

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ESTIMATIVA DA INGESTÃO DIÁRIA DOS CONSERVADORES
ÁCIDO BENZÓICO E ÁCIDO SÓRBICO NO BRASIL**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Sílvia Amelia Verdiani Tfoundi, aprovada pela Comissão Julgadora em 04 de outubro de 2000.

Campinas, 04 de outubro de 2000

SILVIA AMELIA VERDIANI TFOUNI
Engenheira de Alimentos

Prof. Dra. Maria Cecília F. Toledo

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

Profa. Dra. MARIA CECÍLIA DE FIGUEIREDO TOLEDO
Orientadora

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

Campinas – SP
2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



200017472

IDADE 30
 CHAMADA:
UNICAMP
T319e
 Ex.
 MBO BC/ 43078
 OC. 06.278/00
 C ☐ D ☒
 ECO R\$ 11,00
 TA 04/11/00
 CPD



CM-00147251-6

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

T32e
T319e

Tfouni, Silvia Amelia Verdiani
Estimativa da ingestão diária dos conservadores ácido
benzóico e ácido sórbico no Brasil / Silvia Amelia Verdiani
Tfouni. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

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

1. Ácido benzóico. 2. Ácido sórbico. 3. Cromatografia
líquida de alta eficiência. 4. Alimentos - Conservação.
I. Toledo, Maria Cecília de Figueiredo. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

m. lucia de f. toledo

Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo
(orientadora)

Lucia Valente Soares

Profa. Dra. Lucia Maria Valente Soares
(membro)

Hilary C. de Menezes

Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
(membro)

Profa. Dra. Heloísa Máscia Cecchi
(membro)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Aos meus pais
Elia e Leda

Pelo amor, incentivo e apoio

Dedico

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo pela orientação, dedicação e pelo amplo aprendizado que me proporcionou;

às professoras Lucia M. V. Soares, Hilary C. de Menezes e Heloísa M. Cecchi pelas sugestões apresentadas para a redação final do trabalho. Em especial à professora Heloísa pelas “dicas” e sugestões durante as análises;

aos meus pais Elia e Leda pela revisão do trabalho e pequenas correções;

ao meu irmão Fabio pelo companheirismo e apoio;

às sempre presentes Pricila, Luzinha e “amiga/irmã” Adriana pela amizade, pelo suporte nos momentos difíceis e constante incentivo;

aos colegas e amigos do Laboratório de Toxicologia: Rita, Antônio, Mônica, Silvia Helena e Maria José, pelo apoio, companheirismo e pelos preciosos e fundamentais momentos de descontração;

aos amigos Suzana, Francine, Luciane, Gustavo, Regina e Zé Eduardo por terem compartilhado comigo agradáveis e necessários momentos de descontração e lazer;

ao Laboratório de Análise de Alimentos, pelo empréstimo do pHmetro utilizado.

à CAPES, pela bolsa de estudo concedida durante a realização do presente trabalho;

à FAPESP, pela concessão de auxílio à pesquisa, processo 1998/13818-0;

à FAEP, pela concessão de auxílio, processo 0274/00;

em especial à Adriana, Rita e Mônica pelas “dicas”, ajuda e sugestões na realização do trabalho;

a todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho,

Meu muito obrigada.

Índice

Resumo Geral	1
General Summary	3
Introdução Geral	5
Referências bibliográficas	8
 Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica	 9
1. Conservadores	10
1.1. Histórico	10
1.2. Considerações gerais	11
1.3. Legislação	14
1.4. Ácido benzóico	15
1.4.1. Toxicidade do ácido benzóico	17
1.5. Ácido sórbico	21
1.5.1. Toxicidade do ácido sórbico	24
2. Avaliação da segurança de uso de aditivos alimentares	27
3. Ingestão diária aceitável	28
4. Métodos de avaliação de consumo de alimentos	29
5. Avaliação da ingestão	30
6. Métodos de análise	33
6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência	35
7. Referências bibliográficas	40

Capítulo 2 – HPLC determination of benzoic and sorbic acids in foods and beverages	56
Abstract	57
1. Introduction	58
2. Materials and methods	59
2.1. Standards and chemicals	59
2.2. Sample preparation	60
2.2.1. Soft drink	60
2.2.2. Fruit juice	61
2.2.3. Margarine	61
2.2.4. Yogurt and Petit suisse cheese	61
2.2.5. Cheese	62
2.3. High performance liquid chromatography	62
2.4. Quantification	63
2.5. Recovery study	63
3. Results and discussion	64
References	67
 Capítulo 3 – Estimate of the daily intake of benzoic and sorbic acids in Brazil	77
Abstract	78
Introduction	79
Procedure	81
Food consumption data	81
Assessment of potential intake of benzoates and sorbates	82

Budget method	82
Food additive intake data	84
Determination of benzoates and sorbates	85
Results and discussion	86
Conclusion	89
References	90
 Anexos	 98
Anexo 1 – Cromatograma por CLAE de ácido benzóico e ácido sórbico (padrão) e seus respectivos espectros (200 a 400 nm)	99
Anexo 2 – Cromatograma por CLAE em 3D de ácido benzóico e ácido sórbico (padrão)	100
Anexo 3 - Cromatograma por CLAE de amostra de refrigerante guaraná B assim como os espectros dos picos de ácido benzóico e ácido sórbico (200 a 400 nm)	101
Anexo 4 - Cromatograma por CLAE de amostra de margarina E assim como os espectros dos picos de ácido benzóico e ácido sórbico (200 a 400 nm)	102
Anexo 5 - Cromatograma por CLAE de amostra de suco de caju B assim como o espectro do pico de ácido benzóico (200 a 400 nm)	103
Anexo 6 - Cromatograma por CLAE de amostra de iogurte de morango A assim como o espectro do pico de ácido sórbico (200 a 400 nm)	104
Anexo 7 - Cromatograma por CLAE de amostra de requeijão C assim como o espectro do pico de ácido sórbico (200 a 400 nm)	105
Anexo 8 – Cromatogramas por CLAE da amostra de margarina E registrados a 260 nm e 228 nm	106

Índice de tabelas e figuras

Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica

Figura 1 – Estrutura do ácido benzóico	16
Tabela 1 – Efeito do pH na dissociação do ácido benzóico	16
Tabela 2 – Toxicidade do ácido benzóico e do benzoato de sódio	18
Figura 2 – Estrutura do ácido sórbico	22
Tabela 3 – Efeito do pH na dissociação do ácido sórbico	23
Tabela 4 – Toxicidade do ácido sórbico e do sorbato de potássio	24
Tabela 7 – Condições de análise dos ácidos sórbico e benzóico por CLAE	38

Capítulo 2 – HPLC determination of benzoic and sorbic acids in foods and beverages

Table 1 – Recovery of benzoic and sorbic acids from different products	71
Table 2 – Benzoic and sorbic acid contents in different brands of soft drinks	71
Table 3 - Benzoic and sorbic acid contents in fruit juices	72
Table 4 - Benzoic and sorbic acid contents in margarine	72
Table 5 – Sorbic acid contents in strawberry yogurt	73
Table 6 – Sobic acid contents in cheese	73
Figure 1 – HPLC chromatogram of guaraná-type soft drink sample	74
Figure 2 – HPLC chromatogram of cashew juice sample	74
Figure 3 – HPLC chromatogram of margarine sample	75
Figure 4 – HPLC chromatogram of strawberry yogurt sample	75
Figure 5 – HPLC chromatogram of curd-cheese sample	76

Capítulo 3 – Estimate of the daily intake of benzoic and sorbic acids in Brazil

Table 1- Theoretical maximum level for the use of benzoates and sorbates in solid foods	96
Table 2- Theoretical maximum level for the use of benzoates and sorbates in beverages	96
Table 3 – Potential daily intake (PDI) of benzoates based on food consumption data from IBGE (1998) and Datamark (1999)	97
Table 4 – Potential daily intake (PDI) of sorbates based on food consumption data from IBGE (1998) and Datamark (1999)	97

Resumo Geral

A ingestão diária potencial dos ácidos benzóico e sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio foi estimada, em 1999, a partir de categorias específicas de alimentos. Inicialmente foi utilizado o método "Budget" para verificar a segurança dos níveis máximos permitidos desses aditivos pela legislação brasileira. Os resultados indicaram que a ingestão de benzoatos deveria ser avaliada de forma mais refinada. Conduziu-se então uma estimativa de ingestão baseada em dados nacionais de consumo de alimentos e em determinações analíticas desses conservadores em categorias de alimentos selecionadas. Foram analisadas um total de 156 amostras correspondentes a 3 lotes de diferentes marcas e/ou sabores de cinco categorias de alimentos, sendo 45 amostras de refrigerante (15 marcas), 42 de suco (2 marcas, 9 tipos de frutas), 18 de margarina (6 marcas), 24 de iogurte (8 marcas) e 27 de queijo (9 marcas). Os dados nacionais de consumo de alimentos utilizados foram provenientes de pesquisas desenvolvidas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e pelo Datamark, realizadas nos períodos de 1995/1996 e 1998, respectivamente.

Os níveis de benzoatos e sorbatos nas amostras foram determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando detector de arranjo de diodos. O ácido benzóico e o ácido sórbico foram determinados em comprimentos de onda de 228 nm e 260 nm, respectivamente. Na separação foram utilizadas uma coluna C18 e fase móvel composta de 81% de água, 2% de acetato de amônio 0,005 M pH 4,2 ajustado com ácido acético glacial, e 17% de acetonitrila.

Apenas uma amostra apresentou concentração de conservador acima da permitida pela legislação brasileira em vigor.

As estimativas de ingestão feitas para cada um dos conservadores em questão indicaram que a ingestão potencial diária, para os consumidores médios, está abaixo da ingestão diária aceitável estabelecida para estes aditivos. Os refrigerantes foram identificados como principal fonte de ingestão de benzoatos.

General Summary

The daily intake of benzoic and sorbic acids and their respective sodium, potassium and calcium salts from selected food categories was estimated in Brazil in the year 1999. The Budget method was used as a first screening procedure for the estimation of the safety aspects of the maximum permitted levels of benzoates and sorbates established by the Brazilian legislation. This screening indicated that benzoates should be further investigated. In a second step, the daily intake of the preservatives was estimated based on national food consumption data and on analytical determinations of these additives. 156 samples corresponding to 3 batches of different brands and/or flavors belonging to five food categories were analyzed. The total of 156 samples came from 45 samples of soft drink (15 brands), 42 of fruit juice (2 brands, 9 types of fruit), 18 of margarine (6 brands), 24 of yogurt (8 brands) and 27 of cheese (9 brands). The national food consumption data used in this study came from surveys carried out by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) in the period 1995-1996, and by Datamark in 1998.

Benzoate and sorbate levels in the samples were determined by high performance liquid chromatography coupled with a photodiode array detector. Detection of benzoic and sorbic acids was carried out at the wavelengths of 228 and 260 nm, respectively. The analytical column was a C18 one and the mobile phase consisted of 81% water, 2% 0.005 M ammonium acetate buffered at pH 4.2 with glacial acetic acid and 17% acetonitrile. Only one sample presented a preservative level above that permitted by the legislation in force.

The calculated benzoate and sorbate intake values indicated that their potential daily intakes for the average consumer was lower than their respective acceptable daily intakes. Soft drinks were identified as the main source of benzoate intake.

Introdução Geral

A conservação de alimentos sempre foi de grande importância na vida do homem. Compostos como sal, açúcar, ácidos e fumaça de madeira têm sido usados como conservadores de alimentos há séculos. Atualmente, a conservação de alimentos é feita principalmente com o uso de conservadores químicos, os quais atuam como agentes antimicrobianos, protegendo os alimentos contra contaminação por fungos, leveduras e bactérias.

No Brasil, a legislação vigente permite o uso de diferentes conservadores em alimentos, sendo que entre os mais utilizados estão os benzoatos e os sorbatos. Quanto à exposição do consumidor brasileiro a estes aditivos, não existem dados disponíveis na literatura.

Uma vez que as substâncias químicas utilizadas como aditivos alimentares são, na sua maioria, substâncias estranhas ao nosso organismo e, portanto, potencialmente tóxicas, seu emprego em alimentos somente é permitido após a consideração de diversos fatores, entre eles a necessidade tecnológica e, principalmente, o estabelecimento de sua segurança de uso. Esta, por sua vez, envolve a avaliação toxicológica do aditivo e, mais recentemente, a avaliação da exposição do consumidor à substância, quando somadas todas as possíveis fontes.

No âmbito da FAO/OMS existe um programa para aditivos em alimentos que tem como objetivo avaliá-los sistematicamente e fornecer subsídios para que os governos possam controlar seu emprego em alimentos, levando em conta os aspectos relacionados com a saúde humana. Os dois grupos responsáveis pela

implementação do programa são o JECFA (Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares) e o Comitê do Codex sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes (CCFAC). O JECFA, órgão assessor do Codex Alimentarius, avalia toxicologicamente os aditivos alimentares e estabelece, quando possível, valores de ingestão diária aceitável (IDA) para as substâncias avaliadas.

A ingestão diária aceitável, expressa em mg por kg de peso corpóreo (mg/kg pc), é a quantidade de um aditivo que pode ser ingerida pelo homem diariamente e por toda vida sem risco apreciável à saúde, à luz dos conhecimentos toxicológicos disponíveis na época da avaliação (WHO, 1987). Na prática, os valores de IDA são usados por agências nacionais e internacionais para estabelecer quantidades aceitáveis de aditivos alimentares a serem utilizados em diferentes alimentos, de forma que seu consumo não exceda a IDA.

Nos últimos anos foi manifestada pelo CCFAC a preocupação de que os níveis de uso de alguns aditivos, entre eles o ácido benzóico e seus sais, poderia estar resultando em ingestão acima da IDA. Foi então solicitado aos países membros do Codex que enviassem ao JECFA estimativas de ingestão nacional deste aditivo, para que este comitê conduzisse uma avaliação da exposição. Nove países enviaram informações: Austrália, China, Espanha, EUA, Finlândia, França, Inglaterra, Japão e Nova Zelândia. Com base nessas informações o JECFA concluiu que as estimativas de ingestão, quando baseadas nos limites que estão sendo propostos pelo GSFA ("General Standard for Food Additives") e em dados nacionais de consumo de alimentos, resultaram em valores acima da IDA. Entretanto, a IDA não era excedida quando as estimativas se baseavam nos limites de uso permitidos em cada país e nos dados nacionais de consumo de

alimentos. Foi também evidenciado que em alguns casos a estimativa de ingestão pelos grandes consumidores estava acima da IDA (WHO, 2000).

Este trabalho teve como objetivo estimar a ingestão potencial dos conservadores ácidos benzóico e sórbico e seus sais no Brasil, bem como comparar os valores encontrados com a ingestão diária recomendada para estes aditivos. A ingestão potencial foi estimada com base em dados de consumo médio de alimentos e bebidas nos quais é permitido o uso desses conservadores, e em determinações analíticas dos ácidos benzóico e sórbico em produtos selecionados.

O capítulo 1 deste trabalho apresenta uma revisão bibliográfica sobre o assunto, redigida na forma tradicional. O artigo apresentado no capítulo 2 foi redigido segundo as normas da revista Food Chemistry; e o artigo apresentado no capítulo 3 foi redigido segundo as normas da revista Food Additives and Contaminants. Os capítulos estão descritos a seguir:

Capítulo 1. Revisão bibliográfica

Capítulo 2. HPLC determination of benzoic and sorbic acids in foods and beverages

Capítulo 3. Estimate of the daily intake of benzoic and sorbic acids in Brazil

Referências bibliográficas

WHO. Principles for the Safety Assessment of Food Additives and Contaminants in Food. **Environmental Health Criteria**, Geneva, n.70, 1987.

WHO. Evaluation of Certain Food Additives. **Technical Report Series**, Geneva, n.89, 2000.

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Revisão Bibliográfica

1- Conservadores

1.1- Histórico

Compostos que ocorrem naturalmente em uma grande variedade de alimentos como alho, cebola, frutas, vegetais, cereais e temperos contribuem para a resistência natural do alimento à deterioração (Marsh, 1966). Entretanto, com o passar do tempo e principalmente em certas áreas do mundo, onde as colheitas se limitam a alguns meses do ano, tornou-se necessária a conservação de alimentos, de modo que estes pudessem ser estocados (Simão, 1989).

Compostos químicos vêm sendo usados nesta conservação há séculos. Sal, açúcar, álcool, fumaça de madeira e vários condimentos (Kimble, 1977), além de alguns ácidos orgânicos (como os ácidos láctico e acético), têm sido considerados conservadores tradicionais (Lück, 1977).

Com o começo da industrialização, a conservação dos alimentos se tornou mais importante e o consumidor passou a questionar a qualidade dos alimentos, uma vez que muitos conservadores empregados até então alteravam profundamente as propriedades e estrutura dos alimentos (Lück, 1977). Desta forma, aumentaram-se os esforços para que os conservadores além de conservar os alimentos, também protegessem características como suas propriedades nutricionais e organolépticas. Com o descobrimento dos anti-sépticos em medicina, foram introduzidas na conservação de alimentos substâncias como

cloratos, fluoretos e assemelhados. Na época desconheciam-se os danos que estas substâncias poderiam ocasionar, uma vez que não eram conhecidos os efeitos tóxicos a elas associados. Acreditava-se que devido ao fato das quantidades necessárias para conservação dos alimentos serem muito pequenas, estas não seriam suficientes para causar danos à saúde. A introdução do ácido salicílico e do ácido bórico como conservadores de alimentos deve ser considerada como um progresso, ainda que hoje em dia ambas as substâncias sejam consideradas antiquadas. No final do século XIX, iniciou-se o uso de ácido fórmico na conservação de alimentos. No princípio desse século começou-se a utilizar ácido benzóico e seus derivados os quais, ainda hoje, são de grande aplicação na indústria de alimentos e, posteriormente, os sais de ácido propiônico e ácido sórbico (Lück, 1977).

1.2- Considerações gerais

A ocorrência e multiplicação de microorganismos no meio ambiente é comum, e as reações químicas e enzimáticas a eles associadas resultam em decomposição de materiais, inclusive alimentos. Essa decomposição causa modificações na aparência, sabor, textura, cor, consistência e qualidade nutricional do produto. Além disso, certos microorganismos são tóxicos para o ser humano, podendo causar infecções ou intoxicações quando proliferam em alimentos. Portanto, exceto em fermentações microbiológicas úteis, o crescimento de microorganismos em alimentos é indesejável, sendo necessário evitá-lo ou inibi-lo através de métodos de conservação (Sofos, 1995).

Para a conservação de alimentos podem ser utilizados métodos químicos e/ou físicos. Os métodos físicos são aqueles em que se aplica algum tratamento físico que atue contra o crescimento de microorganismos. Estes incluem: altas temperaturas (cozimento, pasteurização, esterilização), baixas temperaturas (refrigeração, congelamento), radiação ou, ainda, remoção de água (evaporação, secagem). Os métodos químicos são aqueles em que há adição de alguma substância química que impeça o desenvolvimento dos microorganismos. Aos compostos químicos utilizados com o objetivo de atuar como agente antimicrobiano, dá-se o nome de conservadores. Outros aditivos químicos podem exercer atividade antimicrobiana direta ou indiretamente, por exemplo: cloreto de sódio, agentes de cura, antioxidantes e fosfatos (Lück, 1977; Chipley, 1993; Sofos, 1995).

Os conservadores podem ser usados isoladamente ou combinados com métodos físicos, complementando técnicas de conservação (Lloyd & Drake, 1975; Simão, 1989; Brul & Coote, 1999). Por exemplo, a presença de conservadores junto com a aplicação de calor leva a uma diminuição dos valores de tempo e temperatura necessários para destruir os microorganismos, assim como é necessária uma menor concentração do aditivo quando os alimentos são armazenados em uma câmara frigorífica e não em temperatura ambiente (Lück, 1981 citado por Frías *et al.*, 1996).

Os conservadores podem ser efetivos na conservação de alimentos, controlando o crescimento dos microorganismos ou destruindo diretamente todos, ou parte deles (Davidson & Branden, 1981). A seleção de um conservador para uma aplicação específica é baseada nos seguintes fatores: propriedades físicas e

químicas (solubilidade, pKa, reatividade, toxicidade), tipos de microorganismo de interesse e tipo e propriedades do produto a ser conservado. Em certos casos, combinações de mais de um conservador são mais eficientes para um determinado produto (Sofos, 1995).

Das várias propriedades de um alimento, o pH é provavelmente o fator que mais influencia na extensão da atividade antimicrobiana do conservador. Baixos pHs potencializam a atividade antimicrobiana de ácidos minerais fracos (nitrito, sulfito) e de ácidos lipofílicos fracos (sorbico, benzoico, propiônico) (Sofos, 1995).

Os ácidos fracos atuam preferencialmente inibindo os microorganismos ao invés de matá-los, prolongando a fase *lag* e prejudicando o transporte ativo (Stratford & Anslow, 1998). Aparentemente, o mecanismo de inibição das células microbianas é o mesmo para todos esses ácidos. Os íons de hidrogênio (prótons) e os íons hidroxila são normalmente separados pela membrana citoplasmática da célula, com o primeiro diminuindo o pH exterior, e o segundo aumentando o pH no interior, próximo à neutralidade. O gradiente da membrana então criado representa o potencial eletroquímico que a célula emprega no transporte ativo de certos compostos como aminoácidos. Os ácidos lipofílicos fracos agem como protonóforos. Após difundirem-se pela membrana, as moléculas não dissociadas se ionizam no interior da célula, diminuindo o pH intracelular. Isto resulta em um enfraquecimento do gradiente da membrana, de modo que o transporte de aminoácidos é afetado (Ronning & Frank, 1987; Ronning & Frank, 1988; Brul & Coote, 1999), e o citoplasma assim acidificado inibe o metabolismo, particularmente das enzimas da glicólise (Stratford & Anslow, 1998). Para atuar no interior da célula, é necessário que o ácido atravesse a membrana, o que é feito

principalmente pelas moléculas não dissociadas (Lück, 1977). Portanto, a atividade antimicrobiana desses ácidos é aumentada conforme o pH é reduzido e se aproxima do seu pKa (Sofos, 1995).

Entretanto, existem evidências de que tanto o ácido sórbico quanto o ácido benzóico utilizam outros mecanismos de inibição simultaneamente à introdução de prótons no citoplasma celular como, por exemplo, atuando diretamente na membrana celular ou atuando como um inibidor específico do metabolismo. Essa teoria se deve ao fato de, nas concentrações mínimas necessárias para a ação inibitória, ambos liberarem menor número de prótons em relação aos outros ácidos fracos (acético, sulfito, nitrito) (Stratford & Anslow, 1998).

1.3- Legislação

O item 3.6 da Portaria nº 540 – SVS/MS de 27/10/97 define conservador como uma “substância que impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microorganismos ou enzimas” (Brasil, 1997).

Segundo a resolução nº 04/88 - CNS/MS de 24 de novembro de 1988, publicada no DOU Seção I - 19/12/88, os conservadores permitidos para uso em alimentos no Brasil são (Brasil, 1988):

- Ácido benzóico e seus sais de sódio, potássio e cálcio
- Ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio
- Dióxido de enxofre (metabissulfito de sódio, potássio e cálcio; sulfito de sódio, potássio e cálcio; bissulfito de sódio, potássio e cálcio)

- Natamicina
- Nisina
- Nitrato de sódio ou potássio, associado ou não a nitrito de sódio ou potássio
- Nitrito de sódio ou potássio
- Para-hidroxibenzoato de metila, propila, etila e seus sais sódicos
- Propionato de sódio, potássio e cálcio

1.4- Ácido benzóico

O ácido benzóico é um dos mais antigos conservadores utilizados nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e de alimentos (Jay, 1986 citado por Chipley, 1993), apresentando um amplo uso em uma grande variedade de alimentos (Jay, 1996). Este ácido ocorre naturalmente em “cranberries” (Marwan & Nagel, 1986a; Marwan & Nagel, 1986b), “loganberries”, ameixas, e em algumas variedades de amoras pretas (Kimble, 1977). Sua ação conservadora foi descrita pela primeira vez por H. Fleck em 1875, quando se esforçava para encontrar um sucessor do já conhecido ácido salicílico. Entretanto, como na época havia dificuldade para sintetizá-lo em grandes quantidades, sua utilização na conservação de alimentos só foi introduzida no fim do século XIX (Lück, 1977). Devido ao seu baixo custo, facilidade de incorporação nos produtos, ausência de cor e relativa baixa toxicidade, o ácido benzóico tornou-se um dos conservadores mais utilizados no mundo (Chipley, 1993). O ácido benzóico pode ser empregado puro ou como sal de sódio, cálcio ou potássio.

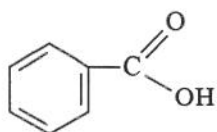


Figura 1- Estrutura do ácido benzóico

O ácido benzóico, com peso molecular 122,1 e pKa 4,19, apresenta-se na forma de agulhas ou folhinhas, brancas ou incolores, tendo solubilidade limitada em água (Chipley, 1993). Os sais do ácido benzóico são preferidos para uso industrial devido a sua maior solubilidade (Kimble, 1977).

Uma vez que as moléculas não dissociadas são as responsáveis pela atividade antimicrobiana, esta será maior a baixos pH. A relação entre o pH e a dissociação das moléculas de ácido benzóico está apresentada na Tabela 1. Como resultado dessa relação entre a atividade antimicrobiana e o pH, o uso de ácido benzóico e seus sais é restrito a produtos de alta acidez ou a produtos que possam ser acidificados (Chipley, 1993).

Tabela 1- Efeito do pH na dissociação do ácido benzóico

pH	Ácido não dissociado (%)
3	93,5
4	59,3
4,19 (pKa)	50,0
5	12,8
6	1,44
7	0,144

Fonte: Baird-Parker (1980), citado por Chipley (1993)

O ácido benzóico apresenta atividade contra fungos, leveduras e bactérias, sendo mais eficiente contra bactérias e leveduras do que contra fungos (Kimble, 1977; Sofos, 1995). Entretanto, o ácido benzóico utilizado em alimentos ácidos age essencialmente inibindo fungos e leveduras, uma vez que valores de pH menor que 4,5 são geralmente suficientes para prevenir o crescimento bacteriano em alimentos ácidos (Kimble, 1977; Wagner & Moberg, 1989; Chipley, 1993; Jay, 1996). A concentração mínima de ácido benzóico necessária para a inibição de microorganismos varia dependendo de fatores como tipo de substrato, pH do meio e microorganismo de interesse. As faixas de concentração mínima para inibição variam de 50 a 1800 ppm (bactérias), 20 a 700 ppm (leveduras) e 20 a 500 ppm (fungos) (Lück, 1977). Quando comparado ao ácido sórbico, o ácido benzóico apresenta menor eficiência em pH acima de 4,5 (Lloyd & Drake, 1975).

Como agente antimicrobiano o ácido benzóico apresenta ação sinérgica com cloreto de sódio, sacarose, ácido bórico, dióxido de carbono e dióxido de enxofre (Sofos, 1995; Smith, 1997). Efeitos antagônicos são observados com surfactantes aniônicos (Chipley, 1993).

1.4.1- Toxicidade do ácido benzóico

O ácido benzóico não se acumula no organismo. Ele combina-se com a glicina e transforma-se em ácido hipúrico, que é facilmente excretado por via renal, sendo este um dos motivos da ausência de efeitos tóxicos (Concon, 1988; Calvo, 1991 citados por Frías *et al*, 1996). Alguns dados disponíveis na literatura

sobre ensaios de toxicidade conduzidos com o ácido benzóico e seus sais estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Toxicidade do ácido benzóico e do benzoato de sódio

Espécies testadas	Período	Dose ou Concentração	Efeitos Observados
Rato	nr*	1,7-4,0 g/kg peso corpóreo	50% mortalidade
Porquinho da Índia, coelho, gato, cachorro	nr*	1,7-2,0 g/kg peso corpóreo	100% mortalidade
Camundongo	3 meses	80 mg/kg peso corpóreo	Aumento na taxa de mortalidade
Camundongo	5 dias	3% da dieta	50% de mortalidade
Camundongo	3 meses	4% da dieta (benzoato de sódio)	Sem efeito
Homem	3 meses	1 g/dia	Sem efeito
Homem	14 dias	12 g/dia	Sem efeito
Homem	60-100 dias	0,3-4,0 g/dia	Sem efeito
Homem	Vários dias	5-10 g/dia (benzoato de sódio)	Sem efeito
Camundongo	17 meses	40 mg/kg peso corpóreo por dia	Distúrbio de crescimento
Rato	18 meses	40 mg/kg peso corpóreo por dia	Distúrbio de crescimento
Rato	2 semanas	5% da dieta (benzoato de sódio)	100% mortalidade
Rato	nr*	1.5% da dieta	Decréscimo na taxa de crescimento
Rato	2 semanas	1% da dieta (benzoato de sódio)	Sem efeito

nr* - não relatado

Fonte: Chipley, 1993

Em 1996, o JECFA revisou e avaliou dados de estudos em humanos e cobaias para os compostos acetato de benzila, álcool benzílico, benzaldeído, ácido benzóico e seus sais. Como todos esses compostos são metabolizados a ácido benzóico, considerou-se razoável assumir que os resultados dos estudos de um composto pudessem ser aplicados a todos os outros. Os resultados destes

estudos indicaram que a formação de ácido hipúrico a partir do ácido benzóico é um processo saturável, onde a disponibilidade de glicina é o fator limitante. Entretanto, mesmo com a saturação da formação de ácido hipúrico, a eliminação dos compostos deste grupo é relativamente rápida, tanto em cobaias quanto em humanos. Uma revisão extensiva da toxicidade do benzoato mostrou que, em altas doses, ele interfere no metabolismo intermediário, incluindo o ciclo da uréia, glucogênese, metabolismo dos ácidos graxos e ciclo do ácido tricarboxílico, provavelmente seqüestrando a coenzima A antes de ela se conjugar à glicina. Isto é coerente com a observação de efeitos como acidose metabólica e convulsões em cobaias e humanos aos quais foram administradas doses bastante altas dessa substância (WHO, 1997).

O JECFA também revisou e avaliou dados de estudos de genotoxicidade dos quatro compostos e nenhum deles foi mutagênico no teste de Ames, tanto com, quanto sem ativação metabólica. Alguma atividade clastogênica foi encontrada *in vitro*, mas não *in vivo* (WHO, 1997).

Estudos relacionados à toxicidade do benzoato de sódio no desenvolvimento mostraram atraso no desenvolvimento e redução de peso em fetos e filhotes de ratos, camundongos, hamsters e coelhos, mas apenas em doses que eram tóxicas para a mãe. No estudo de teratogenicidade do benzoato de sódio, doses que induziram toxicidade maternal severa foram associadas com efeitos fetotóxicos e embriotóxicos e má formação fetal. Um estudo de quatro gerações em ratos mostrou nenhum efeito no crescimento, fertilidade, lactação ou sobrevivência. O JECFA ficou satisfeito com o fato de que os dados revisados

para este grupo de substâncias foram suficientes para demonstrar a ausência de potencial teratogênico e carcinogênico (WHO, 1997).

Diversos autores estudaram em humanos o desenvolvimento de reações alérgicas associadas à ingestão ou contato tópico com ácido benzóico. São citados sintomas como urticária e hipersensibilidade no trato respiratório (rinite e asma) associadas à ingestão, assim como urticária de contato não imunológica (nos lábios, mucosa bucal e na pele) (Lahti *et al.*, 1972; Juhlin *et al.*, 1972; Michaelson & Juhlin, 1973; Hannuksela & Haahtela, 1987; Rademaker & Forsyth, 1989; Safford *et al.*, 1990). O benzoato de sódio também foi associado a casos de anafilaxia (Michils *et al.*, 1991). Entretanto, segundo Hannuksela e Lahti (1986), a ingestão de quantidades usuais de aditivos alimentares não provoca urticária. Michaelson e Juhlin (1973) realizaram estudos nos quais 37 pacientes com urticária recorrente e um grupo controle (33 pessoas) foram submetidos à ingestão de benzoato de sódio, ácido 4-hidroxibenzóico e placebo. As doses de benzoato de sódio administradas foram de 50, 250 e 500 mg. O ácido 4-hidroxibenzóico foi administrado em doses de 50 e 100 mg. Como resultado, em um intervalo de 14 horas, 27 pacientes desenvolveram reações alérgicas ao benzoato de sódio (sendo 22 casos de urticária) e 28 desenvolveram reações alérgicas ao ácido 4-hidroxibenzóico (sendo 21 casos de urticária), enquanto que o grupo controle e aqueles que tomaram placebo não desenvolveram nenhuma reação. Em todos os casos (com exceção de três), a reação foi obtida quando a maior dose foi administrada. Juhlin (1981) estudou pacientes com urticária recorrente para verificar possíveis reações alérgicas à ingestão de diversos aditivos alimentares. De 172 pacientes testados, 11% desenvolveram reações alérgicas ao benzoato de

sódio e ao ácido 4-hidroxibenzóico em um intervalo de 24 horas. Foram administradas doses de 50 e 500 mg de benzoato de sódio e doses de 50 e 200 mg de ácido 4-hidroxibenzóico. Frequentemente, pacientes sensíveis ao ácido acetil salicílico apresentam sensibilidade também aos benzoatos, corantes azo e sulfitos (Hannuksela & Haahtela, 1987).

Segundo a avaliação do JECFA de 1996, os estudos de intolerância idiossincrática a benzoatos em humanos não são relevantes para o estabelecimento da IDA de grupo, sendo a rotulagem adequada uma maneira possível de oferecer proteção a indivíduos susceptíveis. Como resultado da avaliação de 1996, a IDA de grupo dos compostos acetato de benzila, álcool benzílico, benzaldeído, ácido benzóico e seus sais, estabelecida em 1973, foi mantida em 0-5 mg/kg pc (WHO, 1997).

1.5- Ácido Sórbico

O ácido sórbico, composto naturalmente presente na natureza, foi isolado pela primeira vez em 1859 pelo químico alemão A. W. Von Hofmann, a partir do fruto de *Sorbus aucuparia* L. (Sofos & Busta, 1993). Entretanto, foi apenas por volta de 1939 que sua ação antimicrobiana foi descoberta simultaneamente por E. Müller, na Alemanha, e por C. M. Gooding, nos Estados Unidos. O seu emprego como conservador de alimentos é bastante amplo em todo o mundo, devido ao fato de ele não interferir no sabor e ser fisiologicamente inócuo (Lück, 1977). O ácido sórbico pode ser empregado puro ou como sal de sódio, cálcio ou potássio.

O ácido sórbico é um ácido graxo insaturado, de cadeia linear trans-trans, possuindo um peso molecular de 112,13. As duplas ligações conjugadas do ácido sórbico são reativas e podem ter influência tanto na sua capacidade antimicrobiana quanto na qualidade e segurança de produtos alimentícios (Sofos, 1989). Industrialmente, o ácido sórbico é mais utilizado na forma de sais devido a sua maior solubilidade em água (Sofos & Busta, 1993).



Figura 2- Estrutura do ácido sórbico

Assim como para os benzoatos, a atividade antimicrobiana dos sorbatos está aparentemente relacionada com a molécula não dissociada, sendo por este motivo mais efetivos em alimentos ácidos ou acidificados. O ácido sórbico tem pKa 4,80 e apresenta maior atividade em pH menor que 6,0, sendo que é praticamente ineficiente em pH superior a 6,5. Em pH entre 4,0 e 6,0 o ácido sórbico e seus sais são mais eficientes que os benzoatos (Jay, 1996). A relação entre o pH e a dissociação das moléculas de ácido sórbico está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3- Efeito do pH na dissociação do ácido sórbico

PH	Ácido não dissociado (%)
3,00	98,0
3,70	93,0
4,00	86,0
4,40	70,0
4,80 (pKa)	50,0
5,00	37,0
5,80	7,0
6,00	6,0
7,00	0,6

Fonte: Sofos & Busta, 1981.

Os sorbatos são eficientes principalmente contra fungos e leveduras, embora atuem também contra uma variedade ampla de bactérias (Jay, 1996), podendo inibir a germinação de esporos e o crescimento e divisão de células vegetativas (Sofos *et al.*, 1986). A resistência das bactérias lácticas aos sorbatos, especialmente em pH 4,5 ou maior, permite o uso desses como agente fungistático em produtos que sofrem fermentação láctica (Jay, 1996). Assim como para o ácido benzóico, a concentração mínima de ácido sórbico necessária para a inibição de microorganismos varia dependendo de fatores como tipo de substrato, pH do meio e microorganismo de interesse. As faixas de concentração mínima para inibição variam de 10 a 10000 ppm (bactérias), 25 a 400 ppm (leveduras) e 10 a 1000 ppm (fungos) (Lück, 1977).

Como agente antimicrobiano o ácido sórbico apresenta ação sinérgica com cloreto de sódio, sacarose, ácido propiônico, dióxido de carbono e dióxido de enxofre. Efeitos antagônicos são observados com surfactantes aniônicos (Smith, 1997).

A principal desvantagem dos sorbatos é o seu custo, relativamente maior que o dos benzoatos e propionatos. Entretanto, em produtos com pH mais elevado, eles são geralmente utilizados em quantidades menores do que os benzoatos e propionatos de modo a obter o efeito desejado (Robach, 1980).

1.5.1- Toxicidade do ácido sórbico

Como qualquer outro ácido graxo, o ácido sórbico é metabolizado no organismo por β -oxidação, resultando em CO_2 , H_2O e energia (Deuel *et al.*, 1954b). Alguns dados disponíveis na literatura sobre ensaios de toxicidade conduzidos com o ácido sórbico e seus sais estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Toxicidade do ácido sórbico e do sorbato de potássio

Espécies testadas	Período	Dose ou Concentração	Resultados
Camundongo	nr*	8 g/kg p.c. (ac. sórbico)	50% de mortalidade
Rato	nr*	7-10 g/kg p.c. (ac. sórbico)	50% de mortalidade
Rato	nr*	4-7 g/kg p.c. (sorbato de potássio)	50% de mortalidade
Rato	90-120 dias	8 a 10% da dieta (ac.sórbico)	Redução no ganho de peso e aumento relativo no peso do fígado
Cachorro	3 meses	2% da dieta (sorbato de potássio)	Sem efeito
Cachorro	nr*	Dieta com 50% de queijo cheddar contendo 4% de ac. sórbico	Sem efeito
Coelho	nr*	3,3 g/kg p.c. dia	Sem efeito
Camundongo (4 gerações)	8 meses	40 g/kg p.c de ac.sórbico + 2 g/kg p.c. de nisina	Nenhum efeito adverso na função reprodutora ou no desenvolvimento pós-natal

nr* - não relatado
Fonte: Walker, 1990.

Foram também realizados diversos estudos de média e longa duração em ratos com níveis de ácido sórbico de 1% a 10% da dieta, e de 0,1% na água. Esses estudos revelaram uma toxicidade crônica muito baixa e não houve nenhum aumento na incidência de tumores. Quando o aumento do valor calórico (com o ácido sórbico sendo utilizado como ácido graxo) da dieta não era controlado, os animais apresentaram aumento no ganho de peso e aumento no peso do fígado e rins. Quando houve controle da ingestão calórica, não houve efeito no ganho de peso (Deuel *et al.*, 1954a; Shtenberg & Ignat'ev, 1970; Gaunt *et al.*, 1975; Hendy *et al.*, 1976).

Em testes de toxicidade crônica, o ácido sórbico mostrou-se não carcinogênico, assim como não foi mutagênico no teste de Ames (Walker, 1990). Alguns casos de intolerância idiossincrática, como urticária de contato, relacionados ao ácido sórbico e sorbatos foram relatados; porém, os dados foram inadequados para estimar a incidência em diferentes populações (Hannuksela & Haahtela, 1987; Walker, 1990; Safford *et al.*, 1990). Juhlin (1981) estudou por seis anos pacientes com urticária recorrente para verificar possíveis reações alérgicas à ingestão de diversos aditivos alimentares. De 115 pacientes, aos quais foram administradas doses de 50 e 200 mg de ácido sórbico, 9% desenvolveram reações alérgicas em um intervalo de 24 horas.

Diversos autores estudaram o uso de sorbatos como inibidores de *Clostridium botulinum*, assim como seu uso em substituição parcial para o nitrito em processos de cura, reduzindo a formação de nitrosaminas (Sofos *et al.*, 1980a; Sofos *et al.*, 1980b; Robach *et al.*, 1980; Paquette *et al.*, 1980; Lund *et al.*, 1987). Entretanto, a presença de certos aditivos e ingredientes de cura pode influenciar a

estabilidade e a ação inibitória dos sorbatos (Ronning & Frank, 1988; Campos & Gerschenson, 1996). Esta substituição parcial pode também levar a outros problemas toxicológicos, devido ao fato de a reação do ácido sórbico com nitrito levar a produtos de reação mutagênicos, embora as circunstâncias nas quais os produtos mutagênicos são formados (60 a 90°C e altas concentrações) não estejam relacionadas às condições normais de uso em alimentos (Namiki *et al.*, 1981).

Os resultados de testes realizados por Schlatter *et al.* (1992) foram interpretados como indicadores de um fraco potencial genotóxico de soluções de sorbato de sódio que foram armazenadas por 208 dias. Entretanto, os autores consideraram seguro o uso de ácido sórbico e sorbato de potássio como conservadores de alimentos. Segundo estudos de Schiffmann e Schlatter (1992), os produtos da oxidação do sorbato de sódio que possuem propriedades genotóxicas são formados sob aquecimento, sonicação e armazenamento. Quando soluções recém preparadas foram testadas, nenhuma atividade genotóxica foi detectada. Outros estudos identificaram uma fraca atividade clastogênica em soluções estocadas de sorbato de potássio (Münzner *et al.*, 1990), não sendo detectada nenhuma atividade mutagênica ou clastogênica em soluções recém preparadas (Jung *et al.*, 1992).

O ácido sórbico e seus sais foram avaliados em 1973 pelo JECFA quando foi estabelecida uma IDA de 0-25 mg/kg pc, que se mantém inalterada até os dias de hoje (FAO/WHO, 1999).

2- Avaliação da segurança de uso de aditivos alimentares

Os aditivos alimentares são avaliados regularmente por agências de regulamentação internacionais como o JECFA, a Comissão Científica da União Européia e a Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos (FDA), que estabelecem especificações e limites para o seu uso. Isto possibilita que agências governamentais, responsáveis pelo controle destes aditivos, criem legislações específicas para regulamentar seu uso (Toledo, 1996). No Brasil a regulamentação do uso de aditivos em alimentos compete à Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde.

O JECFA é formado por um grupo internacional de peritos que são escolhidos pela FAO (Organização para Alimentação e Agricultura) e OMS (Organização Mundial de Saúde) devido ao seu conhecimento e experiência. Eles atuam como peritos independentes e suas recomendações são baseadas apenas em considerações científicas. O JECFA tem elaborado especificações de identidade e pureza para os aditivos alimentares mais importantes, e tem também avaliado informações biológicas e toxicológicas dos efeitos destes aditivos, levando a conclusões e recomendações para seu uso seguro (Toledo, 1996).

A Comissão do Codex Alimentarius (CCA) é um órgão subsidiário da FAO e da OMS e é formada por representantes do governo de países membros destas organizações. Esta comissão é um fórum internacional para elaboração de padrões para alimentos envolvidos no comércio internacional e para orientação de países que desejem criar suas próprias leis e regulamentação para alimentos (Toledo, 1996).

O Codex trata especificamente da questão do uso seguro de aditivos alimentares através do Comitê do Codex para Aditivos e Contaminantes (CCFAC), um de seus vários comitês subsidiários. Ao estabelecer ou endossar níveis máximos permitidos de aditivos em alimentos, o CCFAC leva em consideração, além de dados sobre a necessidade tecnológica e as justificativas para os níveis de uso propostos, as avaliações e recomendações do JECFA (Toledo, 1996).

As responsabilidades em relação à segurança de aditivos em alimentos são divididas entre o JECFA e o CCFAC da seguinte maneira: o JECFA se preocupa principalmente com a avaliação do risco, enquanto que o CCFAC se preocupa com o gerenciamento do risco (Vettorazzi, 1987).

3- Ingestão Diária Aceitável

A ingestão diária aceitável (IDA), expressa em mg por kg de peso corpóreo (mg/kg pc), é a quantidade de um aditivo que pode ser ingerida diariamente, e por toda vida, pelo homem, sem risco apreciável à saúde, à luz dos conhecimentos toxicológicos disponíveis na época da avaliação (WHO, 1987).

O processo para se estabelecer um valor para a IDA envolve a interpretação de dados toxicológicos, identificando-se, quando possível, uma dose experimental na qual não tenham sido observados efeitos adversos da substância avaliada sobre a espécie animal mais sensível. Esta dose é conhecida como NOEL ("no observed effect level"), sendo expressa em mg/kg pc. Ela é utilizada para a extrapolação dos resultados dos estudos com animais experimentais para o

homem. Isso é feito através da aplicação de um fator de segurança arbitrário que procura considerar, entre outros, diferenças de sensibilidade entre espécies e a heterogenicidade da população humana. Para aditivos alimentares tem sido largamente aceito um fator de segurança igual a 100, que é bastante utilizado pelo JECFA (Vetorazzi, 1987).

4- Métodos de avaliação de consumo de alimentos

Diferentes abordagens têm sido adotadas para obter informações que reflitam a quantidade de alimento consumido. A dieta habitual da população em países industrialmente desenvolvidos é tão variada que nenhuma abordagem irá fornecer dados que reflitam precisamente os padrões de consumo a longo prazo dos indivíduos (Lindsay, 1986).

A escolha do método a ser empregado na coleta de dados sobre consumo de alimentos depende principalmente do objetivo da pesquisa, do tamanho da amostra necessária, dos recursos e do pessoal disponível. Os métodos devem ser modificados de acordo com as condições locais e o objetivo de cada pesquisa. Vários métodos têm sido mencionados, incluindo: relatório sobre o balanço dos alimentos, diário detalhado sobre o consumo dos alimentos, pesagem de todo o alimento consumido, entrevistas e questionários (Pekkarinen, 1970).

Em geral, essas abordagens procuram obter informações sobre a dieta, que reflitam o padrão de consumo de indivíduos, ou de grupos da população.

Para a coleta de dados do consumo de alimentos por indivíduos podem ser utilizados os seguintes métodos: diário de alimentos e pesagem do alimento

ingerido, duplicação das refeições, lembrança da dieta e frequência dos alimentos. Para a coleta de dados do consumo de alimentos por grupos da população, podem ser utilizados: diário dos alimentos e pesagem do alimento ingerido, lembrança da dieta, frequência dos alimentos e desaparecimento dos alimentos (local ou país) (Lindsay, 1986).

Na avaliação de risco, deve-se distinguir entre consumidores médios e consumidores cujos hábitos são amplamente diferentes da média. Estes últimos são aqueles que consomem quantidades extremas de alimentos em geral e aqueles, como as crianças, que consomem uma quantidade restrita de certos alimentos (Lindsay, 1986).

5- Avaliação da ingestão

O único modo possível de averiguar se um consumidor está exposto a um risco seria medir precisamente a quantidade de aditivo presente no alimento a ser consumido e comparar com a IDA estabelecida para este aditivo. Medidas e cálculos deste tipo teriam de ser feitos para todos os alimentos em cada refeição em todos os dias da vida, o que é uma tarefa impossível. Tentativas para buscar uma resposta a este problema levaram ao desenvolvimento de cálculos de ingestão potencial de aditivos, através do uso de dados de seu consumo médio (Vetorazzi, 1987).

Para se calcular a ingestão potencial diária de um componente da dieta, são necessárias informações sobre a concentração da substância na dieta ou a concentração potencial provável a ser encontrada na dieta e a quantidade

consumida do alimento que contém a substância. A obtenção dessas informações apresenta algumas dificuldades: os dados dos fabricantes a respeito dos níveis de aditivos presentes nos alimentos nem sempre estão disponíveis, a dieta deve ser representativa daquela consumida pelos indivíduos, e a grande quantidade de alimentos fabricados e os produtos com marcas individualizadas podem tornar arbitrária a seleção de uma amostragem representativa. Poucos dados sobre hábitos de consumo alimentar entre os indivíduos estão disponíveis, especialmente para produtos individuais. A maioria dos dados disponíveis relaciona categorias de alimentos (Lindsay, 1986).

O JECFA recomenda que a coleta de dados e a estimativa de ingestão (de aditivos e contaminantes) sejam feitas através de um ou mais dos métodos padrão descritos a seguir (WHO, 2000):

- Método "Budget": Estima um nível teórico máximo de aditivo na proporção da quantidade de alimento e/ou bebida na qual pode ser utilizado o aditivo, de modo que a IDA para o aditivo não seja excedida pela população. Em casos onde o nível permitido de uso do aditivo exceda o nível teórico máximo calculado, avaliações de ingestão posteriores são necessárias.
- Desaparecimento de alimentos: Estima a quantidade de aditivo alimentar disponível *per capita*, usado na fabricação de alimentos em um país durante um certo período de tempo. As estimativas podem levar em consideração a importação ou exportação de alimentos contendo o aditivo,

bem como usos não-alimentares. As estimativas podem ser ajustadas para a proporção da população que teoricamente consumiria o aditivo.

- **Balanço de alimentos:** Estima a quantidade de alimento disponível para uso *per capita*/dia com base no alimento (cru, e alguns produtos semiprocessados) disponível para consumo (alimento disponível = alimento produzido + importados – exportados – uso não alimentar). Para uso na estimativa de ingestão de aditivo alimentar, a quantidade de produtos que se espera que contenha o aditivo deve ser prevista pela estimativa da porcentagem de produto que é processada e a porcentagem desse produto que contém o aditivo.
- **Pesquisa de orçamento doméstico:** Estima o consumo diário *per capita* de um aditivo baseado em pesquisas domésticas do alimento comprado pelos consumidores, durante um certo período de tempo.
- **Pesquisa de vendas a varejo:** Estima a ingestão diária *per capita* de um aditivo com base nas vendas de itens alimentares em lojas (alimentos vendidos a varejo por um certo período de tempo).
- **Dietas modelo:** As estimativas são baseadas em dietas construídas a partir da informação disponível sobre o consumo alimentar, a fim de representar uma dieta típica de um sub-grupo específico da população ou para indivíduos com ingestões elevadas de alimentos contendo o aditivo. A

interpretação de estimativas de ingestão feitas usando dietas modelo requer que sejam declaradas as suposições para construir cada dieta.

- Diário individual de alimentos por um determinado período de tempo: As estimativas são baseadas em sondagem sobre consumo de alimentos por indivíduos. Ingestões individuais de aditivos ou contaminantes podem ser ajustadas de acordo com o peso corpóreo individual, quando disponível, antes de derivar a estatística populacional partindo da distribuição da ingestão de aditivos ou contaminantes. A interpretação das estimativas de ingestão requer que as suposições feitas sejam declaradas. O tempo de sondagem pode influenciar os resultados.

6- Métodos de análise

Na literatura existem diversos métodos de análise quantitativa dos ácidos sórbico e benzóico em alimentos. Entre os mais citados estão: cromatografia em camada delgada (Tjan & Konter, 1972; Valdehita *et al.*, 1980; Khan *et al.*, 1994), espectrofotometria de absorção no ultravioleta (UV) (Karasz *et al.*, 1976; Gutfinger *et al.*, 1976) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Leuenberger *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1986; Bui & Cooper, 1987; Mannino & Cosio, 1996).

Os métodos espectrofotométricos para a determinação dos ácidos benzóico e sórbico são geralmente baseados em medidas de absorção em dois comprimentos de onda (aproximadamente 225 e 255 nm) de um extrato etéreo ou de um destilado contendo ambos os ácidos. O procedimento é rápido, porém a

precisão não é boa. Na região de 225 nm (a região de máxima absorção do ácido benzóico) a absorção do ácido sórbico é tão intensa que interfere na determinação do ácido benzóico. Isto leva a erros de leitura quando ambos os compostos estão presentes na solução. Além disso, determinações na região do ultravioleta podem originar leituras de intensidade de absorvância muito altas devido à presença de interferentes, no extrato ou no destilado, que absorvem na região, resultando em concentrações dos ácidos maiores do que as realmente presentes (Gutfinger *et al.*, 1976).

A não especificidade dos vários métodos fotométricos, como os de absorção no UV, foi discutida e reconhecida por diversos autores (Bolin *et al.*, 1984; Bui & Cooper, 1987). Por essa razão, a espectrofotometria é recomendada na quantificação dos ácidos benzóico e sórbico em amostras mais simples, isentas de interferentes (Coelho *et al.*, 1983), sendo apropriada apenas para produtos contendo somente um dos dois conservadores (Cecchi, 1988).

A técnica de cromatografia em camada delgada utiliza, para a detecção dos ácidos benzóico e sórbico, placas com indicador de fluorescência ou reveladores químicos (Tjan & Konter, 1972; Khan *et al.*, 1994). Embora esta técnica apresente a vantagem de utilizar um menor volume de solvente na fase móvel em relação à CLAE, entretanto os limites de detecção são maiores (Cecchi, 1988; Khan *et al.*, 1994). Algumas dificuldades na quantificação, como um estreito intervalo de concentração nos quais os compostos podem ser detectados, têm sido citadas por alguns autores (Valdehita *et al.*, 1980; Terada & Sakabe, 1985).

Os métodos de cromatografia gasosa são sensíveis, específicos e precisos, e também podem ser utilizados para a determinação dos conservadores em

questão. Entretanto, há poucos relatos na literatura a respeito de sua utilização, com ou sem espectrômetro de massas, para a análise dos ácidos sórbico e benzóico (De Luca *et al.*, 1995). Esta técnica requer uma maior preparação das amostras, uma vez que utiliza extração com solvente seguida da derivação dos ácidos (Pant & Trenerry, 1995).

A cromatografia líquida de alta eficiência, por sua vez, oferece alta especificidade com uma mínima preparação da amostra, e não requer derivação (Bui & Cooper, 1987), sendo atualmente o procedimento analítico mais comum para detectar e quantificar os ácidos sórbico e benzóico em alimentos e bebidas (Chen & Fu, 1995; Montaña *et al.*, 1995; Pant & Trenerry, 1995; Mannino & Cosio, 1996; Castellari *et al.*, 1997). Em um estudo comparativo entre os métodos de espectrofotometria no UV, cromatografia em camada delgada e CLAE, este último foi considerado o mais adequado para a análise dos produtos que possuam ambos os conservadores ou substâncias interferentes (Cecchi, 1988).

6.1- Cromatografia líquida de alta eficiência

Na tabela 5 apresenta-se um resumo das condições utilizadas por diversos autores para a análise dos ácidos benzóico e sórbico utilizando CLAE. Conforme pode ser observado, as técnicas de extração utilizadas variam dependendo da matriz analisada.

Para a análise de refrigerantes e sucos, em geral nenhuma extração é utilizada, realizando-se apenas a degaseificação (para refrigerantes), centrifugação e/ou filtração e também diluição da amostra (Bennet & Petrus, 1977;

Leuenberger *et al.*, 1979; Argoudelis, 1984; Williams, 1986; Veerbhadrarao *et al.*, 1987; Bui & Cooper, 1987; Thompson *et al.*, 1995; Pant & Trenerry, 1995). Alguns autores também utilizaram cartuchos C18 para a limpeza de amostras de sucos (Lee *et al.*, 1986; Lee, 1995).

Para a extração de ácido sórbico e ácido benzóico de margarinas, Leuenberger *et al.* (1979) desenvolveram uma técnica onde o produto é dissolvido em éter etílico e, em seguida, os conservadores são extraídos com uma solução de NaOH 0,1N. A extração utilizada por Burini e Damiani (1991) consistiu da adição de H₂SO₄ 1M e sulfato de magnésio heptahidratado, seguida de uma destilação a vapor. Cecchi (1988), por sua vez, utilizou extração com etanol seguida de filtração.

Alguns autores empregaram a mesma técnica de extração para amostras de queijo e iogurte. Leuenberger *et al.* (1979) realizaram a limpeza da amostra em colunas empacotadas com Kieselguhr, enquanto Bui e Cooper (1987) extraíram o ácido sórbico com solução de H₃PO₄ 2%, seguido da adição de acetonitrila, finalizando com filtração do extrato. Cecchi (1988) conduziu a extração utilizando etanol seguido de filtração. Küppers e Jans (1988) utilizaram, apenas em queijos, um procedimento de extração onde se adicionava metanol, tampão acetato e em seguida soluções Carrez I (ferrocianeto de potássio 10%) e Carrez II (220 g de acetato de zinco e 32 mL de ácido acético glacial/1 L água) finalizando com filtração. Para iogurtes, Puttemans *et al.* (1985) adicionaram uma solução de tri-n-octilamina em clorofórmio e efetuaram a extração com solução aquosa de perclorato de sódio 0.1M. Castellari *et al.* (1997) utilizaram, também para iogurtes,

centrifugação seguida da adição das soluções de ferrocianeto de potássio 15% e sulfato de zinco 30%.

Observando a tabela 5 pode-se notar que, para a separação dos ácidos benzóico e sórbico utilizando CLAE, normalmente são utilizadas colunas de fase reversa, sendo a coluna C18 a mais comum. Ao se utilizar colunas de fase reversa geralmente estão presentes na fase móvel uma solução tampão ou um ácido, de forma a manter o pH baixo, e conseqüentemente os ácidos benzóico e sórbico na forma não dissociada. Devido ao caráter ácido dos compostos em questão, alguns autores utilizaram na separação colunas de troca iônica.

Para a detecção normalmente empregam-se detectores de UV, uma vez que os ácidos benzóico e sórbico absorvem na região do ultravioleta. Burini & Damiani (1991) utilizaram detector de fluorescência para a detecção de ácido sórbico, tendo sido necessária uma reação de derivação, de modo a tornar o composto fluorescente.

A quantificação dos ácidos benzóico e sórbico é comumente feita através de padronização externa, embora também se utilize a padronização interna (Argoudelis, 1984; Bui & Cooper, 1987; Burini & Damiani, 1991; Serrano *et al.*, 1991). A identidade dos picos é normalmente confirmada através da comparação dos espectros e do tempo de retenção destes com aqueles dos padrões.

Tabela 7– Condições de análise dos ácidos sórbico e benzóico por CLAE.

Amostra	Preparação e/ou Extração	Coluna	Fase Móvel	Deteção	Referência
Suco de laranja	Centrifugação e filtração	Troca iônica	Tampão fosfato	UV	Bennett & Petrus 1977
Achocolatado, marmelada, catchup, picles, iogurte, queijo	Colunas de limpeza (Kieselguhr)	C18	Tampão fosfato	UV	Leuenberger <i>et al.</i> , 1979
Refrigerantes*	Degaseificação e diluição	Troca iônica	Tampão fosfato	UV	Argoudelis, 1984
Iogurte	Tampão fosfato, tri-n-octilamina 0,01M, perclorato de sódio 0,1M	C18	Tampão fosfato /metanol (40+60)	UV	Puttemans <i>et al.</i> , 1985
Produtos cárneos	Etanol 70%	C18	Gradiente tampão acetato /metanol	UV	Ali, 1985
Café	Destilação a vapor	C18	Acetonitrila/H ₂ O/ tampão fosfato 0,2M (70:12:18)	UV	Terada & Sakabe, 1985
Suco de laranja	Centrifugação e limpeza em pré coluna C18	C18	Acetonitrila/ tampão fosfato (40:60)	UV	Lee <i>et al.</i> , 1986
Refrigerantes	Degaseificação, centrifugação	C8	Acetonitrila/ metanol/ tampão fosfato (17,5:12,5:70)	UV	Williams, 1986
Bebidas, sorvete, molho de tomate, pó para refrescos*	Dissolução na fase móvel, diluição, filtração	C18	Metanol/ácido acético/H ₂ O (20+5+75), tampão acetato/metanol (95+5)	UV	Veerabhadr arao <i>et al.</i> , 1987
Bebidas, molhos, pescados, vegetais, prod lácteos e de panificação	Extração com metanol ou acetonitrila	C18	Tampão fosfato/metanol (95+5)	UV	Bui & Cooper, 1987
Refrigerante, suco, geléia, goiabada, catchup, maionese, margarina e iogurte	1) Éter etílico/éter de petróleo (1:1) 2) Etanol, filtração	Amino-SIL-X-I	Ácido acético 0,5% / Metanol (19:1)	UV	Cecchi, 1988

Tabela 7– Condições de análise dos ácidos sórbico e benzóico por CLAE

Queijo	Extração com metanol /tampão acetato (37+63)	C18	Acetonitrila/ tampão acetato (20+80)	UV	Küppers & Jans, 1988
Molho de soja, suco de laranja e iogurte	NaCl, H ₂ SO ₄ 10% e éter etílico	C18	Metanol/ acetonitrila/ácido acetônico 0,05M (1,5:1:3,1) com 2.5mM cloreto cetiltrimetilamônio	UV	Ikai <i>et al.</i> , 1988
Iogurte*	H ₂ SO ₄ 10%, H ₂ O, ferrocianeto de potássio 15%, acetato de zinco 30%	C18	Metanol/H ₂ O (1:1)	UV	Serrano <i>et al.</i> , 1991
Margarina	Destilação a vapor	C18	Metanol/H ₂ O (gradiente)	Fluores -cência	Burini & Damiani, 1991
Suco de laranja**	Centrifugação e pré coluna C18	Hamilton PRP-1	Acetonitrila/ tampão fosfato (40+60)	UV	Lee, 1995
Produtos vegetais embalados	1) Extração com 60% metanol 2) Destilação a vapor	C18	Tampão fosfato (0,03 mol/l pH 6,7)	UV	Montaño <i>et al.</i> , 1995
Rosbife seco, molho de soja, fruta cristalizada	1) solução aquosa de ácido α -hidroxibutírico e hexadeciltrimetilamônio 2) (1), sonicação, filtração, lavagem com acetonitrila, diluição.	C18	Solução de ácido α -hidroxibutírico, acetonitrila e brometo de hexadeciltrimetilamônio	UV	Chen & Fu, 1995
Produtos lácteos, bebidas	Diluição	C18	H ₂ O/tampão acetato/acetonitrila (88:2:10)	UV	Mannino & Cosio, 1996
Iogurtes, refrigerantes e sucos	1) Diluição e filtração (bebidas) 2) Ferrocianeto de potássio e sulfato de zinco (iogurtes)	DVB-H	H ₂ SO ₄ 0,01N /acetonitrila (75:25)	UV	Castellari <i>et al.</i> , 1997
Vinho branco*	Filtração, diluição, Pré colunas Sep-Pak C18 e resina de troca iônica	C18	H ₂ SO ₄ /metanol (gradiente)	DAD	Benassi & Cecchi, 1998

* só para ácido benzóico

** só para ácido sórbico

7- Referências Bibliográficas

- ALI, M. S. Rapid Quantitative Method for Simultaneous Determination of Benzoic Acid, Sorbic Acid and Four Parabens in Meat and Nonmeat Products by Liquid Chromatography. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.68, n.3, p.488-492, 1985.
- ARGOUDELIS, C. J. Isocratic Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Aspartame and other Additives in Soft Drinks. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.303, n.1, p.256-262, 1984.
- BENASSI, M. T.; CECCHI, H. M. Method Development for the Simultaneous Determination of Carboxylic Acids, Phenolic Compounds, and Sorbic Acid in White Wines. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v.21, n.4, p.491-501, 1998.
- BENNETT, M. C.; PETRUS, D. R. Quantitative Determination of Sorbic Acid and Sodium Benzoate in Citrus Juice. **Journal of Food Science**, Chicago, v.42, n.5, p.1220-1221, Sept./Oct., 1977.
- BOLIN, H. R.; STAFFORD, A. E.; FLATH, R. A. Increased Specificity in Sorbic Acid Determination in Stored Dried Prunes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.32, n.3, p.683-685, May/June, 1984.

BRASIL. **Portaria nº 540 – SVS**, publicada no Diário Oficial da União nº 208, 28 de Outubro, 1997.

BRASIL. **Resolução nº 04/88 – CNS**, publicada no Diário Oficial da União, 24 de Novembro, 1988. ABIA – Compêndio da Legislação de Alimentos – Atos do Ministério da Saúde, 7ª revisão, 1988.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative Agents in Foods. Mode of Action and Microbial Resistance Mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, Gaithersburg, v.50, n.1-2, p.1-17, Sept., 1999.

BUI, L. V.; COOPER, C. Reverse Phase Liquid Chromatographic Determination of Benzoic and Sorbic Acids in Foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.70, n.5, p.892-896, Sept./Oct., 1987.

BURINI, G.; DAMIANI, P. Determination of Sorbic Acid in Margarine and Butter by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.543, n.1, p.69-80, Apr., 1991.

CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L.N. Effect of Certain Additives on Sorbate Stability. **Food Research International**, Amsterdam, v.29, n.2, p.147-154, Mar., 1996.

CASTELLARI, M.; ENSINI, I.; ARFELLI, G.; SPINABELLI, U.; AMATI, A.
Determinazione Dell'acido Sorbico e Dell'acido Benzoico Mediante Colonna
HPLC a Matrice Polimerica (DVB-H). **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v. 36,
n.359, p.606-610, mag., 1997.

CECCHI, H. M. **Comparação e desenvolvimento de Métodos Analíticos para
Ácidos Benzoico e Sórbito em Alimentos**. Campinas, 1988. 152p. Tese
(Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas.

CHEN, B. H.; FU, S. C. Simultaneous Determination of Preservatives, Sweeteners
and Antioxidants in Foods by Paired-Ion Liquid Chromatography.
Chromatographia, Wiesbaden, v.41, n.1/2, p.43-50, July, 1995.

CHIPLEY, J. R. Sodium Benzoate and Benzoic Acid. In: DAVIDSON, P. M. &
BRANEN, A. L. (Eds) **Antimicrobials in Foods**. New York: Marcel Dekker
Inc., 1993. Cap.2, p.11-48.

COELHO, R. G.; NELSON, D. L.; LIESELOTTE, J. Determinação de
Conservadores em Alguns Alimentos Industrializados Brasileiros por
Cromatografia em Fase Gasosa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**,
Campinas, v.3, n.1, p. 1-13, jan./jul. 1983.

DAVIDSON, P. M.; BRANDEN, A. L. Antimicrobial Activity of Non-Halogenated Phenolic Compounds. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.44, n.8, p.623-632, Aug., 1981.

DE LUCA, C.; PASSI, S.; QUATTRUCCI, E. Simultaneous Determination of Sorbic Acid and Parabens in Foods: a New Gas Chromatography-Mass Spectrometry Technique Adopted in a Survey on Italian Foods and Beverages. **Food Additives and Contaminants**, London, v.12, n.1, p.1-7, Jan./Feb., 1995

DEUEL, H. J. Jr.; ALFIN-SLATER, R.; WEIL, C. S.; SMYTH, H. F. Jr. Sorbic Acid as a Fungistatic Agent for Foods. I, Harmlessness of Sorbic Acid as a Dietary Component. **Food Research**, Chicago, v.19, n.1, p.1-11, Jan./Feb., 1954a.

DEUEL, H. J. Jr.; CALBERT, C. E.; ANISFELD, L.; McKEEHAN, H.; BLUNDEN, H. D. Sorbic Acid as Fungistatic Agent for Foods. II Metabolism of β -Unsaturated Fatty Acids with Emphasis on Sorbic Acid. **Food Research**, Chicago, v.19, n.1, p.13-19, Jan./Feb., 1954b.

FAO/WHO. **Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)**. Washington: ILSI Press, 1999.

FRÍAS, I.; ALVAREZ, R.; SIERRA, A.; HARDISSON, A. Aspectos Bromatológicos y Toxicológicos de los Conservantes Benzoico y Sorbico. **Alimentaria**, Madrid, v.34, n.273, p.109-114, jun., 1996.

GAUNT, I. F.; BUTTERWORTH, K. R.; HARDY, J.; GANGOLI, S. D. Long-Term Toxicity of Sorbic Acid in the Rat. **Food Cosmetics Toxicology**, Oxford, v.13, n.1, p.31-45, 1975.

GUTFINGER, T.; ASHKENAZY, R.; LETAN, A. Determination of Benzoic and Sorbic Acids in Orange Juice. **Analyst**, Cambridge, v.101, n.1198, p.49-54, Jan., 1976.

HANNUKSELA, M.; HAAHTELA, T. Hypersensitivity Reactions to Food Additives. **Allergy**, Copenhagen, v.42, n.8, p.561-575, Nov, 1987.

HANNUKSELA, M.; LAHTI, A. Peroral Challenge Tests with Food Additives in Urticaria and Atopic Dermatitis. **International Journal of Dermatology**, Oxford, v.25, n.3, p.178-180, Apr., 1986.

HENDY, R. J.; HARDY, J.; GAUNT, I. F.; KISS, I. S.; BUTTERWORTH, K. R. Long-Term Toxicity Studies of Sorbic Acid in Mice. **Food Cosmetics Toxicology**, Oxford, v.14, n.5, p.381-386, 1976.

IKAI, Y.; OKA, H.; KAWAMURA, N.; YAMADA, M. Simultaneous Determination of Nine Food Additives Using High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 457, p. 333-343, Dec., 1988.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. New York: Chapman & Hall, 1996.

JUHLIN, L. Recurrent Urticaria: Clinical Investigation of 330 Patients. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v.104, n.3, p.369-381, Mar., 1981.

JUHLIN, L.; MICHAELSSON, G.; ZETTERSTROM, O. Urticaria and Asthma Induced by Food and Drug Additives in Patients with Aspirin Hypersensitivity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v.50, n.2, p.92, 1972.

JUNG, R.; COJOCEL, C.; MÜLLER, W.; BÖTTGER, D.; LÜCK, E. Evaluation of the Genotoxic Potential of Sorbic Acid and Potassium Sorbate. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v.30, n.1, p.1-7, Jan., 1992.

KARASZ, A. B.; MAXSTADT, J. J.; REHER, J.; DECOCCO, F. Rapid Screening Procedure for the Determination of Preservatives in Ground Beef: Sulfites, Benzoates, Sorbates, and Ascorbates. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v.59, n.4, p.766-769, July, 1976.

KHAN, S. H.; MURAWSKI, M. P.; SHERMA, J. Quantitative High Performance Thin Layer Chromatographic Determination of Organic Acid Preservatives in Beverages. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v.17, n.4, p.855-865, Feb., 1994.

KIMBLE, C. H. Chemical Food Preservatives. In: BLOCK, S. S. (Ed.) **Desinfection, Sterilization and Preservation**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1977. Cap.41, p.834-858.

KÜPPERS, F. J. E. M.; JANS, J. A. Reverse-Phase Liquid Chromatographic Determination of Benzoic and Sorbic Acids in Fresh Cheese. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.71, n.5, p.1068-1071, 1988.

LAHTI, A.; VÄÄNÄNEN, A.; KOKKONEN, E. L.; HANNUKSELA, M. Acetylsalicylic Acid Non-Immunologic Contact Urticaria. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v.16, n.3, p.133-135, Mar., 1987.

LEE, H. S. Liquid Chromatographic Determination of Benzoic Acid in Orange Juice: Interlaboratory Study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, Gaithersburg, v.78, n.1, p.80-82, 1995.

LEE, H. S.; ROUSEFF, R. L.; FISHER, J. F. Determination of Food Preservatives in Orange Juice by Reversed-Phase Liquid Chromatography. **Journal of Food Science**, Chicago, v.51, n.3, p.568-570, May/June, 1986.

LEUENBERGER, U.; GAUCH, R.; BAUMGARTNER, E. Determination of Food Preservatives and Saccharin by High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.173, n.2, p.343-348, 1979.

LINDSAY, D. G. Estimation of the Dietary Intake of Chemicals in Food. **Food Additives and Contaminants**, London, v.3, n.1, p.71-88, Jan./Mar., 1986.

LLOYD, A. G.; DRAKE, J. J. P. Problems Posed by Essential Food Preservatives. **British Medical Bulletin**, London, v.31, n.3, p.214-219, 1975.

LÜCK, E. **Conservacion Quimica de los Alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1977.

LUND, B. M.; GEORGE, S. M.; FRANKLIN, J. G. Inhibition of Type A and B (Proteolytic) *Clostridium botulinum* by Sorbic Acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, n.5, p.935-941, May, 1987.

MANNINO, S.; COSIO, M. S. Determination of Benzoic and Sorbic Acids in Food by Microdialysis Sampling Coupled with HPLC and UV Detection. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v.8, n.4, p.311-316, 1996.

MARSH, E. H. Antibiotics in Foods - Naturally Occurring, Developed and Added. **Residue Review**, v.12, p.65, 1966.

MARWAN, A. G.; NAGEL, C. W. Microbial Inhibitors of Cranberries. **Journal of Food Science**, Chicago, v.51, n.4, p.1009-1013, July/Aug., 1986a.

MARWAN, A. G.; NAGEL, C. W. Characterization of Cranberry Benzoates and their Antimicrobial Properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v.51, n.4, p.1069-1070, July/Aug., 1986b.

MICHAELSSON, G.; JUHLIN, L. Urticaria Induced by Preservatives and Dye Additives in Foods and Drugs. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v.88, n.6, p.525-532, 1973.

MICHILS, A.; VANDERMOTEN, G.; DUCHATEAU, J.; YERNAULT, J. C. Anaphylaxis with Sodium Benzoate. **The Lancet**, London, v.337, p.1424-1425, June, 1991.

MONTAÑO, A.; SÁNCHEZ, A. H.; REJANO, L. Determination of Benzoic and Sorbic Acids in Packaged Vegetable Products. Comparative Evaluation of Methods. **Analyst**, Cambridge, v.120, n.10, p.2483-2487, Oct., 1995.

SAFFORD, R. J.; BASKETTER, D. A.; ALLENBY, C. F.; GOODWIN, B. F. J. Immediate Contact Reactions to Chemicals in the Fragrance Mix and a Study of the Quenching Action of Eugenol. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v.123, n.5, p.595-606, Nov., 1990.

SCHIFFMANN, D.; SCHLATTER, J. Genotoxicity and Cell Transformation Studies with Sorbates in Syrian Hamster Embryo Fibroblasts. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v.30, n.8, p.669-672, Aug., 1992.

SCHLATTER, J.; WÜRGLER, F. E. ; KRÄNZLIN, R.; MAIER, P.; HOLLIGER, E.; GRAF, U. The Potential Genotoxicity of Sorbates: Effects on Cell Cycle "in vitro" in V79 Cells and Somatic Mutations in *Drosophila*. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v.30, n.10, p.843-851, Oct., 1992.

SERRANO, F. O.; LÓPEZ, I. S.; REVILLA, G. N. High Performance Liquid Chromatography Determination of Chemical Preservatives in Yogurt. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v.14, n.4, p. 709-717, 1991.

SHTENBERG, A. J.; IGNAT'EV, A. D. Toxicological Evaluation of Some Combinations of Food Preservatives. **Food Cosmetics Toxicology**, Oxford, v.8, n.4, p.369-380, 1970.

SIMÃO, A. M. **Aditivos para Alimentos sob o Aspecto Toxicológico**. São Paulo: Nobel, 1989.

- SMITH, J. **Food Additive User's Book.** London: Blackie Academic & Professional, 1997.
- SOFOS, J. N. **Sorbate Food Preservatives.** Boca Raton: CRC Press Inc., 1989.
- SOFOS, J. N. Antimicrobial Agents. In: MAGA, J. A. & TU, A. T. (Eds.) **Food Additive Toxicology.** New York: Marcel Dekker Inc., 1995. Cap.11, p.501-529.
- SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F. Antimicrobial Activity of Sorbate. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.44, n.8, p.614-622, Aug., 1981.
- SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F. Sorbic Acid and Sorbates. In: DAVIDSON, P. M. & BRANEN, A. L. (Eds.) **Antimicrobials in Foods.** New York: Marcel Dekker Inc., 1993. Cap.3, p.49-94.
- SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F.; ALLEN, C. E. Influence of pH on *Clostridium botulinum* Control by Sodium Nitrite and Sorbic Acid in Chicken Emulsions. **Journal of Food Science**, Chicago, v.45, n.1, p.7-12, Sept./Oct., 1980a.
- SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F.; BHOTHIPAKSA, K.; ALLEN, C. E.; ROBACH, M. C.; PAQUETTE, M. W. Effects of Various Concentrations of Sodium Nitrite and Potassium Sorbate on *Clostridium botulinum* Toxin Production in Commercially

Prepared Bacon. **Journal of Food Science**, Chicago, v.45, n.5, p.1285-1292, Sept./Oct., 1980b.

SOFOS, J. N.; PIERSON, M. D.; BLOCHER, J. C.; BUSTA, F. F. Mode of Action of Sorbic Acid on Bacterial Cells and Spores. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.3, n.1, p.1-17, Feb., 1986.

STRATFORD, M.; ANSLOW, P. A. Evidence that Sorbic Acid Does Not Inhibit Yeast as a Classic "Weak Acid Preservative". **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.27, n.4, p.203-206, Oct., 1998.

TERADA, H.; SAKABE, Y. Studies on the Analysis of Food Additives by High-Performance Liquid Chromatography. V Simultaneous Determination of Preservatives and Saccharin in Foods by Ion-Pair Chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.346, n.5, p.333-340, Oct., 1985.

THOMPSON, C. O.; TRENNERY, V. C.; KEMMERY, B. Micellar Electrokinetic Capillary Chromatographic Determination of Artificial Sweeteners in Low-Joule Soft Drinks and Other Foods. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.694, n.2, p.507-514, Mar., 1995.

TJAN, G. H.; KONTER, T. Thin Layer Chromatographic Identification of Preservatives in Food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v.55, n.6, p.1223-1225, Nov., 1972.

- TOLEDO, M. C. F. Aditivos Alimentares. Em OGA, S. (Ed.) **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda., 1996, Cap. 5.1, p.405-439.
- VALDEHITA, M. T.; CARBALLIDO, A.; RODRÍGUEZ, A. C. Conservadores en Alimentos. II- Determinación Cuantitativa por Densitometría UV en Cromatografía de Capa Fina. **Anales de Bromatología**, Madrid, v.32, n.1, p.93-106, nov., 1980.
- VEERABHADRARAO, M.; NARAYAN, M. S.; KAPUR, O.; SASTRY, C. S. Reverse Phase Liquid Chromatographic Determination of Some Food Additives. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.70, n.3, p.578-582, May/June, 1987.
- VETTORAZZI, G. Advances in the Safety Evaluation of Food Additives. **Food Additives and Contaminants**, London, v.4, n.4, p.331-356, Oct./Dec., 1987.
- WAGNER, M. K.; MOBERG, L. J. Present and Future Use of Traditional Antimicrobials. **Food Technology**, Chicago, v.43, n.1, p.143-147, Jan., 1989.
- WALKER, R. Toxicology of Sorbic Acid and Sorbates. **Food Additives and Contaminants**, London, v.7, n.5, p.671-676, Sept./Oct., 1990.

WILLIAMS, M. L. Rapid Separation of Soft Drinks Ingredients Using High Performance Liquid Chromatography. **Food Chemistry**, Oxford, v.22, n.3, p.235-244, Mar., 1986.

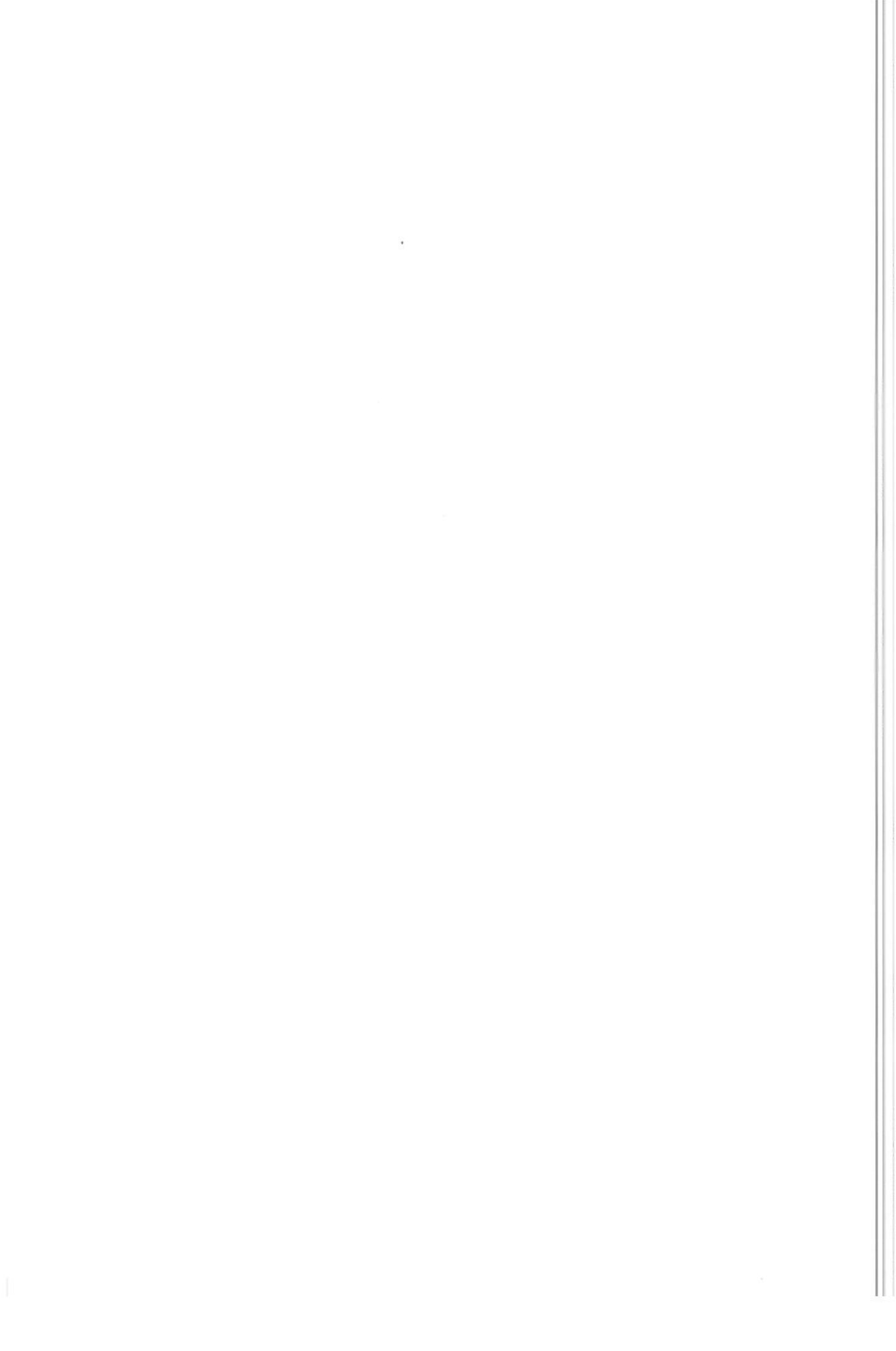
WHO. Principles for the Safety Assessment of Food Additives and Contaminants in Food. **Environmental Health Criteria**, Geneva, n.70, 1987.

WHO. Evaluation of Some Food Additives and Contaminants. **Technical Report Series**, Geneva, n.868, 1997.

WHO. Evaluation of Certain Food Additives. **Technical Report Series**, Geneva, n.89, 2000.

Capítulo 2

HPLC DETERMINATION OF BENZOIC AND SORBIC ACIDS IN FOODS AND BEVERAGES



HPLC determination of benzoic and sorbic acids in foods and beverages

S. A. V. Tfouni^a, M. C. F. Toledo^a

^a*Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
UNICAMP*

Abstract

Different brands of soft drink, fruit juice, margarine, yogurt and cheese available on the Brazilian market, were analyzed for benzoic and sorbic acids by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector. The detection of benzoic and sorbic acids was carried out at the wavelengths of 228 and 260 nm, respectively. An octadecylsilyl analytical column was used and the mobile phase consisted of 81% water, 2% 0.005 M ammonium acetate buffered at pH 4.2 with glacial acetic acid and 17% acetonitrile. The preservatives were present in the samples in a wide range of concentrations. The levels of benzoic and sorbic acids were respectively in the range of 148-338 mg/L and 47.1 mg/L in soft drinks; 289-804 mg/L and 260-450 mg/L in fruit juices; 273-721 mg/kg and 242-803 mg/kg in margarines. The levels of sorbic acid in yogurt and cheese were respectively 126-213 mg/kg and 155-1370 mg/kg. Only one sample presented a preservative level above that permitted by the legislation in force in Brazil.

1. Introduction

Food preservation has always been of great importance. Nowadays this preservation is often made with the use of chemical preservatives. Benzoic and sorbic acids, and their respective sodium, potassium and calcium salts, are widely used as preservatives in food products. They are generally used to inhibit yeast and mold growth, being effective also against a wide range of bacteria. These compounds are most active in foods of low pH value and essentially ineffective in foods at neutral pH values (Jay, 1996; Sofos, 1995).

It is often necessary to quantify the presence of these antimicrobials in different food products because of their possible toxicity. Effects such as metabolic acidosis, convulsions and hyperpnoea were observed in experimental animals and humans given very high doses of benzoic acid. Some weak clastogenic activity was noted in *in vitro* assays (WHO, 1997). The development of allergic reactions to benzoates in humans, such as urticaria, non-immunological contact urticaria and asthma, have been reported in some studies (Hannuksela & Haahtela, 1987; Juhlin, 1981; Juhlin, Michaelsson & Zeterstrom, 1972; Michaelson & Juhlin, 1973). Other studies showed that sorbic acid had low toxicity, explained by the fact that it is rapidly metabolized by pathways similar to those of other fatty acids (Deuel, Calbert, Anisfeld, McKeehan, & Blunden, 1954; Walker, 1990). In humans a few cases of idiosyncratic intolerance to sorbic acid have been reported (non-immunological contact urticaria and *pseudo*-allergy) (Hannuksela & Haahtela, 1987; Safford, Basketter, Allenby & Goodwin, 1990; Walker, 1990).

There are various methods for detecting and quantifying benzoates and sorbates in foodstuffs, such as thin layer chromatography, UV spectroscopy, high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography. Nowadays, HPLC is the most common analytical procedure for the detection and quantification of these preservatives in foods and beverages (Bui & Cooper, 1987; Chen & Fu, 1995; Lee, Rouseff & Fischer, 1986; Leuenberger, Gauch & Baumgartner, 1979; Mannino & Cosio, 1996)

In Brazil benzoates and sorbates are approved for use in a wide range of foodstuffs. The objective of the present study was to determine their level in different brands of foodstuffs commonly consumed in Brazil. The data obtained will be used to further estimate the average intake of these preservatives by the population.

The monitoring of food additive intakes has been recommended by the Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC), as some food additives, among which benzoic acid is included, may approach or exceed the respective acceptable daily intake (ADI) (WHO, 2000).

2. Materials and methods

2.1. Standards and chemicals

HPLC grade acetonitrile was purchased from Mallinckrodt. Other reagents (analytical grade) were purchased from Merck. Commercial standards (Sigma

Chemical Co.) of benzoic and sorbic acids were used. Standards were diluted in water. Water was obtained from a Millipore Milli-Q water purification system. For filtration of the samples prior to injection, a Millex HV 0.45 μm filter (Millipore Co.) was used.

2.2. *Sample preparation*

Different brands and batches of soft drink, fruit juice, margarine, yogurt and cheese were purchased from supermarkets in the city of Campinas, SP, Brazil. Three batches of each brand were homogenized and then analyzed in duplicate. Before injection into the liquid chromatograph, all samples were filtered through a 0.45 μm filter.

2.2.1. *Soft drink*

No extraction was necessary for the determination of sorbates and benzoates in soft drinks, according to Argoudelis (1984); Veerabhadrarao, Narayan, Kapur, and Sastry (1987) and Williams (1986). Samples were decarbonated in an ultrasonic bath for 5 minutes and diluted with water.

2.2.2. *Fruit juice*

The procedure used for fruit juices was based on the method described by Bennet and Petrus (1977) and Bui and Cooper (1987). Samples were centrifuged (2000 rpm) for 10 minutes and an aliquot of the supernatant diluted with water.

2.2.3. *Margarine*

The procedure used for margarine was the same as that described by Leuenberger, Gauch and Baumgartner (1979). A 5 g sample was dissolved in 50 mL of diethyl ether and extracted twice with 10 mL of 0.1 M sodium hydroxide solution in a separating funnel. The basic aqueous extracts were acidified with 1 mL of 2.5 M sulphuric acid in a volumetric flask and diluted to volume with water.

2.2.4. *Yogurt and Petit suisse cheese*

The procedure used for the determination of sorbates in yogurt and petit suisse cheese was based on the method described by Bui and Cooper (1987). A 5 g sample was placed into a test tube with screw thread and 15 mL of 2% H_3PO_4 (ortho-phosphoric acid) added. The solution was then shaken in a tube rotator for 1 minute. Then 30 mL of acetonitrile were added and stirred again for 1 minute. The mixture was filtered through a Whatman n° 1 filter paper and diluted with water.

2.2.5. Cheese

For the determination of sorbates in cheese, the procedure used was based on the method described by Cecchi (1988). 40 mL of ethanol were added to 10 g sample of cheese, and then stirred on a mechanical shaker for 30 minutes. The mixture was then filtered through a Whatman n^o 1 filter paper and diluted with water.

2.3. High performance liquid chromatography

The analysis was carried out using an HPLC apparatus equipped with a Waters 600 Controller pump, a Waters in-line degasser, a Waters 717 plus autosampler, a C18 reversed phase column (Nova-Pak, 30 cm x 3.9 mm id, 4 µm particle size) and a Waters 996 photodiode array detector.

The mobile phase used consisted of 81% water, 2% 0.005 M ammonium acetate buffered at pH 4.2 with glacial acetic acid and 17% acetonitrile, at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The injection volume was 20 µL. The chromatogram was recorded for 15 minutes. The peaks of benzoate and sorbate in the samples were identified by their UV spectrum (200 to 400 nm) and by comparing the retention time with that of the standard. The detection of benzoic and sorbic acids was carried out at the wavelengths of maximum absorption of the compounds, 228 and 260 nm, respectively.

2.4. Quantification

The external standard plot method was used. Duplicate injections of 20 μL benzoic acid and sorbic acid standard solutions were used to construct linear regression lines (peak ratio versus acids concentrations). The concentration range of the standard curves was $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ – $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$. The detection limit (as concentrations), corresponding to the analyte concentration giving a signal equal to the blank signal plus two standard deviations of the blank (Miller & Miller, 1993), was $0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$ for sorbic acid and $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ for benzoic acid, in soft drinks. In fruit juice, the limit was $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ for both benzoic and sorbic acids. In margarine the limit was $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ for sorbates and $0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$ for benzoates. The detection limit for sorbic acid in yogurt and cheese was $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $0.07 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

2.5. Recovery study

In order to verify the accuracy and precision of the analytical procedure, recovery studies were carried out by spiking selected samples of each matrix with benzoic and sorbic acids. Samples were spiked previous to the dilution with water for soft drinks and before the centrifugation for fruit juices. For margarine, this procedure was conducted before dissolving with diethyl ether, and for yogurt and cheese, before the addition of 2% H_3PO_4 and ethanol, respectively. This was made by adding benzoic and sorbic acid standard aqueous solutions (for soft drinks, fruit

juices, margarine and yogurt) or ethanol solutions (for cheese) at three different concentrations. The spiked samples as well as the unspiked controls were analyzed in duplicate.

Recoveries were calculated as the ratio from the differences in the total amount of either benzoic or sorbic acid between the spiked and unspiked sample and the amount added, expressed as percentage.

3. Results and discussion

The analytical method used for the quantification of benzoic and sorbic acids was based on Mannino and Cosio (1996) for the determination of these preservatives in soft drinks. The C18 column used by the authors was 10 cm in length and the mobile phase was supplied at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹. Since the C18 column used in this present work was 30 cm in length, more acetonitrile (17%) than the quantity suggested (10%) was used, and the flow rate was increased to 1.0 ml min⁻¹, in order to avoid a long run time. These analytical conditions resulted in an effective separation of the preservatives for all products analyzed and a 15 min run time. The average retention time was 8 min for benzoic acid and 10.7 min for sorbic acid. The identification and purity of the peaks were confirmed by comparing their spectra (200 to 400 nm) with those of aqueous solutions of the standards.

The extraction of the preservatives was based on procedures described in the literature. For cheese and yogurt, the extraction was based on Cecchi (1988)

and Bui and Cooper (1987), respectively. However, in both cases lower amounts of sample and solvents were used in order to adequate the method with the materials available in our laboratory. As for the other matrices (soft drinks, fruit juices and margarine), no adaptations of the extraction procedure were necessary.

Recovery for benzoic acid and sorbic acid varied from 94.0% to 102.2% and from 86.1% to 101.0%, respectively (Table 1). In yogurt and cheese recovery studies were only carried out for sorbic acid, since the use of benzoic acid in these products is not permitted in Brazil. Figures 1 to 5 show typical chromatograms of the five matrices analyzed.

Average concentrations of benzoic and sorbic acids are given in tables 2 to 6. Of all the products analyzed, only one sample of “prato” cheese had sorbic acid above the maximum level allowed by Brazilian legislation (1000 mg/kg) (ABIA 1999). Sorbic acid was found in only one brand of typical Brazilian soft drink (guaraná-type B) and two brands of fruit juice (passion fruit B and west Indian cherry A). Two out of 3 brands of regular cola did not contain any of the preservatives. In general, regular colas have a high sucrose concentration and very low pH values, which together should inhibit microbial growth without the need of added preservative. The use of either benzoic or sorbic acid was noted in different brands of margarines, whereas only one sample presented both preservatives (margarine E). The analysis of yogurts and cheese confirmed the absence of benzoic acid, in agreement with the Brazilian legislation.

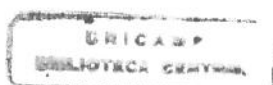
The minimum concentrations of benzoic and sorbic acids required to inhibit microbial growth may vary due to species, strains, pH of the substrate and other

factors. Mostly yeasts and molds are inhibited by 0.001% to 0.1% sorbic acid, and by 0.002% to 0.07% benzoic acid (Lück, 1977).

According to the results of this study, although both preservatives are added to different foodstuffs in a wide range of concentration, none of the samples presented levels below the range of antimicrobial activity. A preference for using benzoic acid in beverages was detected, despite the fact that both preservatives are permitted for use in these products. All samples (except one) complied with the regulations for the use of preservatives in Brazil

References

- ABIA (1999) *Compêndio da legislação de alimentos. Volume 1. Atos do Ministério da Saúde*. São Paulo.
- ARGOUEDELIS, C. J. (1984) Isocratic liquid chromatography method for the simultaneous determination of aspartame and other additives in soft drinks. *Journal of Chromatography* **303** (1): 256-262.
- BENNETT, M. C. and PETRUS, D. R. (1977) Quantitative determination of sorbic acid and sodium benzoate in citrus juice. *Journal of Food Science* **42** (5):1220-1221.
- BUI, L. V. and COOPER, C. (1987) Reverse phase liquid chromatographic determination of benzoic and sorbic acids in foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **70** (5): 892-896.
- CECCHI, H. M. (1988) Comparação e desenvolvimento de métodos analíticos para ácidos benzóico e sórbico em alimentos. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.



- CHEN, B. H. and FU, S. C. (1995) Simultaneous determination of preservatives, sweeteners and antioxidants in foods by paired-ion chromatography. *Chromatographia* **14** (1/2): 43-50.
- DEUEL, H. J. Jr.; CALBERT, C. E.; ANISFELD, L.; McKEEHAN, H. and BLUNDEN, H. D. (1954) Sorbic acid as fungistatic agent for foods. II Metabolism of β -unsaturated fatty acids with emphasis on sorbic acid. *Food Research* **19** (1): 13-19.
- HANNUKSELA, M. and HAAHTELA, T. (1987) Hypersensitivity reactions to food additives. *Allergy* **42** (8): 561-575.
- JAY, J. M. (1996) *Modern food microbiology*. Chapman & Hall, New York.
- JUHLIN, L. (1981) Recurrent urticaria: Clinical investigation of 330 Patients. *British Journal of Dermatology* **104** (3): 369-381.
- JUHLIN, L.; MICHAELSSON, G. and ZETERSTROM, O. (1972) Urticaria and asthma induced by food and drug additives in patients with aspirin hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **50** (2):92.

LEE, H. S.; ROUSEFF, R. L. and FISHER, J. F. (1986) Determination of food preservatives in orange juice reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Food Science* **51** (3): 568-570.

LEUENBERGER, U.; GAUCH, R. and BAUMGARTNER, E. (1979) Determination of food preservatives and saccharin by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **173** (2): 343-348.

LÜCK, E. (1977) *Conservacion quimica de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza.

MANNINO, S. and COSIO, M. S. (1996) Determination of benzoic and sorbic acids in food by microdialysis sampling coupled with HPLC and UV detection. *Italian Journal of Food Science* **8** (4): 311-316.

MICHAELSSON, G. and JUHLIN, L. (1973) Urticaria induced by preservatives and dye additives in foods and drugs. *British Journal of Dermatology* **88** (6): 525-532.

MILLER, J. C. and MILLER, J. N. (1993) *Statistics for analytical chemistry*. Ellis Horwood Limited, Chichester.

SAFFORD, R. J.; BASKETTER, D. A.; ALLENBY, C. F. and GOODWIN, B. F. J. (1990) Immediate contact reactions to chemicals in the fragrance mix and a

- study of the quenching action of eugenol. *British Journal of Dermatology* **123** (5): 595-606.
- SOFOS, J. N. (1995) Antimicrobial agents. In *Food additive toxicology*, eds. MAGA, J. A. & TU, A. T, cap.11, pp.501-529. Marcel Dekker Inc., New York.
- VEERABHADRARAO, M.; NARAYAN, M. S.; KAPUR, O. and SASTRY, C. S. (1987) Reverse phase liquid chromatographic determination of some food additives. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **70** (3): 578-582.
- WALKER, R. Toxicology of sorbic acid and sorbates. (1990) *Food Additives and Contaminants* **7** (5): 671-676.
- WILLIAMS, M. L. (1986) Rapid separation of soft drinks ingredients using high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* **22** (3): 235-244.
- WHO. (1997) Evaluation of some food additives and contaminants. *Technical Report Series* **868**.
- WHO. (2000) Evaluation of certain food additives. *Technical Report Series* **89**.

Table 1
Recovery of benzoic and sorbic acids from different products.

Product	Mean recovery (%) ^{*±} SD	
	Benzoic acid	Sorbic acid
Cola soft drink	102.2 ± 2.7	99.3 ± 5.2
Pineapple juice	98.7 ± 1.9	101.0 ± 2.5
Margarine	94.0 ± 1.9	94.6 ± 2.8
Yogurt	-----	86.1 ± 2.8
Cheese	-----	89.1 ± 4.0

* Average of three different concentrations.

Table 2
Benzoic and sorbic acid contents in diferent brands of soft drinks.

Soft drink	Benzoic acid (mg/L)		Sorbic acid (mg/L)	
	Mean ± SD	%CV	Mean ± SD	%CV
Cola A	nd	-----	nd	-----
Diet Cola A	155 ± 4	2.6	nd	-----
Cola B	nd	-----	nd	-----
Diet Cola B	148 ± 4	2.9	nd	-----
Cola C	150.8 ± 0.6	0.38	nd	-----
Guaraná A	229 ± 7	3.0	nd	-----
Diet Guaraná A	238 ± 4	1.5	nd	-----
Guaraná B	307 ± 3	1.0	47.1 ± 0.9	2.0
Diet Guaraná B	303 ± 9	3.1	nd	-----
Guaraná C	175 ± 4	2.3	nd	-----
Orange A	338 ± 23	6.8	nd	-----
Diet Orange A	294 ± 11	3.7	nd	-----
Orange B	362 ± 1	0.27	nd	-----
Diet Orange B	334 ± 8	2.4	nd	-----
Orange C	337 ± 4	1.9	nd	-----

nd – not detected

Table 3

Benzoic and sorbic acid contents in fruit juices.

Type and brand	Benzoic acid (mg/L)		Sorbic acid (mg/L)	
	Mean $\pm$ SD	%CV	Mean $\pm$ SD	%CV
Pineapple A	383 $\pm$ 5	1.3	nd	----
Pineapple B	575 $\pm$ 5	0.84	nd	----
Mango A	371 $\pm$ 2	0.48	nd	----
Mango B	616 $\pm$ 8	1.4	nd	----
Passion fruit A	804 $\pm$ 4	0.44	nd	----
Passion fruit B	289 $\pm$ 2	0.85	260 $\pm$ 2	0.68
Grape A	577.3 $\pm$ 0.4	0.069	nd	----
Grape B	624 $\pm$ 1	0.17	nd	----
Cashew A	481 $\pm$ 8	1.8	nd	----
Cashew B	634 $\pm$ 10	1.5	nd	----
Guava A	586 $\pm$ 6	0.99	nd	----
West Indian cherry A	nd	----	450 $\pm$ 38	----
"Cajá" A	641 $\pm$ 7	1.1	nd	----
Muscatel grape A	354 $\pm$ 4	1.1	nd	----

nd – not detected

Table 4

Benzoic and sorbic acid contents in margarine.

Brand	Benzoic acid (mg/kg)		Sorbic acid (mg/kg)	
	Mean $\pm$ SD	%CV	Mean $\pm$ SD	%CV
A	nd	----	662 $\pm$ 10	1.5
B	nd	----	803 $\pm$ 6	0.75
C	664 $\pm$ 7	1.0	nd	----
D	nd	----	421 $\pm$ 0	0
E	273 $\pm$ 2	0.73	242 $\pm$ 5	2.0
F	721 $\pm$ 32	4.4	nd	----

nd – not detected

Table 5
Sorbic acid contents in strawberry yogurt.

Brand	Sorbic acid (mg/kg)	
	Mean $\pm$ SD	%CV
A	126 $\pm$ 2	1.6
B	146 $\pm$ 1	1.0
C	213 $\pm$ 4	1.7
D	136 $\pm$ 3	2.3
E	148.5 $\pm$ 0.7	0.45
F	126 $\pm$ 3	2.0
G	162.3 $\pm$ 0.4	0.22
H	129 $\pm$ 1	0.78

Table 6
Sorbic acid contents in cheese.

Cheese type and brand	Sorbic acid (mg/kg)	
	Mean $\pm$ SD	%CV
Strawberry Petit suisse A	306.5 $\pm$ 0.4	0.12
Strawberry Petit suisse B	155.0 $\pm$ 0.7	0.46
Strawberry Petit suisse C	367 $\pm$ 18	4.8
Curd-cheese A	542 $\pm$ 8	1.5
Curd-cheese B	565 $\pm$ 33	5.9
Curd-cheese C	489 $\pm$ 27	5.5
Curd-cheese D	431 $\pm$ 6	1.4
Curd-cheese E	376 $\pm$ 15	3.9
"Prato" cheese A	1371 $\pm$ 7	0.51

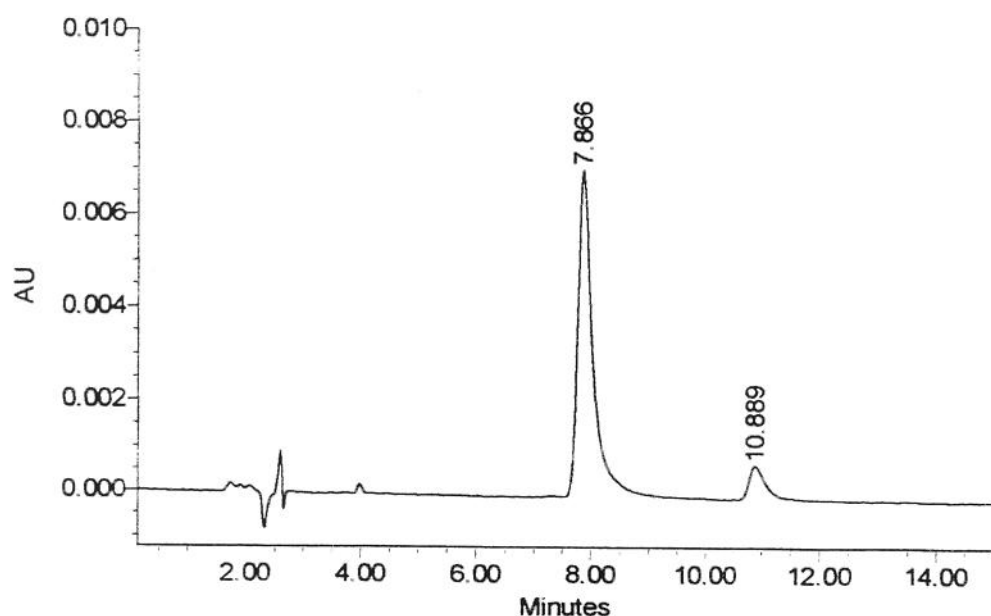


Figure 1 – HPLC chromatogram of guaraná-type soft drink sample. Peaks: 7.866 min = benzoic acid, 10.889 min = sorbic acid. Conditions: Column Nova-Pak C18. Detection: UV 228 nm. Mobile phase: water:acetonitrile:0.005 M ammonium acetate buffered at pH 4.2 with glacial acetic acid (81:17:2, v/v). Flow rate: 1.0 mL min⁻¹.

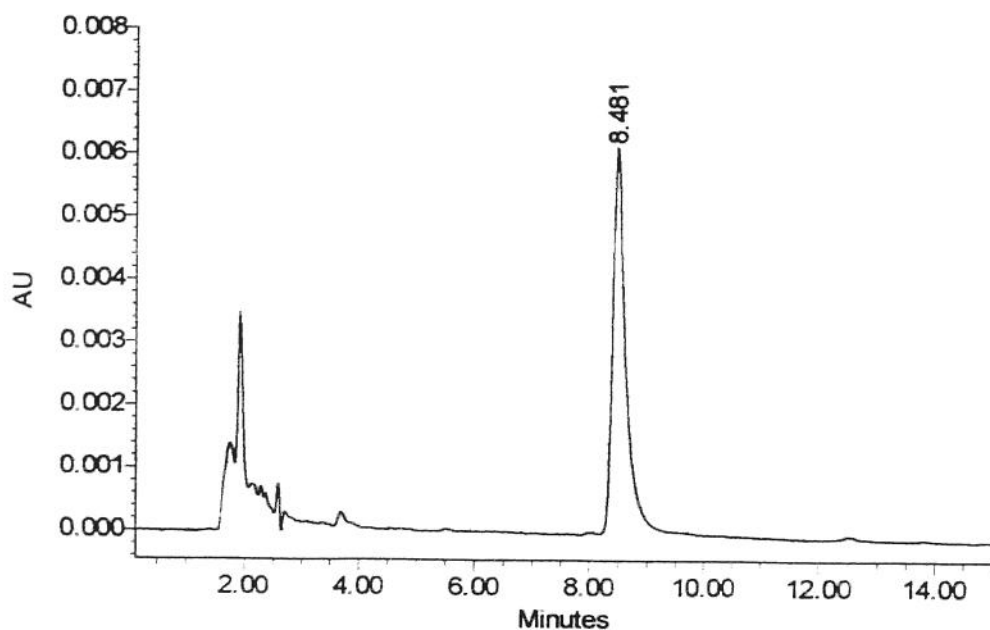


Figure 2 – HPLC chromatogram of cashew juice sample. Peaks: 8.481 min = benzoic acid. Conditions: Column Nova-Pak C18. Detection: UV 228 nm. Mobile phase: water:acetonitrile:0.005 M ammonium acetate buffered at pH 4.2 with glacial acetic acid (81:17:2, v/v). Flow rate: 1.0 mL min⁻¹.

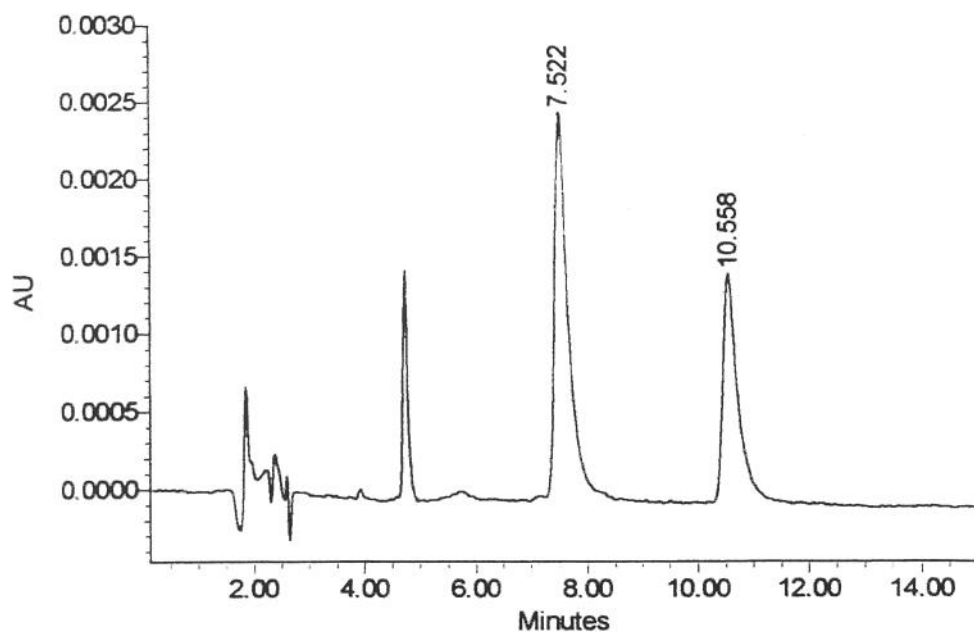


Figure 3 – HPLC chromatogram of margarine sample. Peaks: 7.522 min = benzoic acid, 10.558 min = sorbic acid. Conditions: Column Nova-Pak C18. Detection: UV 228 nm. Mobile phase: water:acetonitrile:0.005 M ammonium acetate buffered at pH 4.2 with glacial acetic acid (81:17:2, v/v). Flow rate: 1.0 mL min⁻¹.

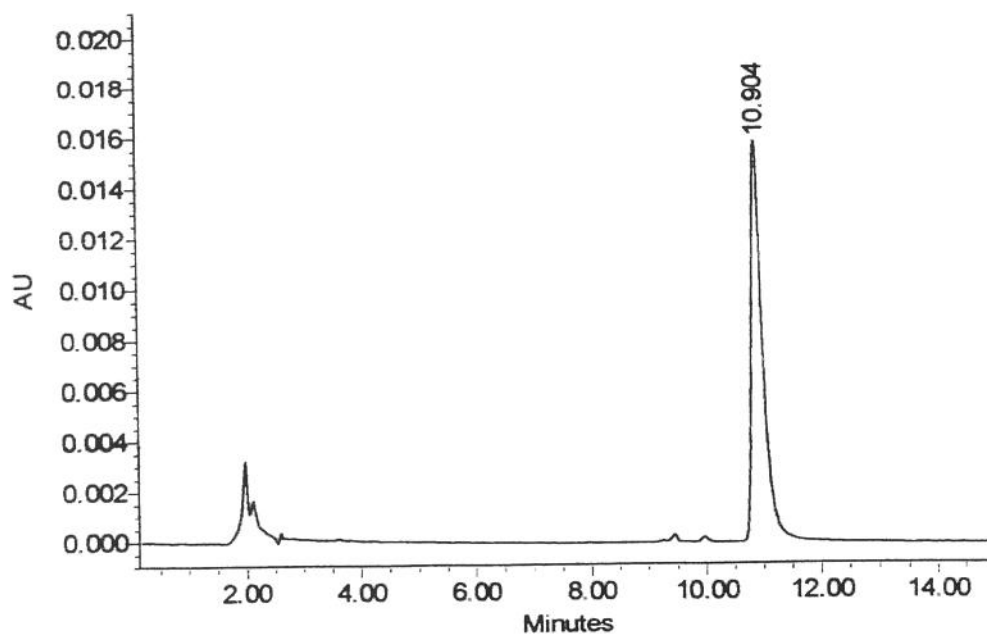


Figure 4 – HPLC chromatogram of strawberry yogurt sample. Peaks: 10.904 min = sorbic acid. Conditions: Column Nova-Pak C18. Detection: UV 260 nm. Mobile phase: water:acetonitrile:0.005 M ammonium acetate buffered at pH 4.2 with glacial acetic acid (81:17:2, v/v). Flow rate: 1.0 mL min⁻¹.

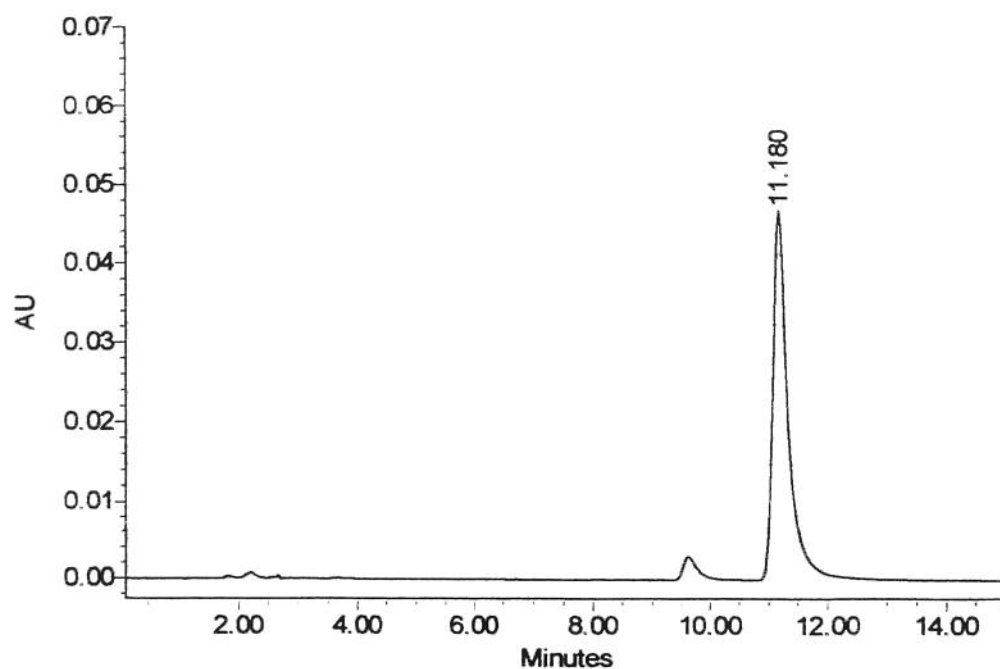


Figure 5 – HPLC chromatogram of curd-cheese sample. Peaks: 11.180 min = sorbic acid. Conditions: Column Nova-Pak C18. Detection: UV 228 nm. Mobile phase: water:acetonitrile:0.005 M ammonium acetate buffered at pH 4.2 with glacial acetic acid (81:17:2, v/v). Flow rate: 1.0 mL min⁻¹.

Capítulo 3

ESTIMATE OF THE DAILY INTAKE OF BENZOIC AND SORBIC ACIDS IN BRAZIL

Estimate of the daily intake of benzoic and sorbic acids in Brazil

Silvia A. V. Tfouni^a and M. Cecília F. Toledo^a

^aDepartamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
UNICAMP

ABSTRACT

The daily intake of benzoates and sorbates from selected food categories was estimated in Brazil in the year 1999. The Budget method was used as a first screening procedure for the estimation of the safety aspects of the maximum permitted levels of benzoates and sorbates established by the Brazilian food legislation. This screening indicated that benzoates should be further investigated. In a second step, the daily intake of the preservatives was estimated based on national food consumption data and on the analytical determination of these additives. Benzoate and sorbate levels in soft drinks, fruit juices, margarine, yogurt and cheese were determined by high performance liquid chromatography coupled with a photodiode array detector (detection at 228 nm for benzoic acid and at 260 nm for sorbic acid). The calculated values indicated that the potential daily intake for the average consumers is lower than the respective acceptable daily intake (ADI) of 5 mg/kg body weight for benzoates and 25 mg/kg body weight for sorbates. Soft drinks were identified as the main source of benzoate intake.

INTRODUCTION

The widespread occurrence and multiplication of microorganisms in the environment and the associated chemical/enzymatic reactions result in the decomposition of materials, including foods (Sofos 1995). Chemicals have been used for centuries in order to preserve the food supply and ensure safety from pathogens. Sodium chloride, sodium and potassium nitrate, sugars, alcohol, wood smoke, various spices and some organic acids have been regarded as traditional preservatives (Kimble 1977, Lück 1977).

Chemical methods of food preservation involve the use of chemical additives, which act as antimicrobial agents. In Brazil various food preservatives are permitted for use; benzoic and sorbic acids and their respective sodium, potassium and calcium salts are among the commonly used ones. As to the Brazilian consumer's exposure to these additives, no data are available in the literature.

Benzoic acid is one of the oldest chemical preservatives used in the cosmetic, drug, and food industries. Its preservative action appears to have first been described in 1875 by H. Fleck. Since benzoic acid could not initially be produced synthetically in large quantities, it was not introduced for food preservation until around 1900 (Lück 1977, Chipley 1993).

Sorbic acid, a naturally occurring compound, was first isolated by the German chemist A. W. von Hofmann in 1859 (Sofos 1989). It was not until the late 1930s

and early 1940s, however, that the antimicrobial and preservative properties of the compound were first discovered both in Germany and in the United States by E. Miller and C. M. Gooding, respectively (Lück 1977, Sofos and Busta 1981).

Some adverse effects have been associated with these preservatives. Effects such as metabolic acidosis, convulsions and hyperpnoea were observed in experimental animals and humans given very high doses of benzoic acid (WHO 1997). Several studies have reported the development of allergic reactions to benzoates in humans (urticaria, non-immunological contact urticaria, asthma) (Juhlin *et al.* 1972, Michaelson and Juhlin 1973, Juhlin 1981, Hannuksela and Lahti 1986, Hannuksela and Haahtela 1987, Rademaker and Forsyth 1989). A few cases of idiosyncratic intolerances associated with sorbic acid have also been reported in humans (non-immunological contact urticaria and *pseudo*-allergy) (Hannuksela and Haahtela 1987, Walker 1990, Safford *et al.* 1990).

The use of food additives in different countries has been limited by specific regulations. As in other countries, Brazil follows the recommendations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA) on the safe use of food additives. According to the committee, the measure of safety in the use of an additive can be expressed in terms of its acceptable daily intake (ADI), which represents the amount of the substances that can be consumed daily, even for a lifetime, without health hazards. The ADI is expressed in mg of the additive/kg body weight (bw) (WHO 1987). Group ADIs of 0-5 mg/kg bw for benzoic acid and benzoate salts, benzyl acetate, benzyl alcohol and benzaldehyde

and 0-25 mg/kg bw for sorbic acid and sorbate salts have been recommended by the JECFA (FAO/WHO 1999).

Preliminary intake assessments of benzoates conducted by the Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC) using the Budget Method and the proposed maximum limits of the draft General Standard for Food Additives (GSFA), showed that their intake may approach or exceed the respective ADI and a need for national data on benzoate intake was evidenced (CAC 1996). This paper describes the estimates of the intake of benzoates and sorbates from dietary sources in Brazil. The survey was based on national food consumption data and the analytical determination of these additives in selected food categories.

PROCEDURE

Food consumption data

In order to estimate the potential daily intake of benzoates and sorbates in Brazil two sources of information on food consumption data were used: Survey on Household Budgets (IBGE 1998) and Brazil Trend'99 (Datamark 1999). The Survey on Household Budgets was carried out by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) in the period 1995-1996 in eleven metropolitan regions (Belém, Belo Horizonte, Brasília, Curitiba, Fortaleza, Goiânia, Porto Alegre, Recife, Rio de Janeiro, Salvador and São Paulo). The food diary method was applied to randomly selected households during a one week period. The

results of the survey, expressed as kg/per capita/year, were reported for food categories as average consumption in each metropolitan region and as national mean consumption.

The Brazil Trend'99 is a report containing the results of a comprehensive investigation of the Brazilian packaged goods market. This report draws on an extensive database for information on markets (years 1979-1998), with projections up to 2003. The estimates for 1999 were based on the historic performance of the market. The study made use of data from over 300 sources, mainly manufacturers of consumer products. In the report, data are expressed as tons or liters of product per year.

Assessment of potential intake of benzoates and sorbates

Budget method

The Budget method was used as a first screening procedure for the estimation of the safety aspects of the maximum permitted levels of benzoates and sorbates as established by the Brazilian food legislation. According to the JECFA (WHO 2000), the Budget method is not intended for the assessment of intake. It estimates a theoretical maximum level in the proportion of the food and/or beverage supply likely to contain the additive such that the ADI for the additive cannot be exceeded by the population. 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 intake of solid food and liquid does not exceed 25 g/kg bw and 100 ml/kg bw, respectively (CAC 1999). In cases where the permitted level of use of the additive exceeds the calculated maximum theoretical level, further intake assessments are required (WHO 2000). For additives with numerical ADI that are used in both solid food and in beverages, which is the case for benzoates and sorbates in Brazil, the following guidelines are recommended, considering F_S (fraction for use in solid foods) = 0.5 and F_L (fraction for use in beverages) = 0.5 (CAC 1999).

Guidelines for additives with numerical ADI used in solid foods:

- Use levels below $F_S \times \text{ADI} \times 40$: indicate that the food additive is suitable for use in foods 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 does not exceed half 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 does not exceed one fourth 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 does not exceed one eighth of the total solid food intake.
- Use levels above $F_S \times \text{ADI} \times 320$: more exact intake estimations should be done, using, for example, food consumption surveys.

Guidelines for additives with numerical ADI used in beverages:

- Use levels below $F_L \times ADI \times 10$: indicate that the food additive is suitable for use in beverages in general.
- Use levels below $F_L \times ADI \times 20$: use levels are acceptable if the daily consumption of beverages containing the additive does not exceed half of the total intake of beverages.
- Use levels below $F_L \times ADI \times 40$: use levels are acceptable if the daily consumption of beverages containing the additive does not exceed one fourth of the total intake of beverages.
- Use levels below $F_L \times ADI \times 80$: use levels are acceptable if the daily consumption of beverages containing the additive does not exceed one eighth of the total intake of beverages.
- Use levels above $F_L \times ADI \times 80$: more exact intake estimations should be done, using, for example, food consumption surveys.

Food additive intake data

For a more refined study the potential daily intake (PDI) of benzoates and sorbates was estimated based on national food consumption data and the analytical determination of these additives in five selected food categories, which together represented over 85% of the processed foods identified as potential dietary sources of benzoates and sorbates for the Brazilian population (Datamark 1999, IBGE 1998). The average intakes were calculated by multiplying the average daily

intake of a selected food category, where the additive is allowed for use, by its use level, as determined analytically, and summing up all these figures.

Determination of benzoates and sorbates

Among the food categories in which both benzoic and sorbic acids as well as their respective sodium, potassium and calcium salts are permitted for use in Brazil, soft drinks, fruit juices and margarine were selected for analysis. Yogurt and cheese, where only sorbates are permitted, were also analyzed. From IBGE (1998) and Datamark (1999), these categories were identified as the most representative sources of these preservatives in the Brazilian diet. Different brands and batches of soft drinks (15 brands), fruit juices (two brands, nine types of fruit), margarine (six brands), yogurt (eight brands) and cheese (nine brands), were purchased from supermarkets in the city of Campinas, SP, Brazil, in 1999/2000. For all products, three batches of each brand were homogenized and then analysed in duplicate.

No extraction procedure was necessary for soft drinks; only dilution with water was used. For fruit juices centrifugation and filtration steps were necessary (Bennet and Petrus 1977, Argoudelis 1984, Williams 1986, Veerbhadrarao *et al.* 1987, Bui and Cooper 1987). The preservatives were extracted from margarine with diethyl ether and 0.1 M sodium hydroxide (Leuenberger *et al.* 1979). Sorbic acid was extracted from yogurts using 2% ortho-phosphoric acid and acetonitrile (Bui and Cooper 1987), and from cheese using ethanol (Cecchi 1988). The analysis was conducted by high performance liquid chromatography (HPLC), based on the method of

Manino and Cosio (1996). The HPLC apparatus was equipped with a Waters 600 controller pump, a Waters in-line degasser, a Waters 717 plus autosampler (20 μ L injection volume), a C18 reverse phase column (Nova-Pak, 30 cm x 3.0 mm id, 4 μ m particle size) and a Waters 996 photodiode array detector (detection at 228 nm for benzoic acid and at 260 nm for sorbic acid). The mobile phase consisted of 81% water, 2% 0.005 M ammonium acetate buffered at pH 4.2 with glacial acetic acid, and 17% acetonitrile, at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹.

RESULTS AND DISCUSSION

A theoretical maximum level for the use of benzoates and sorbates in solid foods and beverages was estimated using the Budget method (CAC 1999). The results are shown in tables 1 and 2. It can be noted that the maximum permitted use level of sorbates in solid foods is equal to $F_S \times ADI \times 160$, indicating that the current limit is acceptable if the daily consumption of solid foods containing the additive does not exceed 1/4 (25%) of the diet. According to IBGE (1998) the solid foods which account for sorbate intake, represent around 1.8% of the diet, while Datamark (1999) projected it as 2.7% of the diet. The maximum permitted use level of sorbates in beverages is equal to $F_L \times ADI \times 80$, indicating that the current limit is acceptable if the daily consumption of beverages containing the additive does not exceed 1/8 (12.5%) of the diet. According to IBGE (1998) the beverages which account for sorbate intake represent approximately 1.8% of the diet, and from Datamark (1999) they represent around 3.6% of the diet. In view of these results, it

can be concluded that the current maximum levels of sorbates in solid foods and beverages in Brazil are acceptable (CAC, 1999).

For benzoates, in both beverages and solid foods the maximum permitted use levels were higher than $F_L \times ADI \times 80$ and $F_S \times ADI \times 320$, respectively, indicating that the intake of this additive should be further investigated (CAC, 1999).

[Insert tables 1 and 2 about here]

A more refined study was then conducted to estimate the potential daily intake of benzoates. The potential daily intake of sorbates was also estimated to check where it stands in relation to the ADI. The results of the estimates are shown in tables 3 and 4.

[Insert tables 3 and 4 about here]

When using IBGE data, the metropolitan region with the highest average consumption for each food category was chosen for the estimates. This region was identified as Porto Alegre for soft drinks, São Paulo for fruit juices and yogurt, Salvador for margarine and Belo Horizonte for cheese. When using Datamark data the Brazilian population was estimated to be 165 000 000 inhabitants, and the market information used was from the 1999 projection. Intake estimates used the average concentration of the preservative in each food category and a consumer average body weight of 60 kg. Samples that were shown not to contain the preservative were excluded from the calculations.

As shown in table 3, benzoate intake was estimated as 0.5 mg/kg bw (10% ADI) and 0.9 (18% ADI) when using IBGE and Datamark data, respectively. Both estimates are within the range of 0.18 - 2.3 mg/kg bw identified by the JECFA as mean benzoate intake, based on the maximum limits specified in national standards (WHO 2000).

The results shown in table 3 also indicated that soft drinks contribute substantially to the intake of benzoates, representing over 80% of the intake estimated for the average consumer. Similarly, soft drinks were shown as an important contributor to the estimated intake of benzoates for the nine Codex Member States (with the exception of China) which submitted data to the Expert Committee (WHO 2000).

Lower intake values were obtained for sorbates: 0.30 mg/kg bw (1.2% ADI) and 0.33 mg/kg bw (1.3% ADI) when using IBGE and Datamark data, respectively (table 4).

Other countries, such as Belgium, Spain, Japan and France have evaluated benzoate and sorbate intakes. In Belgium, the possible intake of benzoic acid was evaluated in 1978: for children the daily intake was estimated as 33% of the ADI, and for adults as 16% of the ADI (Fondu *et al.* 1978). In Spain (Cots *et al.* 1987), the potential daily intake estimated for sorbates, for both children and adults, was below the ADI. Spanish children intakes of benzoates were above the ADI (280%) while adult intakes corresponded to 40% of the ADI. Non-alcoholic beverages were

the most important source of intake of these preservatives by the Spanish. Benzoic and sorbic acids daily intakes by the Japanese were estimated in 1996 as 4.4% and 2.1% of the ADI, respectively (Ishiwata *et al.* 1999). In France the mean daily intake was estimated as 9.4% of the ADI for benzoates and 10.5% of the ADI for sorbates (Verger *et al.* 1998).

CONCLUSION

Despite the methodology used and the dietary habits of the population, the acceptable daily intakes of benzoates and sorbates are unlikely to be exceeded for average consumers all over the world. Nevertheless, a concern may be raised regarding heavy carbonated beverage drinkers, as they may surpass the acceptable intake of benzoates. In this case, whenever technologically possible and economically feasible, the replacement of benzoates by sorbates could be considered.

REFERENCES

- ABIA, 1999, *Compêndio da legislação de alimentos. Volume 1. Atos do Ministério da Saúde* (São Paulo: ABIA).
- ARGOUEDELIS, C. J., 1984, Isocratic liquid chromatography method for the simultaneous determination of aspartame and other additives in soft drinks. *Journal of Chromatography*, **303** (1), 256-262.
- BENNET, M. C. and PETRUS, D. R., 1977, Quantitative determination of sorbic acid and sodium benzoate in citrus juice. *Journal of Food Science*, **42** (5), 1220-1221.
- BUI, L. V. and COOPER, C., 1987, Reverse phase liquid chromatographic determination of benzoic and sorbic acids in foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **70** (5), 892-896.
- 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.
- CAC, 1999, Report of the thirty-first session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Codex Alimentarius Commission, Food and Agriculture Organization of the United Nations, ALINORM **99/12^A**, Rome.

- CECCHI, H. M., 1988, Comparação e desenvolvimento de métodos analíticos para ácidos benzóico e sórbico em alimentos. Campinas. Tese de doutorado em ciência de alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CHIPLEY, J. R., 1993, Sodium benzoate and benzoic acid. Antimicrobials in foods, edited by P. M. Davidson and A. L. Branen (NewYork: Marcel Dekker Inc.), pp.11-48.
- COTS, M., QUER, J. and de la TORRE, M. C., 1987, Evaluación del consumo de aditivos en nuestra población. Conservantes. *Alimentaria*, **24**, 25-28.
- DATAMARK Ltda., 1999. Brazil Trend'99 – Trends in the packaged goods market. 8th ed. (São Paulo).
- FAO/WHO, 1999, *Summary of evaluation performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)* (Washington: ILSI Press).
- FONDU, M. and VAN GINDERTAEL, H. Z. B., 1978, Evaluation de la consommation maximale probable des additifs alimentaires en Belgique: acide benzoïque (2^{ème} étude). *Medicine et Nutrition*, **14** (1), 25-30.
- HANNUKSELA, M. and HAAHTELA, T., 1987, Hypersensitivity reactions to food additives. *Allergy*, **42** (8), 561-575.

- HANNUKSELA, M. and LAHTI, A., 1986, Peroral challenge tests with food additives in urticaria and atopic dermatitis. *International Journal of Dermatology*, **25** (3), 178-180.
- IBGE, 1998, *Pesquisa de orçamentos familiares 1995-1996: Consumo alimentar domiciliar per capita v.2.* (Rio de Janeiro: IBGE).
- ISHIWATA, H., SUGITA, T., TAKEDA, Y., YAMADA, T., NISHIJIMA, M. and FUKASAWA, Y., 1999, Estimation of preservative concentrations in food and their daily intake based on official inspection results in Japan in fiscal year 1996. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, **40** (3), 246-258.
- JUHLIN, L., 1981, Recurrent urticaria: clinical investigation of 330 patients. *British Journal of Dermatology*, **104** (3), 369-381.
- JUHLIN, L., MICHAELSSON, G. and ZETTERSTROM, O., 1972, Urticaria and asthma induced by food and drugs additives in patients with aspirin hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **50** (2), 92.
- KIMBLE, C. H., 1977, Chemical food preservatives. *Desinfection, sterilization and preservation*, edited by S. S. Block (Philadelphia: Lea & Febiger) pp.834-858.

LEUENBERGER, U., GAUCH, R. and BAUMGARTNER, E., 1979, Determination of food preservatives and saccharin by high performance liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, **173** (2), 343-348.

LÜCK, E., 1977, *Conservacion quimica de los alimentos* (Zaragoza: Editorial Acribia).

MANNINO, S., COSIO, M. S., 1996, Determination of benzoic and sorbic acids in food by microdialysis sampling coupled with HPLC and UV detection. *Italian Journal of Food Science*, **8** (4): 311-316.

MICHAELSSON, G. and JUHLIN, L., 1973, Urticaria induced by preservatives and dye additives in foods and drugs. *British Journal of Dermatology*, **88** (6), 525-532.

RADEMAKER, M. and FORSYTH, A., 1989, Contact dermatitis in children. *Contact Dermatitis*, **20** (2), 104-107.

SAFFORD, R. J., BASKETTER, D. A., ALLENBY, C. F. and GOODWIN, B. F. J., 1990, Immediate Contact reactions to chemicals in the fragrance mix and a study of the quenching action of eugenol. *British Journal of Dermatology*, **123** (5), 595-606.

SOFOS, J. N., 1989, *Sorbate food preservatives* (Boca Raton: CRC Press Inc.).

SOFOS, J. N., 1995, Antimicrobial agents. *Food additive toxicology*, edited by J. A. Maga and A. T. TU (New York: Marcel Dekker Inc.) pp.501-529.

SOFOS, J. N. and BUSTA, F. F., 1981, Antimicrobial activity of sorbate. *Journal of Food Protection*, **44** (8), 614-622.

VEERABHADRARAO, M., NARAYAN, M. S., KAPUR, O. and SATRY, C. S., 1987, Reverse phase liquid chromatographic determination of some food additives. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **70** (3), 578-582.

VERGER, P., CHAMBOLLE, M., BABAYOUS, P., LE BRETONS, S. AND VOLATIER, J.-L., 1998, Estimation of the distribution of the maximum theoretical intake for ten additives in France. *Food Additives and Contaminants*, **15** (7), 759-766.

WALKER, R., 1990, Toxicology of sorbic acid and sorbates. *Food Additives and Contaminants*, **7** (5), 671-676.

WILLIAMS, M. L., 1986, Rapid separation of soft drinks ingredients using high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, **22** (3), 235-244.

WHO, 1987, Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food. *Environmental Health Criteria 70*.

WHO, 1997, Evaluation of certain food additives and contaminants. *Technical Report Series 868*.

WHO, 2000, Evaluation of certain food additives. *Technical Report Series 891*.

Table 1- Theoretical maximum level for the use of benzoates and sorbates in solid foods.

	Preservative	
	Benzoates	Sorbates
ADI (mg/kg bw)	0-5	0-25
Maximum permitted level (mg/kg)*	1000	2000
$F_S \times \text{ADI} \times 40$	100	200
$F_S \times \text{ADI} \times 80$	200	1000
$F_S \times \text{ADI} \times 160$	400	2000
$F_S \times \text{ADI} \times 320$	800	4000

*source: ABIA, 1999

F_S (fraction for use in solid foods) = 0.5 (CAC 1999)

Table 2- Theoretical maximum level for the use of benzoates and sorbates in beverages.

	Preservative	
	Benzoates	Sorbates
ADI (mg/kg bw)	0-5	0-25
Maximum permitted level (mg/kg)*	500	1000
$F_L \times \text{ADI} \times 10$	25	125
$F_L \times \text{ADI} \times 20$	50	250
$F_L \times \text{ADI} \times 40$	100	500
$F_L \times \text{ADI} \times 80$	200	1000

*source: ABIA, 1999

F_L (fraction for use in beverages) = 0.5 (CAC 1999)

Table 3 – Potential daily intake (PDI) of benzoates based on food consumption data from IBGE (1998) and Datamark (1999).

Food category	Analytical concentration (mg/kg)	Average daily intake (g/person/day)		PDI (mg/kg bw)	
		IBGE	Datamark	IBGE	Datamark
Soft drink	259.2	96.58	180.62	0.417	0.780
Juice	533.6	2.77	6.27	0.025	0.056
Margarine	552.7	6.33	6.99	0.058	0.064
			Total	0.500	0.900

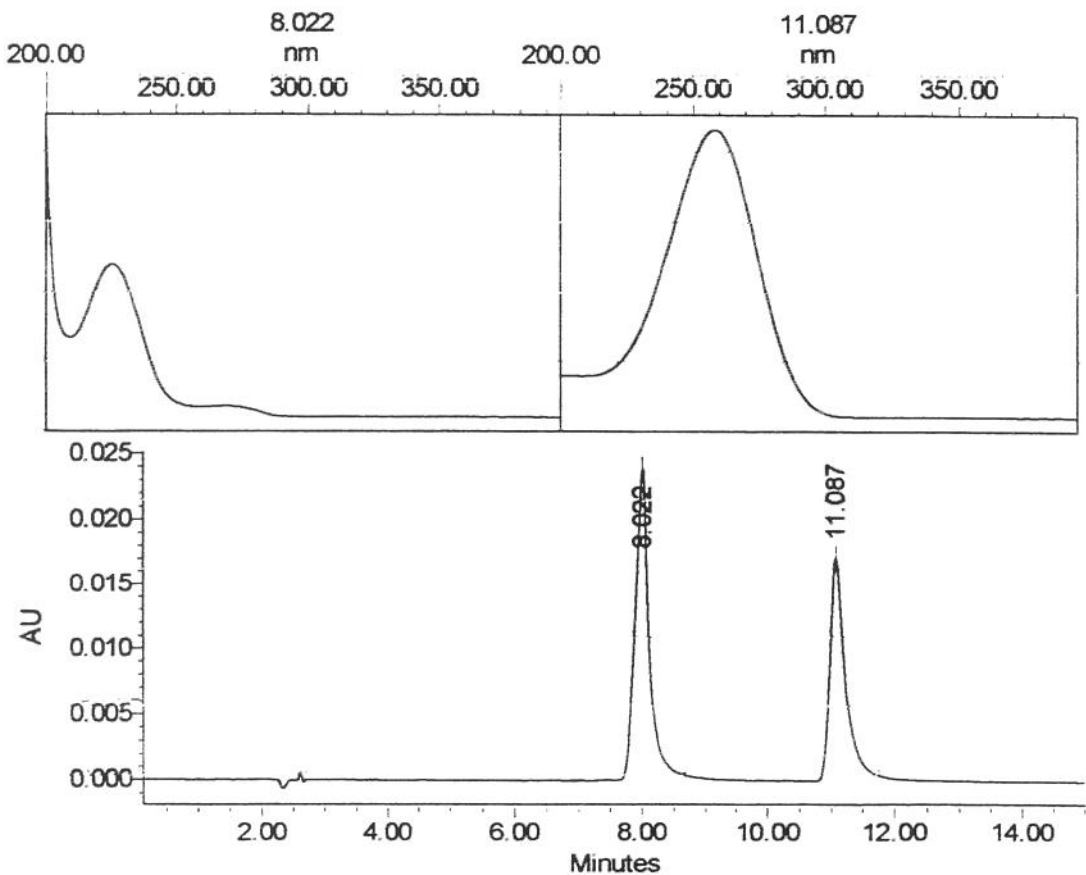
Table 4 – Potential daily intake (PDI) of sorbates based on food consumption data from IBGE (1998) and Datamark (1999).

Food category	Analytical concentration (mg/kg)	Average daily intake (g/person/day)		PDI (mg/kg bw)	
		IBGE	Datamark	IBGE	Datamark
Soft drink	47.10	96.58	180.62	0.076	0.142
Juice	354.8	2.77	6.27	0.016	0.037
Margarine	532.3	6.33	6.99	0.056	0.062
Yogurt	148.1	2.62	7.15	0.006	0.018
Petit suisse	276.2	n.a.	0.61	---	0.003
Cheese	629.1	14.01	6.28	0.147	0.066
			Total	0.301	0.328

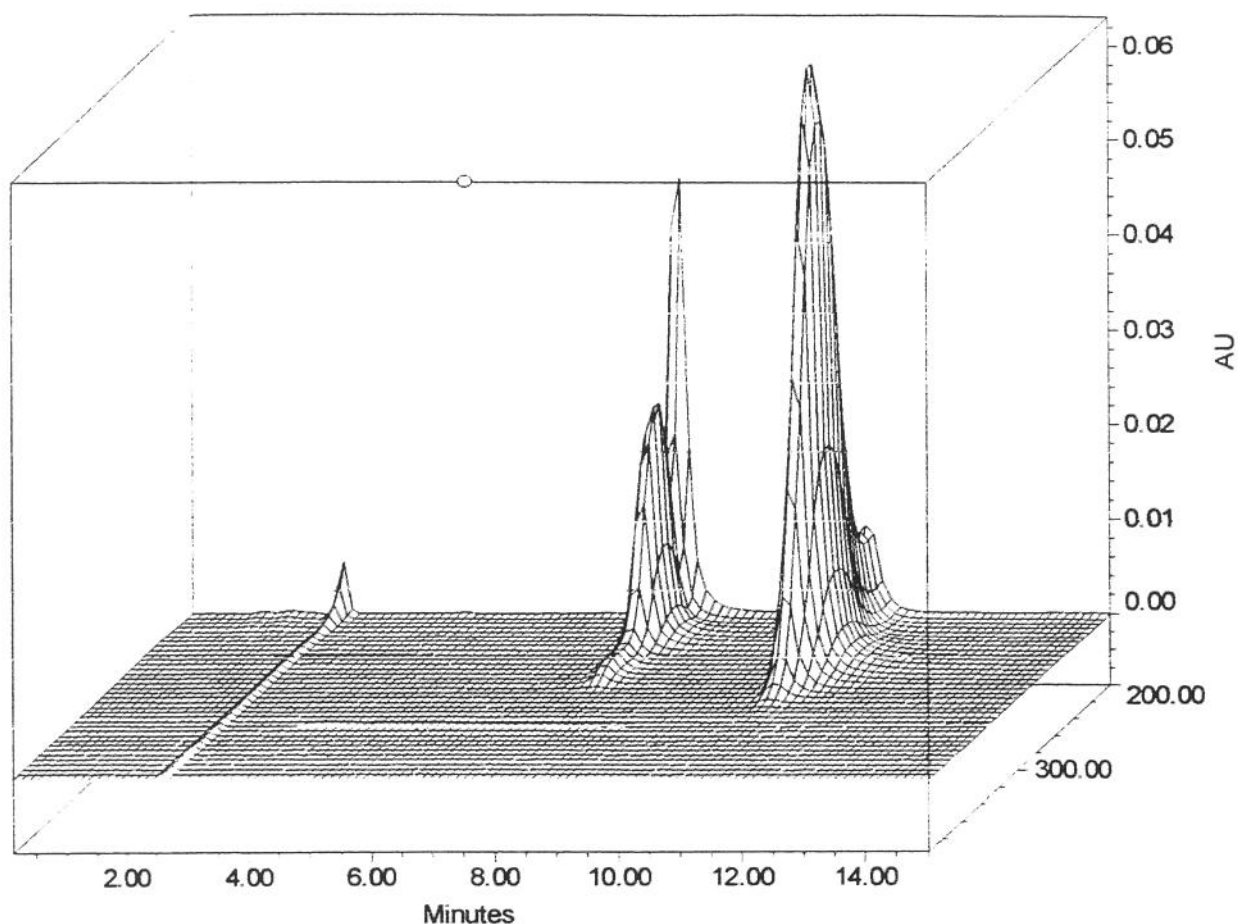
n.a.: not available

Anexos

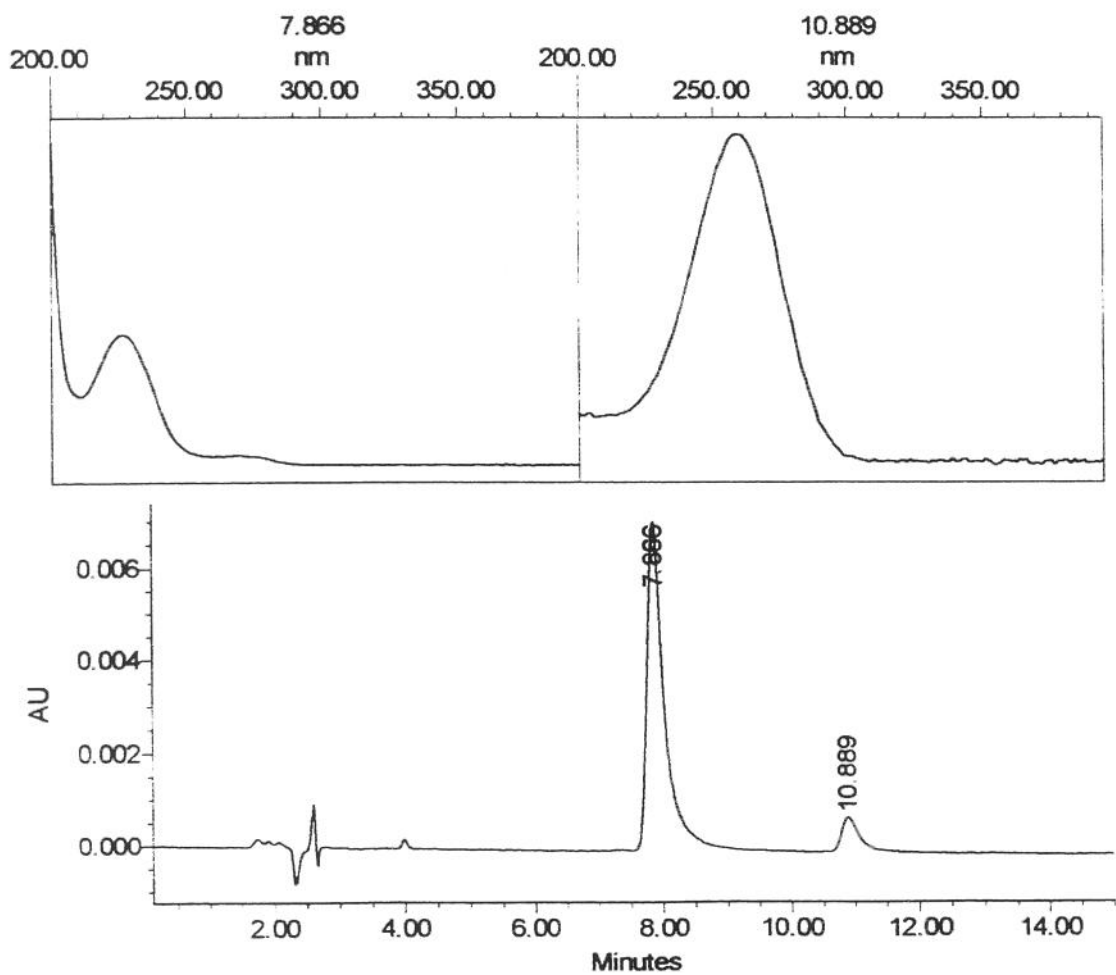
Anexo 1 - Cromatograma por CLAE de ácido benzóico e ácido sórbico (padrão) e seus respectivos espectros (200 a 400 nm). Condições de análise: fase móvel água:acetonitrila:acetato de amônio 0,005M pH 4,2 ajustado com ácido acético glacial (81:17:2, v/v), fluxo 1mL.min⁻¹, coluna Nova-Pak C18, detector de arranjo de diodos. Cromatograma registrado a 228 nm. 8.022 min = ácido benzóico, 11.087 min = ácido sórbico. (Capítulo 2)



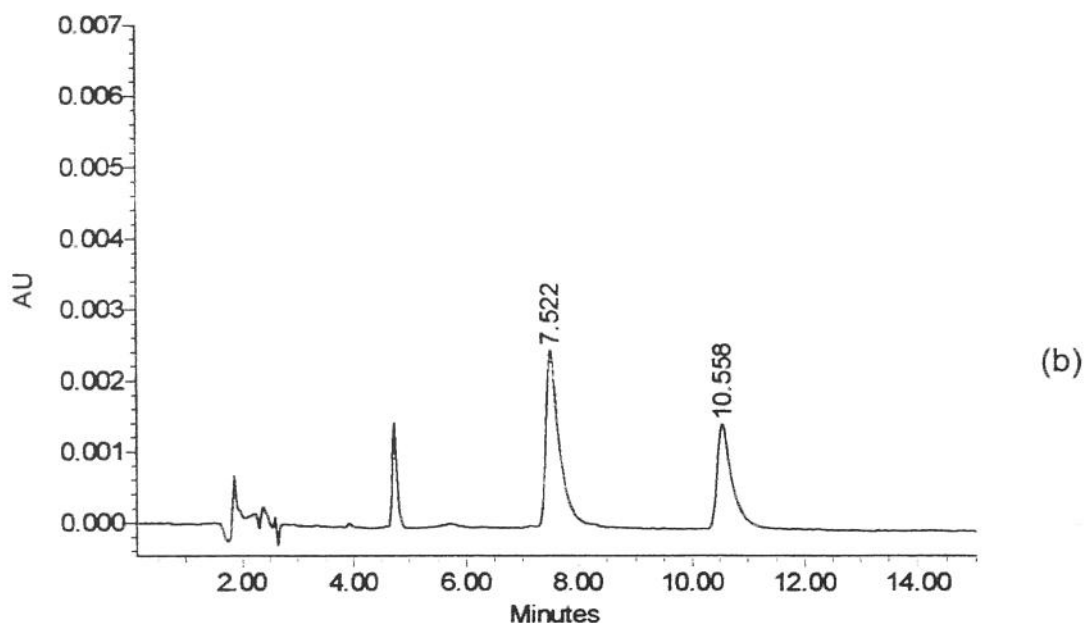
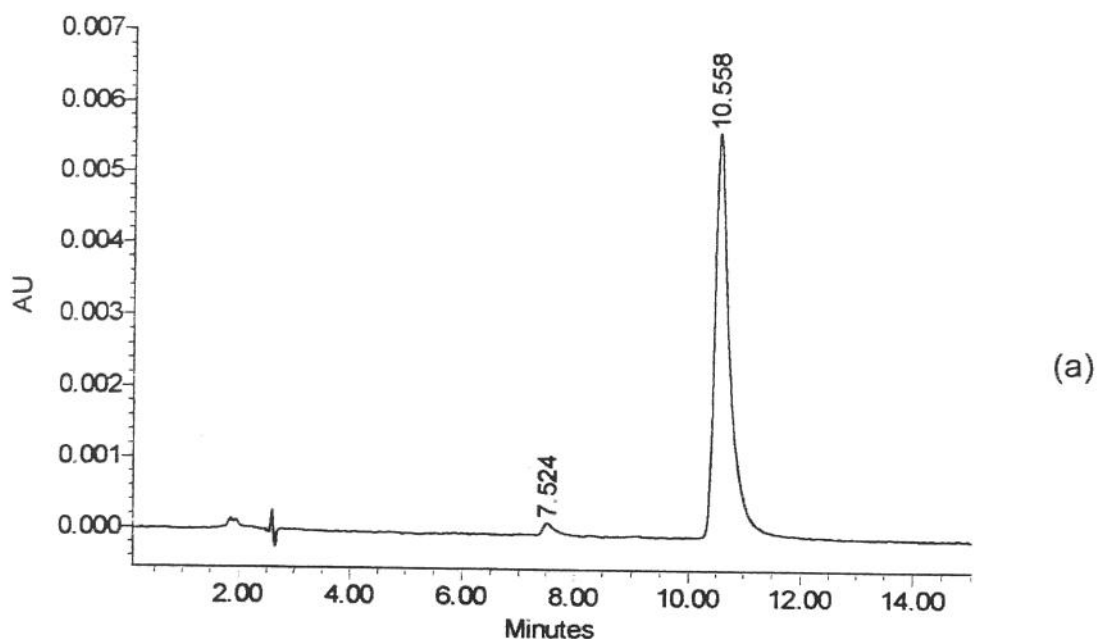
Anexo 2 – Cromatograma por CLAE em 3D de ácido benzóico e ácido sórbico (padrão). Condições de análise: fase móvel água:acetonitrila:acetato de amônio 0,005M pH 4,2 ajustado com ácido acético glacial (81:17:2, v/v), fluxo 1mL.min⁻¹, coluna Nova-Pak C18, detector de arranjo de diodos. 8.022 min = ácido benzóico, 11.087 min = ácido sórbico. (Capítulo 2)



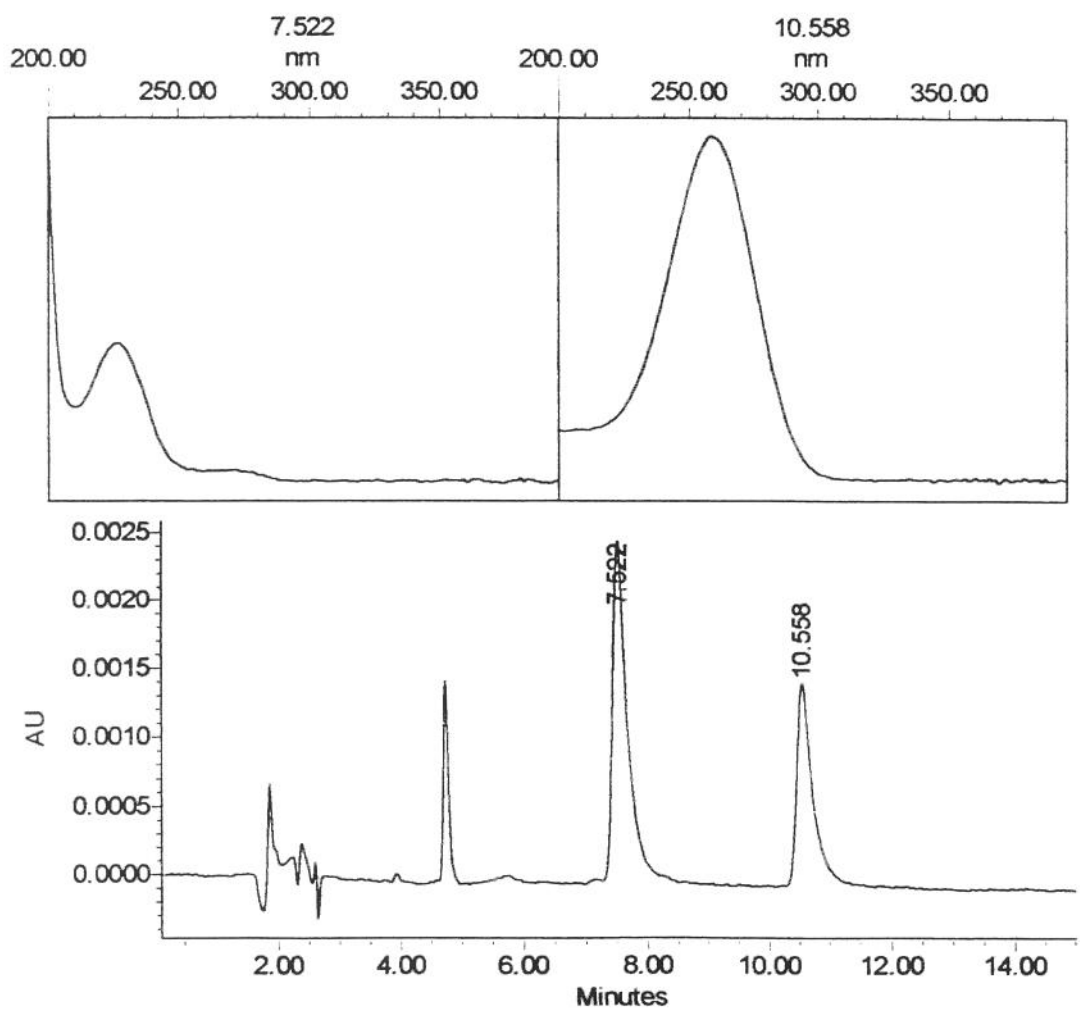
Anexo 3 - Cromatograma por CLAE de amostra de refrigerante guaraná B assim como os espectros dos picos de ácido benzóico e ácido sórbico (200 a 400 nm). Condições de análise: fase móvel água:acetonitrila:acetato de amônio 0,005M pH 4,2 ajustado com ácido acético glacial (81:17:2, v/v), fluxo 1mL.min⁻¹, coluna Nova-Pak C18, detector de arranjo de diodos. Cromatograma registrado a 228 nm. 7.866 min = ácido benzóico, 10.889 min = ácido sórbico. (Capítulo 2)



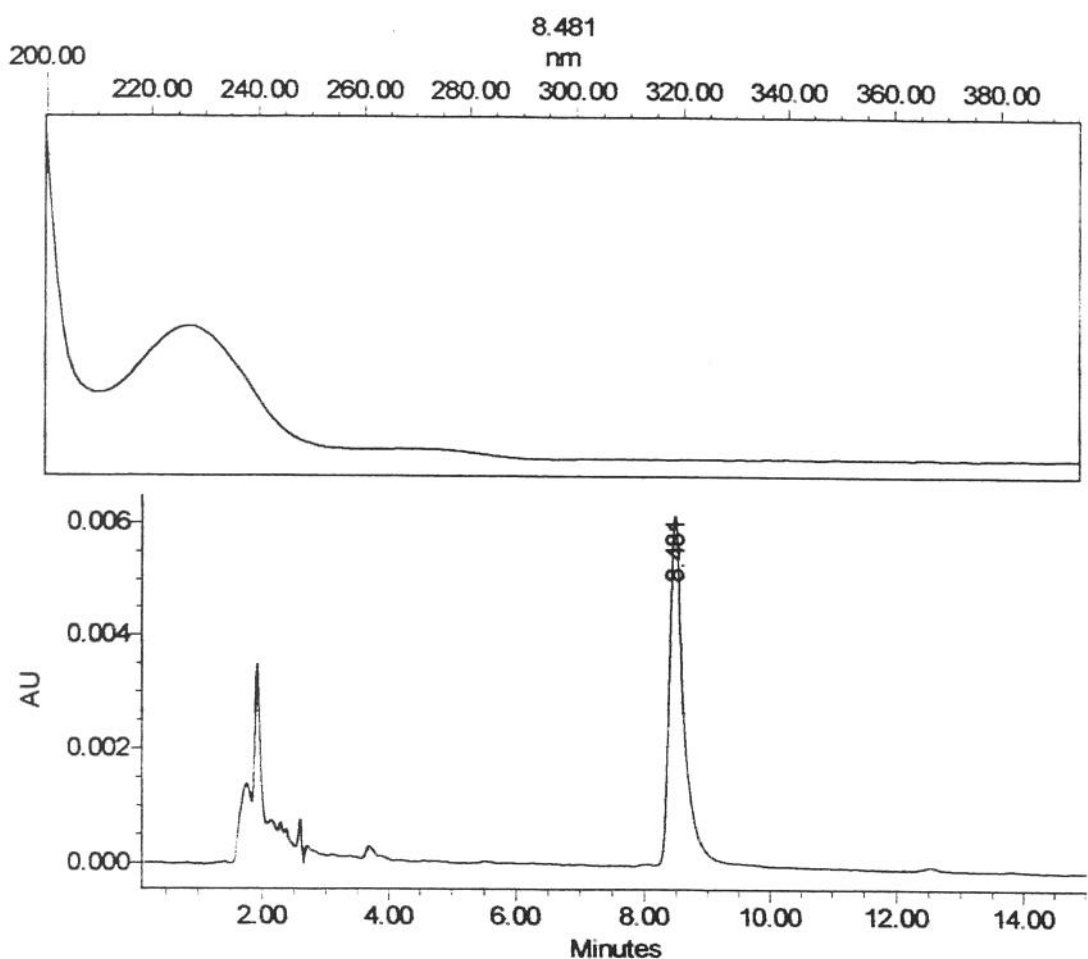
Anexo 8 – Cromatogramas por CLAE da amostra de margarina E registrados a 260 nm (a) e 228 nm (b). Condições de análise: fase móvel água:acetonitrila:acetato de amônio 0,005M pH 4,2 ajustado com ácido acético glacial (81:17:2, v/v), fluxo 1mL.min⁻¹, coluna Nova-Pak C18, detector de arranjo de diodos. 7.522 min. = ácido benzóico, 10.558 min. = ácido sórbico. (Capítulo 2)



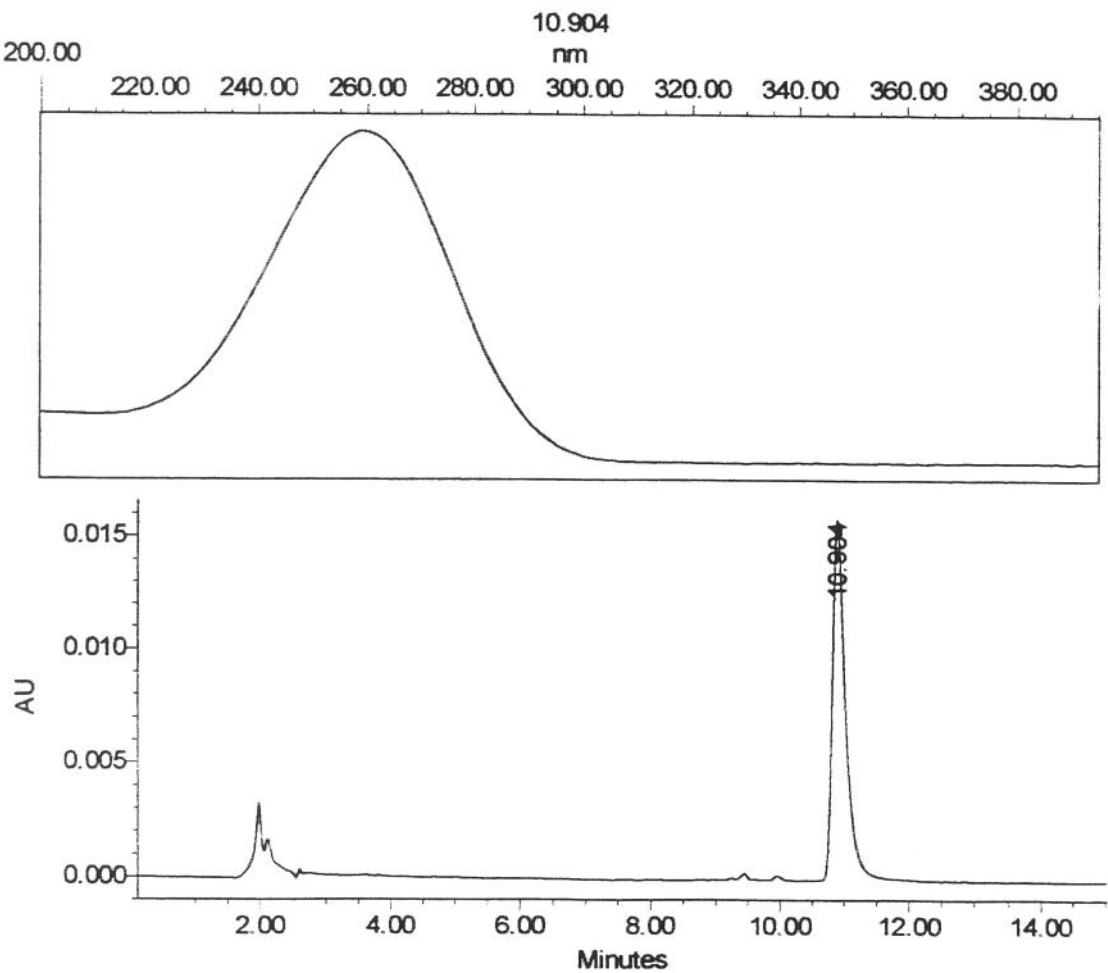
Anexo 4 - Cromatograma por CLAE de amostra de margarina E assim como os espectros dos picos de ácido benzóico e ácido sórbico (200 a 400 nm). Condições de análise: fase móvel água:acetonitrila:acetato de amônio 0,005M pH 4,2 ajustado com ácido acético glacial (81:17:2, v/v), fluxo 1mL.min⁻¹, coluna Nova-Pak C18, detector de arranjo de diodos. Cromatograma registrado a 228 nm. 7.522 min = ácido benzóico, 10.558 min = ácido sórbico. (Capítulo 2)



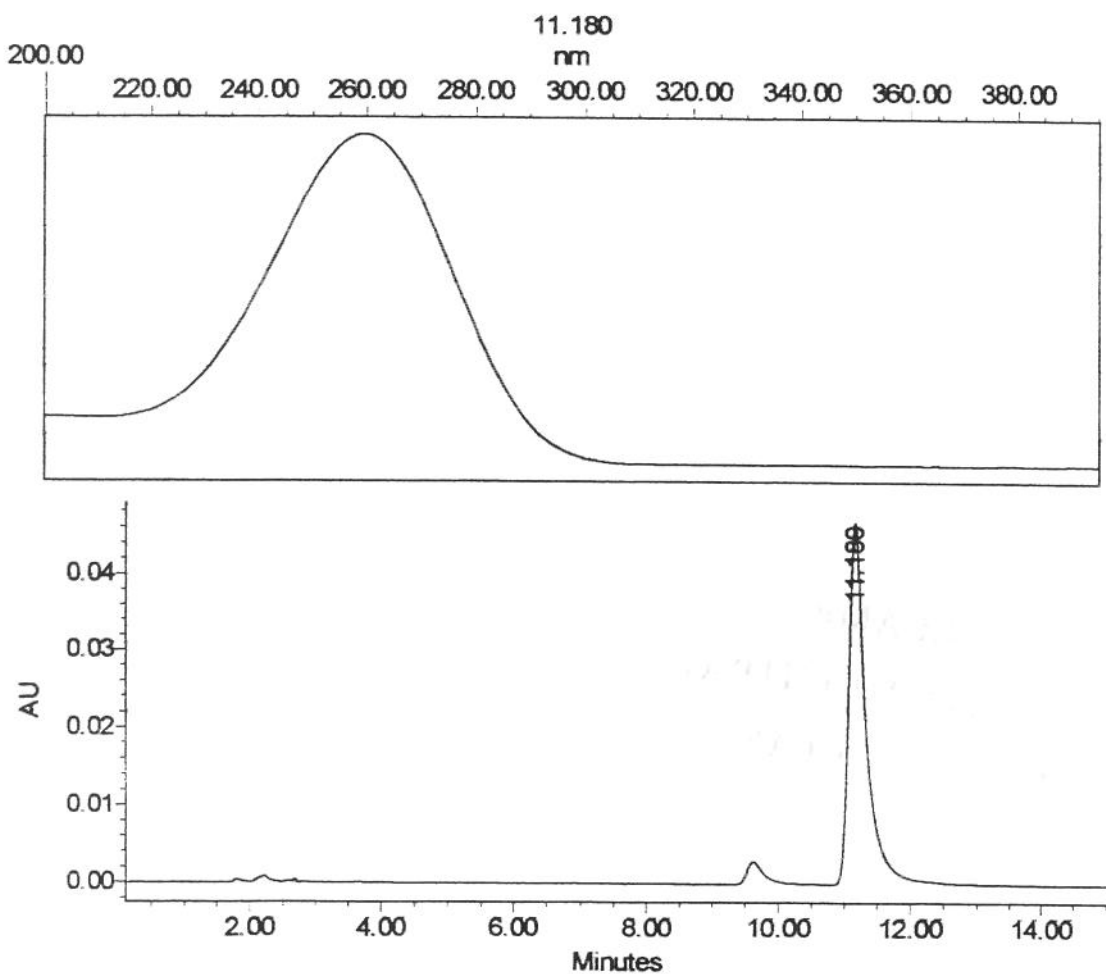
Anexo 5 - Cromatograma por CLAE de amostra de suco de caju B assim como o espectro do pico de ácido benzóico (200 a 400 nm). Condições de análise: fase móvel água:acetonitrila:acetato de amônio 0,005M pH 4,2 ajustado com ácido acético glacial (81:17:2, v/v), fluxo 1mL.min⁻¹, coluna Nova-Pak C18, detector de arranjo de diodos. Cromatograma registrado a 228 nm. 8.481 min = ácido benzóico. (Capítulo 2)



Anexo 6 - Cromatograma por CLAE de amostra de iogurte de morango A assim como o espectro do pico de ácido sórbico (200 a 400 nm). Condições de análise: fase móvel água:acetonitrila:acetato de amônio 0,005M pH 4,2 ajustado com ácido acético glacial (81:17:2, v/v), fluxo 1mL.min⁻¹, coluna Nova-Pak C18, detector de arranjo de diodos. Cromatograma registrado a 228 nm. 10.904 min = ácido sórbico. (Capítulo 2)



Anexo 7 - Cromatograma por CLAE de amostra de requeijão C assim como o espectro do pico de ácido sórbico (200 a 400 nm). Condições de análise: fase móvel água:acetonitrila:acetato de amônio 0,005M pH 4,2 ajustado com ácido acético glacial (81:17:2, v/v), fluxo 1mL.min⁻¹, coluna Nova-Pak C18, detector de arranjo de diodos. Cromatograma registrado a 228 nm. 11.180 min = ácido sórbico. (Capítulo 2)



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE