

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO BENZÓICO E ÁCIDO SÓRBICO EM IOGURTES COMERCIAIS.

Caio Cesar Torres (*)

Sebastião C. C. Brandão (**)

RESUMO

Quinze amostras de iogurtes comerciais foram analisadas quanto ao teor de ácido benzóico e sórbico, por meio de cromatografia líquida de alta performance de acordo com Ito *et al.* (1983). O teor de ácido sórbico em todas as amostras encontrava-se dentro dos limites estabelecidos por lei. O rótulo de três amostras não continham a especificação (P. IV). O ácido benzóico foi encontrado em todas as amostras. Devido a fermentação láctica nenhuma amostra declarava a adição do ácido benzóico no rótulo.

INTRODUÇÃO

A determinação dos teores de conservantes em alimentos é importante, porque seu uso é limitado pela legislação bromatológica brasileira. Os ácidos benzóico e sórbico são muito empregados na indústria alimentícia, em polpas e sucos de frutas, bases de frutas para iogurtes, refrigerantes, margarinas, revestimento de queijos, etc. O Ministério da Saúde adota o limite máximo de 0,2% (2.000 ppm) para polpa de frutas (morango, pêssigo e abacaxi) adicionada em iogurtes, e exige que o ácido sórbico (P. IV) seja declarado no rótulo do produto.

Apesar da legislação citar diversos alimentos que possam ser adicionados de ácido benzóico (P. I), e exigir que também seja declarado no rótulo, ela não cita a adição desse conservante em polpas de frutas para iogurtes (Decreto-Lei nº 55.871 de 26.03.65).

Os ácidos sórbico e benzóico, normalmente na forma de sorbato e benzoato de potássio, são empregados como substâncias fungistáticas. O ácido sórbico atua como inibidor no metabolismo de ácidos graxos α e β insaturados em fungos e leveduras (Melnick *et al.*, 1954).

Diversos métodos podem ser utilizados na determinação dos ácidos sórbico e benzóico, a exemplo do colorimétrico, do espectrofotométrico e cromatográfico. Wahbi *et al.* 1977 determinaram o ácido sórbico no leite por espectrofotometria utilizando a 1ª derivada da curva do seu espectro de absorção. No País, os métodos oficialmente recomenda-

(*) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus-AM.

(**) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

dos são complexos e demandam muito tempo, desestimulando como consequência, o controle destes ácidos nos alimentos. Um método mais eficaz para sua detecção (Coelho et al., 1983), se torna necessário.

Entre os métodos cromatográficos, citam-se a cromatografia de camada fina, gasosa e líquida. Diversos trabalhos tem sido executados baseando-se nesta técnica para detecção dos ácidos sórbico e benzóico em produtos lácteos. Coelho et al. (1983) analisaram a presença destes dois conservantes por cromatografia gasosa em diversos alimentos.

A cromatografia líquida de alto desempenho é uma das técnicas mais recentes para a quantificação destes conservantes. Ela permite análise rápida e alta sensibilidade para pequenas concentrações dos ácidos sórbico e benzóico. Puttemans et al. (1985) extraíram estes dois ácidos de iogurtes, utilizando tri-n-octilamina. Stijve & Hirschmuller (1984) detectaram baixos níveis destes dois agentes conservantes em iogurtes por meio de cromatografia líquida de alto desempenho por fase reversa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se um sistema isocrático para o bombeamento da solução tampão-fosfato (pH 4,5): metanol através de uma coluna de grupamentos silanos quimicamente ligados à sílica. A quantificação foi efetuada por monitoramento da variação do índice de absorvância da fase móvel com padrões e amostras.

Equipamentos

Foi utilizado um sistema de bombeamento CG-480C da Instrumentos Científicos CG equipado com um injetor Rheodyne 7125 e um "loop" de 100µl. Foram injetados volumes de 5 e 20µl das amostras preparadas com uma seringa Hamilton de 50µl.

Empregou-se como detector o espectrofotômetro de comprimento de onda variável UV-50 da Varian Assoc. Para o ácido sórbico adotou-se o comprimento de onda de 250nm, enquanto a atenuação foi mantida em 0,2X. A variação do índice de absorvância foi mantida com um registrador Linear (20 cm/h). O preparo das amostras e degasagem da fase móvel foram feitos com um sonificador modelo B-220 (Branson Co.) com frequência variando de 50-60 Hz.

Na centrifugação e ajuste do pH das amostras empregou-se, respectivamente, uma centrífuga modelo K International Equipment Co. e um pHmetro digital modelo E500 (Metrohm Herison).

Condições cromatográficas

A identificação dos ácidos sórbico e benzóico nas amostras foi feita usando como fase móvel metanol: solução tampão-fosfato (pH 4,5) na proporção 50:50 (v:v), bombeada na razão de 0,7 ml/min. em uma coluna Micropac MCH5 (C-18), 4 X 300 mm (Varian Assoc.). No preparo da fase móvel, empregou-se metanol para cromatografia, filtrado em filtro de

1,5µm (Merck S.A.), enquanto a solução tampão-fosfato foi preparada a partir de 1.000ml de água destilada, acidificada com 1,24 ml de ácido orto-fosfórico (min. 85%) P.A. (Merck S.A.) até pH 2,0 e basificada com 13,7 ml de hidróxido de sódio 2,0N até pH 4,5.

No preparo da solução padrão 0,001% (10ppm) foi empregado sorbato e benzoato de potássio grau P.A.

Preparo das amostras

Amostras de 15 diferentes marcas de iogurte foram coletadas nos supermercados de Belo Horizonte (MG).

De duas marcas de iogurte tipo "sundae", a polpa de fruta foi removida para o iogurte ser analisado separadamente. Uma amostra de iogurte natural foi usada para se verificar a presença de possíveis compostos interferentes.

A extração do ácido sórbico e benzóico do iogurte e da polpa de fruta foi feita de acordo com Ito et al. (1983). À 20g da amostra adicionou-se 25 ml de hidróxido de sódio 0,1N. O pH da solução resultante foi ajustado para pH 8,0, para evitar solubilização da sílica da coluna cromatográfica e, em seguida, sonificada por 15 min. Após sonificação, adicionou-se 1 ml de ferrocianeto de potássio 15% (p/v) e 1 ml de sulfato de zinco 30% (p/v) para precipitação das proteínas do iogurte (reagentes de Carrez). A amostra tratada foi mantida em repouso por 15 min. e logo transferida para um tubo de centrifuga (capacidade 100 ml) e os resíduos arrastados com 25 ml de metanol P.A. (Grupo Química Ltda) e centrifugada a 3.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico (100 ml) e o precipitado lavado com 25 ml de metanol. O volume final do balão foi completado com água.

As amostras foram filtradas em filtro Millipore tipo HA de 0,45µm da Waters Assoc. para eliminar partículas que poderiam entupir o filtro da coluna analítica.

RESULTADO E DISCUSSÃO

As Figuras 1 e 2 mostram o cromatograma das soluções padrões dos ácidos sórbico e benzóico, respectivamente. A regressão linear da resposta do detector (mm) com o peso padrão, apresenta um coeficiente de correlação de 0,986 e 0,992, para os ácidos sórbico e benzóico, respectivamente. As Figuras 1b e 2b mostram o cromatograma de iogurte natural, demonstrando resolução completa dos ácidos sórbico e benzóico.

Os Quadros I e II mostram que os teores médios de ácido sórbico em nenhuma das amostras excederam o limite máximo estabelecido pela legislação, apesar desta não estar bem definida, em relação ao produto pronto para consumo. A Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CENIPA) estabeleceu o limite de 0,2% (2.000 ppm) de ácido sórbico na base de frutas para iogurte, porém não especificou a concentração no produto final. As amostras 5, 6 e 7 mostraram irregularidades; apesar de conterem ácido sórbico, não constava em seus rótulos o tipo de conservante (P. IV).

O Quadro III mostra uma recuperação média de $86,38 \pm 8,74\%$ do ácido sórbico adicionado ao iogurte, conforme Figuras 1c e 1d.

O Quadro IV mostra os níveis de ácido benzóico em diferentes amostras de iogurte. Nenhuma das amostras deixou de conter ácido benzóico, e o Quadro V mostra que as amostras das polpas de frutas analisadas continham níveis relativamente baixos do mesmo. Em nenhum dos rótulos das amostras constava a especificação deste conservante (P.I.). A legislação ainda é omissa quanto a adição deste conservante em polpas de frutas para iogurtes.

O Quadro VI mostra recuperação de $97,3 \pm 25,0\%$ do ácido benzóico, conforme Figuras 2c e 2d, considerada satisfatória para os dois conservantes.

A Figura 3 mostra o resultado de um experimento realizado com leite durante a elaboração de iogurte na usina de laticínios da UFV. Uma amostra foi coletada do leite pasteurizado, instantes antes da adição de 1% da cultura (*L. bulgaricus* e *S. thermophilus*) e incubada a $40^{\circ}\text{C}/3\text{h}$, e as 3 amostras seguintes de hora em hora. Foi observada a formação crescente de ácido benzóico até o final da incubação.

Os resultados concordam com Bertling (1986) e Schmidt-Hebbel (1984) que observaram produção de ácido benzóico durante a fermentação do iogurte, a partir do ácido hipúrico. O ácido benzóico é produzido por bactérias da fermentação láctica, alcançando níveis de 5-30 ppm. Segundo Bertling (1986), o ácido benzóico pode também resultar de sua adição a flavorizantes e/ou em polpa de frutas conforme o Quadro V. Esta observação indica a necessidade dos fabricantes de iogurtes analisarem o produto final, antes de declararem que seus produtos são isentos deste conservante.

Comparando-se os resultados obtidos com cada um dos comprimentos de onda (250 e 227 nm), observou-se que o último comprimento é melhor, pois quantifica simultaneamente os ácidos benzóico e sórbico. Apesar da sensibilidade do método para o ácido sórbico ser maior a 250 nm, com este comprimento de onda não se consegue detectar o ácido benzóico.

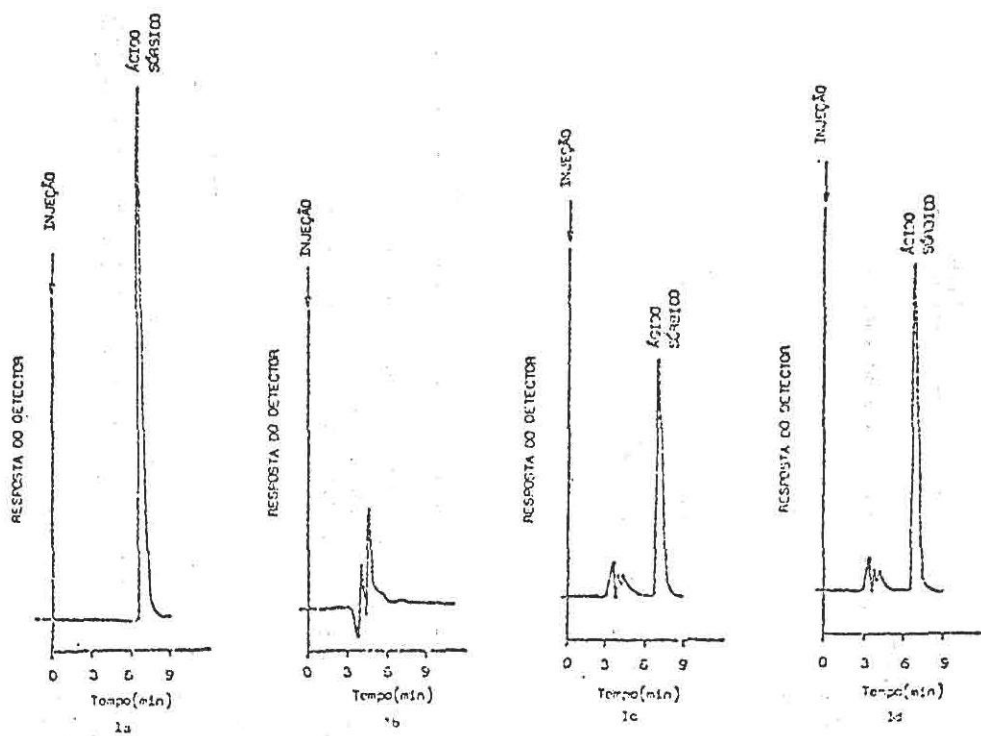


Fig. 1. Cromatograma de diferentes amostras de Iogurte. Fase móvel: metanol / tampão fosfato, pH 4,5 (50/50, v/v); fluxo = 0,7 ml/min.; atenuação: 0,5X; Detector: UV - 250 nm.
 1a - Solução padrão.
 1b - Iogurte natural.
 1c - Iogurte sabor morango
 1d - Iogurte sabor morango adicionado de sorbato de potássio.

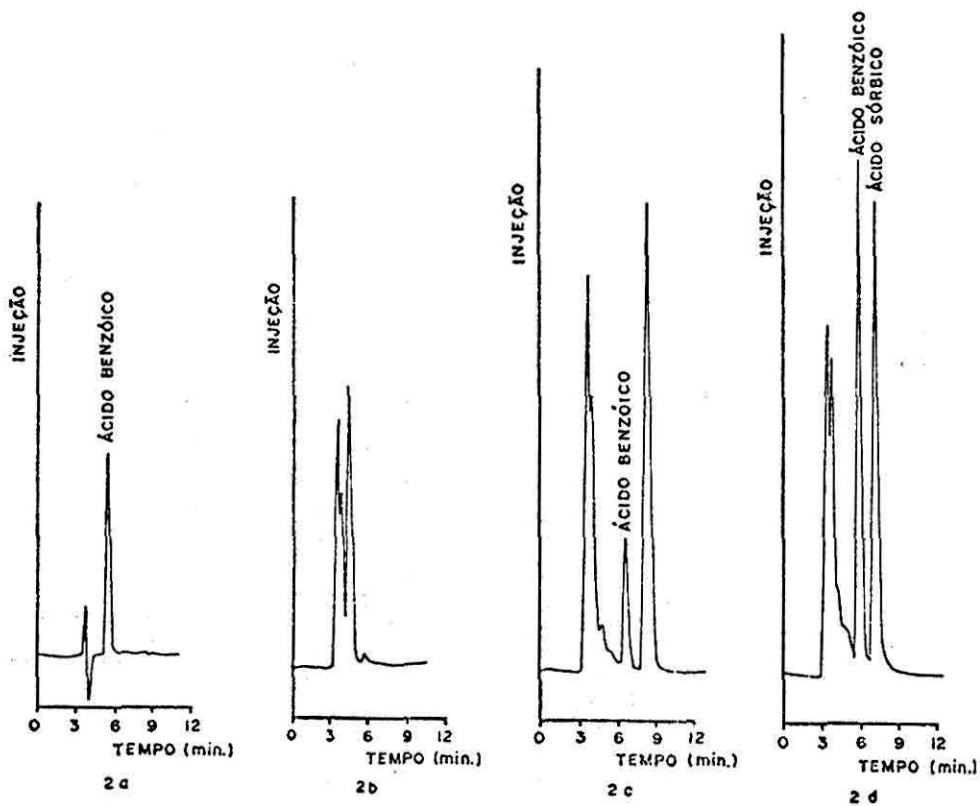


Fig. 2. Cromatograma de diferentes amostras de Iogurte. Fase móvel: metanol / tampão fosfato, pH 4,5 (50/50, v/v); fluxo = 0,7 ml/min.; atenuação: 0,2X; Detector: UV - 227 nm.

2a - Solução padrão.

2b - Iogurte natural.

2c - Iogurte sabor morango

2d - Iogurte sabor morango adicionado de benzoato de potássio

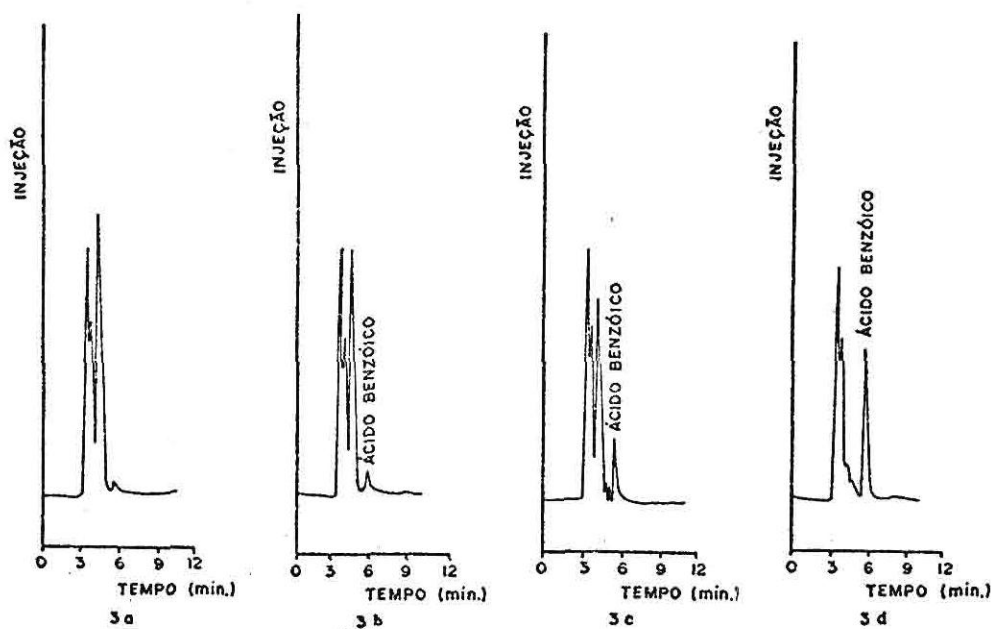


Fig. 3. Cromatograma de Amostras coletadas durante a elaboração de Iogurte Natural. Fase móvel: metanol/tampão fosfato, pH 4,5 (50/50, v/v); fluxo = 0,7 ml/min.; atenuação: 0,2X; Detector: UV - 227 nm.

3a - Leite pasteurizado.

3b - Leite pasteurizado, 1h adição da cultura.

3c - Leite pasteurizado, 2h adição da cultura.

3d - Leite pasteurizado, 3h adição da cultura.

Quadro I. Teor médio de ácido sórbico em diferentes iogurtes comerciais.

Amostra	Rótulo	Concentração (ppm ± dp ^a)
1	P. IV	38,2 ± 0,5
2	P. IV	36,9 ± 0,5
3	P. IV	49,9 ± 1,5
4	P. IV	72,7 ± 2,6
5	— ^b	66,3 ± 0,8
6	—	96,7 ± 2,8
7	—	57,2 ± 1,3
8	P. IV	12,1 ± 0,3
9	P. IV	49,6 ± 0,6
10	P. IV	14,2 ± 0,3
11	P. IV	19,2 ± 0,2
12	P. IV	17,3 ± 0,9
13	P. IV	23,0 ± 0,6

^a dp = desvio padrão de três repetições.

^b — = a especificação do conservante (P. IV) não consta no rótulo do produto.

Quadro II. Teor médio de ácido sórbico na base de morango.

Amostra	Concentração (ppm ± dp ^a)
1	46,5 ± 0,8
2	74,9 ± 1,2

^a dp = desvio padrão de três repetições.

Quadro III. Percentual médio de recuperação do ácido sórbico adicionado ao iogurte.

Quantidade Adicionada (ppm)	Recuperação (%) ^a
1	94,8
2	77,4
5	87,0

^a Média de três repetições.

Quadro IV. Teor médio de ácido benzóico em diferentes iogurtes comerciais.

Amostra	Rótulo	Concentração (ppm ± dp ^a)
1	— ^b	5,43 ± 0,03
2	—	5,91 ± 0,25
3	—	6,14 ± 0,11
4	—	5,31 ± 0,15

continuação (Quadro IV).

Amostra	Rótulo	Concentração (ppm \pm dp ^a)
5	—	7,17 \pm 0,02
6	—	7,07 \pm 0,08
7	—	7,32 \pm 0,03
8	—	6,90 \pm 0,04
9	—	6,86 \pm 0,13
10	—	7,03 \pm 0,04
11	—	7,08 \pm 0,11
12	—	6,90 \pm 0,02
13	—	7,13 \pm 0,21

^adp = desvio padrão de três repetições.

b___ = a especificação do conservante P.l. não consta no rótulo do produto.

Quadro V. Teor médio de ácido benzóico na base de morango.

Amostra	Concentração (ppm \pm dp ^a)
1	4,56 \pm 0,27
2	3,49 \pm 0,05

^adp = desvio padrão de três repetições.

Quadro VI. Percentual médio de recuperação do ácido benzóico adicionado ao iogurte.

Quantidade adicionada (ppm)	Recuperação (%) ^a
10	115,0
20	79,6

^a Média de três repetições.

SUMMARY

Fifteen samples of different commercial yogurt were analyzed for benzoic and sorbic acid contents, using the high performance liquid chromatography method of Ito *et al.* (1983). The level of sorbic acid in all samples was within the legal limits. Three of the commercial yogurt did not show label specifications for sorbic acid. Benzoic acid was detected in all samples as a result of lactic fermentation but none of them showed any specifications on their label.

Referências bibliográficas

- Bertling, K. - 1986. 'Free of preservatives' but still positive for benzoic acid? **Dairy Science Abstracts**, 48(2):94.
- Coelho, R. G.; Nelson, D. L.; Jokl, L. - 1983. Determinação de conservantes em alguns alimentos industrializados brasileiros por cromatografia gasosa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 3(1):1-13.
- Deuel, H. J.; Afin-Slater, R.; Weil, C. S.; Smith, H. F. - 1954. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. I. Harmlessness of sorbic acid as a dietary constituent. **Food Research**, 19:1.
- Freydberg, N. & Gortner, W. A. - 1982. **The Food Additives Book**. Mount Vernon, N. Y., Consumers Union Edition. 722 p.
- Instituto Adolfo Lutz - 1976. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 2ed. São Paulo. v. 1.
- Ito, Y.; Tonogai, Y.; Ogawa, S.; Yokoyama, T.; Honda, T. - 1983. Rapid simultaneous de termination of benzoate and sorbate in yoghurts by use of high-performance liquid chromatography (HPLC). **Japanese Journal of Dairy and Food Science**, 32(3):A89-A94.
- Melnick, D.; Luckmann, R. H.; Gooding, C. M. - 1954. Sorbic acid as a fungistatic agent in foods. VI. Metabolic degradation of sorbic acid in cheese by molds and the mechanism of mold inhibition. **Food Research**, 19:44.
- Ministério da Saúde - 1965. Tabela I, anexa ao Decreto-Lei nº 55.871, de 26.03.65.
- Puttemans, M. L.; Branders, C.; Dryon, L.; Massart, D. - 1985. Extraction of organic acids by ion-pair formation with tri-n-ocetylamine. IV. Determination of sorbic acid, benzoic and saccharin in yoghurt. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 68(1):80-2.
- Schmidt-Hebbel, H. - 1984. Natural benzoic acid formation in milk products. **Dairy Science Abstracts**, 46(5):365.
- Stijve, T.; Hischenuber, C. - 1984. High performance liquid chromatographic determination of low levels of benzoic acid and sorbic acid in yoghurts. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, 80(3):81-4.
- Wahbi, A. A. M.; Abdine, H.; Blaih, S. M. - 1977. Spectrophotometric determination of some preservatives in milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 60(5):1175-9.

(Aceito para publicação em 20.02.1990)