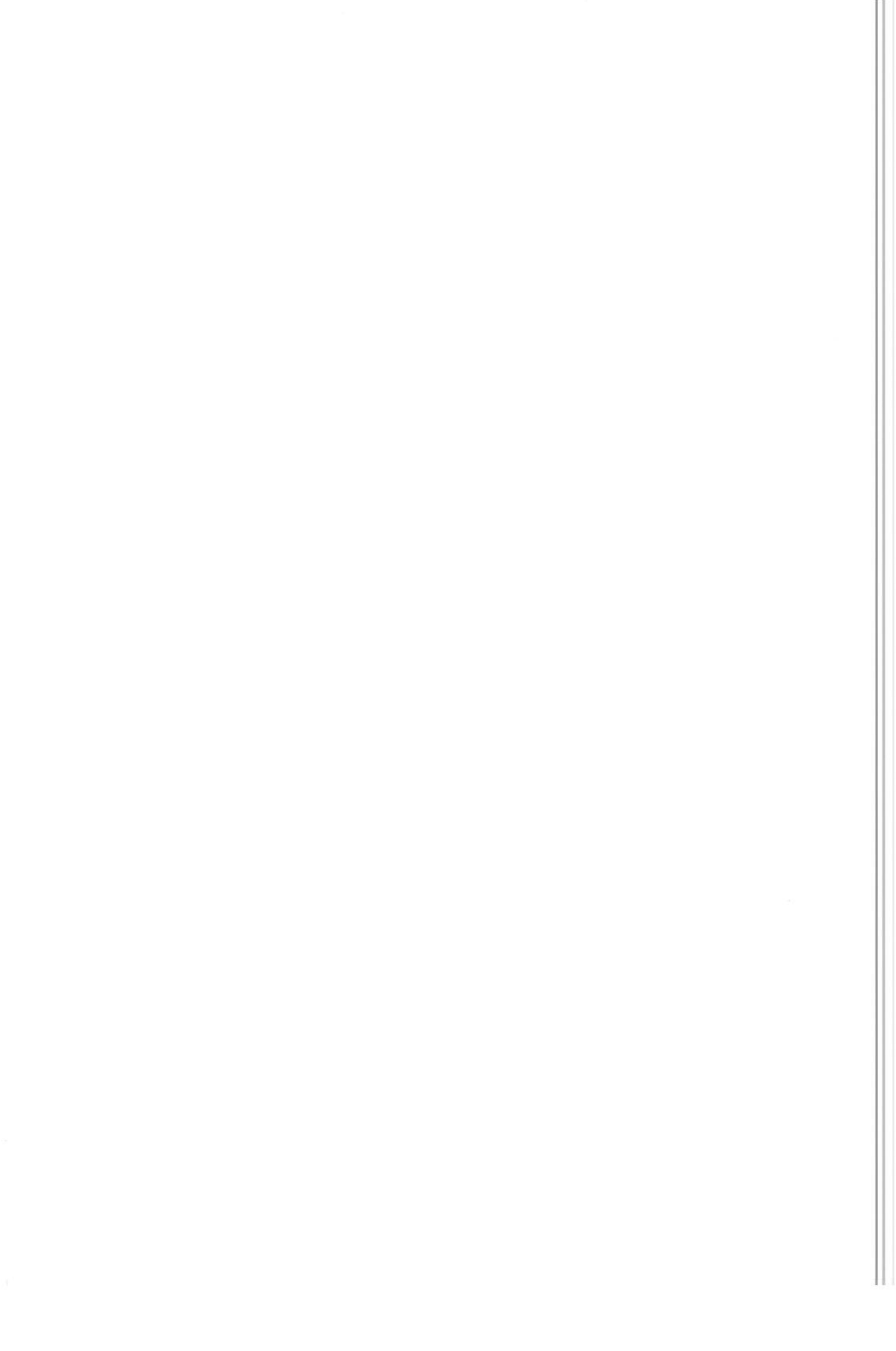
O presente artigo apresenta uma revisão de literatura sobre os principais aspectos toxicológicos dos antioxidantes fenólicos butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT) e terc-butil hidroquinona (TBHQ). Os efeitos tóxicos destes três aditivos têm sido estudados por vários autores e revistos periodicamente pelo JECFA (Joint Expert Commitee on Food Additives) em suas reuniões anuais. Entre os efeitos encontrados em estudos com animais experimentais, podem ser citados a ocorrência de carcinomas no primeiro estômago de roedores, decorrente da exposição ao BHA, efeitos tóxicos nos pulmões, fígado e sangue, causados pelo BHT, e o potencial mutagênico do TBHQ.

Termos de indexação: antioxidantes, BHA, BHT, TBHQ, avaliação toxicológica

ABSTRACT

This paper presents a literature review regarding the main toxicological aspects of the phenolic antioxidants butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) and tert-butylhydroquinone (TBHQ). The toxicological effects of these three additives have been studied by several authors and periodically reviewed by JECFA (Joint Expert Commitee on Food Additives) in its anual meetings. Among the effects found in studies with experimental animals are the occurrence of carcinoms in the forestomach of rodents, after exposure to BHA, adverse effects in the lung, liver and blood, caused by BHT, and the mutagenic potential of TBHQ.

Index terms: antioxidants, BHA, BHT, TBHQ, toxicological evaluation



2.1. Introdução

Uma das principais alterações que ocorrem durante o processamento, a distribuição e o preparo final de certos alimentos é a oxidação. A autooxidação de lipídios inicia outras alterações nos alimentos, que afetam sua qualidade nutricional, bem como suas características de textura, coloração, sabor e odor [4].

Antioxidantes são um dos principais aditivos que protegem a qualidade dos alimentos, através da prevenção da deterioração oxidativa dos lipídios. Compostos fenólicos e alguns de seus derivados são bastante eficientes na prevenção da autooxidação; apenas alguns destes compostos, entretanto, são permitidos para uso como antioxidantes em alimentos. Os principais aspectos considerados para a aceitabilidade de tais substâncias são a sua efetividade e sua segurança de uso [22].

Dentre as substâncias aprovadas como antioxidante para alimentos, o BHA (butil hidroxianisol) e o BHT (butil hidroxitolueno) estão entre as de uso mais amplo em inúmeros produtos gordurosos, apresentando boa resistência a processos de forneamento, embora inadequadas à fritura. TBHQ (*terc*-butil hidroquinona), introduzido como antioxidante na década de 70, é por sua vez particularmente efetivo na estabilização de óleos altamente insaturados, apresentando-se bastante eficiente em produtos submetidos a fritura [10,11]. As estruturas destes três compostos são apresentadas na figura 1.

Os aspectos toxicológicos dos antioxidantes têm sido uma das áreas de maior controvérsia nos debates sobre a segurança de aditivos alimentares. No caso do BHA e do BHT, resultados de estudos a longo prazo realizados nos últimos anos demonstraram que estes compostos podem produzir tumores em animais experimentais. Entretanto, tais resultados não são condizentes com estudos anteriores e, além disto, seu significado para o homem está cercado de incertezas. TBHQ, por sua vez, demonstrou potencial mutagênico em determinados ensaios; por outro lado, não existem estudos adequados quanto ao seu potencial carcinogênico [3].

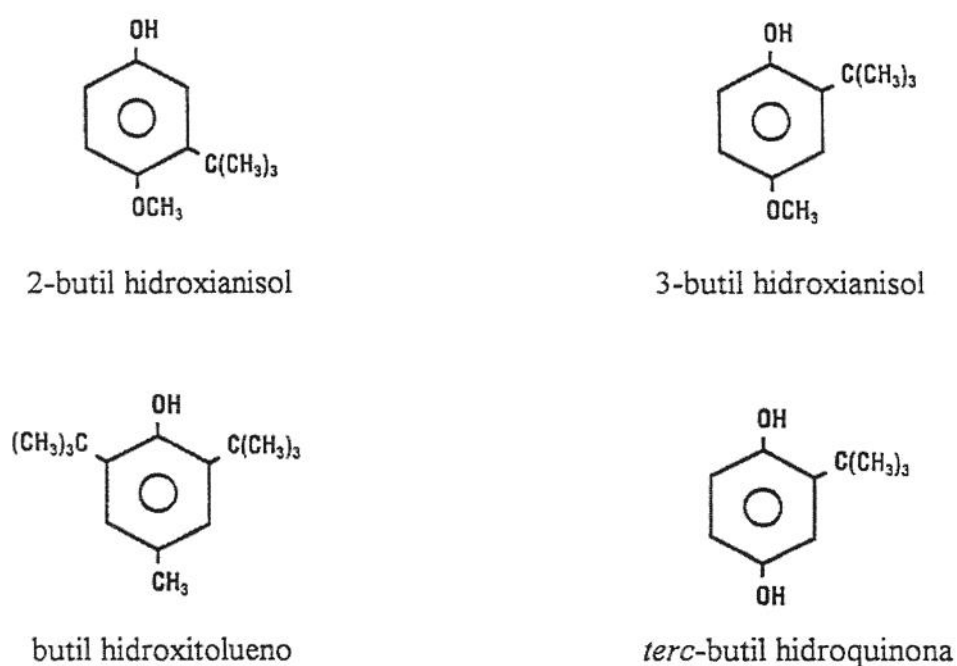


Figura 1 - Estrutura química dos antioxidantes fenólicos BHA, BHT e TBHQ

Apesar destas observações, valores de IDA (Ingestão Diária Aceitável) foram estabelecidos pelo JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants*) para estes três aditivos. A IDA é definida como a quantidade de uma substância, expressa em mg/kg peso corpóreo (pc), que pode ser consumida diariamente, durante toda a vida de um indivíduo, sem acarretar danos à sua saúde. A IDA de um aditivo é derivada do estudo mais sensível com animais experimentais, a partir do qual se determina o NOEL (nível sem efeito observado), expresso em mg do composto/ kg pc, que é então dividido por um fator de segurança, geralmente 100 [28].

Em 1983, uma IDA de grupo de 0-0,5 mg/kg p.c. foi alocada pelo JECFA para os antioxidantes fenólicos BHA, BHT e TBHQ. Atualmente, tais compostos são considerados separadamente, devido aos seus diferentes perfis de toxicidade [3,38]. Nesta revisão, serão abordados os principais aspectos toxicológicos destes três antioxidantes, incluindo metabolismo, efeitos agudos, estudos a curto e longo prazo, carcinogenicidade, efeitos sobre a reprodução e mutagenicidade.

2.2. Aspectos Toxicológicos

2.2.1. Butil hidroxianisol (BHA)

Em 1987, por ocasião da 30ª reunião do JECFA, foi atribuída ao BHA uma IDA temporária de 0-0,3 mg/kg pc, com base em um NOEL de 1.250 ppm de BHA

em roedores, utilizando-se um fator de segurança de 200. Nesta oportunidade, foram requisitados novos estudos toxicológicos quanto à hiperplasia de esôfago em porcos e macacos, além de um estudo de reprodução em multigerações. À luz de novas informações, uma IDA de 0-0,5 mg/kg pc foi estabelecida para o BHA no 33º encontro do JECFA, em 1989, com base em um NOEL de 50 mg BHA/kg pc/dia, derivado de estudos de toxicidade a longo prazo realizados com ratos, ao qual foi aplicado um fator de segurança igual a 100. Nesta ocasião, o Comitê concluiu que estudos adicionais com animais que não possuem o primeiro estômago não seriam necessários [3,30,38].

Absorção, metabolismo e excreção

Após administração oral, o BHA é absorvido no trato gastrointestinal e rapidamente eliminado por ratos, coelhos e humanos, com poucas evidências de acúmulo a longo prazo em tecidos. As principais vias metabólicas do BHA são reações de conjugação do grupo hidroxílico livre com ácido glucurônico ou sulfato, sendo o metabolismo oxidativo (O-desmetilação) relativamente sem importância, exceto em cães [7,24]. Os principais metabólitos do BHA são glucuronídeos, etil sulfato e fenóis livres, que são excretados na urina; o BHA na forma original é eliminado nas fezes. A proporção de cada metabólito varia de acordo com a espécie e a dose [18].

Em comparação com os ratos, doses relativamente menores de BHA são necessárias para originar no homem o mesmo nível do composto no plasma; uma dose oral de 0,5 mg BHA/kg pc em humanos é comparável a 200 mg BHA/kg pc em ratos [27]. CONACHER et al [6] não verificaram acúmulo apreciável de BHA no tecido adiposo de ratos e macacos, mesmo após exposição destes animais a doses elevadas e por longos períodos de tempo (2% na dieta, durante 15 meses); entretanto, a administração do mesmo nível do composto em combinação com 0,2% de BHT resultou em um acúmulo de BHA cerca de 20 vezes maior, sugerindo uma interação entre estes dois compostos. Segundo os autores, o acúmulo de BHA no tecido adiposo do homem é maior que em ratos.

Estudos realizados em humanos sugeriram a formação de TBHQ a partir do BHA, através de uma reação de O-desmetilação, seguida por conjugação com ácido glucurônico ou sulfúrico [7]. No homem, 22-77% de uma dose oral de 0,5-0,7% BHA foram recuperados na urina na forma de glucuronídeos, em 24 horas, juntamente com menos que 1% de BHA livre. Dose de 100 mg de BHA resultou em 46% glucuronídeos, 26% conjugados sulfatos e uma quantidade muito pequena de BHA livre na urina [3].

Toxicidade aguda

A dose oral única de BHA necessária para causar a morte de 50% da população em estudo (DL_{50}) foi de 2.200-5.000 mg/kg pc em ratos e 2.000 mg/kg

pc em camundongos (LEHMAN et al, 1951 e DACRE, 1960, citados por MADHAVI & SALUNKHE [18]). O BHA é uma substância irritante à pele, mas não parece causar irritação após a ingestão nos níveis de uso permitidos, nem outros efeitos tóxicos agudos em animais experimentais ou indivíduos que manuseiam o composto [24].

Estudos a curto prazo

Segundo MADHAVI & SALUNKHE [18], estudos de toxicidade a curto prazo foram conduzidos em várias espécies, incluindo ratos, camundongos, coelhos e cães. Os efeitos observados em ratos (500-600 mg BHA/kg pc, 10 semanas) foram decréscimo na taxa de crescimento e redução da atividade das enzimas catalase, peroxidase e colinesterase. Em coelhos expostos a 1 g BHA/dia, por 5 a 6 dias, verificou-se um aumento na excreção de sódio e potássio na urina; em camundongos e ratos (500 mg BHA/kg pc/dia), houve aumento do peso relativo do fígado e indução de enzimas hepáticas, como a epóxido hidrolase, glutathione-S-transferase e glucose-6-fosfato desidrogenase; em cães (1 a 1,3% de BHA, em relação à dieta), observou-se alargamento do fígado, proliferação do retículo endoplasmático liso e aumento da atividade enzimática hepática e, em macacos *rhesus* (500 mg BHA/kg pc, 28 dias), o BHA induziu à hipertrofia do fígado e à proliferação do retículo endoplasmático liso.

Até 1982, estudos a longo prazo realizados com BHA, utilizando-se a via oral de administração, forneceram resultados negativos. Entretanto, nenhum destes estudos seria aceitável atualmente, por apresentarem duração insuficiente ou deficiências na seleção de tecidos para análises histopatológicas, em relação aos padrões atuais [3]. A partir de 1983, a principal preocupação quanto à toxicidade do composto foi o desenvolvimento de tumores no primeiro estômago de roedores [38]. Tal efeito foi comprovado em novos estudos a longo prazo publicados a partir de 1986.

ITO et al [14] realizaram um estudo de carcinogenicidade do BHA, no qual ratos F344 foram expostos a doses de 0,5 e 2,0% de BHA na dieta, durante 2 anos. A dose maior resultou em aumento significativo da incidência de papilomas e ambas as doses causaram aumento da incidência de hiperplasia do primeiro estômago dos animais. Os autores concluíram que o BHA é carcinogênico aos ratos F344, nas condições do estudo. Em estudo posterior [15], com ratos, camundongos e hamsters, a carcinogenicidade do BHA foi comprovada, sendo que a incidência de lesões neoplásicas e proliferativas no primeiro estômago mostrou-se dependente da dose. Os pesquisadores verificaram que a ação tumorigênica do BHA em hamsters está amplamente associada à ação do isômero constituinte 3-BHA.

Estudos de toxicidade crônica do BHA em roedores foram conduzidos também por ALTMANN et al [2], CLAYSON et al [5] e MOCH [19], comprovando-se a ocorrência de carcinomas no primeiro estômago destes animais. WILLIAMS et al [35], por sua vez, verificaram um discreto aumento na incidência de papilomas na porção não glandular do estômago de ratos F344.

No sentido de verificar o possível significado para o homem das alterações observadas no primeiro estômago de roedores, estudos foram conduzidos por alguns pesquisadores em espécies que, assim como o homem, não apresentam este órgão. Em macacos expostos ao BHA durante 84 dias, IVERSON et al [16] observaram aumento do tamanho do fígado, diminuição da atividade da monooxigenase hepática e aumento do índice mitótico do epitélio do esôfago; entretanto, não foram verificados efeitos proliferativos no esôfago e no estômago dos animais. Cães *Beagle* foram utilizados nos estudos de IKEDA et al [13] e TOBE et al [25], ambos com duração de 180 dias, não tendo sido observado nenhum efeito patológico no estômago, esôfago, duodeno e fígado dos animais. O BHA, administrado a porcas prenhas desde a concepção até o 110º dia de gestação, não afetou a incidência de defeitos nos fetos, nem originou papilomas ou alterações na porção glandular do estômago [40].

O mecanismo pelo qual o 3-BHA induz à formação de carcinomas no primeiro estômago de roedores não é claramente definido. Estudos realizados por deSTAFNEY et al [9] sugerem a ocorrência de um ataque aos constituintes celulares pelos metabólitos reativos do 3-BHA. SCHILDERMAN et al [21]

concluíram que a co-oxidação do TBHQ, metabólito do BHA, pela enzima prostaglandina-H-sintase parece ser responsável pelos efeitos carcinogênicos do 3-isômero.

A relevância para o homem dos efeitos do BHA no primeiro estômago de roedores foi discutida por vários autores [1,15,17,39], segundo os quais é muito pouco provável a ocorrência de efeitos semelhantes no homem em órgãos como esôfago e estômago, já que o nível de BHA necessário para produzir efeitos carcinogênicos em roedores é muito superior aos níveis a que o homem está normalmente exposto através dos alimentos.

Interação com compostos carcinogênicos

O BHA pode potencializar ou inibir a ação de certos compostos carcinogênicos. Segundo WATTENBERG [29], o efeito inibidor do BHA é decorrente de diferentes mecanismos, incluindo o aumento da atividade de sistemas enzimáticos capazes de detoxificar compostos carcinogênicos, a alteração do sistema citocromo P-450, que resulta na formação de compostos menos carcinogênicos, e o próprio efeito antioxidante do BHA.

Em camundongos, a administração de BHA após benzo(a)pireno inibiu em 60% a formação de um metabólito tóxico deste segundo composto no primeiro estômago e no fígado dos animais [12]. Por outro lado, o efeito promotor do BHA

na formação de tumores iniciados por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) no primeiro estômago de ratos foi verificado por WHYSNER et al (1994). O BHA atua de forma sinérgica com outros indutores conhecidos de papilomas e carcinomas do primeiro estômago de roedores, como o N-metil-N-nitrosouréia e N,N'-dibutilnitrosamina [3].

Reprodução, mutagênese e teratogênese

WILLIAMS et al [34] realizaram uma série de testes *in vitro*, incluindo reparo de DNA com culturas de hepatócitos, mutagênese de *Salmonella* na presença de microsomas e testes com células do ovário de hamster, onde nenhuma evidência de genotoxicidade foi verificada para o BHA. Entretanto, o composto inibiu a troca molecular intercelular entre células cultivadas do fígado de ratos, efeito que tem sido observado para vários agentes promotores de neoplasmas.

Segundo MADHAVI & SALUNKHE [18] e BARLOW [3], o BHA não exerce efeitos adversos na reprodução e não é teratogênico, conforme observado em estudos realizados com ratos, camundongos, hamsters, coelhos, porcos e macacos. Segundo os mesmos autores e SHERWIN [24], o BHA não apresentou mutagenicidade em uma série de ensaios *in vitro* e *in vivo*, como o teste de Ames com diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium*, reparo de DNA em hepatócitos, testes com culturas de mamíferos, testes de aberrações

cromossômicas, testes com células da medula de ratos e ensaios do dominante letal.

2.2.2. Butil Hidroxitolueno (BHT)

Em 1987, na 30ª reunião do JECFA, uma IDA temporária de 0-0,125 mg/kg p.c. foi atribuída ao BHT, com base em um NOEL de 25 mg/kg pc, obtido em um teste de reprodução em uma única geração, com ratos. Nesta oportunidade, foram solicitados novos estudos no sentido de esclarecer a questão da hepatocarcinogenicidade observada em um estudo com esta mesma espécie, após exposição *in-utero* ao BHT, bem como elucidar o mecanismo das hemorragias induzidas pelo composto nas espécies susceptíveis [3](BARLOW, 1987). Em 1996, por ocasião da 44ª reunião do JECFA, o NOEL de 25 mg/kg pc foi revisado e os efeitos observados nos estudos de exposição *in utero*, previamente solicitados, foram também considerados na derivação deste nível. Utilizando um fator de segurança de 100, o Comitê alocou um novo valor de IDA para o BHT, de 0-0,3 mg/kg pc [31].

Absorção, metabolismo e excreção

A administração oral de BHT resulta em absorção rápida pelo trato gastrointestinal e eliminação na urina e nas fezes de ratos, camundongos e humanos [24]. Ao contrário do BHA, que é metabolizado de forma similar no

homem e em ratos, o metabolismo do BHT no homem é diferente do que ocorre em ratos [27].

A principal via de degradação do BHT é o metabolismo oxidativo mediado pelo sistema monooxigenase microssomal [3]. Em ratos, coelhos, cães e macacos, a oxidação do grupo *p*-metil é predominante, enquanto que no homem os grupos *terc*-butil são preferencialmente oxidados; em camundongos, ambos os grupos são oxidados. O metabolismo do BHT é mais complicado e mais lento que o do BHA, e a sua excreção relativamente lenta é atribuída, segundo alguns autores, à circulação enterohepática [18].

Em ratos, os principais metabólitos encontrados na urina foram o ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxibenzóico (BHT-ácido), tanto livre como na forma de éster glucurônico, e o S-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxibenzil)-N-acetilcisteína (BHT-ácido mercaptúrico), além de menores quantidades de outros metabólitos, incluindo BHT-álcool, BHT-aldeído e BHT-dímero. Nas fezes, o metabólito predominante foi o BHT-ácido livre. Em coelhos, o BHT-ácido foi o metabólito predominante, sendo excretado como éster glucurônico e conjugado glicínico (BHT-ácido hipúrico), estando também presentes BHT-álcool, BHT-aldeído e BHT-dímero. O BHT na forma original foi identificado apenas nas fezes [7].

Em camundongos, o principal metabólito encontrado na urina foi o conjugado glucurônico do BHT-ácido e, nas fezes, o BHT-ácido livre. Em cães, o metabolismo é similar ao dos ratos, sendo que uma excreção biliar significativa foi

observada em alguns estudos. Em macacos, o principal metabólito detectado foi o éster glucurônico do BHT-ácido, sendo a taxa de excreção similar à do homem [18]. A excreção biliar do BHT e seus metabólitos foi observada em ratos, coelhos e cães, retardando a excreção dos metabólitos por meio de recirculação enterohepática. Em ratos, 90% de uma dose oral única foram excretados em 4 dias, sendo até 40% na urina; em coelhos, 54% de uma dose oral foram excretados na urina em 3-4 dias [3].

Estudos limitados em humanos, com doses orais únicas de aproximadamente 0,5 mg BHT/kg pc, indicaram que o principal metabólito do composto é um glucuronídeo éter-insolúvel, estando o BHT-ácido, livre e conjugado, presente apenas em pequenas quantidades. Aproximadamente 50% da dose foram excretados na urina nas primeiras 24 horas, seguida por uma excreção mais lenta nos 10 dias seguintes. A retenção em tecidos foi maior no homem do que em ratos. Outros estudos sugerem que a excreção biliar parece ser uma importante via de eliminação do BHT, e comprovam a ocorrência de circulação enterohepática no homem [7,18].

Toxicidade aguda

O BHT apresenta uma baixa toxicidade aguda. Embora cause irritação à pele, conforme estudos realizados com porcos, o composto não parece causar irritação após ingestão nos níveis de uso permitidos em alimentos [24]. Segundo

WÜRTZEN [38], em estudos de exposição aguda realizados com camundongos, o BHT demonstrou efeitos tóxicos nos pulmões, incluindo hiperplasia, hipertrofia e uma desorganização geral dos constituintes celulares. Sua DL_{50} , observada por diferentes autores, foi de 1.700-1.970 mg/kg pc em ratos, 2.100-3.200 mg/kg pc em coelhos, 10.700 mg/kg pc em porcos; 940-2.100 mg/kg pc em gatos e 2.000 mg/kg pc em camundongos [18].

O fígado, os pulmões e o sangue são os principais alvos de toxicidade do BHT, sendo que, em ratos, os efeitos do composto sobre o fígado são mais marcantes que os do BHA, incluindo hipertrofia deste órgão. Diversos estudos mostram que o BHT causa toxicidade aguda nos pulmões de camundongos, em níveis de 400-500 mg/kg pc. Os efeitos incluem hipertrofia, hiperplasia e um espessamento das paredes alveolares dos pulmões. Uma proliferação substancial das células pulmonares, bem como um aumento total de DNA, RNA e lipídios nos pulmões foram também observados dentro de 3-5 dias após uma injeção intraperitoneal de BHT [3].

Estudos a curto prazo

POWELL et al [20] verificaram a ocorrência de necroses centritubulares em ratos expostos a 1.000 ou 1.250 mg BHT/kg pc/dia por até 4 dias. A administração diária de 500 mg BHT/kg pc por 7 ou 28 dias causou hepatomegalia e necroses periportais progressivas nos hepatócitos, além de alterações bioquímicas, como a

indução da epóxido hidrolase, alterações das isoenzimas do citocromo P-450 e depressão da glucose-6-fosfatase. Segundo os autores, neste e em vários outros estudos, não há evidências de que o BHT cause danos ao fígado em um nível equivalente a 25 mg/kg pc/dia, nível muito superior ao consumo humano, sendo portanto muito pouco provável que o BHT ofereça riscos à saúde humana.

Em coelhos expostos a uma dose de 2% de BHT na dieta, foi observado efeito sobre a excreção de eletrólitos, similar à descrita para o BHA. Doses menores, porém, não resultaram em efeitos adversos. Em cães, nenhum sintoma de intoxicação ou alterações histopatológicas foram observados em doses equivalentes a 0,17-0,94 mg BHT/kg pc, por 12 meses. Em macacos expostos a 500 mg BHT/kg pc por 14 dias observou-se discreta hepatomegalia, proliferação moderada do retículo endoplasmático liso, redução da atividade da glucose-6-fosfatase e aumento da atividade da nitroanisol desmetilase. Em dose menor, nenhum efeito adverso foi observado [18].

COTTRELL et al [8] verificaram que ratos que receberam altas doses de BHT (superiores a 600 mg/kg pc/dia), durante 21 dias, apresentaram um requerimento de vitamina K maior que o normal. Foi também observado, ao longo do estudo com BHT, um aumento significativo do tempo de coagulação sanguínea destes animais. Por outro lado, o BHT não produziu alterações na coagulação sanguínea em ratos que ingeriram dose de 1.250 mg/kg pc, o que levou os pesquisadores a concluírem que os efeitos observados no estudo não podiam ser

considerados como um indicativo de problemas de segurança do consumo humano deste antioxidante.

Diversos estudos relatados por MADHAVI & SALUNKHE [18] demonstraram que o BHT pode causar hemorragias interna e externa, além de hipoprotrombinemia em roedores, sendo a dose mínima efetiva para tal efeito equivalente a 7,5 mg BHT/kg pc. Coelhos, cães e hamsters parecem ser resistentes a tal efeito. Segundo os autores, a ocorrência de hemorragia está relacionada à ruptura do mecanismo de coagulação do sangue e pode ser prevenida através da administração de vitamina K. De acordo com BARLOW [3], a administração de BHT leva a uma redução dos fatores coagulantes dependentes desta vitamina, além de alterar as funções das plaquetas e a permeabilidade vascular.

Ainda segundo BARLOW [3] e MADHAVI & SALUNKHE [18], os efeitos observados em roedores foram principalmente redução da taxa de crescimento, hipertrofia do fígado, proliferação do retículo endoplasmático liso e do nível de citocromo P-450 no fígado, indução de enzimas hepáticas, como a nitroanisol desmetilase, timidina quinase, bifenil-4-hidroxilase, glutathione-S-transferase, glutathione redutase, epóxido hidrolase e aminopireno desmetilase, além de redução da atividade da glucose-6-fosfatase. Os efeitos tóxicos observados no fígado e nos pulmões parecem ser devido a um metabólito reativo do BHT, o BHT-quinona metídeo, identificado no fígado e na bile de ratos.

WÜRTZEN e OLSEN [41] realizaram um estudo crônico com ratos, em duas gerações, tendo observado, além de redução do peso corpóreo dos animais, um aumento significativo na incidência de adenomas e carcinomas hepatocelulares, efeito detectado principalmente em animais expostos por mais de 2,5 anos, duração superior à normalmente utilizada em estudos crônicos. O aumento da ocorrência de tumores foi significativo apenas em doses de 250 mg BHT/kg pc. Segundo os autores, o BHT é considerado um promotor pouco potente da carcinogênese de fígado, em comparação com outros compostos, o que pode explicar o tempo necessário para a ocorrência dos efeitos observados no estudo.

BHT foi administrado a ratos Wistar, em doses equivalentes a 25, 50, 100 e 250 mg/kg pc, por 117 semanas. Na maior dose, foi observado um aumento no número de ratos com adenomas e carcinomas hepatocelulares [19]. Dois estudos crônicos com ratos F344 foram conduzidos por WILLIAMS et al [35]; em um deles, os animais foram expostos a 100-600 ppm de BHT durante 76 semanas e, no outro, os animais receberam doses de 12.000 ppm de BHT durante 110 semanas. Em ambos estudos não foram encontrados efeitos neoplásicos em nenhum órgão, em comparação com o controle.

Vários outros estudos de toxicidade crônica do BHT, realizados com roedores, são citados por BARLOW [3] e por MADHAVI & SALUNKHE [18]. Os

efeitos observados nestes estudos incluem principalmente redução do ganho de peso dos animais, aumento na incidência de tumores nos pulmões e no fígado, lesões não neoplásicas na bexiga, adenomas e carcinomas hepatocelulares, aumento do peso do fígado, aumento da ocorrência de tumores benignos nos ovários e, em alguns casos, verificou-se que os animais tratados com BHT apresentaram uma maior sobrevivência em comparação com os animais controle. Tumores em outros órgãos foram também observados, porém sua ocorrência não foi estatisticamente significativa. Quanto à indução de carcinogênese no primeiro estômago de roedores, ao contrário do BHA, o composto não resultou em efeitos adversos neste órgão.

Interação com compostos carcinogênicos

Segundo WITSCHI [36], o BHT aumentou a incidência de tumores nos pulmões de camundongos, quando administrado após uma dose iniciadora de carcinógenos, como uretano, dimetilnitrosamina, benzo(a)pireno ou 3-metilcolantreno. O mesmo autor, em pesquisa posterior [37], verificou que em camundongos BALB/c a administração de 0,5% BHT na dieta aumentou significativamente a incidência de tumores no cólon e no trato gastrointestinal induzidos por dimetilhidrazina (DMH), não exercendo porém efeitos em neoplasmas induzidos por metilnitrosouréia. Segundo o autor, o tratamento de camundongos com BHT pode aumentar o número de tumores induzidos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em até 5-6 vezes.

O BHT mostrou-se promotor da carcinogênese em bexiga de ratos, iniciada por N-butil-N-(4-hidroxibutil)-nitrosamina (BBN) ou N-metilnitrosouréia (MNU) e da incidência de adenomas na tireóide, iniciada por MNU. Por outro lado, o BHT apresentou ação inibidora sobre a carcinogênese no duto auricular e a incidência de fibroadenomas mamários induzidas por 7,12-dimetil-benz(a)antraceno (DMBA) [15].

Segundo BARLOW [3], os resultados obtidos em estudos de interação do BHT com compostos carcinogênicos mostraram que o antioxidante pode inibir ou potencializar a atividade carcinogênica destas substâncias, de acordo com a espécie animal envolvida, o carcinógeno testado, o órgão alvo examinado e também quanto ao momento em que o BHT é administrado em relação ao carcinógeno. De modo geral, quando o BHT é administrado antes ou ao mesmo tempo que o composto carcinogênico, a incidência de tumores é reduzida e, se administrado após o carcinógeno, a incidência de tumores aumenta. Existem, porém, exemplos em que o efeito oposto foi verificado em ambas as situações.

Reprodução, mutagênese e teratogênese

Em estudos de mutagenicidade realizados por SHELEF & CHIN [23], utilizando o teste de Ames com *Salmonella typhimurium* TA100 e TA98, o BHT mostrou-se não mutagênico nas duas linhagens testadas. WILLIAMS et al [34] estudaram os efeitos celulares do BHT em uma bateria de testes *in vitro*, não

tendo observado nenhuma evidência de genotoxicidade em testes de reparo de DNA com culturas primárias de hepatócitos, teste de mutagênese com *Salmonella*/microssomos e testes com células epiteliais de fígado/ hipoxantina-guanina fosforibosil transferase.

Segundo MADHAVI & SALUNKHE [18], o BHT apresentou resultados negativos em várias linhagens de *Salmonella typhimurium*, com ou sem ativação metabólica. O composto apresentou resultados positivos em alguns testes *in vitro* utilizando células mamárias, culturas de linfócitos humanos e células do ovário de hamsters. Em testes *in vivo*, foram obtidos resultados negativos em testes de aberrações cromossômicas, em células da medula óssea e do fígado de ratos. Em camundongos, três ensaios do dominante letal foram negativos e, em ratos, dois ensaios foram positivos. Segundo os autores, de modo geral, os efeitos mutagênicos do BHT foram observados apenas sob altas doses do composto.

Ainda segundo MADHAVI & SALUNKHE [18], o BHT não apresentou efeitos adversos em termos de reprodução e teratogenicidade em estudos de geração única ou múltipla, em ratos, camundongos, hamsters, coelhos e macacos, em doses relativamente baixas, sendo o nível sem efeito observado equivalente a 50 mg/kg pc. Em doses mais altas (500 mg/kg pc/dia), alguns dos efeitos significativos observados em ratos incluem alterações no tamanho da cria, número de machos por cria e ganho de peso durante a lactação. Em estudos de neurotoxicidade realizados com ratos, o composto não apresentou nenhuma toxicidade específica no sistema nervoso central. Nenhuma anormalidade clínica

ou comportamental foi verificada em filhotes de macacos *rhesus*, cujos pais foram mantidos em uma dieta contendo 50 mg BHT/kg/pc/dia durante 1 ano antes da concepção.

2.2.3. *terc*-Butil hidroquinona (TBHQ)

O antioxidante TBHQ foi avaliado pelo JECFA nas seguintes reuniões: 19^a, 21^a, 30^a, 37^a e 44^a [32]. Na 37^a reunião, o Comitê atribuiu ao composto uma IDA temporária de 0-0,2 mg/kg, derivada de um NOEL de 1.500 mg TBHQ/kg alimento (equivalentes a 37 mg TBHQ/ kg pc/dia), obtido em um estudo com cães, durante 117 semanas, com base em anormalidades hematológicas verificadas no nível imediatamente superior do composto (5.000 mg TBHQ/kg alimento). Nesta reunião, foi solicitado pelo Comitê o esclarecimento dos resultados observados em estudos de genotoxicidade, que indicavam que o composto era clastogênico em ensaios *in vitro* e *in vivo* [31].

Na 44^a reunião do Comitê, foram avaliados os resultados de todos os estudos de genotoxicidade disponíveis, bem como os resultados de novos estudos quanto ao metabolismo do TBHQ, efeitos no epitélio renal e promoção/inibição de câncer. Os resultados finais de estudos de longa duração com roedores não se encontravam disponíveis para revisão. Nesta reunião, a IDA temporária de 0-0,2 mg/kg pc foi prorrogada e os dados dos estudos de longa duração com roedores foram solicitados para revisão em 1997 [31].

Na 49ª reunião do Comitê, em 1997, foram revisados os resultados dos estudos de toxicidade a longo prazo com roedores e avaliadas novas informações com relação ao metabolismo do TBHQ, seus efeitos na indução de enzimas, toxicidade a curto prazo e efeitos na reprodução em roedores. Resultados de estudos a longo prazo com cães e de estudos de genotoxicidade foram também reavaliados. Com base nestas informações, o Comitê concluiu que o TBHQ não é carcinogênico em roedores. Em estudos de toxicidade a longo prazo com ratos, camundongos e cães, esta última foi a espécie mais sensível. Uma IDA de 0-0,7 mg/kg pc foi então alocada ao TBHQ, com base em um NOEL de 72 mg/kg pc/dia e em um fator de segurança de 100 [32].

Absorção, metabolismo e excreção

TBHQ administrado oralmente é absorvido no trato gastrointestinal e rapidamente excretado na urina de ratos, cães e humanos. O metabolismo ocorre através de processos oxidativos, seguidos por reações de conjugação; nestas três espécies, a excreção é feita principalmente na urina, através de conjugados sulfato e glucuronídeos. Estudos mostraram que, no homem, a excreção urinária de uma dose oral única de 20 mg TBHQ/ kg pc ocorre em 48 horas [24]. Em um outro estudo realizado no homem, relatado por BARLOW [3], doses orais únicas de 2 mg TBHQ/ kg pc, administradas através de um veículo altamente gorduroso (30% óleo de milho), foram eliminadas quase totalmente em 2-3 dias através da urina, principalmente nas formas 4-O-sulfato (73-88%), 4-O-glucuronídeo (15-

22%) e menos que 0,1% na forma original. Entretanto, a administração através de um veículo com baixo teor de gordura (10% óleo de milho) resultou em menor absorção, sendo que menos da metade da dose foi eliminada na urina.

Em ratos expostos a doses orais únicas de TBHQ (100 mg/kg pc), cerca de 57-80% foram excretados na urina como 4-O-sulfato, 4% como 4-O-glucuronídeo e aproximadamente 4-12% na forma original. Em estudos prolongados, observou-se um aumento da quantidade de glucuronídeo. Comportamento similar foi observado em cães; porém, a proporção de glucuronídeo foi maior (mais que 20%). O acúmulo de TBHQ não foi observado em nenhuma destas duas espécies [18]. Após administração intraperitoneal de 200 mg TBHQ/kg pc a ratos Wistar, dois metabólitos foram detectados na urina: o 3-terc-butil-5-metiltiohidroquinona (TBHQ-5-SMe) e o 3-terc-butil-6-metiltiohidroquinona (TBHQ-6-SMe). Em um outro estudo com animais desta mesma espécie, foi sugerido o envolvimento da prostaglandina H sintase no metabolismo *in vivo* do TBHQ a TBQ (*terc*-butilquinona) [31].

Efeitos agudos

Segundo SHERWIN [24], o TBHQ apresenta uma baixa toxicidade aguda e, embora em estudos realizados com porcos tenha apresentado uma discreta irritação à pele, não é considerado um composto irritante, ingerido nos níveis permitidos em alimentos. A DL_{50} do TBHQ observada em ratos foi equivalente a

700-1.000 mg/kg pc(oral) e 300-400 mg/kg pc (intraperitoneal); em camundongos, a dose letal oral foi de 1.260 mg/kg pc e, em porcos, 790 mg/kg pc [18].

Estudos a curto prazo

Não foram realizados estudos convencionais de curta duração com TBHQ. Contudo, tendo em vista o efeito dos antioxidantes BHA e BHT no fígado de animais experimentais, alguns estudos especiais foram conduzidos com o TBHQ, nos quais não foram produzidos efeitos significativos em termos de alargamento do fígado, proliferação do retículo endoplasmático ou indução de oxidases de função mista. A atividade de algumas enzimas, como a *p*-nitroanisol desmetilase, a anilina hidroxilase e a bilirubina glucuronil transferase, foi induzida pela administração do TBHQ através da dieta. Entretanto, esta indução foi muito menor que a observada sob doses equivalentes de BHA [3]. Segundo MADHAVI & SALUNKHE [18], a administração intraperitoneal de 100 ou 200 mg TBHQ/kg pc em ratos, durante 1 mês, ou através da dieta (1%), durante 22 dias, não resultou em efeitos adversos em termos de crescimento, mortalidade ou patologias microscópicas.

Estudos a longo prazo/carcinogênese

Estudos de longa duração foram realizados com o TBHQ em cães e roedores. Em um estudo realizado com cães, no qual o antioxidante foi

administrado por 117 semanas em doses de 500, 1.500 ou 5.000 mg/kg alimento, não foram detectadas alterações de comportamento, aparência, crescimento, ingestão de alimento e peso de órgãos, nem tampouco efeitos histopatológicos e aumento no retículo endoplasmático das células do fígado. Apenas sob a maior dose foram observadas reduções das contagens de células sanguíneas vermelhas, do nível de hemoglobina e dos valores de hematócritos, em comparação aos animais controle [26]. Segundo BARLOW [3], para a espécie animal considerada, o cachorro, este estudo teve duração insuficiente para que o potencial carcinogênico do TBHQ pudesse ser avaliado. O estudo foi revisado pelo JECFA em sua 49ª reunião, quando o Comitê confirmou que o NOEL derivado de estudos de toxicidade a longo prazo com cães era de 1.500 mg/kg TBHQ na dieta [32].

A exposição de ratos aos níveis de 160, 500, 1.600 e 5.000 mg TBHQ/kg alimento, durante 20 meses, não resultou em efeitos adversos em termos de crescimento, peso de órgãos, ingestão de alimento, alterações hematológicas, bioquímicas e histológicas. Tal estudo, assim como o anteriormente citado, não pôde ser considerado adequado para a avaliação da carcinogenicidade do composto, devido à duração insuficiente e à baixa taxa de sobrevivência dos animais [3,18,24].

Segundo SHERWIN [24], o TBHQ não causa efeitos hemorrágicos semelhantes aos observados em ratos expostos ao BHT. TBHQ foi testado quanto à ocorrência de efeitos adversos nos pulmões de camundongos e,

enquanto o BHT produziu hiperplasia dos pneumócitos, o TBHQ não ocasionou nenhuma lesão nestes órgãos. TBHQ foi também investigado com relação à sua habilidade de induzir a proliferação celular no primeiro estômago de roedores. Em alguns estudos foram observados efeitos discretos em termos de proliferação celular e hiperplasia da mucosa do primeiro estômago; porém, estes resultados foram obtidos apenas sob altas doses do composto (acima de 5.000 mg/kg alimento), além de terem sido muito menos pronunciados do que os efeitos do BHA, em doses equivalentes [31].

Interação com compostos carcinogênicos

TBHQ demonstrou um discreto efeito promotor sobre a carcinogênese na bexiga de ratos, iniciada por N-butil-N-(4-hidroxibutil)-nitrosamina (BBN), em um nível de 2.000 mg TBHQ/kg alimento, administrado durante 32 semanas. Em um outro estudo com ratos, no qual os animais receberam uma dieta contendo 0,8% TBHQ durante 51 semanas, após exposição oral única a 25 mg dimetil benz(a)antraceno (DMBA)/kg pc, o TBHQ apresentou efeito inibitório no desenvolvimento de tumores mamários iniciados pelo DMBA, mas não afetou a incidência de tumores no duto auricular e no primeiro estômago, iniciados pelo mesmo [31]. Segundo BARLOW [3], o TBHQ inibe reações de nitrosação no estômago e pode, desta forma, exercer um efeito protetor contra a toxicidade resultante da administração simultânea de nitrato e compostos nitrosáveis, embora não pareça exercer nenhum efeito sobre nitrosaminas pré-formadas.

Reprodução, mutagênese e teratogênese

Três estudos de reprodução foram conduzidos com ratos, sendo um deles em três gerações. A maior dose de TBHQ testada, 0,5% na dieta, resultou na redução da ingestão de alimentos, com consequente diminuição no ganho de peso dos filhotes, efeito este atribuído a problemas de palatabilidade. TBHQ não apresentou efeitos toxicológicos sobre a reprodução e sobre o desenvolvimento dos filhotes e, em doses de até 0,5% na dieta, não demonstrou teratogenicidade [26].

Segundo SHERWIN [24], o TBHQ não afetou a reprodução de ratos, nem causou efeitos patológicos nos animais, em um estudo com uma única geração, sob doses de até 0,5% do composto na dieta. Segundo o autor, com base neste e em outros estudos, TBHQ apresenta um baixo potencial tóxico em termos de reprodução e desenvolvimento. O NOEL derivado dos estudos de reprodução realizados com ratos foi, em geral, em torno de 1.500 mg TBHQ/ kg alimento (equivalentes a cerca de 75 mg TBHQ/ kg pc), não tendo sido realizados estudos desta natureza com outras espécies animais [3]. Os resultados de 4 estudos de reprodução em ratos indicaram um efeito adverso do TBHQ em termos de sobrevivência e/ou peso corpóreo dos filhotes, em níveis equivalentes a 5g/kg na dieta, ou superior [32].

O potencial mutagênico do TBHQ foi investigado através de diferentes tipos de ensaios, conforme compilação apresentada pela OMS (Organização Mundial

de Saúde) [31]. Segundo BARLOW [3] e MADHAVI & SALUNKHE [18], o TBHQ mostrou-se não mutagênico no teste de Ames com 5 linhagens de *Salmonella typhimurium*, com e sem ativação metabólica. Resultados negativos foram também obtidos em um ensaio de mutação tipo CHO/ HGRPT (hipoxantina-guanina-fosforibosil transferase), em testes com células de hamsters chineses V79, testes de aberração cromossômica com células de mamíferos *in vivo*, em um ensaio do dominante letal com ratos e em um teste citogenético com células da medula óssea de camundongos. Em testes *in vivo*, o composto demonstrou efeitos clastogênicos em células da medula de camundongos e, em testes de aberração cromossômica com células do pulmão de camundongos V79 e com fibroblastos de hamsters, foram observados resultados positivos discretos. Segundo SHERWIN [24], as evidências indicam que o TBHQ apresenta um baixo potencial genotóxico e, de acordo com MADHAVI & SALUNKHE [18], o composto pode ser discretamente mutagênico em altas doses.

À luz dos resultados de vários estudos de genotoxicidade e do fato de o TBHQ não ter demonstrado carcinogenicidade em roedores, foi concluído pelo JECFA em sua 49ª reunião que o composto não apresenta potencial genotóxico *in vivo* sob as condições de uso do composto como antioxidante, não sendo necessários estudos posteriores neste aspecto [32].

2.3. Considerações Finais

Conforme dados de literatura, os antioxidantes fenólicos BHA, BHT e TBHQ estão relacionados à ocorrência de determinados efeitos adversos em diferentes espécies de animais experimentais. No caso do BHA, o efeito mais amplamente estudado até o presente foi a ocorrência de tumores no primeiro estômago de roedores. BHT demonstrou efeitos tóxicos no fígado e nos pulmões de animais de diferentes espécies, além de causar alterações no mecanismo de coagulação sanguínea dos mesmos. TBHQ, por sua vez, foi considerado discretamente mutagênico por alguns autores, quando administrado em altas doses.

Apesar destes efeitos, valores de IDA foram atribuídos pelo JECFA para estes três compostos, uma vez que, mediante a avaliação dos diversos estudos disponíveis, concluiu-se que os efeitos tóxicos observados em animais experimentais não representam riscos à saúde humana, pois as doses necessárias para produzi-los é muito superior àquelas ingeridas pelo homem através da dieta. Além disto, no caso específico do BHA, o órgão alvo do composto não existe no homem, o que reforça a segurança de uso do aditivo.

Os antioxidantes são aditivos de extrema importância para a conservação de alimentos, aumentando a vida de prateleira de produtos gordurosos e preservando suas qualidades sensoriais e nutricionais. Tais aditivos são normalmente utilizados em quantidades pequenas, da ordem de 100-200 ppm, em alimentos cujo consumo em uma dieta normal é relativamente baixo, em

comparação com outras categorias de alimentos. Desta forma, os efeitos tóxicos observados para os antioxidantes em animais experimentais que, conforme já mencionado, não significam danos à saúde humana, pouco representam em comparação com os inúmeros benefícios que estes aditivos oferecem aos alimentos.

Cumpre salientar que a IDA de um composto, assim como os níveis de uso permitidos em diferentes alimentos, podem ser alterados a qualquer momento, desde que novos estudos sugiram tal necessidade. Em vista disto, é extremamente importante, além da continuidade de estudos toxicológicos, a realização periódica de estudos de ingestão de antioxidantes, assim como de outras classes de aditivos, a fim de verificar se a IDA destes compostos não está sendo ultrapassada, garantindo assim sua segurança de uso. Para tanto, é necessária a obtenção de dados de consumo de alimentos, em nível nacional ou individual, além do monitoramento da concentração real destes compostos nos diferentes alimentos, principalmente os de maior consumo, através de determinação analítica ou de pesquisas junto aos fabricantes de alimentos.

2.4. Referências Bibliográficas

- [1] ADDIS, P.B., HASSEL, C.A. Safety Issues with antioxidants in foods. In.: FINLEY, J.W.; ROBINSON, S.F., ARMSTRONG, D.J.(Ed.) Food safety assessment, **American Chemical Society**, Washington, 1992, p.346-376.
- [2] ALTMANN, H.J.; GRUNOW, W.; MOHR, U.; RICHTER-REICHHELM, H.B., WESTER, P.W. Effects of BHA and related phenols on the forestomach of rats. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.24, n.10/11, p. 1183-1188, 1986.
- [3] BARLOW, S.M. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In: HUDSON, B.J.F (Ed.). **Food Antioxidants**, Elsevier Applied Science, London, 1997, p. 253-307.
- [4] BUCK, D.F. Antioxidants. In: SMITH, J.(Ed.) **Food Additive User's Handbook**, Blackie, London, 1991, p.1-46.
- [5] CLAYSON, D.B.; IVERSON, F.; NERA, E.; LOK, E.; ROGERS, C.; RODRIGUES, C.; PAGE, D., KARPINSKI, K. Histopathological and radioautographical studies on the forestomach of F344 rats treated with butylated hydroxyanisole and related chemicals. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.24, n.10/11, p. 1171-1182, 1986.
- [6] CONACHER, H.B.S.; IVERSON, F.; LAU, P.Y., PAGE, D.B. Levels of BHA and BHT in human and animal adipose tissue: interspecies extrapolation.

Food and Chemical Toxicology, Exeter, v.24, n.10/11, p.1159-1162, 1986.

[7] CONNING, D.M., PHILLIPS, J.C. Comparative metabolism of BHA, BHT and other phenolic antioxidants and its toxicological relevance. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.24, n.10/11, p. 1145-1148, 1986.

[8] COTTRELL, S.; ANDREWS, C.M.; CLAYSON, D., POWELL, C.J. The dose-dependent effect of BHT (butylated hydroxytoluene) on vitamin K-dependent blood coagulation in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.32, n.7, p. 589-594, 1994.

[9] deSTAFNEY, C.M.; PRABHU, U.D.G.; SPARNINS, V.L., WATTENBERG, L.W. Studies related to the mechanism of 3-BHA-induced neoplasia of the rat forestomach. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.24, n.10/11, p. 1149-1157, 1986.

[10] DORKO, C. Antioxidants used in foods. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.4, p. 33, 1994.

[11] DURÁN, R.M, PADILLA, R.B. Atividade antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, v.44, n.2, p.101-106, 1993.

[12] IANNOU, Y.M.; WILSON, A.G.E., ANDERSON, M.W. Effect of butylated hydroxyanisole, α -angelica lactone and β -naphthoflavone on benzo(α)pyrene:DNA adduct formation in vivo in the forestomach, lung

- and liver of mice. **Cancer Research**, Chicago, v.42, n.4, p. 1199-1204, 1982.
- [13] IKEDA, G.J.; STEWART, J.E.; SAPIENZA, P.P; PEGGINS, J.O., MICHEL, T.C.; OLIVITO, V.; ALAM, H.Z., O'DONNELL Jr, M.W. Effect of subchronic dietary administration of butylated hydroxyanisole on canine stomach and hepatic tissue. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.24, n.10/11, p. 1201-1221, 1986.
- [14] ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; HAGIWARA, A.; SHIBATA, M., OGISO, T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.70, n.2, p. 343-352, 1983.
- [15] ITO, N.; HIROSE, M.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H.; SHIRAI, T., TAMETATSU, M. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.24, n.10/11, p. 1071-1082, 1986.
- [16] IVERSON, F.; TRUELOVE, J.; NERA, E.; LOK, E.; CLAYSON, D.B., WONG, J. A 12-week study of BHA in the cynomolgus monkey. *Food and Chemical Toxicology*, Exeter, v.24, n.10/11, p.1197-1200, 1986.
- [17] KAHL, R. Protective and adverse biological actions of phenolic antioxidants. In.: SIES, H.(Ed.) **Oxidative stress: oxidants and antioxidants**, Academic Press, London, 1991, p.245-273.

- [18] MADHAVI, D.L., SALUNKHE, D.K. Antioxidants. In: MAGA, J.A., TU, A.T.(Ed.) **Food Additive Toxicology**, Marcel Dekker, Inc., New York, 1997, p.89-177.
- [19] MOCH, R.W. Pathology of BHA- and BHT-induced lesions. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.24, n.10/11, p. 1167-1169, 1986.
- [20] POWELL, C.J.; CONNELLY, C.J.; JONES, S.M.; GRASSO, P., BRIDGES, J.W. Hepatic responses to the administration of high doses of BHT to the rat: their relevance to hepatocarcinogenicity. **Food Additives and Contaminants**, London, v.24, n.10/11, p. 1131-1143, 1986.
- [21] SCHILDERMAN, P.A.E.L.; VAARWERK, F.J.; LUTGERINK, J.T.; WURFF, A.Van der; HOOR, F., KLEINJANS, J.C.S. Induction of oxidative DNA damage and early lesions in rat gastro-intestinal epithelium in relation to prostaglandin H sintase-mediated metabolism of butylated hydroxyanisole. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.33, n.2, p. 99-109, 1995.
- [22] SHAHIDI, F., WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.32, n.1, p.67-103, 1992.
- [23] SHELEF, L.A., CHIN, B. Effect of phenolic antioxidants on the mutagenicity of aflatoxin B₁. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.40, n.6, p.1039-1043, 1980.

- [24] SHERWIN, E.R. Antioxidants. In: BRANEN, A.L., DAVIDSON, P.M., SALMINEN, S.(Ed.) **Food Additives**, Marcel Dekker, Inc., New York, 1990, p.139-193.
- [25] TOBE, M.; FURUYA, T.; KAWASAKI, Y.; NAITO, K.; SEKITA, K.; MATSUMOTO, K.; OCHIAI, T.; USUI, A.; KOKUBO, T.; KANNO, J., HAYASHI, Y. Six-month toxicity study of butylated hydroxyanisole in beagle dogs. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.24, n.10/11, p. 1223-1228, 1986.
- [26] VAN ESCH, G.J. Toxicology of *tert*-butylhydroquinone. **Food and Chemical Toxicology, Exeter**, v.24, n.10/11, p. 1063-1065, 1986.
- [27] VERHAGEN, H.; BECKERS, H.H.G.; COMUTH, P.A.W.V.; MAAS, L.M.; HOOR, F.; HENDERSON, P.T., KLEINJANS, J.C.S. Disposition of single oral doses of butylated hydroxytoluene in man and rat. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.27, n.12, p. 765-772, 1989.
- [28] WALKER, R. Toxicity testing and derivation of the ADI. **Food Additives and Contaminants**, London, v.15 (supplement), p.11-16, 1998.
- [29] WATTENBERG, L.W. Protective effects of 2(3) *tert*-butyl-4-hydroxyanisole on chemical carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.24, n.10/11, p. 1099-1102, 1986.

- [30] WHO Evaluation of certain additives and contaminants. Thirty-third Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 1989.
- [31] WHO Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food. World Health Organization Food Additive Series: 35, Geneva, 1996.
- [32] WHO Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food. World Health Organization Technical Report Series 884, Geneva, 1999.
- [33] WHYSNER, J.; WANG, C.X.; ZANG, E.; IANTROPOULOS, M.J., WILLIAMS, G.M. Dose response of promotion by butylated hydroxyanisole in chemically initiated tumours of the rat forestomach. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.32, n.3, p. 215-222, 1994.
- [34] WILLIAMS, G.M.; McQUEEN, C.A., TONG, C. Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene.I.Genetic and celular effects. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.28, n.12, p. 793-798, 1990.
- [35] WILLIAMS, G.M.; WANG, C.X., IANTROPOULOS, M.J. Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene.II.Chronic feeding studies. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.28, n.12, p. 799-806, 1990.

- [36] WITSCHI, H.P. Enhancement of lung tumours formation in mice. In.: MOSS, M.J.; KAUFMAN, J.M.; SIEGFRIED, J.M.; STEELE, V.E., NESNOW, S. (Ed.) **Carcinogenesis**, Raven Press, New York, 1985, v.8, p.147.
- [37] WITSCHI, H.P. Enhanced tumour development by butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.24, n.10/11, p. 1127-1130, 1986.
- [38] WÜRTZEN, G. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.28, n.11, p. 743-745, 1990.
- [39] WÜRTZEN, G. Scientific evaluation of the safety factor for the acceptable daily intake (ADI). Case study: butylated hydroxyanisole (BHA). **Food Additives and Contaminants**, London, v.10, n.3, p. 307-314, 1993.
- [40] WÜRTZEN, G., OLSEN, P. BHA study in pigs. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.24, n.10/11, p.1229-1233, 1986.
- [41] WÜRTZEN, G., OLSEN, P. Chronic study on BHT in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.24, n.10/11, p. 1121-1125, 1986.

CAPÍTULO 3

ESTIMATE OF THE DAILY INTAKE OF BHA, BHT AND TBHQ IN BRAZIL

Artigo enviado para publicação na revista *Food Additives and Contaminants*

SUMMARY

The potential daily intakes of the phenolic antioxidants butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) and tert-butyl hydroquinone (TBHQ) in Brazil were estimated using two sources of information on food consumption data and national maximum permitted levels of these food additives. In a first step, the Budget Method was used as a screening tool to estimate the safety aspects of the national additives use levels. This screening indicated that the intake of BHA, BHT and TBHQ should be further investigated. In a second step, the Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI) approach was used to estimate the potential daily intake of these antioxidants. The calculated values indicated that the mean intake estimates of BHA, BHT and TBHQ were lower than their respective Acceptable Daily Intake (ADI) of 0.5, 0.3 and 0.7 mg/kg body weight established by JECFA. To check if the additives are used at their maximum authorized levels, analytical determination of these compounds in selected food categories were carried out using HPLC with UV detection. BHT and TBHQ concentrations in foodstuffs considered to be important sources of these antioxidants in the diet were below the respective maximum permitted levels. BHA was not detected in any of the analysed samples. In view of the results and considering that both approaches are overestimates, one can assume that the dietary intakes of BHA, BHT and TBHQ in Brazil do not represent a hazard for the mean consumer.

Key words: antioxidants, BHA, BHT, TBHQ, intake, oils, fats

3.1. Introduction

Food antioxidants are substances that inhibit or interfere with the free-radical reaction fundamental to lipid oxidation; this ability arises mainly from the phenolic structure of the antioxidants (Sherwin, 1990; Dorko, 1994). Phenolic antioxidants function by donating a hydrogen atom to a free radical to reform the original fat molecule. They also inhibit oxidation by serving as a donor of hydrogen atoms to peroxides to form hydroperoxides, thus preventing free radical formation in other fat molecules (Dougherty, 1993).

The use of phenolic antioxidants in foods had its beginning in the late 1940s when butylated hydroxyanisole (BHA) was found to have antioxidant effectiveness in fatty foods. Somewhat earlier, several alkyl (including *n*-propyl) esters of gallic acid had been investigated and approved for food use in a number of countries. Later on, around 1954, butylated hydroxytoluene (BHT) was put to widespread use in the United States along with the previously available food antioxidants. The next major development on phenolic antioxidants occurred in 1972, when *ter*-butyl hydroquinone (TBHQ) was commercialized as a food grade antioxidant (Sherwin, 1990).

BHA and BHT serve a vast range of fat-containing products. They give good carry-through for baking but are too volatile for frying. BHA and BHT are most frequently used as antioxidants for granola bars, breakfast cereals, animal fats, potato granules and flakes, chewing gum base, candies and baked goods (Coulter,

1988). TBHQ is particularly effective in stabilizing highly unsaturated oils such as soy bean, sunflower, safflower and fish oils (Lavers, 1991). It is carried through during deodorization, thereby protecting the deodorized oil from oxidative deterioration thereafter (Charteris, 1995). TBHQ offers good carry-through activity to protect fried food products against oxidative deterioration, but is not effective for baked food applications (Coulter, 1988).

Some adverse effects have been associated with phenolic antioxidants. BHA has been demonstrated to cause forestomach carcinogenesis in rats and mice, BHT has caused lesions in the liver, lung and seems to interfere in the blood coagulation in different species, TBHQ was found to be clastogenic *in vitro* and *in vivo* (Sherwin, 1990; Barlow, 1997; Madhavi & Salunkhe, 1997). Nevertheless, according to many authors, these effects are unlikely to represent a health hazard to humans if the compounds are used under their respective regulation.

The use of antioxidants and other food additives in different countries is limited by specific regulations, established in terms of their safety for use and technological needs. Many countries, like Brazil, follow the recommendations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA) on the safe use of food additives. According to JECFA, the safety in use of an additive such as an antioxidant can be expressed in terms of its ADI (Acceptable Daily Intake), which represents the amount of the substance that can be daily consumed for a lifetime without health hazards. The ADI is expressed in mg of the additive/kg body weight (bw) (CAC, 1989). The ADI of the antioxidants BHA, BHT and TBHQ,

as recommended by JECFA, are 0.5, 0.3 and 0.7 mg/kg bw, respectively (CAC, 1996).

The Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC) has shown a particular interest about the phenolic antioxidants BHA, BHT and TBHQ. This was due to the fact that preliminary intake assessments of these additives using the Budget Method and proposed maximum limits of the draft General Standard for Food Additives (GSFA) indicated that intakes of these food additives may approach or exceed their respective ADI (CAC, 1996).

Codex member countries were then requested to submit information on national assessments of the intake of these food additives to JECFA for evaluation. JECFA was asked to provide CCFAC guidance on their potential to exceed their respective ADIs. In this study, the potential intakes of BHA, BHT and TBHQ in Brazil were estimated based on national food consumption data and on current maximum permitted levels. Analytical determination of these additives in selected food categories was performed to support the estimates.

3.2. Experimental

3.2.1. Food consumption data

The potential dietary intakes of BHA, BHT and TBHQ in Brazil were calculated using two sources of information on food consumption data. One of them, called

Survey on Household Budgets, was carried out by the IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistics) in the period of 1995-1996 in 11 metropolitan regions: Belém, Fortaleza, Recife, Salvador, Belo Horizonte, Rio de Janeiro, São Paulo, Curitiba, Porto Alegre, Brasília and Goiânia. Information on the dietary habits of the population was obtained through the food diary method applied to randomly selected households, during a stated one-week period of time. The results of the survey, expressed in kg/per capita/year, were reported for selected individual food categories as average consumption for each metropolitan region and as national mean consumption (IBGE, 1998). For the purpose of this study the national mean consumption data were used in all estimates.

The other survey is called *Brazil Trend'99* and was conducted by Datamark Ltda. It presents the results of a comprehensive investigation of the Brazilian packaged goods market from 1989 to 1998 and projections up to 2003. The estimated total market is based on the identified sample extrapolated to the total market and the projections up to 2003 are based on the historic performance of the market. This study used data from over 300 sources, mainly manufacturers of consumer products, and the results are reported as quantity (tons or Liters) of selected food categories per year. Datamark data assumed the Brazilian population as $162 \cdot 10^6$ habitants in 1998 (Datamark, 1999). To express intake as mg/kg bw, the average density of vegetable oils was assumed as 0.9 g/mL.

3.2.2. Assessment of potential intake of BHA, BHT and TBHQ

The Budget Method was used as a first screening procedure for the estimation of the safety aspects of maximum permitted levels of the antioxidants BHA, BHT and TBHQ, established by the Brazilian regulation (ABIA, 1998). In a second step, the potential intake of each antioxidant was estimated using the TMDI (Theoretical Maximum Daily Intake) approach. (CAC, 1989). Additionally, five selected food categories, which represented over 80% of the estimated intake of BHA, BHT and TBHQ (IBGE, 1998 and Datamark, 1999) were analysed for these antioxidants.

Budget Method:

It is based on the fact that there is a physiological upper limit to the amount of food and drink, and thus of food additives, that can be consumed each day. It assumes that the intakes of solid food and liquid do not exceed 25 g/kg bw and 100 ml/kg bw, respectively. This method is an initial tool for screening additive intakes and is designed to cover the worst case scenario, as it exaggerates potential additive intakes. For food additives with numerical ADI that are used only in solid food and not in beverages, which is the case of BHA, BHT and TBHQ in Brazil, the following guidelines are recommended, considering $F_s=1$ (F_s is the fraction of the additive for use in solid food) (CAC, 1999):

Use levels below $F_s \times \text{ADI} \times 40$: indicate that the food additive is suitable in food in general.

Use levels below $F_s \times \text{ADI} \times 80$: use levels are acceptable if the daily consumption of the foods containing the additive do not exceed $\frac{1}{2}$ of the total solid food intake.

Use levels below $F_s \times \text{ADI} \times 160$: use levels are acceptable if the daily consumption of the foods containing the additive do not exceed $\frac{1}{4}$ of the total solid food intake.

Use levels below $F_s \times \text{ADI} \times 320$: : use levels are acceptable if the daily consumption of the foods containing the additive do not exceed $\frac{1}{8}$ of the total solid food intake.

If the proposed levels are higher than **ADI x 320**, more exact intake estimations should be done, using for example food consumption surveys (CAC, 1999).

TMDI Approach

According to Alinorm 89/12A-appendix 4 (CAC, 1989), the Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI) of a food additive is calculated by multiplying the average daily intake of selected food categories where the additive is allowed for use by its maximum permitted use level and by summing up the figures for each of the selected categories.

This calculation can be represented by the following expression, according to Verhagen et al (1990):

$$\text{Antioxidant intake} = \sum_{f_c=1}^n F_{f_c} \text{ML}_{f_c} ,$$

where f_c stands for the selected food categories (n being the number of selected food categories), F is the average consumption of each selected food category and ML is the national maximum permitted level of antioxidant in the food category. In all the TMDI calculations, the average body weight was considered as 60 kg (CAC, 1989)

Although maximum levels of BHA, BHT and TBHQ for some food categories are expressed on the basis of fat content (cereal flakes, grated coconut) or gum base content (chewing gum), the maximum limit was assumed for the final product, as the contribution of these food categories to the total intake of the antioxidants was small.

3.2.3. Determination of food antioxidants

Of the food categories in which the antioxidants BHA, BHT and TBHQ are permitted for use in Brazil, vegetable oils, hydrogenated vegetable fat, margarine (80% fat), vegetable cream (margarine with 60% fat) and *halvarina* (margarine with 40% fat) were selected for analysis. These five categories were identified as the most representative sources of the antioxidants in the Brazilian diet, based on

data from IBGE (1998) and Datamark (1999). Three different brands (3 batches/brand) of each food were purchased in the main supermarkets of the city of Campinas, São Paulo State, and analysed for BHA, BHT and TBHQ.

The extraction procedure was carried out with acetonitrile, as recommended by AOAC (Sec. 983.15, 1990). The analysis was conducted by high performance liquid chromatography (HPLC). A Model 7725i sample injection system with a loop of 20 μ l (Rheodyne, Inc.) and a Model 510 pump (Waters Associates) were used. The detector was a Model 486 UV-vis (Water Associates), with detection at 280 nm, and the column a C₁₈ (5 μ m, 25 cm X 4,6 mm d.i., Vydac 201-TP 54). The mobile phases used were acetonitrile:methanol:5% acetic acid (25:25:50, v/v/v) and acetonitrile:methanol:5% acetic acid (42.5:42.5:15, v/v/v), for the analysis of TBHQ and BHA, and for BHT, respectively. The flow rate was 1 mL/min and the system operated at ambient conditions. Each sample was analysed in duplicate, with at least two injections.

The peak of each of the antioxidants in the samples was identified by comparing the retention time with that of a standard (Sigma Chemical Corporation). Quantitation was performed using the external standard plot method.

3.3. Results and discussion

Table 1 shows the results of the assessment of the Brazilian permitted maximum levels for BHA, BHT and TBHQ using the Budget Method. It can be noted that significant maximum use level of TBHQ is below $F_s \times 320$, indicating that the current limit is acceptable if the daily consumption of the foods containing the additive does not exceed 1/8 of the diet. According to IBGE (1998), the foods which account for TBHQ intake represent around 4% of the diet. For both BHA and BHT all the permitted use levels were higher than $F_s \times 320$, indicating that the intake of these two additives should be further investigated or uses should be revised.

In view of these preliminary results, a more refined study was conducted to estimate the theoretical maximum daily intake (TMDI) of BHA and BHT. The TMDI of TBHQ was also investigated to confirm its safety when used according to the current Brazilian legislation. The results of TMDI calculations are shown in tables 2 to 4. The calculations were based on the national maximum permitted levels of each antioxidant for each food category and on food consumption data from IBGE (1998) and Datamark (1999). It was assumed that all the considered food categories contained the maximum permitted level of the antioxidants.

Based on this maximum approach, BHA, BHT and TBHQ intakes expressed as mg/person were, respectively, 5.34, 3.24 and 4.21, using IBGE food consumption data, and 8.83, 5.75 and 7.16, using Datamark data. For a 60-kg individual, the

potential intake of these antioxidants in mg/kg bw would be 0.09, 0.05 and 0.07 (IBGE) and 0.15, 0.10 and 0.12 (Datamark). Patterns of food consumption related to age and gender, as well as high consumers of fat foods could not be identified for the present estimates as such information was not provided in the data sources.

When TMDI were estimated using data from IBGE, mean values of food consumption were used. Estimates using the highest values of food consumption, which were identified among individuals living in the metropolitan region of Curitiba, PR, were also performed. In this case, the TMDI of each antioxidant, although approximately 50% higher, was still below the corresponding ADI.

Table 5 shows the potential intake of BHA, BHT and TBHQ estimated for the period of 1997-2003, using food consumption data from Datamark (1999) and the same maximal approach of the previous calculations (Tables 2 to 4). These results indicate that the potential intakes of BHA, BHT and TBHQ have been lower than their respective ADI in all of the considered years and, despite increasing through the time, their potential intakes are unlikely to surpass the ADI. Projections made for 2003 indicate that the TMDI of BHA and BHT will correspond to less than 40% of their respective ADI while the TMDI of TBHQ will represent 20% of its ADI.

Based on these data it was concluded that the ADIs of BHA, BHT and TBHQ is unlikely to be exceeded in Brazil. It is important to emphasize that these intake estimates were based on a maximal approach assuming that all of the considered

food categories contained each antioxidant at the maximum permitted level. One can therefore expect that the actual intakes of BHA, BHT and TBHQ are even lower than their calculated TMDI and their use as food additives should be considered safe.

TMDI estimates based on Datamark were approximately 70 % higher than those calculated using IBGE food consumption data. Differences can be attributed to the fact that these surveys were carried out using different methodologies. IBGE data are obtained from household interviews in different regions of the country while Datamark used data from manufacturers of consumer products. The main differences detected were related to the consumption of vegetable oils, mayonnaise and powdered chocolate, for which Datamark presented higher values. Also, TMDI estimates based on IBGE do not account for the contribution of vegetable cream, chewing gum and coconut milk as sources of the antioxidants, because data on their consumption were not available.

In a study conducted by VERHAGEN et al (1990) based on a maximal approach, the maximum daily intake of BHA and/or BHT in the Netherlands ranged from 2.31 mg/day for children (1-3 years) to 5.76 mg/day for male adolescents (16-21 years), with an average of 4.51 mg or 0.075 mg/kg body weight for a 60-kg individual. According to the authors, these results agree with previous studies in the Netherlands and with estimations made in other countries. As shown in the present study, the potential daily intake of BHA and BHT in Brazil (0.05-0.15 mg/kg body)

is also in accordance with the previously reported data, despite the differences in dietary patterns.

To confirm that the use levels of BHA, BHT and TBHQ in Brazil do not exceed their maximum limits established by the current legislation, five categories of food representing more than 80% of the intake of these antioxidants (IBGE, 1998 and Datamark, 1999) were selected for analysis. The results (Table 6) indicate that the actual uses of BHT and TBHQ are below their maximum permitted levels. Surprisingly, BHA, widely used in the past in combination with BHT, was not detected in any of the analysed samples, in spite of being mentioned on the labels of one brand of hydrogenated vegetable fat. For all the other analysed samples, the antioxidants TBHQ and BHT were detected in all the samples whose labels had mentioned these additives, and were not detected in the products which were not labeled as containing them. A similar observation was reported by Minim & Cecchi (1996) which didn't find BHA and BHT in hydrogenated vegetable fat and margarine marketed in Brazil, in spite of at least one of them being mentioned in the product label.

Mean recoveries of TBHQ in vegetable oils, BHA in hydrogenated vegetable fat and BHT in vegetable fat, margarine, vegetable cream and *halvarina* were in the respective ranges of 103 ± 2 to $108\pm3\%$, 87 ± 0 to $98\pm1\%$, 87 ± 1 to $98\pm2\%$, 81 ± 5 to $82\pm3\%$, 78 ± 4 to $90\pm5\%$ and 78 ± 2 to $80\pm3\%$. Detection limits of BHA, BHT and TBHQ were 0.6, 2.7 and 3.0 mg/kg, respectively.

3.4. Conclusions

Despite a public concern about the use of the phenolic antioxidants BHA, BHT and TBHQ in food due to their possible toxicological effects, the intake of such additives in Brazil does not seem to represent a potential risk to the population. This conclusion is supported by the daily intake estimates made for each of the compounds and by the actual use of these antioxidants in selected food categories representing more than 80% of their total intake.

Projection for the year 2003, according to Datamark (1999), suggests that even with the increase of individual food consumption it is unlikely that the ADI of these three antioxidants will be exceeded.

We note that although recent national implementation of Mercosur Resolutions have extended BHT, BHA and TBHQ uses to a few additional food categories, the maximum permitted levels have not increased and the current pattern of use of these antioxidants is not expected to change in the near future.

The results of this study were submitted to the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) for evaluation. Other countries have submitted results of intake estimates for BHA, BHT and TBHQ, using different methods based on national maximum permitted levels of use and on maximum limits specified in the draft General Standard for Food Additives (GSFA). The Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC) have noted that intake estimates based on

national maximum permitted levels of use for BHA, BHT and TBHQ were below their ADIs, but exceeded their ADIs when they were based on the maximum limits and range of foods specified in the draft GSFA. The differences arise because the range of foods specified in the draft GSFA is wider and the proposed levels of use in specified food categories are generally higher than those specified in national standards. The Expert Committee identified food groups in the draft GSFA that could potentially contribute to high intakes of BHA, BHT and TBHQ and may wish to review the appropriate levels of these antioxidants for these foods (WHO 2000).

3.5. References

- A.O.A.C. - **Official Methods of Analysis**, 15.ed. Arlington, Virginia: Association of Official Analytical Chemists, 1990. section 983.15.
- Barlow, S.M., 1997, Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In: Hudson, B.J.F. *Food Antioxidants*, Elsevier Applied Science, 253-307.
- Brazil. **Resolução Nº 04/88 - CNS/MS**, publicada no Diário Oficial da União, 24 de Novembro de 1988. In: ABIA - Compêndio da Legislação de Alimentos - Atos do Ministério da Saúde. 7ª revisão, 1998.
- Charteris, W.P., 1995 Minor ingredients of edible table spreads. *Journal of the Society of Dairy Technology*, **48**(4), 101-106.
- CAC, 1989, Report of the twenty-first session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Codex Alimentarius Commission, Food and Agriculture Organization of the United Nations, ALINORM **89/12^A**, Roma.
- CAC, 1996, Codex risk assessment and management procedures: proposed exposure assessment methods in support of the Codex general standard for food additives. CX/FAC **97/5**, october.
- Coulter, R.B., 1988, Extending shelf life by using traditional phenolic antioxidants. *Cereal Foods World*, **33**(2), 207-210.

- Datamark Ltda., 1999. Brazil Trend'99 - Trends in the packaged goods market, 8th ed., São Paulo, SP.
- Dorko, C., 1994, Antioxidants used in food. *Food Technology*, **48**(4), 3.
- Dougherty, M.E., 1993, Effectiveness of natural antioxidants compared to synthetic antioxidants. *International Food Ingredients*, **3**, 27-32.
- IBGE, 1998. POF - Pesquisa de orçamentos familiares, 1995-1996, vol. 2. Consumo alimentar domiciliar per capita. Rio de Janeiro, RJ.
- Lavers, B., 1991 Rancidity restrained. *Food Processing*, **60**(7), 11-12.
- Madhavi, D.L. and Salunkhe, D.K., 1997, Antioxidants. In: Maga, J.A. e Tu, A.T. *Food Additive Toxicology*, Marcel Dekker, Inc., 89-177.
- Minim, V.P.R. and Cecchi, H.M. 1996. Antioxidantes em alimentos. *Revista Nacional da Carne*, **227**, 37-38.
- Sherwin, E.R., 1990, Antioxidants. In: Branen, A.L.; Davidson, P.M. and Salminen, S. *Food Additives*, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 139-193.
- Verhagen, H.; Deerenberg, I.; Marx, A.; ten Hoor, F.; Henderson, P.Th. and Kleijans, J.C.S., 1990, *Food and Chemical Toxicology*, **28**(4), 215-220.

Table 1 - Assessment of national maximum significant levels of BHA, BHT and TBHQ through the Budget Method (CAC, 1999)

	Food Antioxidant		
	BHA	BHT	TBHQ
ADI (mg/kg bw)	0,5	0,3	0,7
Significant maximum permitted level (mg/kg)*	200	200	200
$F_s \times \text{ADI} \times 40$	20	12	28
$F_s \times \text{ADI} \times 80$	40	24	56
$F_s \times \text{ADI} \times 160$	80	48	112
$F_s \times \text{ADI} \times 320$	160	96	224

BHA, BHT e TBHQ are used only in solid food: $F_s=1,0$ and $F_B=0,0$

* Source: Brazil - Resolution Nº 04/88 - CNS/MS, November 24, 1988.

Table 2 - Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI) of BHA

Food category	National maximum permitted level (mg/kg)*	Average daily intake (g/person)		TMDI (mg/person)	
		1	2	1	2
Vegetable oils	200		31.45		6.29
Soybean oil	200	19.01		3.80	
Corn oil	200	0.55		0.11	
Vegetable fat	200	0.23	0.57	0.05	0.11
Margarine	200	4.00	4.01	0.80	0.80
Vegetable cream	200	n.a.	1.71	-	0.34
Mayonnaise	200	0.96	2.38	0.19	0.48
Cereal flakes	200 ^a	0.30	0.45	0.06	0.09
Chewing gum	100 ^b	n.a.	0.97	-	0.10
Grated coconut	100 ^c	0.08	0.23	0.01	0.02
Coconut milk	100	n.a.	0.71	-	0.07
Powdered chocolate	200	1.58	2.63	0.32	0.53
			Total	5.34	8.83
				(0.09 mg/kg bw)	(0.15 mg/kg bw)

* Source: Brazil - Resolution Nº 04/88 - CNS/MS, November 24, 1988.

n. a.: not available

1: based on IBGE data (1998)

2: based on Datamark data (1999)

a: based on oil content

b: based on gum base content

c: based on fat content

Table 3 - Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI) of BHT

Food category	National maximum permitted level (mg/kg)*	Average daily intake (g/person)		TMDI -IBGE (mg/person)	
		1	2	1	2
Vegetable oils	100		31.45		3.15
Soybean oil	100	19.01		1.90	
Corn oil	100	0.55		0.06	
Vegetable fat	100	0.23	0.57	0.02	0.06
Margarine	200	4.00	4.01	0.80	0.80
Vegetable cream	200	n.a.	1.71	-	0.34
Mayonnaise	100	0.96	2.38	0.10	0.24
Cereal flakes	100 ^a	0.30	0.45	0.03	0.05
Chewing gum	500 ^b	n.a.	0.97	-	0.49
Grated coconut	100 ^c	0.08	0.23	0.01	0.02
Coconut milk	100	n.a.	0.71	-	0.07
Powdered chocolate	200	1.58	2.63	0.32	0.53
			Total	3.24	5.75
				(0.05 mg/kg bw)	(0.10 mg/kg bw)

* Source: Resolution Nº 04/88 - CNS/MS, November 24, 1988.

n. a.: not available

1: based on IBGE data (1998)

2: based on Datamark data (1999)

a: based on oil content

b: based on gum base content

c: based on fat content

Table 4 - Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI) of TBHQ

Food category	National maximum permitted level (mg/kg)*	Average daily intake (g/person)		TMDI (mg/person)	
		1	2	1	2
Vegetable oils	200		31.45		6.29
Soybean oil	200	19.01		3.80	
Corn oil	200	0.55		0.11	
Vegetable fat	200	0.23	0.57	0.05	0.11
Margarine	n.p.	4.00	4.01	-	-
Vegetable cream	n.p.	n.a.	1.71	-	-
Mayonnaise	200	0.96	2.38	0.19	0.48
Cereal flakes	200 ^a	0.30	0.45	0.06	0.09
Chewing gum	200 ^b	n.a.	0.97	-	0.19
Grated coconut	n.p.	0.08	0.23	-	-
Coconut milk	n.p.	n.a.	0.71	-	-
Powdered chocolate	n.p.	1.58	2.63	-	-
			Total	4.21	7.16
				(0.07 mg/kg bw)	(0.12 mg/kg bw)

* Source: Resolution Nº 04/88 - CNS/MS, November 24, 1988.

n. a.: not available

n. p.: not permitted

1: based on IBGE data (1998)

2: based on Datamark data (1999)

a: based on oil content

b: based on gum base content

Table 5 - Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI) of BHA, BHT and TBHQ in Brazil (mg/kg body weight)

Antioxidant	ADI (mg/kg body weight)	Reference year*			
		1997	1998	1999**	2003**
BHA	0.5	0.14	0.15	0.15	0.17
BHT	0.3	0.09	0.10	0.10	0.11
TBHQ	0.7	0.11	0.12	0.12	0.14

*source of food consumption: Datamark (1999)

**based on projections

Table 6 - Levels of BHT and TBHQ in selected food categories

Food category	n	Antioxidant detected	Maximum permitted level (mg/kg)	Mean detected level (mg/kg)
soybean oil	9	TBHQ	200	81.8
corn oil	9	TBHQ	200	18.9
hydrogenated vegetable fat	9	BHT	100	63.7
margarine	9	BHT	200	33.5
vegetable cream	9	BHT	200	45.5
halvarina	9	BHT	200	151.7

n: number of analysed samples

CAPÍTULO 4

DETERMINAÇÃO DE BHA, BHT E TBHQ EM ÓLEOS E GORDURAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Artigo aceito para publicação no *Brazilian Journal of Food Technology*

RESUMO

Amostras de óleos de soja e milho, gordura vegetal hidrogenada, margarina, creme vegetal e halvarina foram obtidas nos principais supermercados da cidade de Campinas, SP. Análises cromatográficas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram conduzidas a fim de determinar a concentração dos antioxidantes BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno) e TBHQ (terc-butil hidroquinona) em tais produtos. As recuperações médias obtidas para BHA, BHT e TBHQ variaram, respectivamente, entre 87 ± 0 e 98 ± 1 , 78 ± 4 e 98 ± 2 e 103 ± 2 e $108\pm3\%$. Os limites de detecção, em mg/kg, foram de 0,6 (BHA), 2,7 (BHT) e 3,0 (TBHQ). Níveis variados de antioxidantes foram encontrados em diferentes marcas dos mesmos produtos, bem como em diferentes lotes de marcas iguais, no caso de alguns produtos. Concentrações na faixa de n.d. ($<3,0$ mg/kg) a 143 ± 9 mg TBHQ/kg e n.d. ($<2,7$ mg /kg) a 197 ± 3 mg BHT/kg foram determinadas, respectivamente, em óleos vegetais e nos demais produtos. BHA não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. Os níveis de antioxidantes detectados na maioria das amostras analisadas encontram-se abaixo dos respectivos limites máximos permitidos pela legislação brasileira. Notou-se um aumento da utilização do TBHQ em substituição às combinações de BHA e BHT, bastante empregadas no passado.

Palavras-chave: antioxidantes, BHA, BHT, TBHQ, CLAE

SUMMARY

Samples of soybean and corn oil, hydrogenated vegetable fat, margarine, vegetable cream and "halvarinas" were purchased in the main supermarkets of the city of Campinas, SP. HPLC analysis were conducted to determine the content of the antioxidants BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene) and TBHQ (tert-butylhydroquinone) in these samples. Mean recoveries obtained for BHA, BHT and TBHQ were, respectively, in the range of 87 ± 0 - 98 ± 1 , 78 ± 4 - 98 ± 2 and 103 ± 2 - $108\pm3\%$. Detection limits, in mg/kg, were 0.65 (BHA), 2.68 (BHT) e 3.04 (TBHQ). Variable levels of antioxidants were found within different brands of the same products and within different batches of the same brand, for certain products. Concentrations in the range of n.d. (<3.0 mg/kg) to 143 ± 9 mg TBHQ/kg and n.d. (<2.7 mg /kg) to 197 ± 3 mg BHT/kg were determined in vegetable oils and in the other analysed products. BHA was not found in the analysed samples. The levels of antioxidants found in most of the analysed samples are below their respective maximum permitted levels, according to the Brazilian legislation. Also, an increased use of TBHQ was observed in substitution to the mixture of BHA and BHT, widely used in the past.

Key words: antioxidants, BHA, BHT, TBHQ, HPLC

4.1. Introdução

A oxidação é uma das maiores causas da deterioração de alimentos, sendo responsável pela degradação de sabor, odor, textura, consistência e aparência, além da perda de valor nutricional, decorrente da degradação de ácidos graxos essenciais, como o ácido linoleico, e vitaminas lipossolúveis (A, D e E) (SIMS & FIORITI, 1990; BUCK, 1991; CHARTERIS, 1995). A adição de antioxidantes é uma forma geralmente efetiva e de custo relativamente baixo de retardar o processo oxidativo, aumentando a vida de prateleira de diversos tipos de alimentos (COPPEN, 1994).

Antioxidantes são definidos pela legislação brasileira como substâncias que retardam alterações oxidativas em alimentos (Portaria nº 540, de 27/10/97). Para que sejam efetivos, tais compostos devem ser adicionados aos alimentos tão cedo quanto possível, seja no processo de fabricação ou no produto acabado, já que não são capazes de reverter a oxidação de produtos já rancificados (GIESE, 1996).

Com base em sua forma de atuação, os antioxidantes são classificados em primários (ou bloqueadores de cadeia), sinergistas e secundários. Antioxidantes primários atuam como doadores de hidrogênio ou de elétrons aos radicais livres, formando produtos mais estáveis e interrompendo, desta forma, a reação de oxidação em cadeia (MADHAVI & SALUNKHE, 1997).

Centenas de substâncias naturais e sintéticas já foram avaliadas quanto à atividade antioxidante, porém apenas algumas tiveram seu uso regulamentado. Entre os antioxidantes sintéticos aprovados, apenas quatro compostos apresentam ampla utilização em alimentos: butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), *terc*-butil hidroquinona (TBHQ) e, com menor frequência, galato de propila (PG). Tais compostos pertencem ao grupo dos antioxidantes primários e atendem à maioria das necessidades de proteção de óleos e gorduras contra a oxidação (SHERWIN, 1990; DORKO, 1994).

A principal preocupação quanto ao uso de antioxidantes está relacionada aos possíveis efeitos toxicológicos associados a estes compostos. Em vista disto, a determinação analítica dos níveis de antioxidantes em alimentos é essencial para certificar que os níveis de uso permitidos pela legislação não estejam sendo ultrapassados e, ao mesmo tempo, verificar se as quantidades reais de antioxidantes utilizadas são suficientes para manter a qualidade dos alimentos. Além disto, dados analíticos da concentração real de antioxidantes presente em diferentes alimentos podem ser utilizados para estimar a ingestão potencial destes compostos pela população, de forma a garantir sua segurança de uso.

Os métodos utilizados para detecção e quantificação de antioxidantes sintéticos em alimentos foram extensivamente revisados por diversos autores, como STUCKEY & OSBORNE (1965), ENDEAN (1976), FORN (1981), ROBARDS & DILLI (1987), KOCHAR & ROSSEL (1997) e RAJALAKSHMI & NARASIMHAN (1997). Tais métodos incluem principalmente colorimetria, espectrofotometria,

cromatografia (papel, gel, camada delgada, gás, gás-líquido e líquida de alta eficiência) e, com menor frequência, voltametria, polarografia e densitometria (RAJALAKSHMI & NARASIMHAN, 1997).

Em função de suas limitações, os métodos colorimétricos e espectrofotométricos, amplamente utilizados no passado, têm sido substituídos por outras técnicas, como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (KOCHAR & ROSSEL, 1997), este último bastante estudado e aplicado por diversos pesquisadores para determinação de antioxidantes fenólicos (PAGE, 1979, 1983, 1993; VAN NIEKERK & DU PLESSIS, 1980; ARCHER, 1981; INDYK & WOOLLARD, 1986; ANDERSON & VAN NIEKERK, 1987; ANDRIKOPOULOS et al, 1991; CHEN & FU, 1995).

O presente artigo apresenta os resultados da determinação analítica por CLAE dos antioxidantes fenólicos BHA, BHT e TBHQ em amostras de óleos, gorduras e derivados comercializados na região de Campinas, SP. O estudo foi conduzido com o objetivo de verificar se as concentrações destes aditivos nos alimentos analisados encontram-se dentro dos respectivos limites máximos estabelecidos pela legislação nacional vigente. Os valores de concentração determinados foram utilizados, também, em estudo de ingestão realizado para estes antioxidantes.

4.2. Metodologia

4.2.1. Amostras

Amostras de óleos de soja e milho, gordura vegetal hidrogenada, margarina, creme vegetal e halvarina foram coletadas nos principais hipermercados da cidade de Campinas, SP. Foram selecionadas três marcas comerciais de cada produto, tendo sido analisados três lotes diferentes de cada marca, num total de nove amostras por produto. As análises foram conduzidas em duplicata, num período máximo de dois meses após a data de fabricação das amostras.

4.2.2. Extração

O método utilizado para a extração dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ foi o indicado pela AOAC (Seção 983.15, 1990), conforme descrito a seguir:

- **Óleos:** pesar 20 gramas de amostra (óleos de soja e milho) em béquer de 50 mL e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, lavando o béquer e completando o volume com hexano. Após homogenização, pipetar uma alíquota de 25 mL e transferir para um funil de separação de 125 mL. Extrair com três porções de 50 mL de acetonitrila saturada com hexano, coletando os extratos em balão de 250 mL. Evaporar até obter um volume de 3-4 mL, em evaporador rotatório com banho de água à temperatura menor que 40°C, por um

tempo máximo de 10 minutos, a fim de evitar perdas de TBHQ. Transferir o concentrado para um cilindro graduado de 10 mL, lavando o frasco e a pipeta com pequenas porções de acetonitrila não saturada e transferindo estas porções para o cilindro, até que um volume de 5 mL seja obtido; continuar a lavagem com pequenas porções de 2-propanol, transferindo para o cilindro, até obter um volume total de 10 mL. Injetar 20 μ L desta solução na coluna cromatográfica.

- *Gorduras*: pesar 10 gramas de amostra íntegra (gordura vegetal, margarina, creme vegetal, halvarina) em béquer de 150 mL, adicionar 30 mL de hexano e dissolver a amostra, aquecendo se necessário. Transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, lavando o béquer e completando o volume com hexano. Continuar a extração conforme descrito anteriormente para óleos.

4.2.3. Procedimentos Cromatográficos

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi a técnica utilizada na determinação dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ nas amostras de óleos e gorduras. As condições cromatográficas utilizadas foram adaptadas a partir da metodologia descrita por PAGE (1979, 1983) e do método da AOAC (Seção 983.15, 1990).

O sistema cromatográfico foi consituído por bomba Waters 510, injetor manual Rheodyne™ 7725i com alça de injeção de 20 µL e detector UV Waters 486 de comprimento de onda variável. A coluna utilizada foi a Vydac 201 - TP 54, C₁₈, 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 µm. As fases móveis utilizadas foram: **(I)** acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (25:25:50, v/v), para determinação de TBHQ e BHA, e **(II)** acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v), para BHT. Em todas as análises, o fluxo foi de 1 mL/min. Foram feitas, no mínimo, duas injeções por duplicata.

Os picos de cada antioxidante nas amostras analisadas foram identificados por comparação de seus tempos de retenção com o dos respectivos padrões (Sigma Chemical Corporation). A quantificação foi feita por padronização externa. As soluções padrão foram preparadas com acetonitrila:2-propanol (1:1), a partir de soluções-estoque (1 mg/mL) de cada antioxidante, segundo as recomendações da AOAC (1990).

Um indicativo para confirmação da identidade dos picos foi obtido através de mudança das fases móveis, mantendo-se as demais condições da análise, comparando-se então os deslocamentos apresentados pelos picos das amostras com os dos respectivos padrões. As fases móveis utilizadas nesta etapa foram: **(III)** acetonitrila:água:metanol (36:60:4, v/v), para BHA e TBHQ, e **(IV)** acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v), para BHA e BHT. Cumpre salientar que tal procedimento não é, entretanto, conclusivo para a confirmação dos picos; para

a confirmação efetiva dos mesmos, outros parâmetros deveriam ser utilizados em conjunto, tais como: espectros de absorvância, reações químicas específicas e espectros de massas.

4.2.4. Recuperação do Método

Estudos de recuperação foram realizados, adicionando-se às amostras, durante a etapa de extração, quantidades conhecidas dos padrões de antioxidantes, em três níveis diferentes.

4.2.5. Limites de Detecção

Os limites de detecção dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ foram estimados com padrões, realizando-se diluições sucessivas e determinando a menor concentração detectável, aproximadamente 3 vezes a amplitude do ruído do equipamento. Foram então adicionadas concentrações de antioxidantes (padrões) equivalentes ao dobro deste valor a óleo de soja (no caso do TBHQ) e a gordura vegetal (no caso do BHA e do BHT) que não continham originalmente os antioxidantes adicionados. Foram feitas 7 recuperações para cada antioxidante, seguindo a mesma metodologia anteriormente descrita e calcularam-se as respectivas médias e desvios padrão. Os limites de detecção foram considerados como sendo 3 vezes o desvio padrão em cada caso (GLASER et al, 1981).

4.3. Resultados e discussão

As condições cromatográficas utilizadas foram adequadas para a determinação de BHT e TBHQ nas amostras analisadas (BHA não foi detectado nas mesmas). Fases móveis distintas foram empregadas para a determinação de tais compostos, em virtude de não se ter obtido a resolução simultânea dos mesmos nas condições utilizadas. A fase móvel (I) permitiu a detecção simultânea de BHA e TBHQ, enquanto que com a fase móvel (II) apenas o BHT pode ser detectado. As fases móveis (III) e (IV), utilizadas para se obter um indicativo da confirmação dos picos, permitiram, por sua vez, a resolução simultânea de BHA/TBHQ e BHA/BHT, respectivamente. Na Tabela 1, são apresentados os tempos de retenção de cada antioxidante nas diferentes fases móveis empregadas e, nas Figuras 1 e 2, encontram-se cromatogramas correspondentes aos padrões analíticos (BHA, BHT e TBHQ).

Os resultados dos estudos de recuperação são apresentados na Tabela 2. A recuperação média do BHA em gordura vegetal foi de 87 ± 0 a $98 \pm 1\%$ e a do BHT em gordura vegetal, margarina, creme vegetal e halvarina esteve nas faixas respectivas de 87 ± 1 a $98 \pm 2\%$, 81 ± 5 a $82 \pm 3\%$, 78 ± 4 a $90 \pm 5\%$ e 79 ± 2 a $80 \pm 3\%$. Para o TBHQ, a recuperação média obtida em óleos vegetais foi de 103 ± 2 a $108 \pm 3\%$. Estes resultados são compatíveis com os valores reportados na literatura (PAGE, 1979; PAGE, 1993; YAMADA et al, 1993; CHEN & FU, 1995). Dentre os três antioxidantes em estudo, o BHT foi o que apresentou o menor nível

de recuperação. Segundo PAGE (1979, 1983, 1993), que realizou diversos estudos colaborativos com antioxidantes fenólicos e obteve resultados semelhantes, a baixa recuperação do BHT em relação aos demais antioxidantes se deve à extração incompleta do composto ou a perdas do mesmo durante a extração.

No caso do BHA, os valores de CV (0-1,1%) foram menores que os relatados por PAGE (1983), entre 3,35 e 5,22%, e por PAGE (1993), de 2,56 a 4,97%; tais valores estão, também, dentro da faixa reportada por YANG et al (1993), 0,63-6,21%. Os valores de CV para o BHT (na faixa de 1,2 a 6%) estão dentro das faixas reportadas por PAGE (1983) e por YANG et al (1993), respectivamente 2,89-6,66% e 0,35-6,81%; alguns dos valores obtidos são, porém, maiores que os relatados por PAGE (1993), 3,22-5,27%. Para o TBHQ, os valores de CV, entre 1,9 a 2,8%, foram um pouco maiores que o relatado por ARCHER (1981), igual a 1,8%, porém menores que os valores encontrados por PAGE (1983, 1993), respectivamente nas faixas de 5,46-22,1 e 3,63-7,85; tais valores encontram-se também dentro da faixa reportada por YANG et al (1993), que foi de 0,14 a 3,73. Os dados da literatura citados referem-se a gordura animal, no caso de BHA e BHT, e a óleos vegetais, no caso do TBHQ.

Os limites de detecção dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ, nas condições utilizadas no presente trabalho, foram 0,6, 2,7 e 3,0 mg/kg, respectivamente, dentro da faixa relatada na literatura (0,6 a 3,0 mg/kg) (PAGE, 1979; KITADA et

al, 1984; PAGE & CHARBONNEAU, 1989; YAMADA et al; 1993; IRACHE et al, 1997).

Os resultados da determinação analítica dos antioxidantes TBHQ e BHT são apresentados nas Tabelas 3 a 7. O BHA não foi encontrado em nenhuma das amostras analisadas. Nas Figuras 3 a 6 são apresentados cromatogramas típicos obtidos para cada uma das matrizes analisadas.

As concentrações médias de TBHQ encontradas nos óleos vegetais foi bastante variável, desde não detectado (marcas B e D) até 143 ± 9 mg/kg (marca A). Nos óleos de milho das marcas B e D, cujos rótulos não declaravam a presença do antioxidante, o mesmo realmente não foi detectado. Convém salientar que mesmo o maior teor de TBHQ determinado (marca A) encontra-se abaixo do limite máximo permitido pela legislação brasileira (200 mg TBHQ/ kg).

Dentre as três marcas de gordura vegetal analisadas, em apenas duas (marcas E e F) foi detectado o antioxidante BHT, sendo que as concentrações encontradas em duas das três amostras analisadas da marca E foram superiores à permitida pela legislação (100 mg BHT/kg). A marca F apresentou quantidade de antioxidante de acordo com tal limite e, na marca G, cujo rótulo não previa o uso do antioxidante, o composto realmente não foi encontrado. O antioxidante BHA, embora declarado no rótulo da marca E, não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas, mesmo quando se utilizaram diferentes fases móveis (descritas na Metodologia). Em margarina e creme vegetal, não foram observadas

grandes variações de conteúdo de BHT em lotes diferentes da mesma marca e, além disto, todas as amostras analisadas apresentaram níveis de antioxidante inferiores ao máximo permitido pela legislação (200 mg BHT/kg), na faixa de não detectado a 109 ± 1 mg/kg. Com exceção da marca F, as amostras de halvarina apresentaram concentrações de BHT praticamente no limite máximo permitido pela legislação (200 mg BHT/kg), havendo pouca variação entre lotes diferentes da mesma marca.

Pelos resultados obtidos, observou-se a presença de apenas um antioxidante, dentre os três em estudo, em cada produto analisado: TBHQ em óleos vegetais e BHT nas demais matrizes. Estes resultados estão de acordo com a literatura, já que o TBHQ é considerado o antioxidante mais efetivo para óleos ou gorduras utilizados em processos de fritura, enquanto o BHT e o BHA são os mais indicados para gorduras e produtos forneados, devido à sua resistência a processos desta natureza. Até há alguns anos, combinações de BHA e BHT eram de amplo uso em diversos tipos de alimentos gordurosos, embora já se conhecesse a maior eficiência do TBHQ (TOLEDO et al, 1985).

Em estudo conduzido por MINIM (1991), amostras comerciais de gordura vegetal hidrogenada e margarina, cujos rótulos declaravam a presença BHA e/ou BHT, foram analisadas por espectrofotometria na região UV, colorimetria e cromatografia em camada delgada (CCD-UV e CCD-colorimetria). Foi detectada a presença de antioxidante (BHA) em apenas uma das amostras de gordura vegetal

hidrogenada, em concentração inferior ao limite máximo permitido pela legislação brasileira vigente na época do estudo.

Segundo informações fornecidas por representantes de antioxidantes no Brasil (comunicação pessoal), o TBHQ, apesar de mais eficiente, apresenta maior custo que o BHA e o BHT. Estes últimos, com menor custo e eficiência, são os antioxidantes geralmente utilizados em produtos que permanecem por pouco tempo nas prateleiras, como é caso das gorduras para uso doméstico, que costumam ser vendidas muito antes do final de sua vida útil. Entretanto, de acordo com a mesma fonte consultada, o BHA tem sido raramente utilizado na forma isolada, sendo normalmente encontrado em algumas formulações específicas de antioxidantes. O TBHQ, por sua vez, é geralmente adicionado a óleos acondicionados em embalagens plásticas, como é o caso das amostras analisadas neste trabalho, já que as embalagens metálicas funcionam como barreira à oxidação e podem dispensar o uso de antioxidantes. Realmente, a ausência de antioxidantes foi confirmada em análises preliminares com óleos acondicionados em embalagens metálicas, o que descartou sua inclusão no presente estudo.

Com relação às variações de concentração encontradas entre marcas diferentes de um mesmo produto ou mesmo entre lotes de mesma marca, foram também consultados fabricantes de óleos e gorduras. Conforme relatado, estas variações são geralmente decorrentes de falhas na etapa de mistura dos antioxidantes ao óleo ou gordura, além de variação nas quantidades efetivamente adicionadas a

diferentes produtos e a lotes diferentes de um mesmo produto. Além disto, não pode ser descartada uma eventual degradação dos antioxidantes nas etapas de armazenamento, transporte e distribuição dos alimentos.

4.4. Conclusões

Pelos resultados obtidos, observou-se que o BHT e o TBHQ são os antioxidantes fenólicos mais utilizados atualmente no Brasil, em óleos, gorduras e derivados. As concentrações destes antioxidantes encontradas na maioria dos alimentos analisados (óleos de soja e milho, gordura vegetal hidrogenada, margarina, creme vegetal e halvarina) apresentaram-se de acordo com os níveis máximos permitidos pela legislação brasileira, exceto no caso de uma das três marcas de gordura vegetal (marca F), cujas concentrações de BHT em dois lotes analisados superaram o limite máximo permitido (100 mg/kg) em aproximadamente 30%.

Notou-se, também, que não há um controle muito rigoroso das quantidades de antioxidantes adicionadas aos alimentos, o que na verdade deveria ser feito de forma adequada, a fim de garantir tanto a segurança do consumo destes aditivos, como uma conservação eficiente dos alimentos contra a oxidação.

Tabela 1 – Tempo de retenção de BHA, BHT e TBHQ em diferentes fases móveis

Antioxidante	Tempo de retenção			
	(I)	(II)	(III)	(IV)
BHA	10,33	-	15,25	4,23
BHT	-	5,29	-	11,33
TBHQ	5,01	-	5,90	-

(I): acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (25:25:50, v/v)

(II): acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v)

(III): acetonitrila:água:metanol (36:60:4, v/v)

(IV): acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v)

Tabela 2 - Recuperação de antioxidantes em óleos e gorduras

Produto	Antioxidante	Nível de Fortificação (mg/kg)	Recuperação* (%)	CV (%)
Óleo vegetal	TBHQ	21,7	108±3	2,8
		43,4	107±2	1,9
		100,9	103±2	1,9
Gordura vegetal hidrogenada	BHA	32,6	98±1	1,0
		65,0	92±1	1,1
		161,1	87±0	0
	BHT	33,7	98±2	2,0
		82,9	87±1	1,2
		165,2	91±5	5,5
Margarina	BHT	32,5	81±5	6,2
		81,1	81±1	1,2
		161,7	82±3	3,7
Creme vegetal	BHT	32,3	90±5	5,6
		80,3	88±4	4,6
		163,2	78±4	5,1
Halvarina	BHT	31,5	78±2	2,6
		78,4	80±3	3,8
		157,3	79±2	2,5

* Os valores são média de 4 determinações ± estimativa do desvio padrão

Tabela 3 - Concentração de TBHQ em óleos vegetais

Óleo vegetal	Marca	Lote	Concentração* (mg/kg)
Soja	A	1	137 ± 6
		2	137 ± 3
		3	143 ± 9
	B	1	93 ± 1
		2	69,5 ± 0,2
		3	75 ± 6
	C	1	30 ± 5
		2	39,0 ± 0,2
		3	14,1 ± 0,6
Milho	A	1	53 ± 2
		2	56 ± 6
		3	62 ± 3
	B	1	n.d.
		2	n.d.
		3	n.d.
	D	1	n.d.
		2	n.d.
		3	n.d.

* Os valores são média de 4 determinações ± estimativa do desvio padrão

n.d.: não detectado (<3,0 mg/kg)

Tabela 4 - Concentração de BHT em gordura vegetal hidrogenada

Marca	Lote	Concentração* (mg/kg)
E	1	121 ± 9
	2	93 ± 2
	3	125 ± 5
F	1	81 ± 2
	2	78,8 ± 0,9
	3	75 ± 2
G	1	n.d.
	2	n.d.
	3	n.d.

* Os valores são média de 4 determinações ± estimativa do desvio padrão

n.d.: não detectado (<2,7 mg/kg)

Tabela 5 - Concentração de BHT em margarina

Marca	Lote	Concentração*
		(mg/kg)
F	1	67 ± 2
	2	63 ± 2
	3	$69,4 \pm 0,8$
G	1	$34,2 \pm 0,7$
	2	36 ± 2
	3	32 ± 2
H	1	n.d.
	2	n.d.
	3	n.d.

* Os valores são média de 4 determinações $\pm$ estimativa do desvio padrão

n.d.: não detectado (<2,7 mg/kg)

Tabela 6 - Concentração de BHT em creme vegetal

Marca	Lote	Concentração* (mg/kg)
B	1	n.d.
	2	n.d.
	3	n.d.
F	1	92 ± 5
	2	99 ± 5
	3	109 ± 1
G	1	34 ± 4
	2	43,0 ± 0,9
	3	34 ± 3

* Os valores são média de 4 determinações ± estimativa do desvio padrão

n.d.: não detectado (<2,7 mg/kg)

Tabela 7 - Concentração de BHT em halvarina

Marca	Lote	Concentração* (mg/kg)
F	1	79 ± 5
	2	71 ± 6
	3	78,1 ± 0,6
G ₁	1	192,4 ± 0,7
	2	188 ± 4
	3	194 ± 6
G ₂	1	197 ± 3
	2	173 ± 9
	3	194 ± 6

* Os valores são média de 4 determinações ± estimativa do desvio padrão

n.d.: não detectado (<2,7 mg/kg)

G₁ e G₂: marcas diferentes de um mesmo fabricante

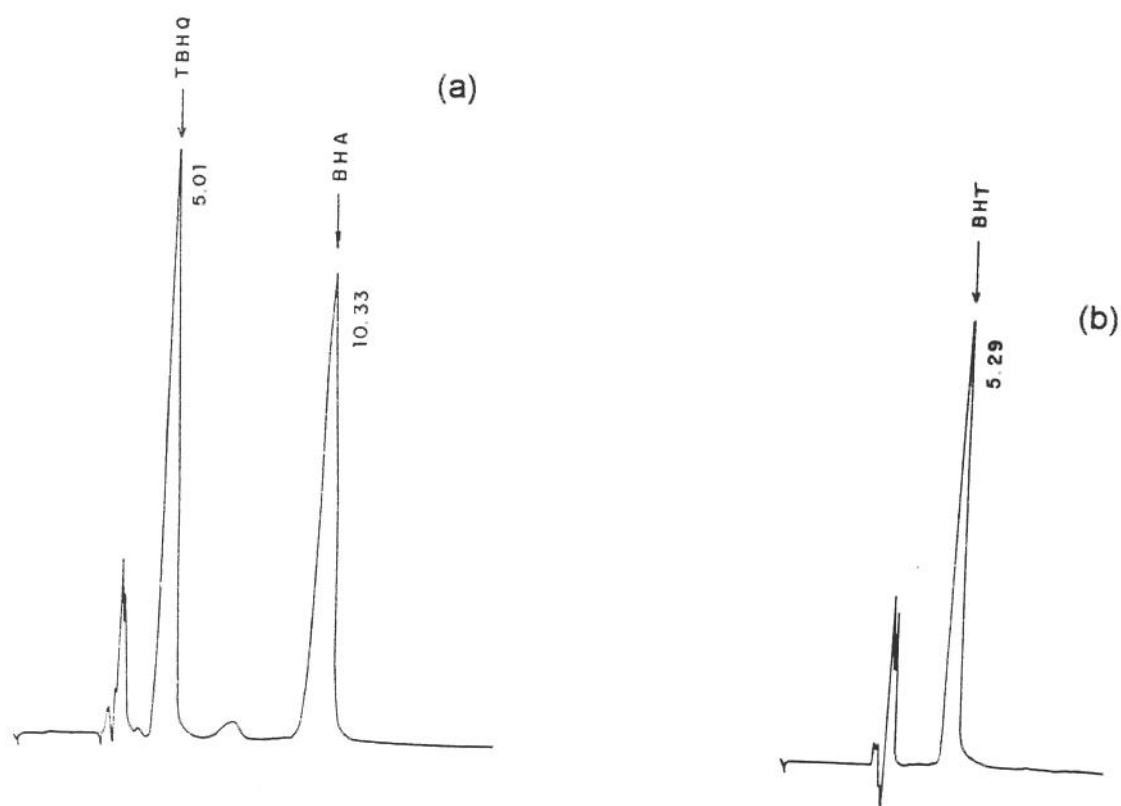


Figura 1 - Cromatogramas por CLAE - padrões analíticos. (a) TBHQ, BHA, (b) BHT. Condições cromatográficas: fases móveis **(I)** acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (25:25:50, v/v), **(II)** acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v), coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), fluxo 1 mL/min., detector UV-vis fixado a 280 nm. BHA = butil hidroxianisol, BHT = butil hidroxitolueno, TBHQ = *terc*- butil hidroquinona.

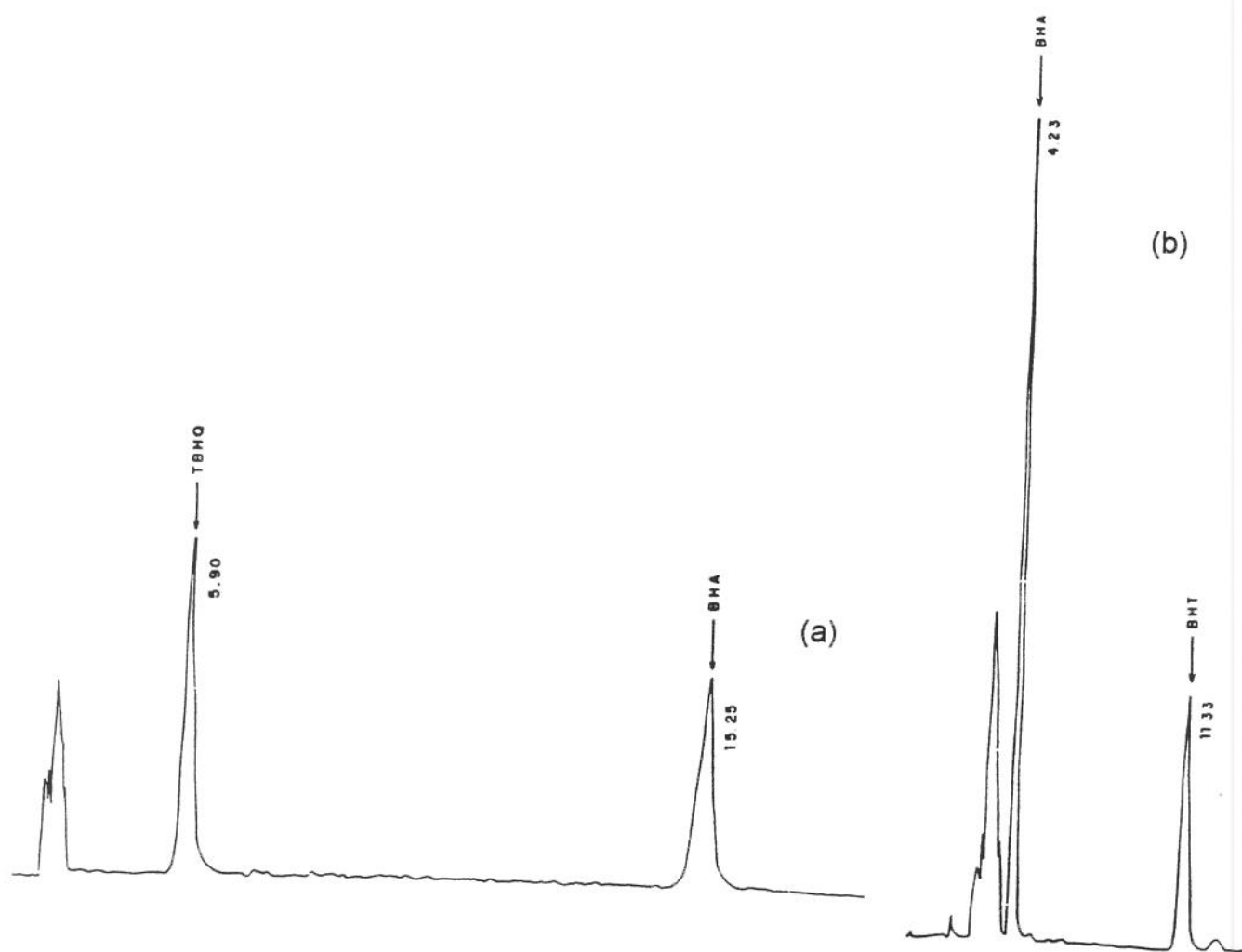


Figura 2 - Cromatogramas por CLAE - padrões analíticos. (a) TBHQ, BHA, (b) BHA, BHT. Indicativo da confirmação dos picos. Condições cromatográficas: fases móveis (III) acetonitrila:água:metanol (36:60:4, v/v), (IV) acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v), coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), fluxo 1 mL/min., detector UV-vis fixado a 280 nm. BHA = butil hidroxianisol, BHT = butil hidroxitolueno, TBHQ = *terc*- butil hidroquinona.

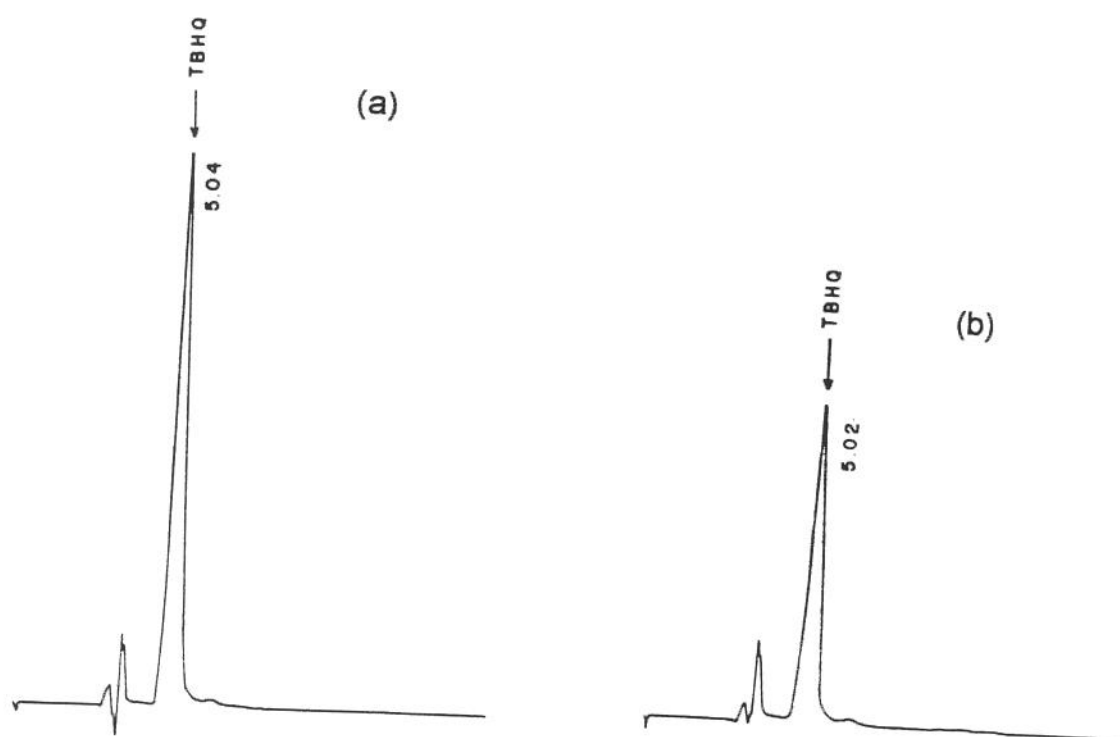


Figura 3 - Cromatogramas por CLAE. (a) óleo de soja (marca B), (b) óleo de milho (marca A). Condições de análise: fase móvel (I): acetonitrila: metanol: ácido acético 5% (25:25:50, v/v), coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), fluxo 1 ml/min., detector UV-vis fixado a 280 nm. TBHQ = *terc*-butil hidroquinona.

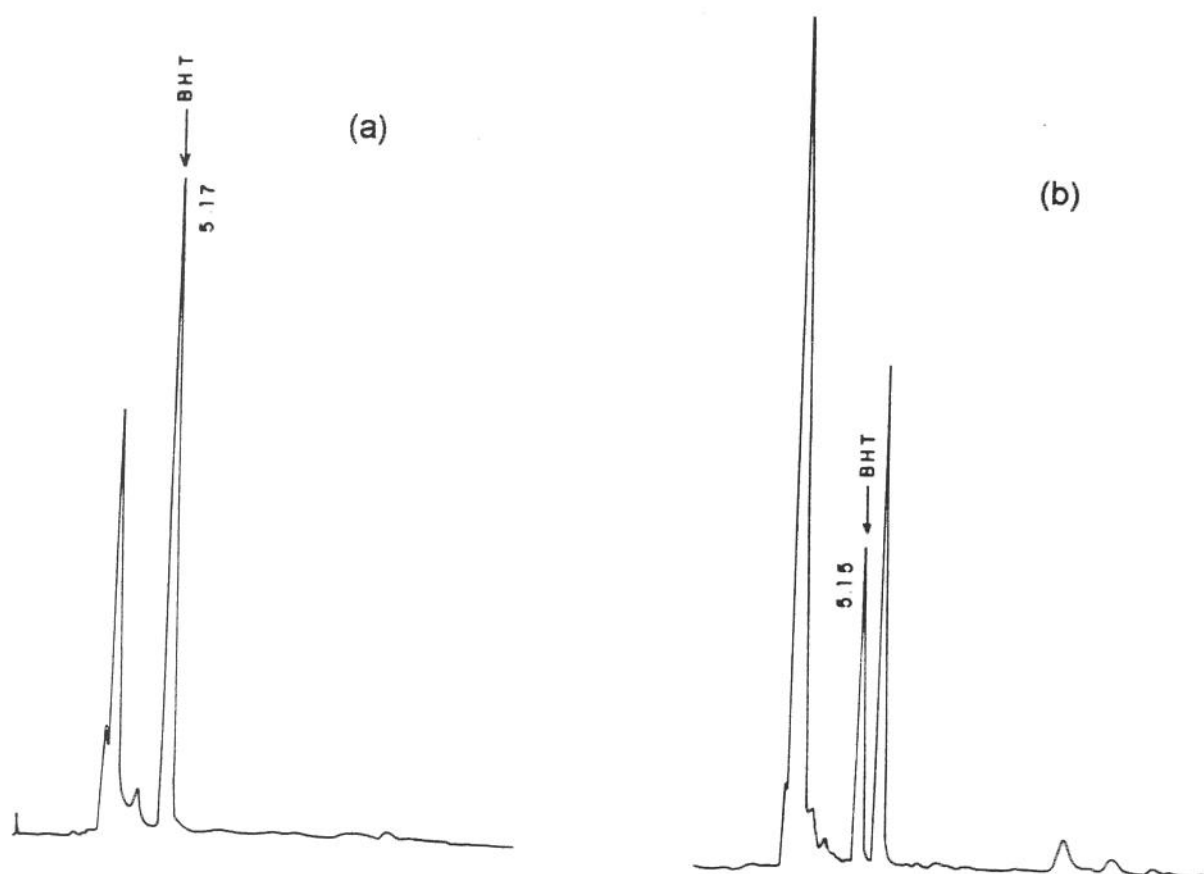


Figura 4 - Cromatogramas por CLAE. (a) gordura vegetal hidrogenada (marca F), (b) margarina (marca G). Condições de análise: fase móvel (II): acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v), coluna C_{18} Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 μ m), fluxo 1 mL/min, detector UV-vis fixado a 280 nm. BHT = butil hidroxitolueno.

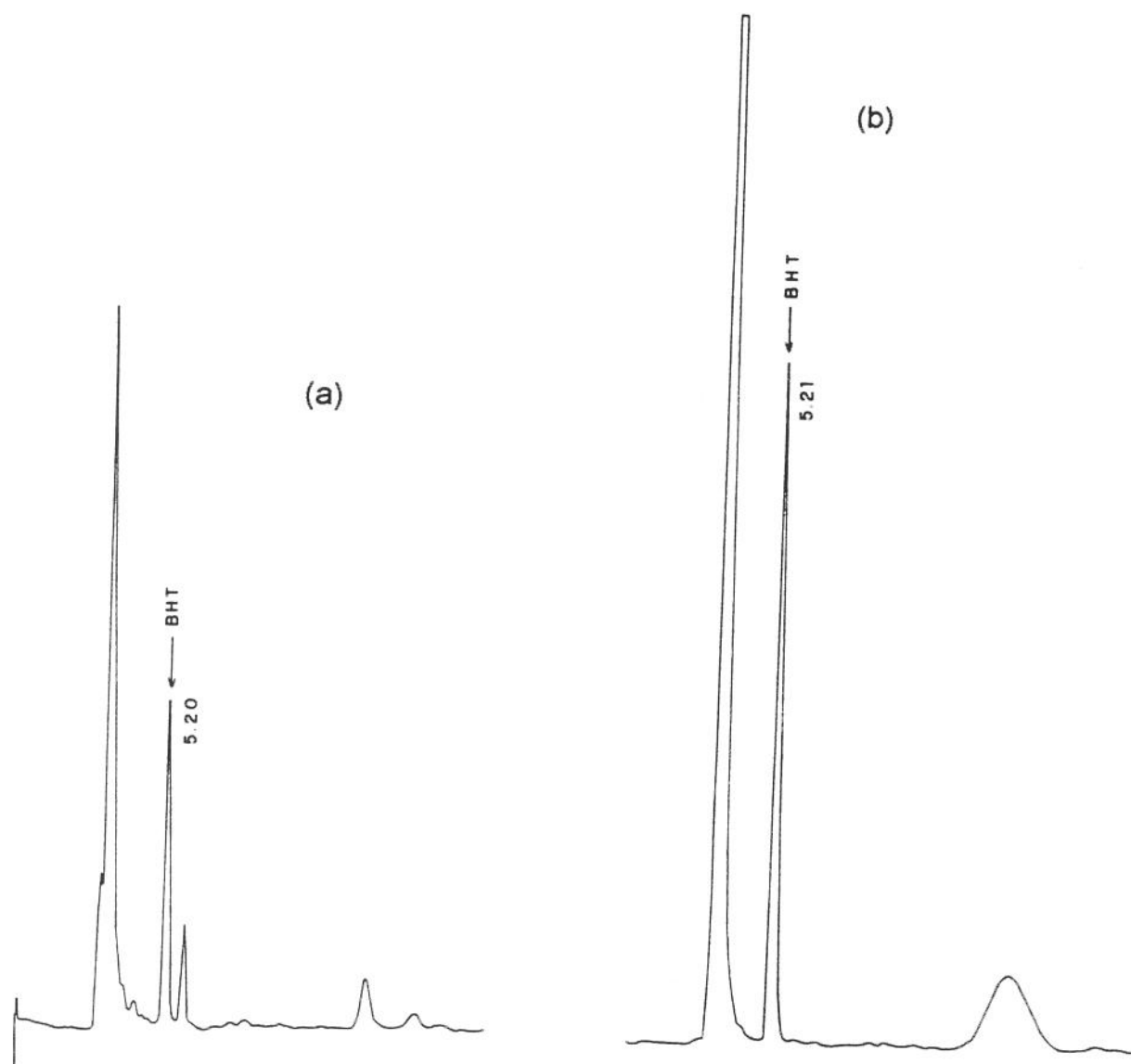


Figura 5 - Cromatogramas por CLAE. (a) creme vegetal (marca G), (b) halvarina (marca G₁). Condições de análise: fase móvel (II): acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v), coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), fluxo 1 mL/min, detector UV-vis fixado a 280 nm. BHT = butil hidroxitolueno.

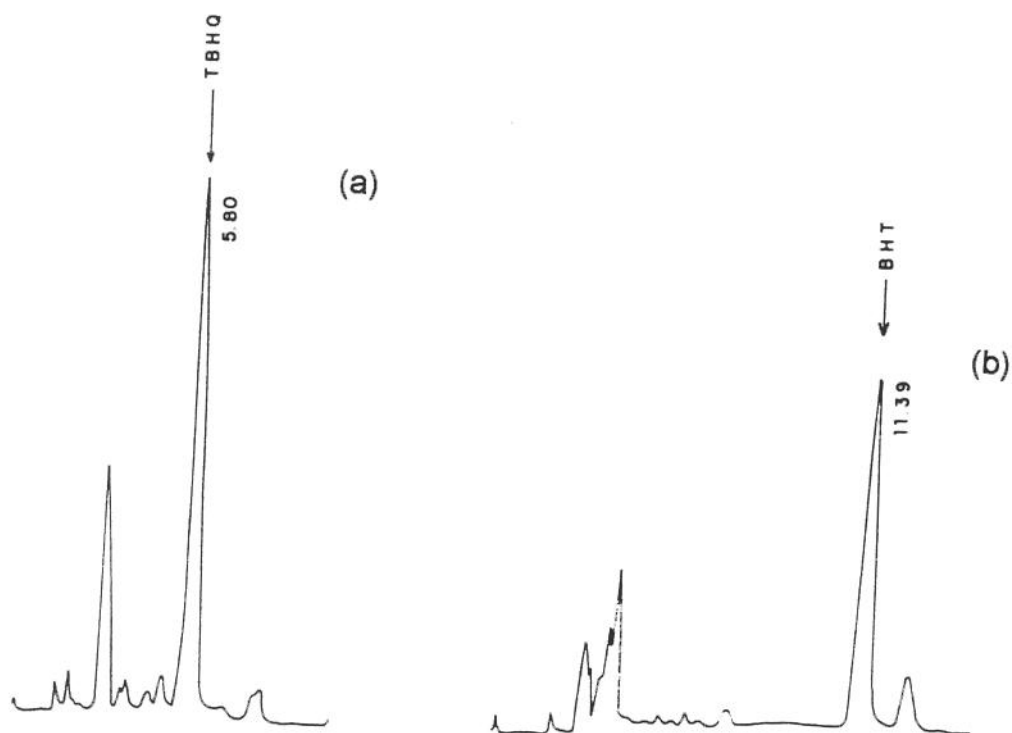


Figura 6 - Cromatogramas por CLAE – indicativo da confirmação dos picos. (a) óleo de soja (marca B), (b) gordura vegetal hidrogenada (marca F). Condições de análise: fases móveis: **(III)**: acetonitrila:água:metanol (36:60:4, v/v) (a) e **(IV)** acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v) (b), coluna C_{18} Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 μ m), fluxo 1 mL/min, detector UV-vis fixado a 280 nm. BHT = butil hidroxitolueno, TBHQ = *terc*-butil hidroquinona.

4.5. Referências Bibliográficas

- ANDERSON, J. & VAN NIEKERK, P. J. High-performance liquid chromatographic determination of antioxidants in fats and oils. **Journal of Chromatography**, **394**(2):400-402, 1987.
- ANDRIKOPOULOS, N. K.; BRUESCHWEILER, H.; FELBER, H. & TAESCHLER, Ch. HPLC analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, **68**(6):359-364, 1991.
- A.O.A.C. - **Official Methods of Analysis**, 15.ed. Arlington, Virginia: Association of Official Analytical Chemists, 1990. seção 983.15.
- ARCHER, A. W. The determination of phenolic antioxidants in edible oils and fats by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, **128**:235-237, 1981.
- BRASIL. Regulamento técnico - Aditivos alimentares. **Portaria Nº 540**, de 27 de outubro de 1997, publicada no Diário Oficial da União.
- BUCK, D. F. Antioxidants. In: SMITH, J. (Ed). **Food Additive User's Handbook**, London: Blackie Academic & Professional, 1991, p.1-46.
- CHARTERIS, W. P. Minor ingredients of edible table spreads. **Journal of the Society of Dairy Technology**, **48**(4):101-106, 1995.

- CHEN, B. H. & FU, S. C. Simultaneous determination of preservatives, sweeteners and antioxidants in foods by paired-ion liquid chromatography. **Chromatographia**, **41**(1/2):43-50, 1995.
- COPPEN, P. P. The use of antioxidants. In: ALLEN, J.C., HAMILTON, R.J. (Ed). **Rancidity in Foods**, London: Blackie Academic & Professional, 1994, p.84-103.
- DORKO, C. Antioxidants used in food. **Food Technology**, **48**(4):33, 1994.
- ENDEAN, M. E. The detection and determination of food antioxidants - a literature review. **Scientific and Technical Surveys - Leatherhead Food R.A.**, **91**, p.8-48, 1976.
- FORN, M. P. Antioxidants alimentarios: su investigación y determinación en alimentos. **Circular Farmacéutica**, **270**:5-28, 1981.
- GIESE, J. Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. **Food Technology**, **50**(11):73-81, 1996.
- INDYK, H. & WOOLLARD, D. C. Antioxidant analysis in edible oils and fats by normal-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, **356**:401-408, 1986.

- IRACHE, J.M., EZPELETA, I. & VEJA, F.A. Antioxygènes phénoliques dans des margarines: comportement au cours de la conservation. **Sciences des Aliments**, 17(1):95-105, 1997.
- KITADA, Y.; TAMASE, K.; MIZOBUCHI, M.; SASAKI, M.; TANIGAWA, K.; KOMIYAMA, S. & NAZAKAWA, H. Determination of *tert*-Butylhydroquinone in oily foods and dried fish. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, 25(2):209-213, 1984.
- KOCHHAR, S. P. & ROSSELL, J. B. Detection, estimation and evaluation of antioxidants in food systems. In: HUDSON, B.J.F. (Ed). **Food Antioxidants**, London: Elsevier Applied Science, 1997, p.19-64.
- MADHAVI, D. L. & SALUNKHE, D. K. Antioxidants. In: MAGA, J.A., TU, A.T. (Ed). **Food Additive Toxicology**, New York: Marcel Dekker, 1997, p.89-177.
- MINIM, V.P.R. 1991. Modificações e avaliação de métodos analíticos para determinação de antioxidantes em alimentos. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP.
- PAGE, B. D. High performance liquid chromatographic determination of nine phenolic antioxidants in oils, lards and shortenings. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 62(6):1239-1246, 1979.

- PAGE, B. D. High performance liquid chromatographic determination of seven antioxidants in oil and lard: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, **66**(3):727-745, 1983.
- PAGE, B. D. Liquid chromatographic method for the determination of nine phenolic antioxidants in butter oil: collaborative study. **Journal of the AOAC International**, **76**(4):765-779, 1993.
- PAGE, B.D. e CHARBONNEAU, C.F. Liquid chromatographic determination of seven antioxidants in dry foods. . **Journal of the AOAC International**, **72**(2):259-265, 1989.
- RAJALAKSHMI, D. & NARASIMHAN, S. Food Antioxidants: sources and methods of evaluation. In: MADHAVI, D.L., DESHPANDE, S.S., SALUNKHE, D.K. (Ed). **Food Antioxidants -Technological, Toxicological and Health Perspectives**, New York: Marcel Dekker, 1997, p.65-157.
- ROBARDS, K. & DILLI, S. Analytical chemistry of synthetic food antioxidants- a review. **Analyst**, **112**:933-943, 1987.
- SHERWIN, E. R. Antioxidants. In: BRANEN, A.L., DAVIDSON, P.M., SALMINEN, S. (Ed.). **Food Additives**, New York: Marcel Dekker, 1990, p.138-193.
- SIMS, R. J. & FIORITI, J. A. Antioxidants. In: GOLDBERG, I., WILLIAMS, R. (Ed.). **Biotechnology and Food Ingredients**, New York: Van Nostrand Reinhold, 1990, p. 482-505.

- STUCKEY, B. N. & OSBORNE, C. E. A review of antioxidant analysis in food products. **The Journal of the American Oil Chemists' Society**, 42(3):228-232, 1965.
- TOLEDO, M.C.F., ESTEVES, W. & HARTMANN, V.E.M. Eficiência de antioxidantes em óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 5(1):1-11, 1985.
- VAN NIEKERK, P. J. & DU PLESSIS, L. M. High performance liquid chromatographic determination of *tert*-butyl-hydroquinone in vegetable oils. **Journal of Chromatography**, 187(2):436-438, 1980.
- YAMADA, M., MIYATA, M., KATO, Y., NAKAMURA, M., NISHIJIMA, M.; SHIBATA, T. & ITO, Y. Determination of nine phenolic antioxidants in foods by high performance liquid chromatography. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, 34(6):535-541, 1993.

CONCLUSÃO

Na primeira etapa do estudo de ingestão realizado para os antioxidantes fenólicos BHA, BHT e TBHQ, os resultados obtidos através do método de "Budget" indicaram a necessidade de uma investigação mais detalhada, principalmente no caso do BHA e do BHT. Entretanto, os valores de IDMT (Ingestão Diária Máxima Teórica) posteriormente estimados para estes três aditivos foram inferiores às respectivas IDAs (Ingestão Diária Aceitável) recomendadas pelo JECFA, mesmo que utilizados nas concentrações máximas permitidas para todas as categorias de alimentos.

A IDMT estimada para 2003, com base em projeções de consumo de alimentos (Datamark, 1999), indica que, mesmo com o aumento do consumo individual de alimentos, é improvável que a IDA dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ venha a ser ultrapassada. É importante ressaltar que os métodos utilizados neste estudo de ingestão são bastante conservadores e geralmente resultam em superestimativas, de modo que a ingestão diária real dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ pode ser considerada inferior à estimada no trabalho. Concluiu-se, portanto, que o consumo destes três aditivos não apresenta riscos à saúde do consumidor médio brasileiro.

Os resultados da determinação analítica dos antioxidantes reforçam a conclusão do estudo de ingestão, uma vez que os níveis de TBHQ e BHT

detectados nas categorias de alimentos selecionadas foram menores que os limites máximos permitidos pela legislação brasileira, em 95% das amostras analisadas. O BHA não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. Observou-se que o TBHQ e o BHT são os antioxidantes atualmente mais utilizados em óleos vegetais e em gorduras e derivados, respectivamente, em substituição às combinações de BHA e BHT bastante utilizadas no passado.

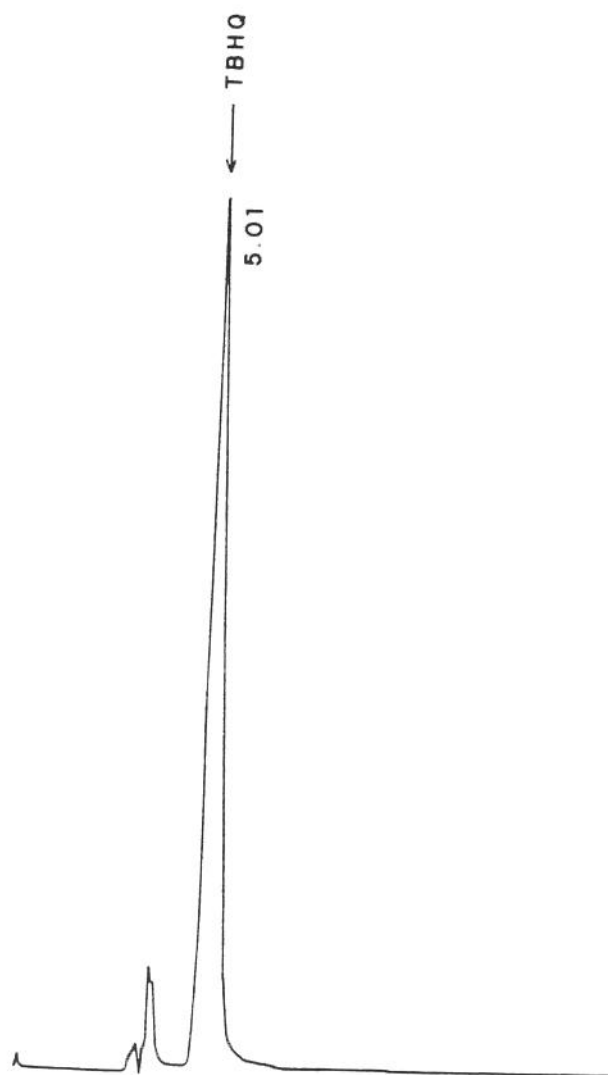
Com a internalização da legislação do Mercosul, novas categorias de alimentos estão sendo incluídas para uso dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ, embora os níveis de uso não tenham sido alterados. Deve-se considerar, entretanto, que estes três aditivos não serão necessariamente utilizados em todas as categorias introduzidas e que nem todas estas categorias fazem parte da dieta do brasileiro, já que os hábitos alimentares dos países membros do Mercosul são diferentes. Para garantir a segurança de uso dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ, o presente estudo deveria ser repetido, quando a legislação do Mercosul estiver totalmente internalizada.

ANEXOS

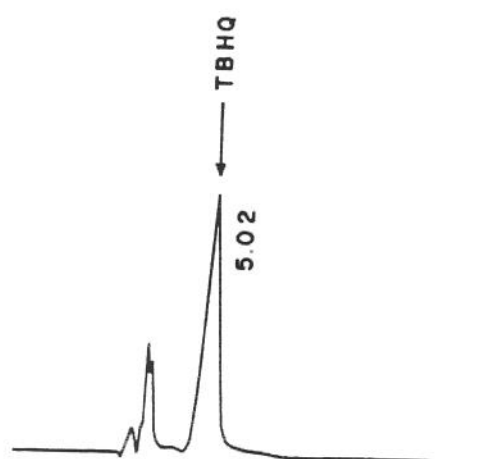
Anexo 1 – Antioxidantes declarados nos rótulos das amostras analisadas

Produto	Marca	BHA	BHT	PG	TBHQ	Ác. cítrico	EDTA
Óleo de soja*	A				X	X	
	B				X	X	
	C				X		
Óleo de milho*	A				X	X	
	B					X	
	D						
Gordura vegetal hidrogenada	E	X	X			X	
	F		X			X	
	G						
Margarina	F		X			X	
	G		X			X	X
	H					X	
Creme vegetal	B					X	
	F		X			X	
	G		X			X	X
Halvarina	F		X			X	
	G ₁		X			X	
	G ₂		X			X	X

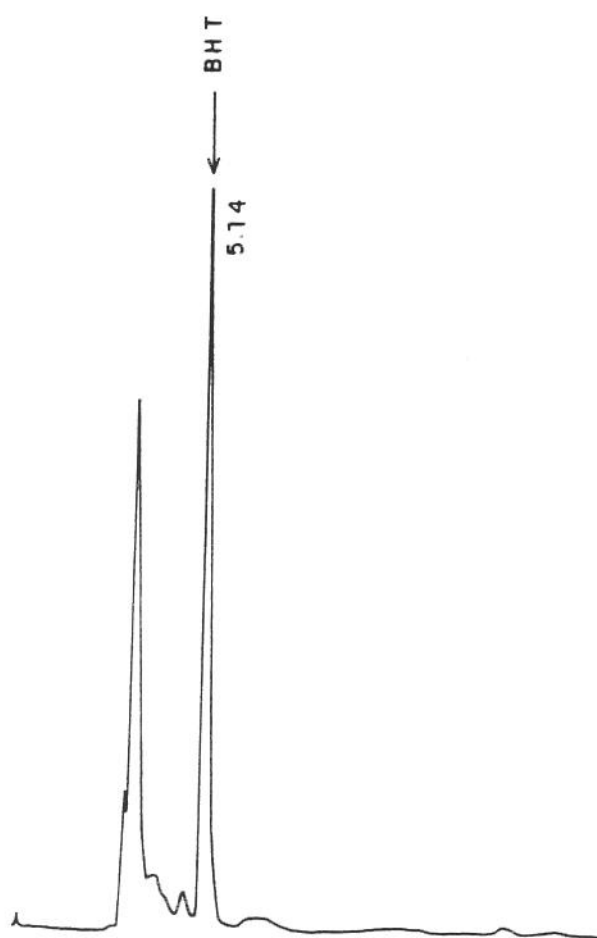
* Embalagem PET



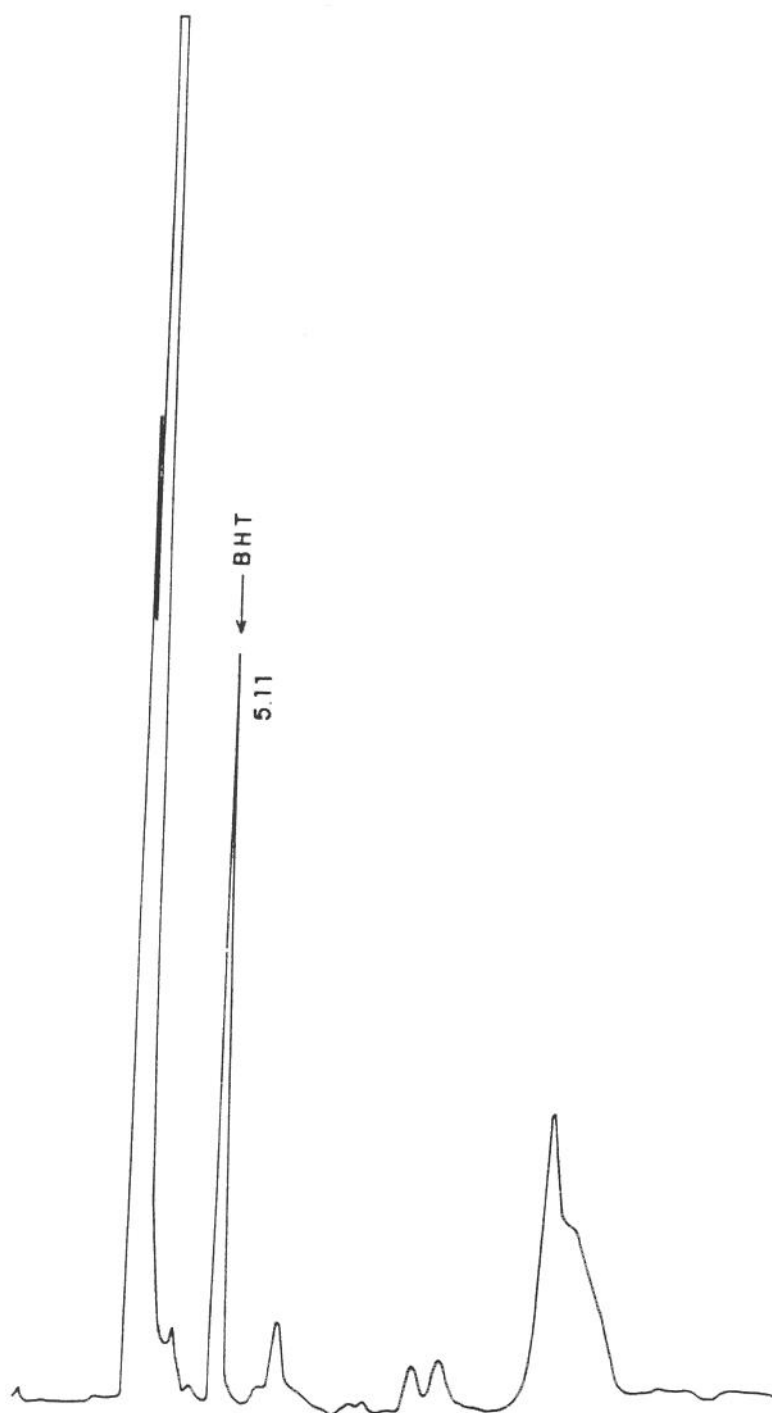
Anexo 2 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de óleo de soja (marca A). Condições de análise: fase móvel **(I)** acetonitrila:metanol: ácido acético 5% (25:25:50, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). TBHQ: *terc*-butil hidroquinona.



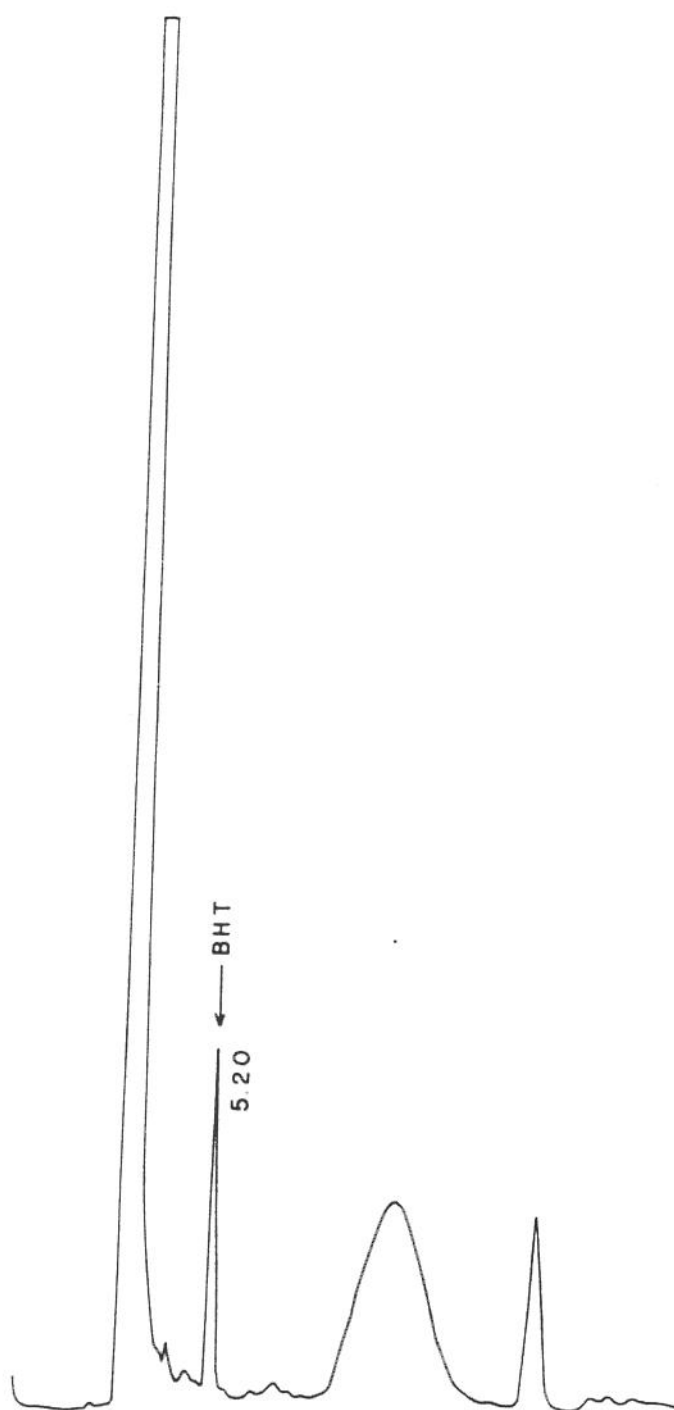
Anexo 3 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de óleo de soja (marca C).
Condições de análise: fase móvel **(I)** acetonitrila:metanol: ácido acético 5%
(25:25:50, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm
d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). TBHQ: *terc*-butil hidroquinona.



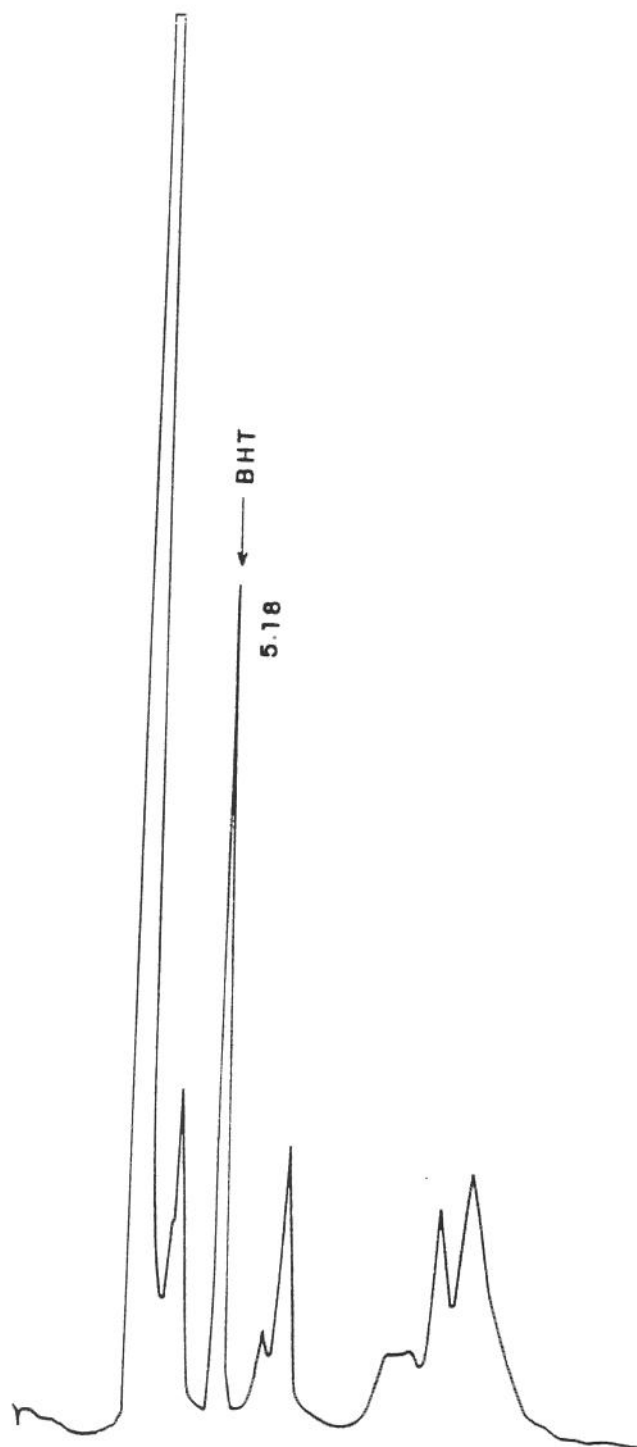
Anexo 4 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de gordura vegetal hidrogenada (marca E). Condições de análise: fase móvel (II) acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.



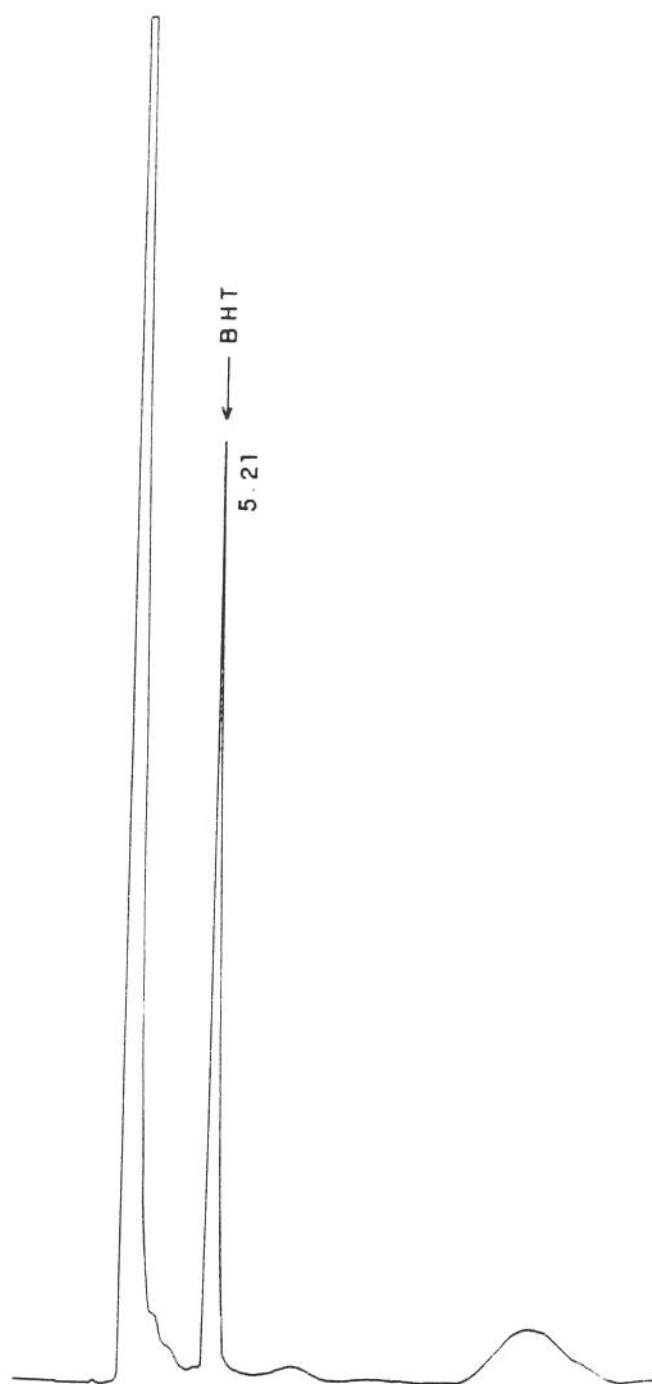
Anexo 5 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de margarina (marca F). Condições de análise: fase móvel (II) acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.



Anexo 6 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de creme vegetal (marca F). Condições de análise: fase móvel (II) acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.



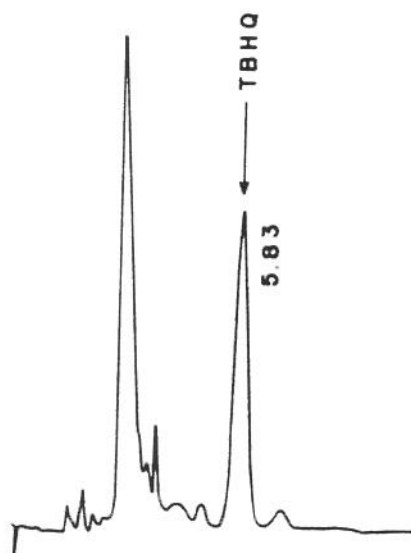
Anexo 7 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de halvarina (marca F). Condições de análise: fase móvel (II) acetonitrila:metanol:ácido acético 5% (42,5:42,5:15, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.



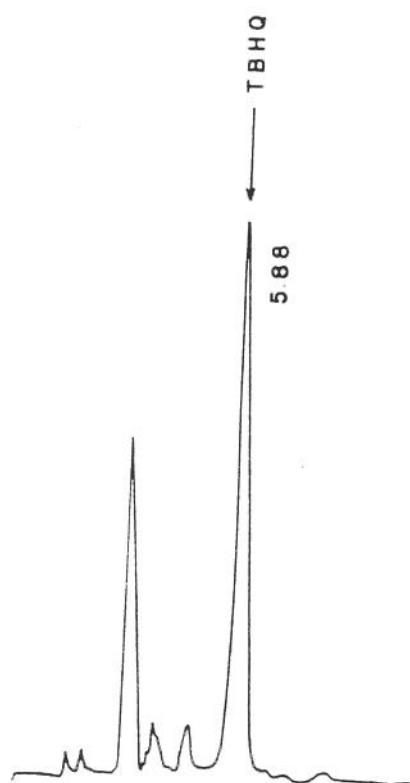
Anexo 8 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de halvarina (marca G₂).
Condições de análise: fase móvel (II) acetonitrila:metanol:ácido acético 5%
(42,5:42,5:15, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6
mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.



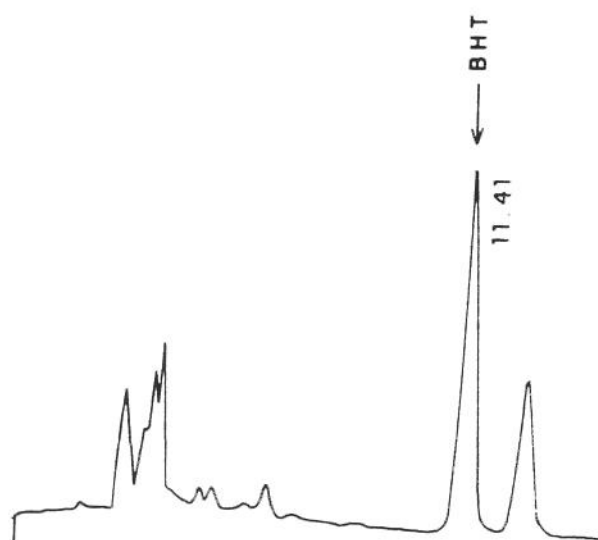
Anexo 9 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de óleo de soja (marca A) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel (III) acetonitrila:água:metanol (36:60:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). TBHQ: *terc*-butil hidroquinona.



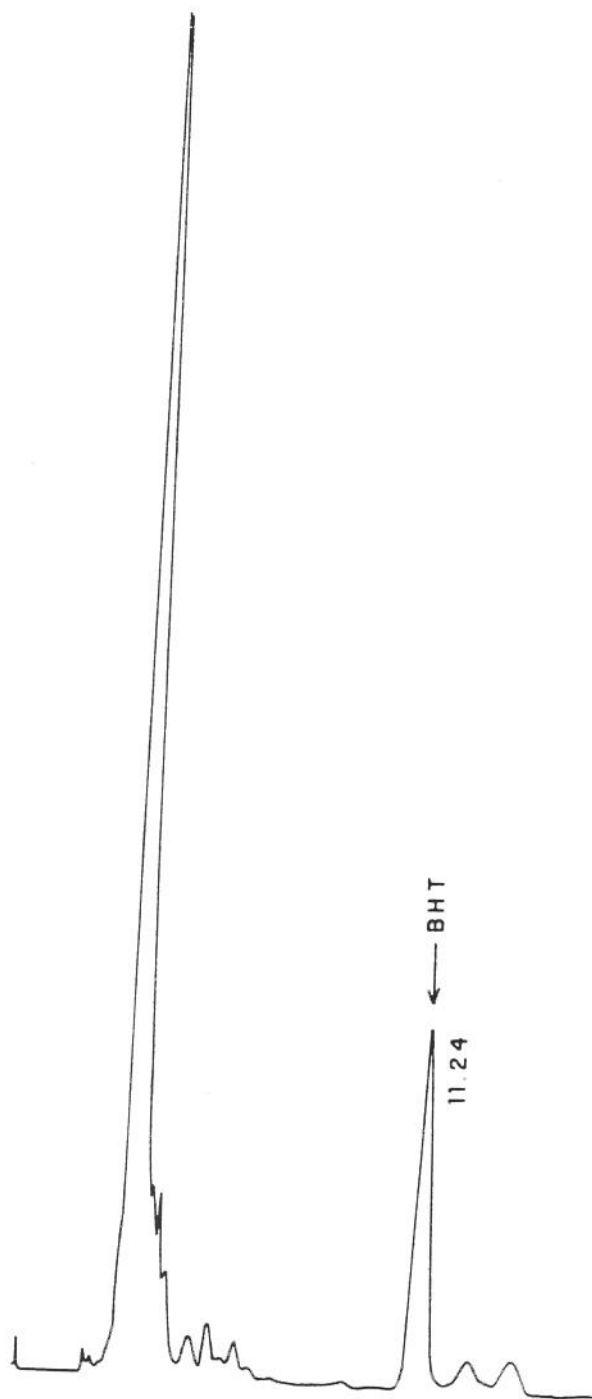
Anexo 10 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de óleo de soja (marca C) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel (III) acetonitrila:água:metanol (36:60:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). TBHQ: *terc*-butil hidroquinona.



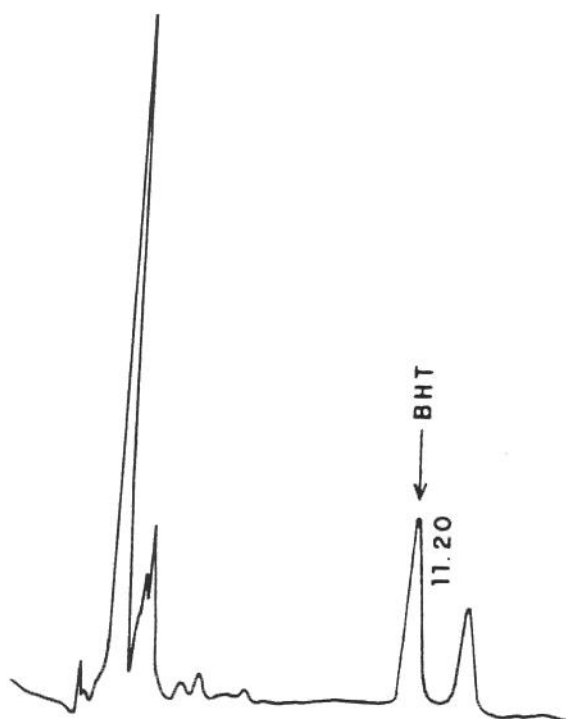
Anexo 11 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de óleo de milho (marca A) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel (III) acetonitrila:água:metanol (36:60:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). TBHQ: *terc*-butil hidroquinona.



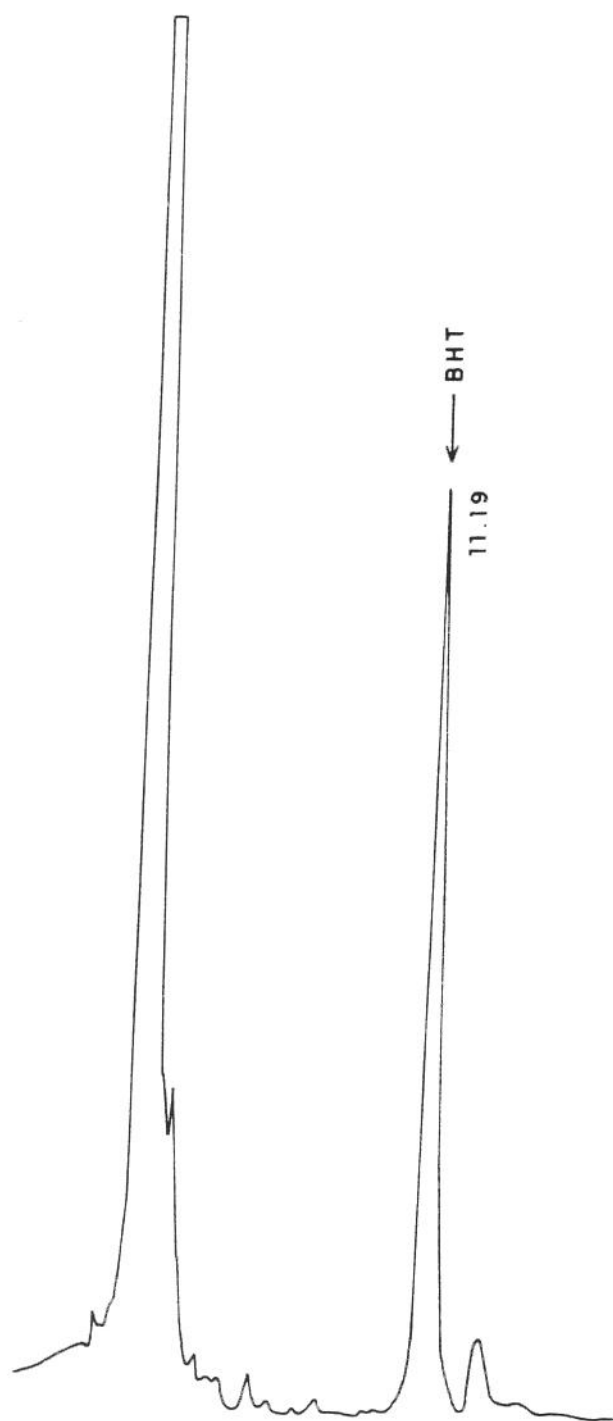
Anexo 12 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de gordura vegetal hidrogenada (marca E) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel **(IV)** acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.



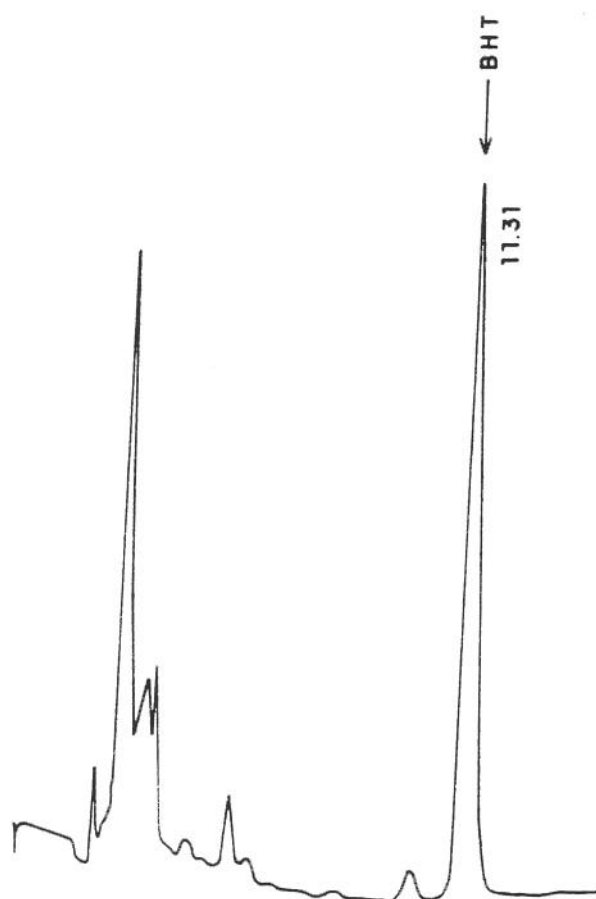
Anexo 13 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de margarina (marca F) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel (IV) acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.



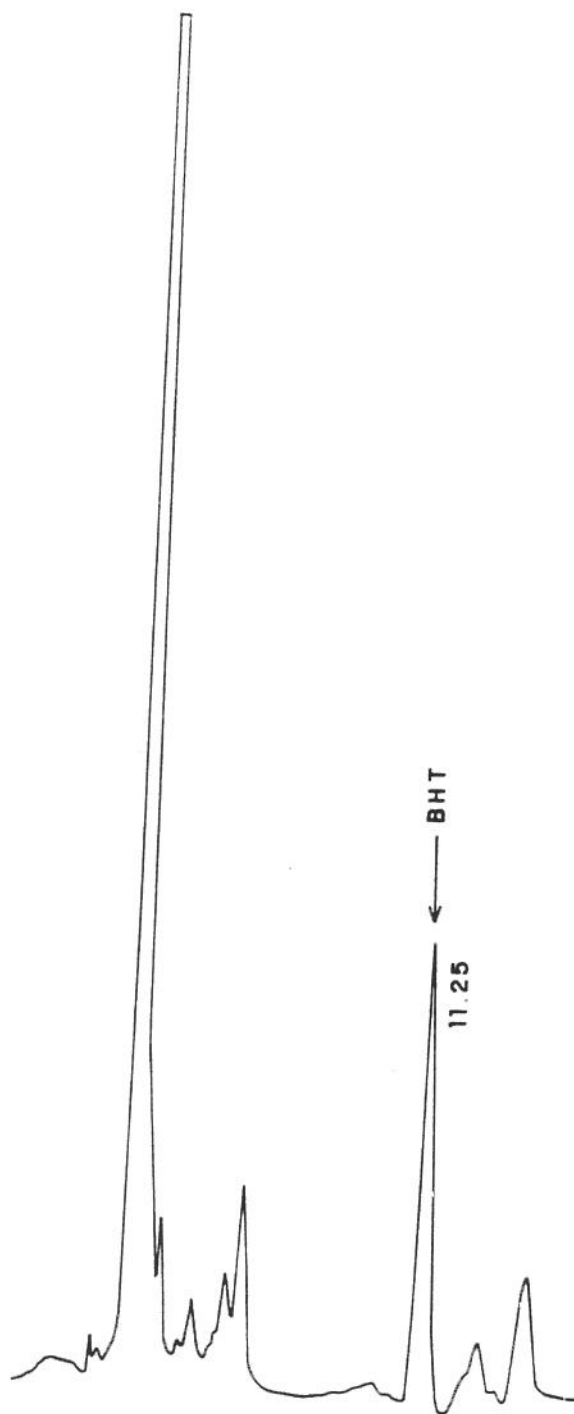
Anexo 14 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de margarina (marca G) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel (IV) acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.



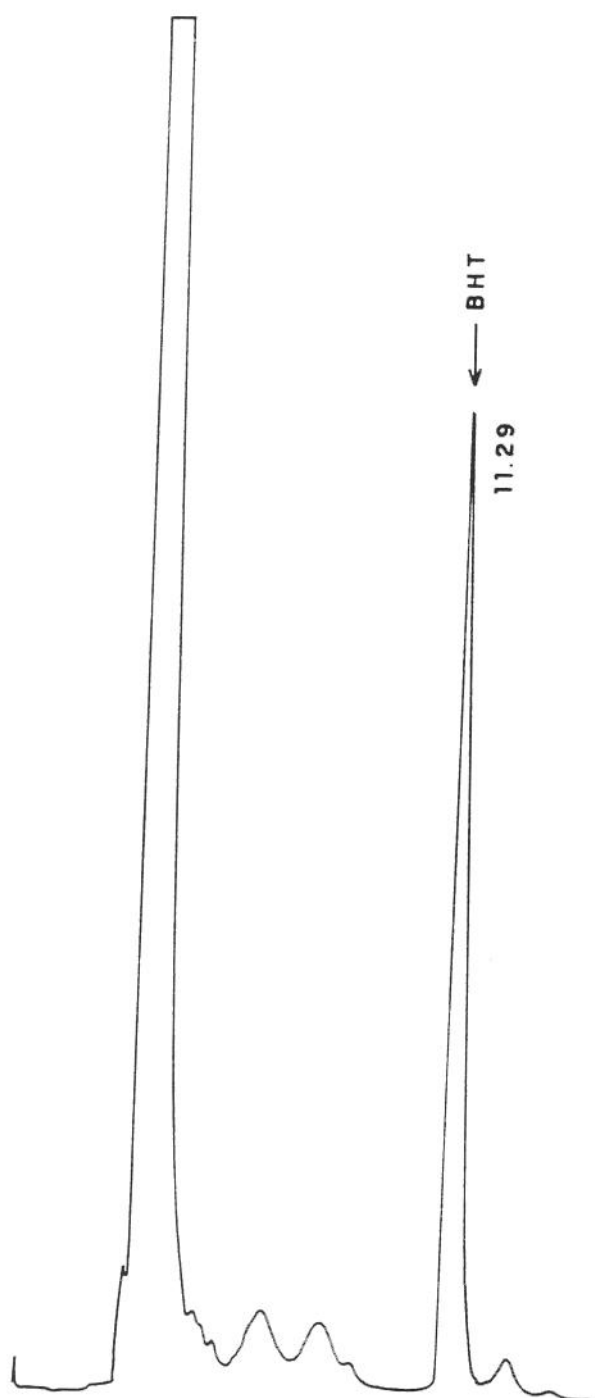
Anexo 15 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de creme vegetal (marca F) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel (IV) acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.



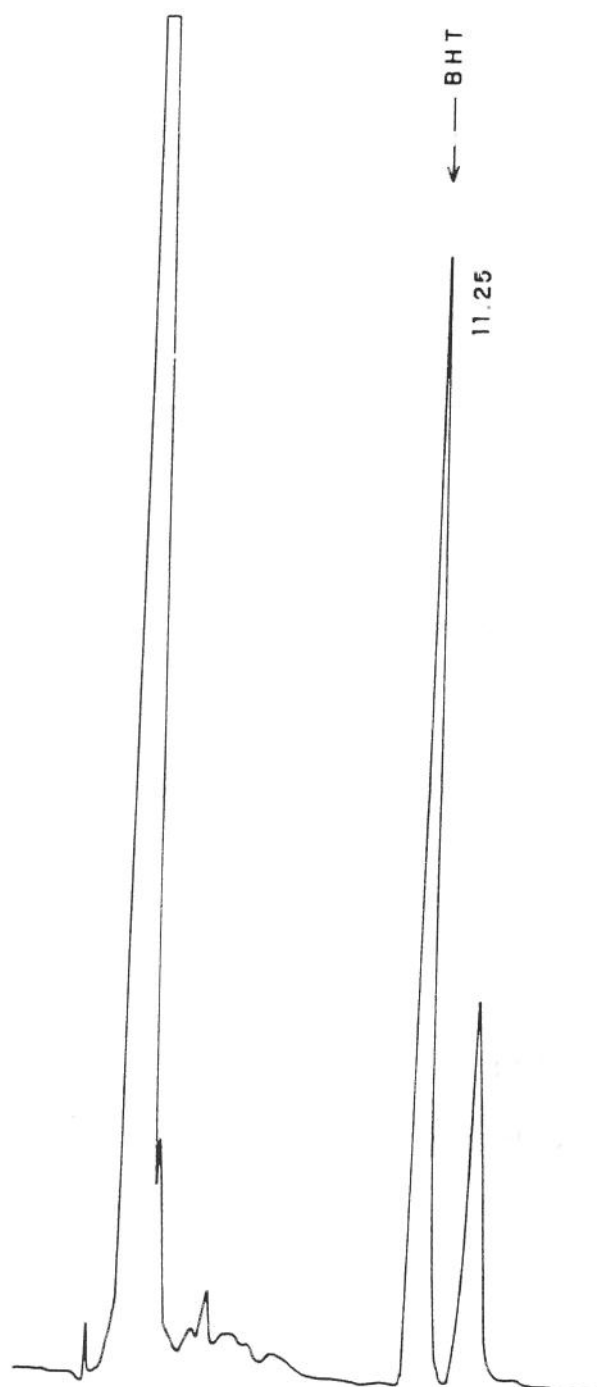
Anexo 16 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de creme vegetal (marca G) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel (IV) acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.



Anexo 17 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de halvarina (marca F) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel (IV) acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.



Anexo 18 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de halvarina (marca G₁) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel (IV) acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.



Anexo 19 - Cromatograma por CLAE de uma amostra de halvarina (marca G₂) – indicativo da confirmação do pico. Condições de análise: fase móvel (IV) acetonitrila:água:metanol (62:34:4, v/v); fluxo 1 ml/min., coluna C₁₈ Vydac 201 – TP 54 (25 cm X 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm), detector UV (280 nm). BHT: butil hidroxitolueno.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE