



GABRIELLE DIAS ROSA BELTRAMIN

**“ESTUDO DA ESTABILIDADE DE CORANTES AZO
UTILIZADOS EM ALIMENTOS POR
ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL”**

**“STUDY OF THE STABILITY OF THE AZO DYES USED
IN FOOD BY UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY”**

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GABRIELLE DIAS ROSA BELTRAMIN

**“ESTUDO DA ESTABILIDADE DE CORANTES AZO UTILIZADOS
EM ALIMENTOS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL”**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado

**“STUDY OF THE STABILITY OF THE AZO DYES USED IN FOOD BY
UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

Dissertation presented to the Food Science Postgraduation Programme of the School of Food Engineering of the University of Campinas to obtain the Master grade in Food Science.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA GABRIELLE DIAS ROSA BELTRAMIN
E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCELO ALEXANDRE PRADO**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

B419e Beltramin, Gabrielle Dias Rosa, 1985-
Estudo da estabilidade de corantes azo utilizados em
alimentos por espectrofotometria UV-visível / Gabrielle
Dias Rosa Beltramin. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marcelo Alexandre Prado.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Alimento. 2. Corantes azo. 3. Estabilidade. 4.
Espectrofotometria. I. Prado, Marcelo Alexandre. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Study of the stability of the azo dyes used in food by UV-VIS
spectrophotometry

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Food

Azo dyes

Stability

Espectrophotometry

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Marcelo Alexandre Prado [Orientador]

Juliana Azevedo Lima Pallone

Raquel Grando de Oliveira

Data da defesa: 30/07/2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação Estudo da Estabilidade de Corantes Azo em Alimentos por Espectrofotometria UV-visível, defendida em 30/07/2012 por Gabrielle Dias Rosa Beltramin, aprovada pela comissão julgadora em 30/07/2012.

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado

Profa. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone

Dra. Raquel Grando de Oliveira

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy

Dra. Daniela de Queiroz Pane

Dedico este trabalho aos meus pais, Izabel e Maurício, por estarem sempre presentes em todos os momentos de minha vida e por serem exemplos de dedicação e amor incondicional. Ao meu irmão Daniel, pelo companheirismo e carinho sempre!

*Dedico ao meu marido querido, Paulo, pela força,
carinho, companheirismo e amor sempre.*

*“Não olhe para trás e também não sonhe com o futuro.
O futuro jamais lhe devolverá o passado,
nem satisfará os seus sonhos insensatos.
O seu dever está aqui e agora.”*

Dag Hammarskjold

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por estar sempre ao meu lado me dando forças a cada momento de minha vida.

Agradeço ao Prof^o Marcelo Prado pela orientação e oportunidade dada para realização deste trabalho. Por “quebrar meu galho” nos momentos em que estava distante.

Agradeço às professoras Juliana Azevedo Lima Pallone e Helena Teixeira Godoy pelos auxílios técnicos. Aos professores da FEA pelas disciplinas dadas.

Agradeço à minha família, mãe, pai, avó e irmão, por me darem suporte e força para enfrentar cada etapa desta jornada. Essenciais para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu marido, Paulo, por compreender minha ausência em alguns momentos e por estar sempre disposto a me ajudar da forma que fosse possível.

Agradeço aos meus amigos, Michele, Luciana, Sílvia, Naty e Ivan, por proporcionarem muitos momentos de alegria em Campinas. Ao Ivan, em particular, por ter me ajudado na parte experimental, concedendo equipamentos de seu laboratório e tempo, além de muita força física.

Às meninas do Laboratório de Análise de Alimentos, pelas conversas e momentos descontraídos.

Agradeço ao técnico Dirceu Pedro Alves pelas conversas e ajuda na realização deste trabalho.

Por fim, não poderia deixar de agradecer meu companheirinho de todas as horas em Campinas, Ziggy.

RESUMO

O emprego de aditivos químicos em alimentos é um assunto que tem gerado bastante controvérsia entre consumidores, indústrias, pesquisadores e governo. Exemplo são os corantes artificiais, aditivos bastante utilizados pela indústria de alimentos na coloração de seus produtos. Sem valor nutricional, seu uso é justificado apenas por questões alimentares. Em comparação com os corantes naturais, apresentam maior uniformidade, estabilidade e poder tintorial. Apesar das vantagens, evidências toxicológicas são consideravelmente maiores para os corantes artificiais e, apesar da alta estabilidade podem ter essa característica prejudicada por efeito de fatores físico-químicos, como luz, temperatura e conservantes presentes na composição de alimentos e bebidas. Tendo em vista as características climáticas no Brasil e, levando em consideração sua enorme extensão, é de interesse analisar a estabilidade de corantes artificiais comumente utilizados em alimentos e bebidas comercializadas no país, uma vez que, a instabilidade desses corantes pode afetar a qualidade do produto, bem como causar riscos a saúde. Estudos comprovaram a influência de açúcares, ácidos ascórbico, sórbico, cítrico e benzóico na estabilidade de alguns corantes azo, porém, ácido cítrico em presença de ácido ascórbico ainda não foi abordado de forma minuciosa. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranto frente aos efeitos de luz, temperatura e presença dos ácidos ascórbico e cítrico, utilizando a técnica de espectrofotometria UV-visível. A estabilidade dos corantes também foi analisada em misturas de corantes para verificar a existência ou não de sinergia. Resultados demonstraram maior estabilidade dos corantes tartrazina e amarelo crepúsculo, independente das condições de estocagem. O amaranto apresentou alta instabilidade, principalmente em condições de alta temperatura e luz solar. Essas condições, de modo geral, provocaram maior instabilidade para os três corantes, que por outro lado, mantiveram-se estáveis em condição de escuro e baixa temperatura. A presença de ácido cítrico e ácido ascórbico provocou maior instabilidade dos corantes em todas as condições físicas testadas, exceto para a

condição de escuro e alta temperatura, o qual apresentou estabilidade semelhante ao grupo com presença apenas de ácido ascórbico. A análise de soluções com mistura de corantes garantiu, principalmente, maior estabilidade ao amarantho tanto na presença do amarelo crepúsculo quanto da tartrazina. Análises com bebidas coloridas artificialmente confirmaram o efeito da luz solar na diminuição da estabilidade dos corantes e da temperatura baixa na estabilidade desses compostos.

Palavras-chave: alimento, corante Azo, estabilidade, Espectrofotometria .

ABSTRACT

The adding of chemical additives in foods and beverages is a controversial issue between consumers, industries, researchers and government. Examples are artificial dyes, so used by food industries to color foodstuffs. With no nutritional value, use is only justified by alimentary habit. In comparison to natural dyes, they present higher uniformity, stability and coloring power. In spite of these advantages, toxicological evidences for artificial dyes are even higher than for natural ones and stability can be affected by physical-chemical factors, like for example, light, temperature and presence of preservative compounds in foods and beverages. Given the climatic characteristics in Brazil and taking into account its enormous extent, it is interesting to analyze the stability of artificial dyes commonly used in foods and beverages traded in the country, since the instability of these dyes can affect product quality as well as causing health risks. Researches have already proved sugar, ascorbic, sorbic, citric and benzoic acids influence on the stability of some azo dyes, though there are no information about citric and ascorbic acids influence together on the stability of tartrazine, sunset yellow and amaranth, neither when they are mixed with another artificial dye. Therefore, the aim of this study was to check the stability of tartrazine, sunset yellow and amaranth by the effects of light, temperature and presence of ascorbic and citric acid, using the technique of UV-visible spectrophotometry. Dyes' stability was also analyzed at dye mixtures to verify the existence of synergy. Results showed greater stability of tartrazine and sunset yellow, regardless of storage conditions. Amaranth was highly unstable, especially under conditions of high temperature and sunlight. These conditions generally caused greater instability for the three azo dyes. On the other hand, their color remained stable at dark and low temperature condition. The presence of citric and ascorbic acid caused greater instability of the dyes in all physical tested conditions, except for dark and high temperature condition, which presented the same stability of the group with only ascorbic acid. Analysis of dye mixture solutions ensured, especially, greater stability to amaranth in the presence of either sunset yellow or tartrazine. Analysis with artificially

colored beverages confirmed the effect of sunlight in dyes' stability decrease and low temperature in the stability of these compounds.

Keywords: food, Azo dye, stability, Spectrophotometry.

ÍNDICE GERAL

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1 <i>Importância da cor</i>	3
2.2 <i>Riscos à saúde</i>	3
2.3 <i>Legislação</i>	6
2.3.1 <i>Legislação brasileira</i>	7
2.4 <i>Corantes azo</i>	9
2.4.1 <i>Amaranto</i>	9
2.4.2 <i>Tartrazina</i>	10
2.4.3 <i>Amarelo Crepúsculo</i>	11
2.5 <i>Estabilidade dos corantes azo</i>	12
2.6 <i>Métodos de análise</i>	15
3. Objetivo	19
3.1 <i>Objetivo geral</i>	19
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	19
4. Material e Métodos	20
4.1 <i>Amostras</i>	20
4.2 <i>Estudo da estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranto em soluções modelo</i>	20
4.3 <i>Estudo da estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranto em bebidas comercializáveis</i>	23
4.3.1 <i>Preparo da amostra</i>	24
5. Resultados e Discussão	25
5.1 <i>Análise espectrofotométrica</i>	25
5.1.1 <i>Curva de calibração</i>	25
5.1.2 <i>Princípio da aditividade da Lei de Beer</i>	26
5.2 <i>Estudo da estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranto por influência de fatores físicos</i>	28
5.2.1 <i>Ausência de luz</i>	28
5.2.1.1 <i>Estocagem a temperatura de 25 °C</i>	28
5.2.1.2 <i>Estocagem a temperatura de 5 °C</i>	30
5.2.1.3 <i>Estocagem a temperatura de 55 °C</i>	32

5.2.2	<i>Luz artificial</i>	34
5.2.3	<i>Luz Solar</i>	37
5.3	<i>Estudo comparativo da estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranto</i>	41
5.3.1	<i>Influência de condições químicas na estabilidade de corantes azo</i>	41
5.3.2	<i>Influência de condições físicas na estabilidade de corantes azo</i>	45
5.3.3	<i>Interação: condição física x condição química</i>	48
5.3.4	<i>Efeito da interação de corantes azo na estabilidade</i>	51
5.4	<i>Estudo da estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranto em bebidas comercializáveis</i>	59
6.	Conclusão	67
7.	Referências Bibliográficas	69
8.	ANEXOS	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Limite máximo aceitável em bebidas não-alcoólicas..	9
Tabela 2. Propriedades dos corantes artificiais tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranato.	12
Tabela 3. Parâmetros para ensaios de degradação dos corantes da classe azo em estudo.....	21
Tabela 4. Descrição dos grupos estudados..	21
Tabela 5. Absortividade molar dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranato.....	28
Tabela 6. Resultado do teste de Tukey para as condições internas estudadas..	44
Tabela 7. Resultado do teste de Tukey para as condições externas estudadas..	47
Tabela 8. Efeito de ambiente escuro à 25 ± 2 °C e conservantes (ácido ascórbico e ácido cítrico) na estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranato em misturas (% retenção) ..	52
Tabela 9. Efeito de ambiente escuro e baixa temperatura (5 ± 1 °C) e conservantes (ácido ascórbico e ácido cítrico) na estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranato em misturas (% retenção) ..	53
Tabela 10. Efeito de ambiente escuro e alta temperatura (55 ± 4 °C) e conservantes (ácido ascórbico e ácido cítrico) na estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranato em misturas (% retenção) ..	54
Tabela 11. Efeito de luz artificial e conservantes (ácido ascórbico e ácido cítrico) na estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranato em misturas (% retenção) ..	55
Tabela 12. Efeito de radiação solar e conservantes (ácido ascórbico e ácido cítrico) na estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranato em misturas (% retenção) ..	56
Tabela 13. Estudo da estabilidade de corantes presentes em refrigerantes e sucos artificiais quando em ambiente escuro e temperatura ambiente (25 ± 2 °C) ..	60
Tabela 14. Estudo da estabilidade de corantes presentes em refrigerantes e sucos artificiais quando em ambiente escuro e baixa temperatura (5 ± 1 °C) ..	61
Tabela 15. Estudo da estabilidade de corantes presentes em refrigerantes e sucos artificiais quando em ambiente escuro e alta temperatura (55 ± 4 °C) ..	62
Tabela 16. Estudo da estabilidade de corantes presentes em refrigerantes e sucos artificiais quando em ambiente com incidência de luz fosforescente e temperatura ambiente (25 ± 2 °C) ..	63
Tabela 17. Estudo da estabilidade de corantes presentes em refrigerantes e sucos artificiais quando sob condições climáticas ..	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Prováveis sais formados pela degradação do amaranto.</i>	6
Figura 2. <i>Estrutura química do corante amaranto.</i>	10
Figura 3. <i>Estrutura química do corante tartrazina.</i>	11
Figura 4. <i>Estrutura química do corante amarelo crepúsculo.</i>	11
Figura 5. <i>Curva de calibração do corante tartrazina à 425 nm.</i>	25
Figura 6. <i>Curva de calibração do corante amarelo crepúsculo à 480 nm.</i>	26
Figura 7. <i>Curva de calibração do corante amaranto à 525 nm.</i>	26
Figura 8. <i>Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição de ácido ascórbico sob condição de ausência de luz (grupo C).</i>	29
Figura 9. <i>Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição dos ácidos cítrico e ascórbico sob condição de ausência de luz (grupo D).</i>	29
Figura 10. <i>Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição de ácido ascórbico sob baixa temperatura ($5 \pm 1^{\circ}\text{C}$) (grupo C).</i>	31
Figura 11. <i>Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição dos ácidos cítrico e ascórbico sob baixa temperatura ($5 \pm 1^{\circ}\text{C}$) (grupo D).</i>	31
Figura 12. <i>Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição de ácido ascórbico sob alta temperatura ($55 \pm 4^{\circ}\text{C}$) (grupo C).</i>	33
Figura 13. <i>Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição dos ácidos cítrico e ascórbico sob alta temperatura ($55 \pm 4^{\circ}\text{C}$) (grupo D).</i>	33
Figura 14. <i>Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição de ácido cítrico expostos à luz fosforescente (grupo B).</i>	35
Figura 15. <i>Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição de ácido ascórbico expostos à luz fosforescente (grupo C).</i>	35
Figura 16. <i>Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição dos ácidos cítrico e ascórbico expostos à luz fosforescente (grupo D).</i>	36
Figura 17. <i>Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo expostos à luz solar (grupo A).</i>	39
Figura 18. <i>Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição de ácido cítrico expostos à luz solar (grupo B).</i>	39
Figura 19. <i>Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição de ácido ascórbico expostos à luz solar (grupo C).</i>	40
Figura 20. <i>Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição dos ácidos cítrico e ascórbico expostos à luz solar (grupo D).</i>	40

Figura 21. Comparação entre os resultados de degradação, em porcentagem, dos corantes tartrazina (gráfico verde), amarelo crepúsculo (gráfico laranja) e amaranto (gráfico vermelho), em soluções modelo com adição de ácido ascórbico e solução modelo com adição dos ácidos cítrico e ascórbico, nas condições físicas (externas) estudadas..... 49

Figura 22. Comparação entre os resultados de degradação, em porcentagem, dos corantes tartrazina (gráfico verde), amarelo crepúsculo (gráfico laranja) e amaranto (gráfico vermelho), em soluções modelo acondicionadas em ambiente escuro e alta temperatura e soluções modelo expostas à luz solar, nas condições químicas (internas) estudadas..... 50

1. INTRODUÇÃO

Há séculos o homem vem colorindo os alimentos com o intuito de torná-los mais atrativos e saborosos. O que antigamente utilizavam-se especiarias e condimentos como corantes naturais em alimentos, com o passar do tempo foram sendo gradativamente substituídos por corantes artificiais com o objetivo único de colorir (QUEIJA *et al.*, 2001; DOWNHAM & COLLINS, 2000; REYES, *et al.*, 1996). A partir disso, esses corantes começaram a ser explorados e cada vez mais utilizados, principalmente por apresentarem características como maior uniformidade, estabilidade e poder tintorial comparado com substâncias naturais (QUEIJA *et al.*, 2001).

O emprego de corantes em alimentos é um dos mais polêmicos avanços da indústria de alimentos. Com o único objetivo de conferir coloração a bebidas e alimentos, não apresentam valor nutricional algum. Por este motivo, corantes artificiais em geral não são recomendados à saúde, estando na mira de investigações científicas por apresentarem reações adversas que alguns consumidores podem apresentar. Seu uso é justificado, quase que exclusivamente, pela importância no aumento da aceitabilidade dos produtos por consumidores, sendo forte indicativo de qualidade, além de despertarem maior prazer de consumo (PRADO & GODOY, 2003). Em virtude do aumento no número de compostos que conferem cor, assim como, seu uso estendido em alimentos e bebidas, tornou-se necessário controlar suas aplicações e, ao mesmo tempo, cresceu a preocupação por possíveis efeitos que podem causar à saúde humana.

Além da importância de se controlar corantes artificiais em alimentos estabelecendo –se limites máximos para cada categoria, uma recente preocupação está voltada para os produtos formados a partir da degradação destes compostos (MARMITT *et al.*, 2010; GOSETTI *et al.*, 2005; GOTTLIEB *et al.*, 2003; BHASKAR *et al.*, 2003). Sabendo-se que a degradação dos corantes é caracterizada pela sua descoloração, a falta de estabilidade provocada por fatores físico-

químicos pode, além de prejudicar a qualidade dos produtos no mercado, colocar em risco a saúde humana (GOSETTI *et al.*, 2005).

O transporte e a estocagem dos alimentos são etapas que requerem muitos cuidados, pois exposição ao sol e a elevadas temperaturas podem ser prejudiciais à estabilidade e conservação dos mesmos (OSTROSKI *et al.*, 2005; McWEENY, 1982). Não apenas por influência de fatores físicos, como também sabe-se que a interação com outras substâncias químicas presentes nos alimentos pode provocar a modificação da estrutura destes corantes e ocasionar sua degradação com possível formação de novos compostos com toxicidade potencialmente maior que os compostos originais (ADAMS, 1997).

A estabilidade de corantes azo em alimentos é influenciada por inúmeros fatores, sendo o mais importante deles relacionado à presença de agentes redutores que podem resultar na clivagem da dupla ligação azo e formação de aminas aromáticas (MAROVATSANGA & MACRAE, 1987). A preocupação com a formação destes compostos vem do fato de que muitos corantes artificiais utilizados em alimentos são compostos amino-sulfatos aromáticos.

Mesmo apresentando estabilidade prejudicada por efeito da interação com ácidos, sais, conservantes, luz, temperatura e pH, os corantes artificiais ainda apresentam degradação consideravelmente menor que os corantes naturais (THAKUR & ARYA, 1993). Como discutido anteriormente, a idéia em se utilizar corantes artificiais em alimentos é devido a maior estabilidade que apresentam frente aos corantes naturais. No entanto, sua utilização e consumo podem ocasionar problemas ambientais e a saúde, principalmente quando se degradam (KAYODÉ *et al.*, 2012). Assim, além de estudos toxicológicos, estudos relacionados a estabilidade de corantes artificiais é importante para a utilização em alimentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da cor

A cor é a primeira qualidade sensorial pelo qual os alimentos são julgados, por isso os corantes são muito utilizados na indústria de alimentos, para atender as expectativas do consumidor (OSTROSKI *et al.* 2005; KAPOR *et al.*, 2001).

A aparência, segurança, características sensoriais e aceitabilidade dos alimentos são todas afetadas pela cor (QUEIJA *et al.*, 2001). Sabe-se que a relação cor-alimento está relacionada com o nosso desenvolvimento cognitivo, dependendo, além da memória, de experiências passadas. Por esse motivo, Clydesdale (1993), em seu estudo, demonstrou que, pêras vermelhas, bifes azuis e ovos verdes causam aversões praticamente a todos os consumidores.

A cor influencia o flavor, a aceitabilidade e, assim, a preferência por determinados alimentos e bebidas (PRADO & GODOY, 2004). Embora estes efeitos sejam associações inerentes às características psicológicas, estes interferem na escolha e dificultam a quantificação do sabor. Isto é um problema para as indústrias, pois a relação causa-efeito não pode ser ignorada ou minimizada nas formulações de novos alimentos e bebidas que visam suprir nossas necessidades.

2.2 Riscos à saúde

Estudos sobre os efeitos que os corantes artificiais causam à saúde tem sido bastante contraditórios. Vários autores relatam reações adversas causadas por corantes, desde simples urticárias, asma, reações imunológicas até câncer em animais de laboratórios (CHEN *et al.*, 2008; PÉREZ-URQUIZA e BELTRÁN, 2000; LEDERER, 1990), enquanto outros demonstram a ação

antitumoral de alguns deles (KAPADIA *et al.*, 1998). Assim, o controle no teor de corantes artificiais em alimentos tem contribuído para um consumo consciente de produtos alimentícios que contenham em sua composição tais aditivos (PRADO & GODOY, 2004). Cada país possui sua própria legislação, apresentando suas próprias conclusões quanto à inocuidade de cada corante artificial. Geralmente, um dos critérios utilizados para determinar valores presentes na legislação se faz através de estudos que verifiquem a quantidade no consumo de alimentos coloridos presentes na dieta da população.

Os aditivos são inofensivos à saúde, desde que obedecendo aos limites máximos estabelecidos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e Codex Alimentarius. Corantes artificiais permitidos pela Legislação Brasileira já possuem valor de IDA (Ingestão Diária Aceitável) definido (ANVISA, 2009), no entanto, estes valores podem sofrer alterações de acordo com resultados de estudos toxicológicos. O comitê de peritos da FAO (Food and Agriculture Organization) e da OMS (Organização Mundial da Saúde) em aditivos alimentares, o JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives), recomenda que os países verifiquem sistematicamente o consumo total de aditivos permitidos, através de estudos da dieta de sua população, para assegurar que a ingestão total desses aditivos não ultrapasse os valores determinados de IDA (PRADO & GODOY, 2007).

Em 1906, surgiram as primeiras suspeitas da ação cancerígena dos corantes artificiais após a injeção de um corante azóico (vermelho escarlate) sob a pele da orelha de um coelho e posterior crescimento celular atípico no local. Em 1924, a ingestão deste corante por camundongos e, conseqüentemente, a formação de adenomas hepáticos, reafirmaram sua possível ação cancerígena (LEDERER, 1990), incentivando pesquisas sobre o assunto (CHEN *et al.*, 2008; RAUF & ASHRAT, 2009).

No início da década de noventa, surgiram na indústria de corantes as primeiras preocupações com relação à exposição humana à aminas aromáticas carcinogênicas. A formação

de produtos intermediários durante a fabricação dos corantes, assim como, aminas envolvidas em outros setores da indústria química, tornaram-se alvos de atenção para estudos toxicológicos e carcinogênicos. Atualmente, esta atenção está voltada para aminas aromáticas formadas pela degradação de corantes azo, pois, apesar de apenas corantes a base de benzidina serem considerados de alto risco carcinogênico, a possibilidade de degradação de corantes azo tem sido demonstrada por uma variedade de condições ecológicas, incluindo aquela encontrada no trato digestivo de mamíferos (PINHEIRO *et al.*, 2004).

Devido à associação da toxicidade de corantes com seu caráter hidrofóbico, baixa toxicidade foi alcançada introduzindo grupamentos polares em sua estrutura, como por exemplo, grupos carboxílicos (COOH) e sulfonados (SO₃H) no lugar de grupos aminas (NH₂). Além de uma diminuição da ação carcinogênica, isto os tornou hidrossolúveis, permitindo a rápida eliminação do organismo, ao contrário da matriz original lipofílica que fica retida no organismo durante muito tempo (LEDERER, 1990; PINHEIRO *et al.*, 2004).

No entanto, dada a estrutura química dos corantes azóicos, suspeita-se que a parte ativa da molécula causadora de tumores seja possivelmente formada no processo de degradação do corante, com a quebra da dupla ligação azo (N=N) e formação de aminas aromáticas (LEDERER, 1990; REHORET *et al.*, 2004; GOSETTI *et al.*, 2005).

O principal processo pelo qual o amaranto, segundo alguns autores, se torna cancerígeno (LEDERER, 1990) é a sua transformação metabólica por redução do grupo N=N, formando um amino-composto. A figura 1 apresenta os possíveis sais formados na degradação do amaranto.

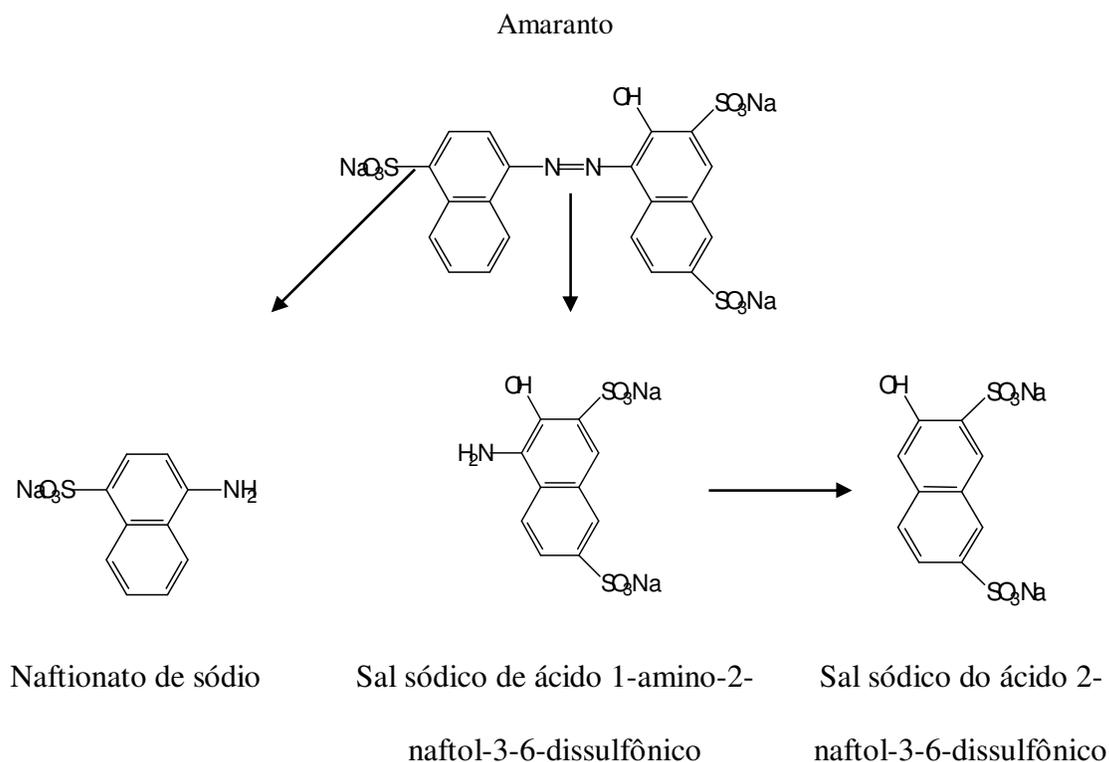


Figura 1. Prováveis sais formados pela degradação do amaranto.

O fato destes corantes terem sido autorizados para uso alimentício pela legislação de muitos países, simplesmente por serem sulfonados e hidrossolúveis, não lhes tira quaisquer propriedades cancerígenas. Somente experimentos realizados em várias espécies de animais, podem oferecer a convicção da inocuidade desses compostos e assim garantir o consumo humano sem riscos à saúde.

2.3 Legislação

Com a utilização cada vez maior desses aditivos, diversos países começaram a estabelecer legislações para controlar seu uso. Assim, organizações internacionais, tais como a Comissão do

Codex Alimentarius, órgão subsidiário da FAO e da OMS, têm sido criadas com o intuito de, entre outros objetivos, estabelecer especificações e critérios para a utilização de aditivos alimentares, incluindo a utilização de corantes em alimentos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009; QUEIJA *et al.*, 2001; REYES & PRADO, 2001). Atualmente, os Estados Unidos possuem nove corantes sintéticos permitidos, sendo dois de uso restrito (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009; DOWNHAM & COLLINS, 2000). No Japão, segundo a legislação, permite-se o uso de 11 corantes sintéticos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009; REYES *et al.*, 1996). Na União Européia, 17 corantes artificiais são permitidos em alimentos e bebidas, sendo que a Noruega e Suécia proibem qualquer corante artificial em alimentos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009; QUEIJA *et al.*, 2001; REYES & PRADO, 2001).

2.3.1 Legislação Brasileira

No Brasil, o Decreto N° 50.040, de 24 de janeiro de 1961, dispunha sobre as normas técnicas especiais reguladoras do emprego de aditivos químicos a alimentos, sendo alterado pelo Decreto n° 691, de 13 de março de 1962. A legislação foi alterada novamente por conta do Decreto N° 55.871 de 26 de março de 1965. Em 1977, a resolução CNNPA n°44 estabeleceu as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos e bebidas. A Portaria n°02 DINAL/MS, de 28 de janeiro de 1987 excluiu do Decreto 55871/65, os corantes Amarelo Ácido ou Amarelo Sólido (13015), Azul de Indantreno ou Azul de Alizarina (69800), Laranja GGN (15980), Vermelho Sólido E (16045) e Escarlata GN (14815) para uso em alimentos (ANVISA, 2011).

No momento, a legislação brasileira, atualizada com boa parte das leis internacionais e seguindo recomendações multilaterais da FAO (Food and Agriculture Organization), permite para alimentos e bebidas o uso de apenas oito corantes artificiais, sendo eles: Amarantho (E123), Vermelho de Eritrosina (E127), Vermelho 40 (E129), Ponceau 4R (E124), Amarelo Crepúsculo (E110), Amarelo Tartrazina (E102), Azul de Indigotina (E132) e Azul Brilhante (E133) (SILVA, 2008). Isto ocorreu devido à necessidade de harmonização da legislação entre os países membros do Mercosul para o uso de corantes em alimentos. A Resolução GMC nº 50/98 trata dessa harmonização, a Resolução GMC nº 52/98 trata dos critérios para determinar funções de aditivos, aditivos e seus máximos para todas as categorias de alimentos (ANVISA, 2011).

As já citadas Resoluções nº 382, nº 384 e nº 389 de 05 de Agosto de 1999 foram revogadas, respectivamente, pelas Resoluções RDC nº4, nº3 e nº5 de 15 de Janeiro de 2007, sendo que apenas a primeira contém alterações, referentes aos corantes artificiais Amarelo Tartrazina, Amarelo Crepúsculo, Azorrubina, Ponceau 4R, Vermelho 40, Azul Patente V, Azul de Indigotina e Azul Brilhante, permitindo o uso destes em molhos emulsionados, em molhos não emulsionados e em mostardas de mesa (ANVISA, 2011).

Os rótulos dos alimentos coloridos artificialmente devem conter os dizeres “COLORIDO ARTIFICIALMENTE” e ter relacionado nos ingredientes o nome completo do corante ou seu número de INS (International Numbering System) (ANVISA, 2011; ABIA, 2001).

À partir da Portaria nº 1003, de 11 de dezembro de 1998, que lista e enumera categorias de alimentos para efeito de avaliação do emprego de aditivos, várias Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) que consideram que o uso de aditivos deva ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado, começaram a ser aprovadas para cada categoria de alimento (ANVISA, 2012). A RDC nº 5, de 15 de janeiro de 2007, especifica para bebidas não-alcoólicas gaseificadas e não-gaseificadas os limites máximos

permitidos para os corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranço, conforme tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Limite máximo aceitável em bebidas não-alcoólicas (ANVISA, 2012).

Bebidas não –alcoólicas – Categoria 16.2	
Corante	Limite máximo aceitável (mg/100 mL)
Tartrazina	10
Amarelo Crepúsculo	10
Amaranto	5

2.4 Corantes azo

Classe de corantes artificiais formado por compostos que apresentam um anel naftaleno ligado a um segundo anel benzeno por uma ligação azo (N=N). Até três grupos sulfônicos podem estar presentes nos anéis da molécula (DRAKE, 1975). Representa a classe de corantes artificiais mais importante e utilizada em alimentos e é composta pelos seguintes corantes: amaranço, ponceau 4R, vermelho 40, azorrubina, tartrazina e amarelo crepúsculo. Destacam-se para este trabalho os corantes amaranço, tartrazina e amarelo crepúsculo.

2.4.1 Amaranço

Caracterizada pela cor vermelha, é representante dos corantes mono-azo, ou seja, possui apenas uma ligação azo em sua estrutura. Apresenta alta solubilidade em água (aproximadamente,

70 g/l à 25°C), é pouco solúvel em etanol (pouco acima de 4 g/l) e é insolúvel em óleos vegetais. É geralmente fornecido em pó ou grânulo na forma de sais de sódio, potássio ou cálcio. Alguns estudos são contraditórios quanto à inocuidade carcinogênica deste corante, sendo, por medida de segurança, proibido nos Estados Unidos desde 1976. No entanto, seu uso é permitido no Canadá, por apresentar semelhança estrutural a outros corantes considerados não carcinogênicos, na Inglaterra, em caráter provisório até que se apresentem estudos mais conclusivos, e na União Européia. No Japão, foi, voluntariamente, banido pelas indústrias de alimentos (DOWNHAM & COLLINS, 2000). No Brasil, seu uso em alimentos é permitido pela ANVISA, porém sua adição pode variar somente de 5 a 30 mg/100g ou mg/100mL, dependendo da categoria em que o alimento se encontra (ANVISA, 2011). O valor de IDA varia de 0 – 0,5 mg/kg de peso corpóreo (FAO, 2011). A Figura 2 mostra a estrutura química deste corante.

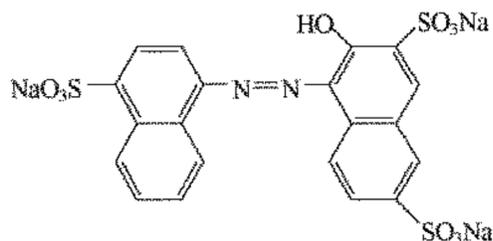


Figura 2. Estrutura química do corante amarantho.

4.2 Tartrazina

Corante amarelo-esverdeado altamente solúvel em água e pouco solúvel em etanol. Dentre os corantes azo, tem despertado maior atenção por toxicologistas e alergistas (DOWNHAM & COLLINS, 2000), sendo apontado como o responsável por várias reações adversas, causando desde urticária até asma. Provavelmente, de 8 a 20% dos consumidores sensíveis à aspirina, são também sensíveis a este corante. Entretanto, é um dos corantes mais empregados em alimentos e é permitido em muitos países, como Canadá, Estados Unidos e União Européia (DOWNHAM &

COLLINS, 2000). No Brasil, seu uso em alimentos é permitido pela ANVISA, no entanto, sua adição varia de 5 a 50 mg/100g ou mg/100mL, dependendo da categoria em que o alimento se encontra (ANVISA, 2011). O valor de IDA varia de 0 – 7,5 mg/kg de peso corpóreo (FAO, 2011). A Figura 3 mostra a estrutura química deste corante.

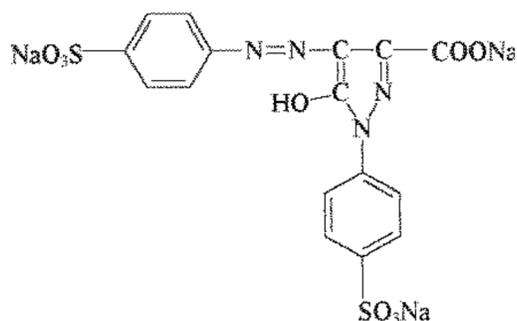


Figura 3. Estrutura química do corante tartrazina.

2.4.3 Amarelo Crepúsculo

Corante amarelo-alaranjado que, assim como os citados acima, é solúvel em água e pouco solúvel em etanol. Os Estados Unidos, Japão e países da Europa permitem seu emprego em alimentos (DOWNHAM e COLLINS, 2000). No Brasil, seu uso em alimentos é permitido pela ANVISA, porém, sua adição pode variar apenas de 5 a 50 mg/100g ou mg/100mL, dependendo da categoria em que o alimento se encontra (ANVISA, 2011). O valor de IDA varia de 0 – 4.0 mg/kg de peso corpóreo (FAO, 2011). A Figura 4 mostra a estrutura química deste corante.

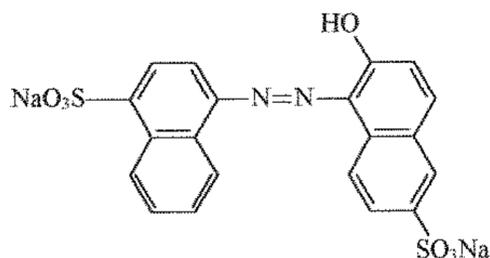


Figura 4. Estrutura química do corante amarelo crepúsculo.

Tabela 2. Propriedades dos corantes artificiais tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranço.

PROPRIEDADES DOS CORANTES			
Nome Usual	Tartrazina	Amarelo Crepúsculo	Amaranto
Nome Químico	sal tri-sódico 5-hidroxi-1-(4-sulfofenil)-4-[(4-sulfofenil) azo]-pirazole-3-carboxilato	sal di-sódio 6-hidroxi-5-[(4-sulfofenil) azo]-naftaleno-2-sulfonato	sal tri-sódico do ácido 3-hidroxi-4-(4-sulfo-1-naftil azo)-naftaleno-2,7-di-sulfonato
Classe	monoazo	monoazo	monoazo
Fórmula	C ₁₆ H ₉ N ₄ Na ₃ O ₉ S ₂	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃
Massa Molar	534,35781	452,36374	604,46361
CAS Number	1934-21-0	2783-94-0	915-67-3
Color Index (C.I.)	19140	15985	16185
Código Brasil	E-102	E-110	E-123
Absorção Máxima	λ _{max.} = 425nm	λ _{max.} = 480nm	λ _{max.} = 523nm
IDA (mg/kg pc)	7,5	4,0	0,5

2.5 Estabilidade dos corantes azo

Os alimentos que chegam à mesa, em quase sua totalidade, apresentam coloração, seja ela natural ou artificial. Isto se deve a cor ser uma das primeiras qualidades sensoriais pela qual estes produtos são julgados. Trata-se de uma característica essencial nos alimentos já que apresenta para o consumidor relação direta com a qualidade, sabor e estado de conservação destes produtos (MASCARENHAS *et al.*, 1999).

Corantes naturais, conhecidos por serem muito instáveis durante as etapas de processamento e estocagem dos alimentos, foram assim substituídos por corantes artificiais como

forma de solucionar tal problema. No entanto, mesmo que de forma mais lenta, esses corantes também tendem a se degradar (THAKUR & ARYA, 1993).

Devido à boa impressão e grande aceitabilidade dos consumidores por alimentos coloridos, corantes artificiais tem sido amplamente utilizados na indústria de sucos, balas, refrigerantes, guloseimas e gelatinas e sua estabilidade nestes produtos pode variar conforme a forma física em que foram adicionados, a composição e ao tipo de embalagem de cada produto alimentício.

Na literatura, poucos estudos são encontrados sobre estabilidade de corantes artificiais frente a exposição à luz solar e visível, à presença de ácidos e açúcares e à influência do pH.

A vasta utilização de aditivos em alimentos tem se tornado algo tão comum e significativo que pouco se questiona sobre interações entre moléculas que compõem estes produtos. Aditivos altamente reativos, como dióxido de enxofre, ácido ascórbico e ácido nítrico, de acordo com Adams (1997), sofrem interações com outros aditivos, inclusive com corantes azo.

O ácido ascórbico, composto adicionado em alimentos como suplemento nutricional e/ou antioxidante, é um aditivo muito utilizado na composição de produtos coloridos artificialmente, como por exemplo, refrigerantes, sucos, isotônicos e gelatinas. Em 1983, Fogg e Summan estudaram o efeito do ácido ascórbico na estabilidade de alguns corantes utilizados em alimentos e, como resultado, demonstraram instabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranto, em ordem crescente, quando em presença deste ácido e em condições de luz visível e escuro (FOGG & SUMMAN, 1983a). Posterior estudo demonstrou que, com a inibição da oxidação do ácido ascórbico por EDTA, esta taxa de degradação diminuía (FOGG & SUMMAN, 1983b). Em contraste, Marovatsanga e Macrae (1987), estudando a influência de compostos que protegem o ácido ascórbico de degradação, como açúcar e gás nitrogênio, verificaram aumento na degradação do corante amaranto em soluções modelo, dando origem a dois compostos: o ácido naftiônico e o amino R-sal, instável e facilmente oxidável. Thakur e Arya (1993), demonstraram que a taxa de degradação em corantes depende da natureza das substâncias presentes na

composição dos alimentos. Em seu estudo, demonstraram que ácido ascórbico e luz aumentam a degradação do amarelo crepúsculo e tartrazina, enquanto a presença de açúcar causa efeito contrário, permitindo maior estabilidade dos corantes. Além desses compostos, dióxido de enxofre e ácido sórbico também mostraram-se eficientes na degradação do amarelo crepúsculo e da tartrazina.

Estudo sobre estabilidade de corantes azo mostrou que o processo de degradação destes compostos depende primordialmente do pH da solução, além da presença de outros aditivos. Deste modo, soluções ácidas resultaram na aceleração do processo de degradação, assim como a adição de ácido ascórbico e/ou ácido cítrico, e a adição de benzoato de sódio dificultou a degradação dos corantes tartrazina e amarelo crepúsculo. Análises em refrigerantes demonstraram dependência no tipo de corante e nos aditivos presentes, tendo os sabores uva e morango apresentado maior estabilidade em sua coloração, e citrus e laranja, menor estabilidade (OSTROSKI *et al.*, 2005).

A preocupação com a estabilidade de corantes artificiais tem crescido tanto, que, atualmente, muitos estudos de degradação têm focado na identificação e quantificação dos produtos intermediários formados a partir deste processo. Produtos estes normalmente caracterizados por aminas aromáticas, sem coloração e possivelmente tóxicas, uma vez que, substâncias incolores não são necessariamente indicativos de elementos atóxicos (MARMITT *et al.*, 2010; GOSETTI *et al.*, 2008). Técnicas cromatográficas com utilização do espectrofotômetro de massas têm sido as mais indicadas para este fim (GOSETTI *et al.*, 2008; GOSETTI *et al.*, 2007; PREVOT *et al.*, 2008; GOSETTI *et al.*, 2005.)

Gosetti *et al.*(2005) demonstraram, através de ensaios de degradação em soluções-modelo, condições em que o corante amarelo crepúsculo sofre degradação e conseqüente perda de cor. Dentre os efeitos testados de temperatura, luz (visível e solar), reações fortemente oxidativas (Reação de Fenton), adição de ácido ascórbico e sulfitos em meio oxidativo e adição de ácido ascórbico e sacarose em meio reduzido e oxidativo na presença de luz solar, esta última, quando

em meio reduzido, aumentou a degradação da molécula, com ou sem adição de sacarose. A Reação de Fenton apareceu em segundo lugar, apresentando pouca e rápida descoloração. As soluções foram analisadas por HPLC-MS e a clivagem da ligação azo (N=N) foi identificada pela formação dos compostos: 5-amino-6-hidroxi-2-naftalenosulfonato e *p*-amino benzenosulfonato (GOSETTI *et al.*, 2005).

Em 2007, Gosetti e pesquisadores, através de estudo similar ao descrito no parágrafo anterior, porém com o corante Azul Brillhante, verificaram a degradação do corante em bebidas comercializadas quando estas foram expostas às condições do tempo (luz solar e temperatura incontrolável). Após 16 dias, a bebida perdeu completamente sua coloração, com perdas graduais ao longo do período de exposição. Enquanto isso, experimentos preparados em laboratório e expostos às mesmas condições demonstraram que soluções padrão, compostas apenas por água e corante, não sofreram nenhuma degradação neste mesmo período, levando à conclusão de que a degradação destes compostos pode estar associada a interação com outros compostos presentes na bebida.

2.6 Métodos de análise

O controle analítico de corantes artificiais em alimentos é de fundamental importância devido aos riscos que estes podem causar à saúde (ALTINÖZ & TOPTAN, 2002). Desta forma, alta sensibilidade, acurácia, rapidez e simplicidade são fatores essenciais no desenvolvimento de metodologias que tem como finalidade garantir a segurança alimentar.

Diversas metodologias analíticas tem sido desenvolvidas para a determinação de corantes em misturas, uma vez que, a coloração dos alimentos industrializados é normalmente obtida pela mistura de dois ou mais corantes. Métodos que envolvem cromatografia (PRADO & GODOY, 2007; PRADO & GODOY, 2004; ALTINÖZ & TOPTAN, 2003; BERZAS NEVADO *et al.*,

1997), espectrometria de massas (HARADA, 1991), voltametria (BECERRO *et al.*, 1990; MASLOWSKA, 1985; FOGG & SUMMAN, 1983a; FOGG & SUMMAN, 1983b), eletroforese capilar (PRADO *et al.*, 2006; PEREZ-URGUIZA & BELTRAN, 2000; SUZUKI *et al.*, 1994) e espectrofotometria (LLHAMAS *et al.*, 2009; VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2006; SANTOS & NAGATA, 2005; ALTINÖZ & TOPTAN, 2003; ALTINÖZ & TOPTAN, 2002; BERZAS NEVADO *et al.*, 1999(a); BERZAS NEVADO *et al.*, 1999(b); CAPITÁN *et al.*, 1996; BERZAS NEVADO *et al.*, 1995) têm tido alta repercussão na determinação de corantes artificiais em diferentes matrizes.

Apesar do enorme destaque da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a análise simultânea de corantes artificiais, seja ela acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) ou ao espectrômetro de massas (CLAE-MS), a Espectrofotometria na região de UV-visível, técnica muito utilizada para o estudo de compostos coloridos, apresenta o diferencial de garantir baixo custo analítico, bem como simplicidade, fatores estimulantes para a descoberta de novas metodologias que incluam sua utilização.

A espectrofotometria pode ser utilizada separando-se ou não os corantes na matriz. É uma técnica que auxilia na quantificação de corantes artificiais e, através de análises matemáticas, é possível obter de maneira rápida e prática a concentração de cada um dos compostos (QUEIJA *et al.*, 2001). A identificação e quantificação, baseadas em análises computacionais e calculados com análises de regressão linear, necessita que os corantes não apresentem sobreposição de seus espectros, para que não ocorra erros nas leituras das absorvâncias e assim possam ser identificados e quantificados de maneira satisfatória (NI e GONG, 1997).

Métodos espectrofotométricos simples para determinação de corantes em misturas, que não necessitam de separação prévia, são realizados através da leitura direta da absorvância do composto em seu comprimento de onda de máxima absorção. No entanto, quando os corantes

presentes na mistura apresentam comprimentos de onda de máxima absorção muito próximos, a quantificação torna-se dificultada pela interferência que um ocasiona na quantificação do outro.

Diversos trabalhos tentam desenvolver, com algum sucesso, técnicas usando a espectrofotometria, através de um recurso matemático de análise das derivadas dos espectros dos corantes. Esta metodologia consiste na visualização da curva que representa o produto da mistura de corantes, e a partir dele é possível obter novas curvas, representando cada corante, onde o cálculo de concentração é realizado, não mais no máximo de absorção do composto, mas em uma região do novo espectro onde o composto calculado absorve e os outros não. Assim, através de equações matemáticas é possível determinar sua concentração, mesmo estando em misturas e com os espectros de absorção sobrepostos (ROJAS & OJEDA, 2009; CHEN *et al.*, 2008; VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2006; ÖZDEMIR & AKKAN, 1999; BERZAS NEVADO *et al.*, 1999b).

Além da espectrofotometria derivativa, métodos quimiométricos também são atualmente muito utilizados para solucionar a falta de especificidade ocasionada pela sobreposição de espectros na determinação dos corantes artificiais. Metodologias matemáticas de calibração multivariada, como a Regressão por Componentes Principais (PCR) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) são exemplos de técnicas quimiométricas que apresentam uma etapa de calibração, na qual a relação entre o espectro e a concentração do composto é deduzida a partir de um conjunto de amostras de referência, seguida de uma etapa de predição, a qual utiliza-se o resultado da calibração para determinar a concentração do composto pelo espectro da amostra (LLHAMAS *et al.*, 2009; SANTOS & NAGATA, 2005; BERZAS NEVADO *et al.*, 1999b).

Dentre os métodos espectrofotométricos, existe ainda o método de Vierordt que representa, frente aos demais, uma técnica simples, rápida e barata para quantificação de compostos com máximos de absorção em comprimentos de onda próximos. Baseia-se no princípio da aditividade da Lei de Beer e consiste na quantificação por meio da resolução de sistemas de equações lineares, sendo essencial o conhecimento do coeficiente de extinção molar ou absorvidade molar de cada

composto em seu comprimento de onda de máxima absorção (DINÇ, 1999). Estudos que comparam o método de Vierordt e métodos de espectrofotometria derivativa foram realizados para determinação de corantes artificiais em alimentos sem necessidade de prévia separação dos compostos. Resultados demonstraram não haver diferenças significativas entre tais métodos e, para melhor efeito de comparação, os mesmos resultados foram comparados com resultados obtidos por CLAE e, de forma idêntica, não apresentaram diferenças significativas, além de permitirem recuperação satisfatória dos corantes em alimentos (ALTINÖZ & TOPTAN, 2003; ALTINÖZ & TOPTAN, 2002).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo estudar a estabilidade, por influência de fatores físicos e químicos, de três corantes da classe azo mais utilizados por indústrias de alimentos no Brasil, tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranato.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar a estabilidade destes corantes, por meio de soluções modelo, sob efeito dos seguintes fatores físicos: luz solar (presença e ausência), luz fosforescente (presença e ausência) e temperatura (5°C, 25°C e 55°C);
- Estudar a estabilidade, por meio de soluções modelo, sob influência do ácido ascórbico e efeitos físicos mencionados no item anterior;
- Estudar a estabilidade, por meio de soluções modelo, sob influência do ácido cítrico e efeitos físicos mencionados no primeiro item;
- Estudar a estabilidade, por meio de soluções modelo, sob influência da mistura dos ácidos cítrico e ascórbico, e efeitos físicos mencionados no primeiro item;
- Verificar a estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranato quando em soluções de misturas binárias e ternárias;
- Verificar a estabilidade dos corantes presentes e sucos e refrigerantes sob influência dos fatores físicos estudados neste trabalho;
- Quantificar por padronização externa soluções com um único corante e aplicar o princípio da aditividade da Lei de Beer em caso de misturas;
- Avaliar, estatisticamente, os dados levantados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Para os ensaios de estabilidade, utilizou-se soluções modelo e bebidas não-alcoólicas, especificamente sucos artificiais e refrigerantes, comercializadas em garrafas PET (politereftalato de etileno).

Amostras de refrigerante e suco artificial foram adquiridas em estabelecimentos comerciais nas cidades de São José dos Campos e Campinas. Dentre elas, quatro marcas de refrigerante de uva e laranja e três marcas de suco artificial, dois de frutas cítricas e um de frutas vermelhas.

4.2 Estudo da estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amarantho em soluções modelo

Os ensaios de estabilidade foram realizados em soluções modelo (água MilliQ e corante) com concentração de 2,5mg/100ml e controlados por leituras espectrofotométricas UV-visível, que avaliou o decaimento dos corantes frente aos efeitos de luz (solar e fosforescente) e temperatura, combinados com ácido cítrico e ácido ascórbico, de acordo com a Tabela 2. Os experimentos foram divididos em grupos de acordo com a composição das soluções (Tabela 4).

Tabela 3. Parâmetros para ensaios de degradação dos corantes da classe azo em estudo.

LUZ SOLAR E ARTIFICIAL (Ausência e presença)	TEMPERATURA (ausência de luz)		
	5 °C	25 °C	55 °C
- Presença de ácido cítrico;	- Presença de ácido cítrico;	- Presença de ácido cítrico;	- Presença de ácido cítrico;
- Presença de ácido ascórbico;	- Presença de ácido ascórbico;	- Presença de ácido ascórbico;	- Presença de ácido ascórbico;
- Presença de ambos;	- Presença de ambos;	- Presença de ambos;	- Presença de ambos;
- Ausência de ambos (Controle).	- Ausência de ambos (Controle).	- Ausência de ambos (Controle).	- Ausência de ambos (Controle).

Tabela 4. Descrição dos grupos estudados.

Grupo	Descrição
A	Soluções de corante (controle).
B	Soluções de corante com adição de ácido cítrico.
C	Soluções de corante com adição de ácido ascórbico.
D	Soluções de corante com adição dos ácidos cítrico e ascórbico.

Cada experimento consistiu em um grupo (A, B, C e D) contendo 13 frascos de vidro incolor de 60 mL da seguinte forma: 3 frascos contendo solução de um único corante (tartrazina, amarelo crepúsculo ou amaranço); 9 frascos contendo solução com dois corantes misturados nas

proporções 1:1; 1:2; 2:1 (m/m); e 1 frasco contendo solução com mistura dos três corantes igual proporção.

Experimentos com adição de ácido ascórbico apresentaram concentração de 30 mg/100ml deste composto em cada uma das 13 soluções representantes. Isto foi obtido adicionando-se 16,7 mL de uma solução concentrada de ácido ascórbico (9,3 g/L) à 500 mL de solução modelo e esta distribuída em 4 frascos pequenos com a finalidade de se obter quatro replicatas de cada solução submetida à mesma condição externa. Já para os experimentos com adição de ácido cítrico, foi adicionado 5 mL de uma solução concentrada (pH 1,9) à 500 mL de solução modelo e assim, da mesma forma que nas soluções com ácido ascórbico, foi distribuído em 4 frascos pequenos. Por fim, a solução final obtida apresentou pH na faixa de 3,2 a 3,3. As medidas de pH foram realizadas utilizando o pHmetro Mettler Toledo 320.

A etapa inicial de cada experimento consistiu de leituras no espectrofotômetro de alíquotas de cada uma das soluções nos comprimentos de máxima absorção de cada um dos corantes presentes na mistura. Soluções contendo tartrazina foram analisadas à 425 nm, amarelo crepúsculo à 480 nm e amaranto à 525 nm em espectrofotômetro (UV 1600, Pró-Análise).

Cada experimento, exceto aqueles submetidos à luz solar, tiveram duração de 45 dias e leitura espectrofotométricas dos extratos foram realizadas a cada uma semana. A cada período, três alíquotas de cada solução era retirada para leitura em triplicata e logo o frasco era preenchido com gás nitrogênio para manter sua atmosfera interna sem gás oxigênio, preservando o ácido ascórbico de oxidação.

Os experimentos de temperatura foram realizados internamente no laboratório, especificamente, dentro de geladeira ($5 \pm 1^\circ\text{C}$), dentro de armário à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e dentro de estufa ($55 \pm 4^\circ\text{C}$). Os ensaios de luz foram realizados parte dentro do laboratório e parte fora. Aqueles expostos à luz fosforescente ficaram acondicionados no interior de uma estrutura de madeira de dimensão 55x35x55 cm (L x A x C) e equipada com duas lâmpadas

fosforescentes tipo “bastão”, uma em cada lado da estrutura, na parte superior. Os experimentos expostos à luz solar ficaram sob condições climáticas por trinta dias durante o verão, recebendo luz durante cinco horas diárias, parte no período da manhã e parte a tarde. Estes ficaram sob observação constante, sendo realizadas leituras espectrofotométricas à medida que alterações visíveis na coloração das soluções fossem observadas. Não havendo modificação na cor, mantinham-se leituras a cada cinco dias de experimento.

4.3 Estudo da estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranço em bebidas comercializáveis

Com o intuito de se estudar a estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranço em matrizes alimentícias, quando estes se submetem à diferentes maneiras de transporte e armazenamento, amostras de mercado foram submetidas às mesmas condições físicas estudadas neste trabalho.

Quatro marcas de refrigerantes de sabores uva e laranja e três marcas de sucos artificiais, todos comercializados em garrafas PET e que apresentavam composição dos corantes em estudo, bem como o conservante ácido cítrico e o antioxidante ácido ascórbico, estudados na estabilidade das soluções modelo, foram expostos aos efeitos físicos de luz e temperatura.

Este estudo teve duração de, aproximadamente, 30 dias, sendo realizadas leituras no espectrofotômetro a cada uma semana para verificação da estabilidade dos corantes.

4.3.1. Preparo da Amostra

Amostras de refrigerante foram apenas degaseificadas por agitação manual e amostras de suco artificial não receberam nenhum tratamento específico. Antes de separarem alíquotas para análise no espectrofotômetro, as amostras foram bem homogeneizadas.

Uma única diluição de amostra foi necessária para o suco de marca A por ultrapassar o limite de absorbância permitido pelo espectrofotômetro. Para isso, uma diluição 1:3 da amostra em água milliQ foi preparada e esta submetida às leituras de absorbância. O valor corrigido foi obtido através da fórmula:

$$C_r = 3 \times C_d$$

onde:

C_r = concentração real do corante na amostra

C_d = concentração da amostra diluída

O valor obtido da concentração real foi, assim, inserido nas tabelas de concentração inicial e final dos corantes presentes nas amostras após testes de estabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise espectrofotométrica

5.1.1. Curva de Calibração

Foram construídas três curvas de calibração para cada corante em estudo, com leituras nos seguintes comprimentos de onda: 425 nm, 480 nm e 525 nm. Soluções padrão com concentrações de 12,5 mg/L; 18,75 mg/L; 25,0 mg/L; 32,25 mg/L e 40,0 mg/L foram preparadas em triplicata e a média das absorbâncias foi obtida para cada concentração.

Todas as curvas de calibração apresentaram excelente linearidade, com valores de R^2 acima de 0,99.

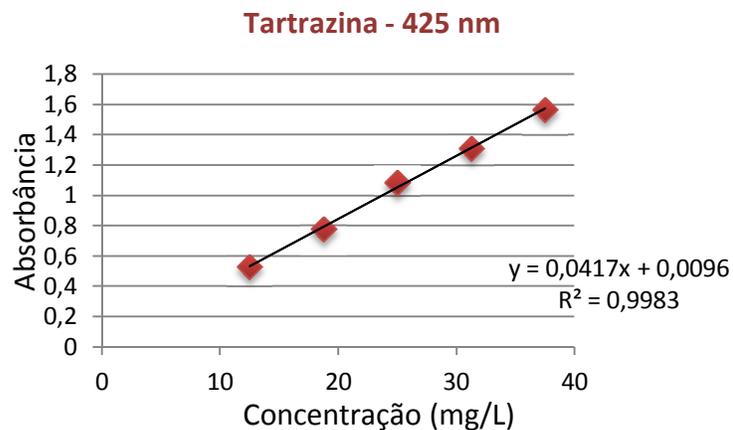


Figura 5. Curva de calibração do corante tartrazina à 425 nm.

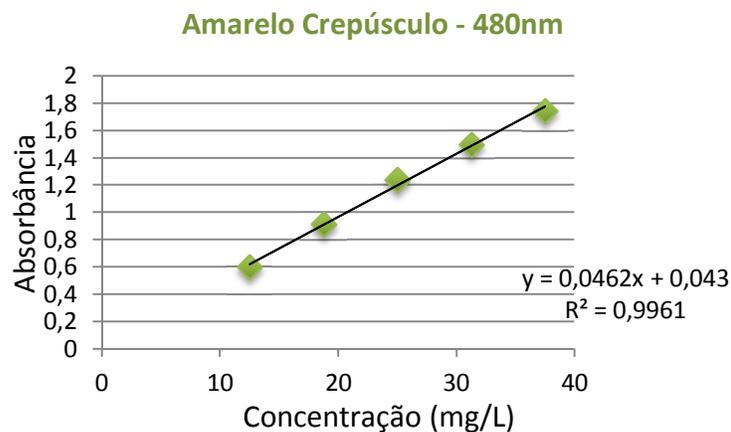


Figura 6. Curva de calibração do corante amarelo crepúsculo à 480 nm.

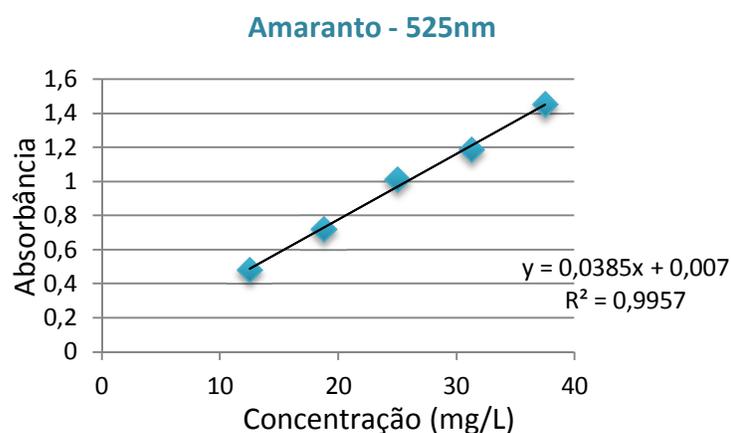


Figura 7. Curva de calibração do corante Amaranto à 525 nm.

5.1.2. Princípio da aditividade da Lei de Beer

Misturas de compostos que apresentam máximos de absorção em comprimentos de onda próximos podem ser analisados através da utilização do valor da absortividade molar de cada composto presente na solução.

A absorvância de uma solução em qualquer comprimento de onda representa a soma das absorvâncias dos compostos presentes na mistura, como demonstrado pela fórmula abaixo. Desta forma, conhecendo-se a absorvidade molar de cada composto em cada um dos comprimentos de onda, é possível quantificá-los (SANTOS *et al.*, 2010; HARRIS, D.C., 2008).

$$A_m = \varepsilon_x b[X] + \varepsilon_y b[Y]$$

onde:

A_m = absorvância da solução em um determinado comprimento de onda (medida adimensional).

ε = absorvidade molar do composto x ou y no comprimento de onda de leitura (unidades mol . L⁻¹ . cm⁻¹)

b = caminho óptico da cubeta (1,0 cm).

[X] = concentração em mol . L⁻¹ do composto x .

[Y] = concentração em mol . L⁻¹ do composto y .

Vale ressaltar que esta fórmula foi apenas utilizada para a quantificação de corantes em misturas. Soluções que apresentavam apenas um corante foram quantificados por meio de padronização externa utilizando-se a equação da reta obtida pelas leituras no comprimento de onda de máxima absorção do composto de interesse.

Por meio da resolução de sistemas de equações lineares obteve-se a concentração de cada corante presente em misturas. Para isto, foi necessário determinar, pela Lei de Beer, a absorvidade molar (ε) para cada corante nos comprimentos de onda de interesse (Tabela 4):

$$\varepsilon_x = \frac{A_x}{b[X]}$$

onde:

ϵ_x = absorptividade molar do composto x no comprimento de onda de leitura (unidades mol . L⁻¹ . cm⁻¹).

A_x = absorvância do padrão x no comprimento de onda de interesse.

b = caminho óptico da cubeta (1,0 cm).

$[X]$ = concentração em mol . L⁻¹ do composto x .

Tabela 5. Absortividade molar dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranço.

Corante	Comprimento de Onda (nm)	Absortividade molar (ϵ)
Tartrazina	425	$2,31 \times 10^4$
Amarelo Crepúsculo	425	$9,73 \times 10^3$
Amaranto	425	$5,53 \times 10^3$
Tartrazina	480	$7,59 \times 10^3$
Amarelo Crepúsculo	480	$2,24 \times 10^4$
Amaranto	480	$1,57 \times 10^4$
Tartrazina	525	$4,27 \times 10^1$
Amarelo Crepúsculo	525	$8,63 \times 10^3$
Amaranto	525	$2,44 \times 10^4$

5.2 Estudo da estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranço por influência de fatores físicos

5.2.1. Ausência de luz

5.2.1.1. Estocagem a temperatura de 25°C

A permanência das amostras em ambiente escuro e temperatura na faixa de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ não apresentou efeito sobre a estabilidade dos corantes tartrazina (T), amarelo crepúsculo (AC) e amaranço (A).

Não foi observada estabilidade dos corantes nos grupos controle (grupo A) e com ácido cítrico (grupo B), ocorrendo apenas em amostras dos grupos com ácido ascórbico (grupo C) e com

ácido ascórbico e cítrico (grupo D). A taxa de degradação apresentada por cada um dos corantes nas diferentes soluções de cada grupo está demonstrada nos gráficos abaixo.

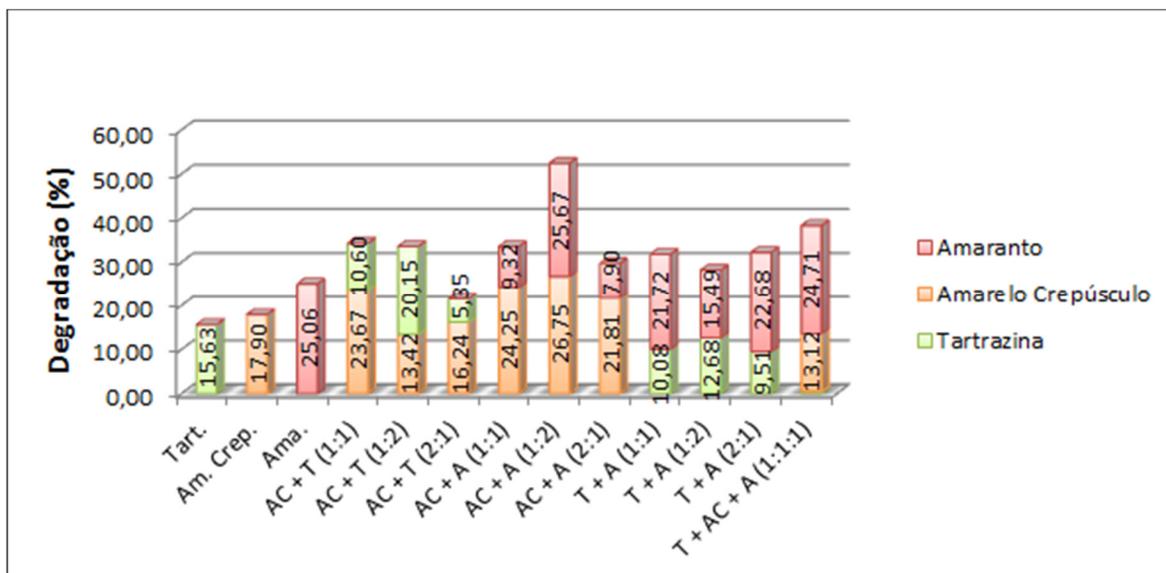


Figura 8. Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição de ácido ascórbico sob condição de ausência de luz (grupo C).

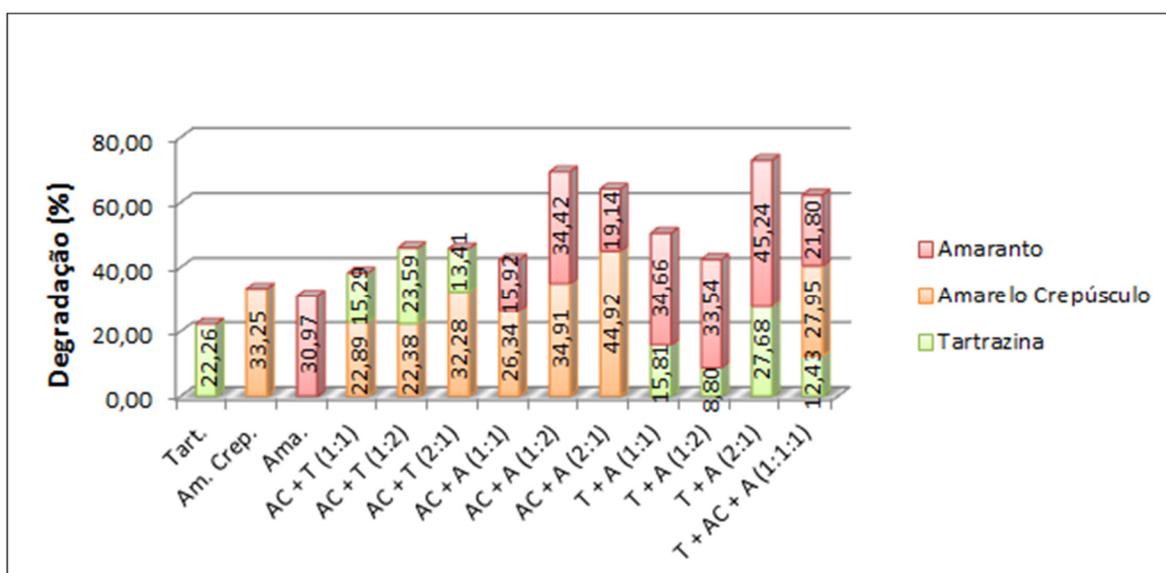


Figura 9. Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição dos ácidos cítrico e ascórbico sob condição de ausência de luz (grupo D).

Diferenças nas taxas de degradação podem ser notadas comparando-se os dois grupos, C e D, este apresentando maior degradação que aquele. Resultados de maior degradação para soluções com presença de ácido ascórbico e cítrico provavelmente se deve ao fato de que estas soluções apresentam uma maior acidez comparado com as soluções apenas com ácido ascórbico. De acordo com Ostroski *et al.* (2005), quanto mais ácida a solução de corante maior será a velocidade de degradação destes compostos.

Além disso, algumas amostras específicas apresentaram degradação mais acentuada, como é o caso das amostras AC + T (2:1), AC + A (2:1) e T + A (2:1).

Para averiguar a existência de interferência dos ácidos ascórbico e cítrico na medida de absorbância dos corantes, leitura espectrofotométrica foi realizada em solução dos ácidos em água MilliQ e em água MilliQ (branco), nos três comprimentos de onda trabalhados. Como resultado, ambas as medidas apresentaram a mesma absorbância, não havendo absorção de luz pelos ácidos nos comprimentos de ondas de interesse.

5.2.1.2. Estocagem a temperatura de 5°C

Assim como nos experimentos conduzidos em ambiente escuro e temperatura em torno de 25 °C, foi observado que nos experimentos dos grupos A e B os corantes permaneceram estáveis quando mantidos em ambiente escuro e temperatura em torno de 5°C ± 1. As amostras pertencentes aos grupos C e D apresentaram degradação. Resultados apresentados pelos gráficos abaixo (Figuras 10 e 11).

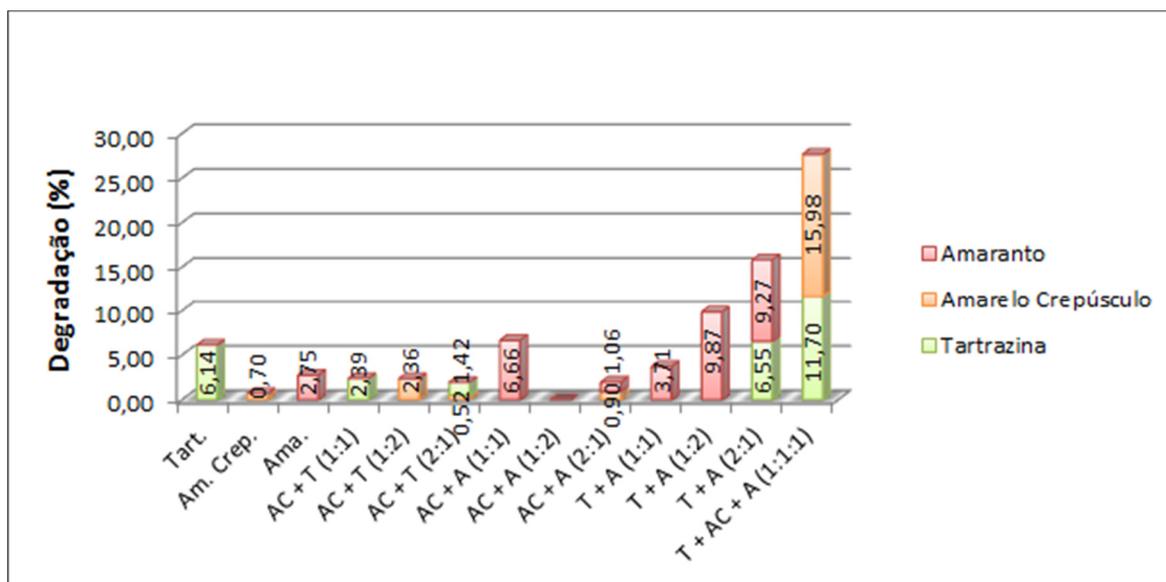


Figura 10. Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição de ácido ascórbico estocados a 5±1°C (grupo C).

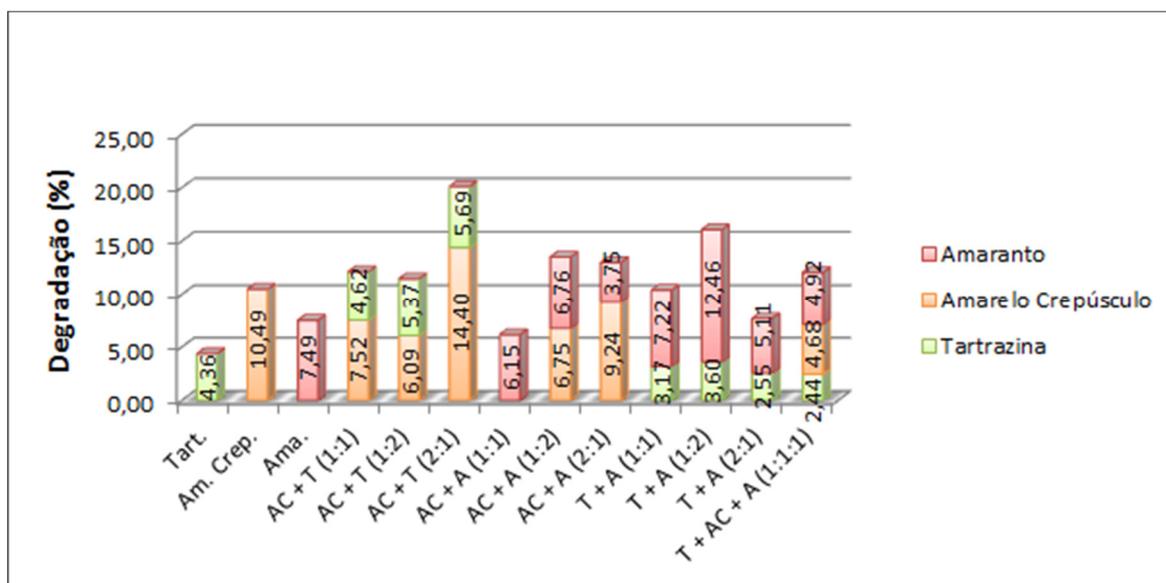


Figura 11. Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição dos ácidos cítrico e ascórbico estocados a 5±1°C (grupo D).

Pouquíssima degradação foi obtida pelas amostras do grupo C, tendo algumas amostras deste grupo nem apresentado degradação, como é o caso da amostra AC e AC + A (1:2). Neste

mesmo grupo observa-se que a maioria das amostras apresentam apenas degradação de um dos seus corantes. Como exemplo, podem ser citados os seguintes:

- AC + T (1:1) : degradação do corante tartrazina;
- AC + T (1:2) : degradação do corante amarelo crepúsculo;
- AC + A (1:1) : degradação do corante amaranto;
- T + A (1:1) : degradação do corante amaranto;
- T + A (1:2) : degradação do corante amaranto;

De modo geral, a estocagem em baixas temperaturas permitiu maior estabilidade dos corantes. Amostras com apenas ácido cítrico mantiveram-se estáveis durante o período de 45 dias, assim como as amostras do grupo controle. Pouca instabilidade foi observada em amostras com presença de ácido ascórbico e em amostras com presença dos ácidos ascórbico e cítrico, confirmando a atuação do pH na velocidade de degradação dos corantes. Além disso, ao se comparar os resultados com o experimento acondicionado a 25°C, nota-se uma diminuição na velocidade de degradação dos corantes, tendo a temperatura baixa atuado como inibidor da degradação.

5.2.1.3. Estocagem a temperatura de 55°C

Estabilidade a temperatura elevada também foi estudada e, novamente, amostras dos grupos A e B mantiveram sua coloração estável, tendo observado instabilidade dos corantes apenas em amostras dos experimentos de grupos C e D, como verificado nos gráficos abaixo.

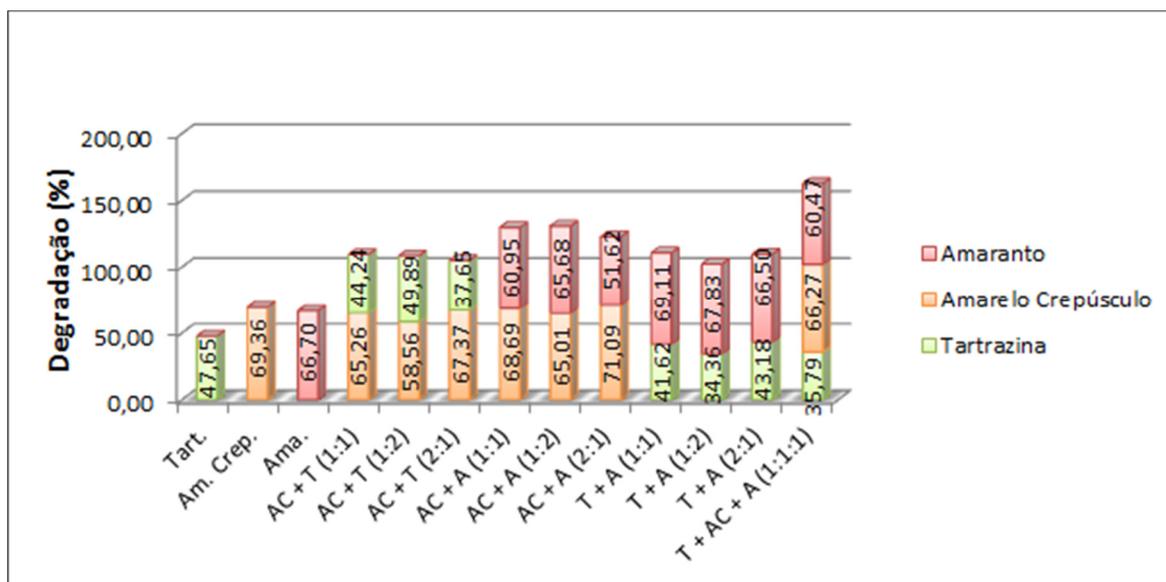


Figura 12. Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição de ácido ascórbico a $55\pm 4^{\circ}\text{C}$ (grupo C).

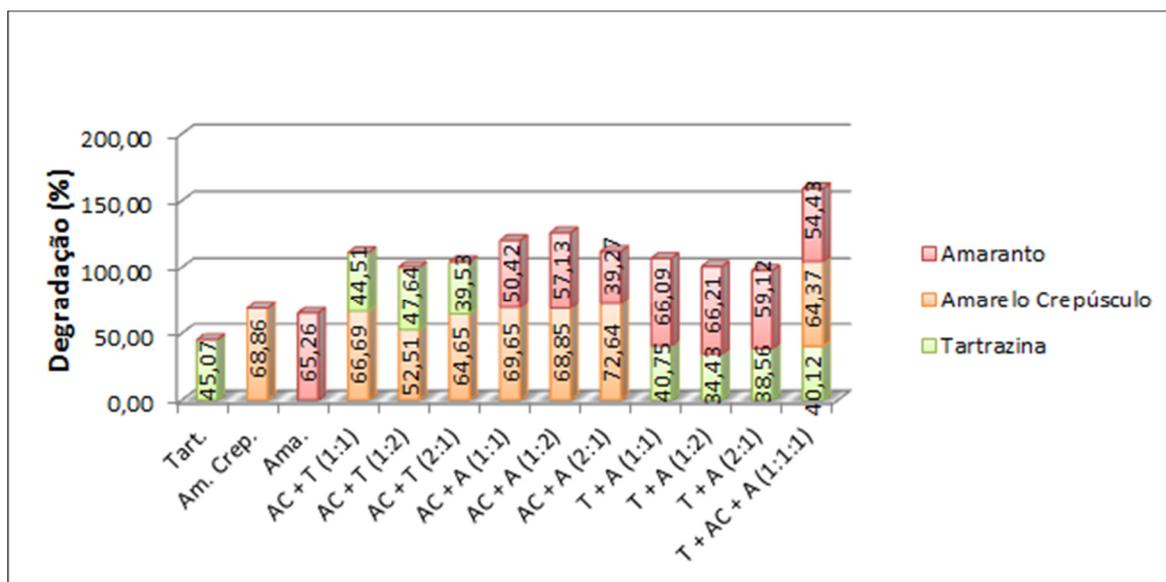


Figura 13. Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição dos ácidos cítrico e ascórbico a $55\pm 4^{\circ}\text{C}$ (grupo D).

Diferente dos experimentos à temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e baixa temperatura ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$), amostras pertencentes aos grupos C e D quando submetidos à alta temperatura ($55\pm 3^{\circ}\text{C}$)

apresentaram maior instabilidade, seguindo o raciocínio de que a temperatura influencia na degradação de corantes artificiais.

Semelhança foi observada entre os grupos C e D, notando-se pouquíssima influência do ácido cítrico na degradação dos corantes quando em presença de ácido ascórbico, diferente dos resultados apresentados pelos experimentos em condições de temperatura ambiente e baixa temperatura. Uma provável inibição da ação do ácido cítrico por alta temperatura pode ter ocorrido para que este não atuasse da mesma maneira que nos experimentos conduzidos nas condições estudadas anteriormente.

5.2.2. Luz artificial

A exposição das amostras à luz fosforescente manteve estável a coloração daquelas pertencentes ao grupo A, diferentemente dos grupos B, C e D.

De modo geral, notou-se maior estabilidade dos corantes quando presentes apenas com ácido cítrico quando comparado com amostras com presença apenas de ácido ascórbico e presença de ambos os ácidos, como apresentado pelos gráficos à seguir.

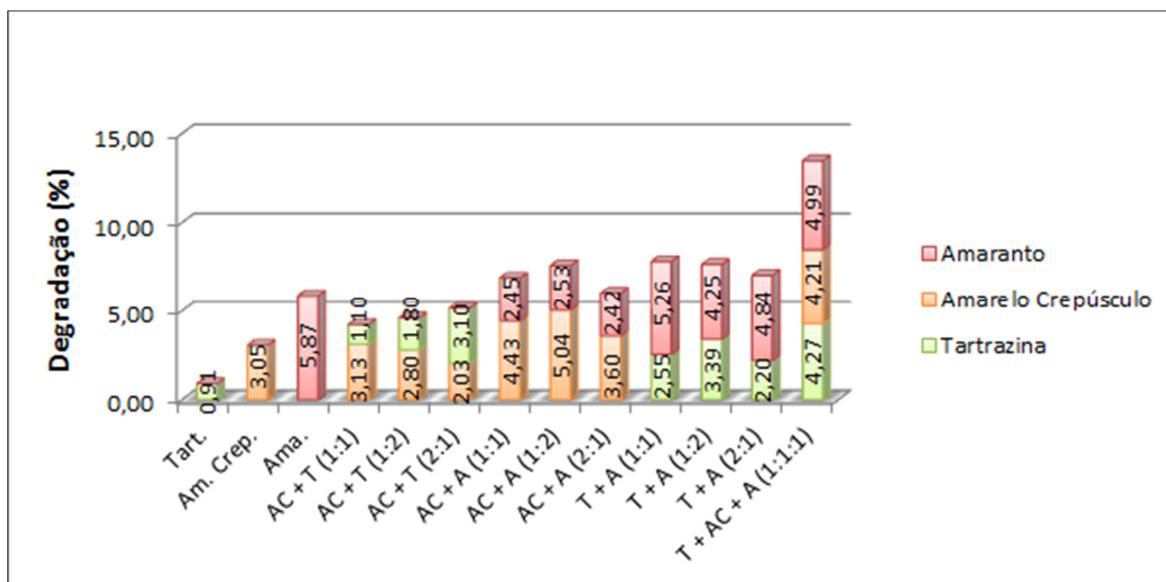


Figura 14. Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição de ácido cítrico expostos à luz fosforescente (grupo B).

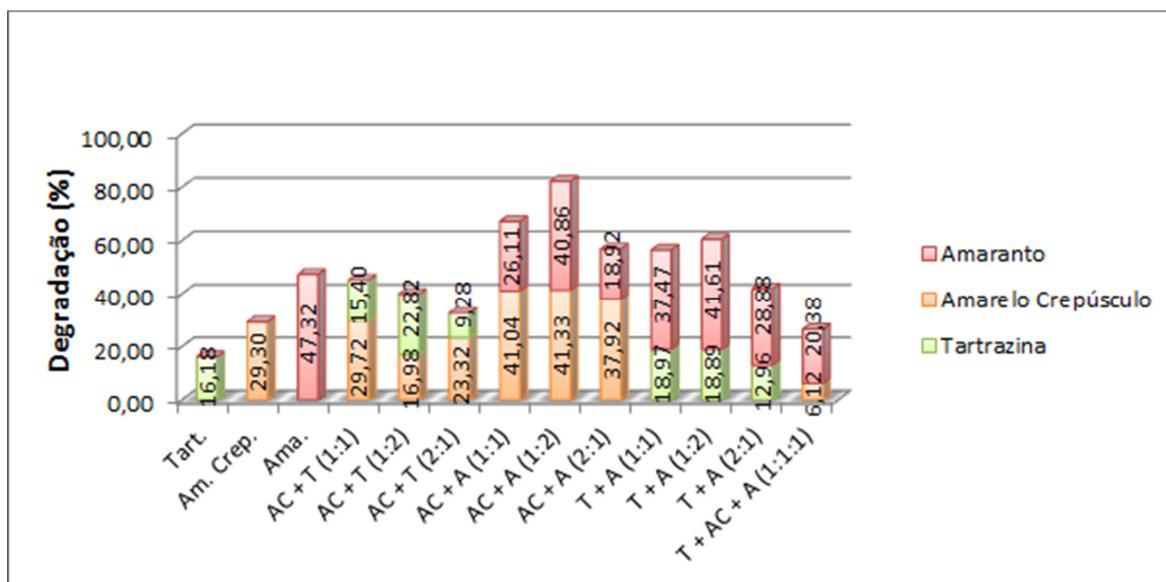


Figura 15. Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição de ácido ascórbico expostos à luz fosforescente (grupo C).

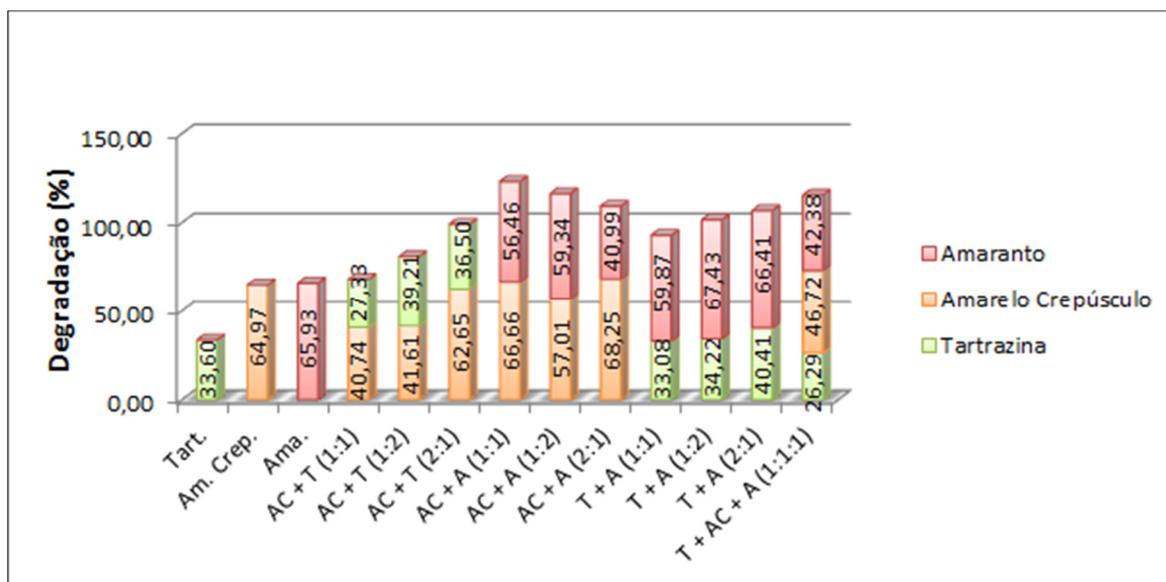


Figura16. Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição dos ácidos cítrico e ascórbico expostos à luz fosforescente (grupo D).

Nas condições de luz fosforescente, observou-se maior efeito do ácido cítrico na degradação dos corantes, não observado anteriormente em experimentos conduzidos no escuro. Provavelmente, a presença de luz pode ter estimulado o ácido cítrico e forçado um aumento na degradação dos corantes por este ácido. Grupos C e D continuaram apresentando maior instabilidade dos seus corantes. O Grupo C teve menor degradação quando exposto a luz do que em temperatura alta e o Grupo D apresentou resultado semelhante ao apresentado por este mesmo grupo em alta temperatura. Uma possível explicação seria talvez a inibição do ácido ascórbico quando exposto a luz artificial e, como comentado anteriormente, um estímulo do ácido cítrico na degradação dos corantes quando exposto a luz.

5.2.3. Luz Solar

O estudo de estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranço pela luz solar foram conduzidos externamente ao laboratório, na cidade de Campinas.

Sob influência climática, os experimentos foram mantidos diariamente à luz do dia por um período de cinco horas, podendo neste tempo receber ou não alta incidência de luz solar.

Além do efeito da luz solar sobre a estabilidade dos corantes, as soluções também sofreram influência da temperatura, não sendo possível desconsiderar tal efeito.

A temperatura atmosférica, durante o período em que os experimentos ficaram expostos ao sol, foi registrada para cada dia de experimento para manter maior controle sobre o estudo. Temperaturas na faixa de 26 a 31°C foram registradas durante todo o período de experimento.

Diferente dos experimentos conduzidos dentro do laboratório, leituras espectrofotométricas foram realizadas à medida em que notava-se descoloração das soluções. Além disso, cada experimento teve duração de 30 dias, pelo fato dos corantes sob influência de luz solar e alta temperatura apresentarem rápida degradação.

Acompanhamento diferenciado foi realizado para este experimento, com descrição das condições do tempo observadas para cada dia de teste e com verificação diária da temperatura do ar pelo site do Centro de Previsão e Estudos Climáticos do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE).

Durante o mês de março, período de condução do teste, todas as condições de tempo possíveis para a região foram observadas. Desta forma, para facilitar os registros realizados diariamente, estas condições foram divididas em três grupos: dias chuvosos, dias nublados e dias de muito sol. Dias chuvosos foram caracterizados por dias inteiros de chuva, sem aparecimento de sol. Já dias nublados caracterizaram-se pelo aparecimento de sol fraco pela manhã e formação de nuvens por volta do meio dia, com possibilidade de chuva rápida durante a tarde. Dias de muito

sol foram caracterizados pela ausência de nuvens no céu, permitindo maior incidência de raios solares nos experimentos, além de muito calor.

No final, o período de experimento, em sua totalidade, contou com um pouco mais de dias nublados do que dias de muito sol e dias chuvosos. Por se tratar de uma época de passagem do verão para o outono, diminuição de chuvas de verão foi verificada. Dias de muito sol foram observados principalmente nos últimos dez dias de experimento, chegando à atingir temperaturas de até 31°C. Dias chuvosos foram poucos, totalizando três dias de chuva o dia inteiro e quatro dias de tempo bem nublado, em um período de 30 dias.

Degradação foi observada em amostras pertencentes aos quatro grupos experimentais, tendo o grupo A (Figura 17) e D (Figura 20) apresentado maior e menor estabilidade dos corantes em estudo, respectivamente. Intermediários à estes estão os grupos B (Figura 18) e C (Figura 19), em ordem decrescente de estabilidade.

Em poucos dias de experimento, notou-se total degradação do amarantho presente em algumas amostras com apenas este corante e presença dos ácidos cítrico e ascórbico (grupo D). Algumas amostras tornaram-se completamente incolores por efeito das condições em que se encontravam, principalmente amostras do grupo D. Total degradação não foi observado para todas as quatro replicatas de um mesmo tipo de amostra.

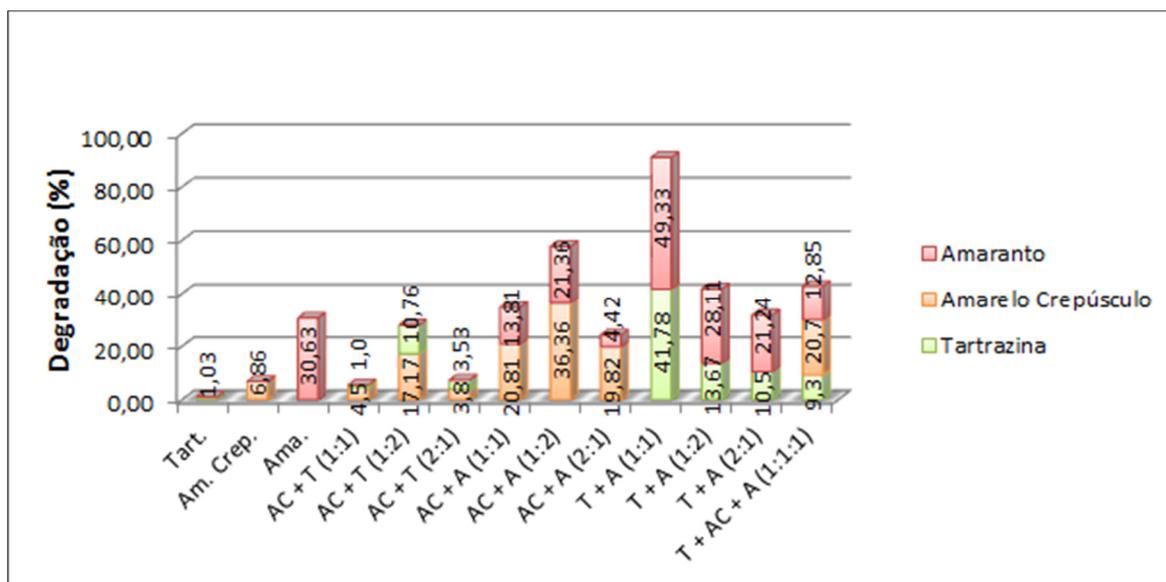


Figura 17. Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo expostos à luz solar (grupo A).

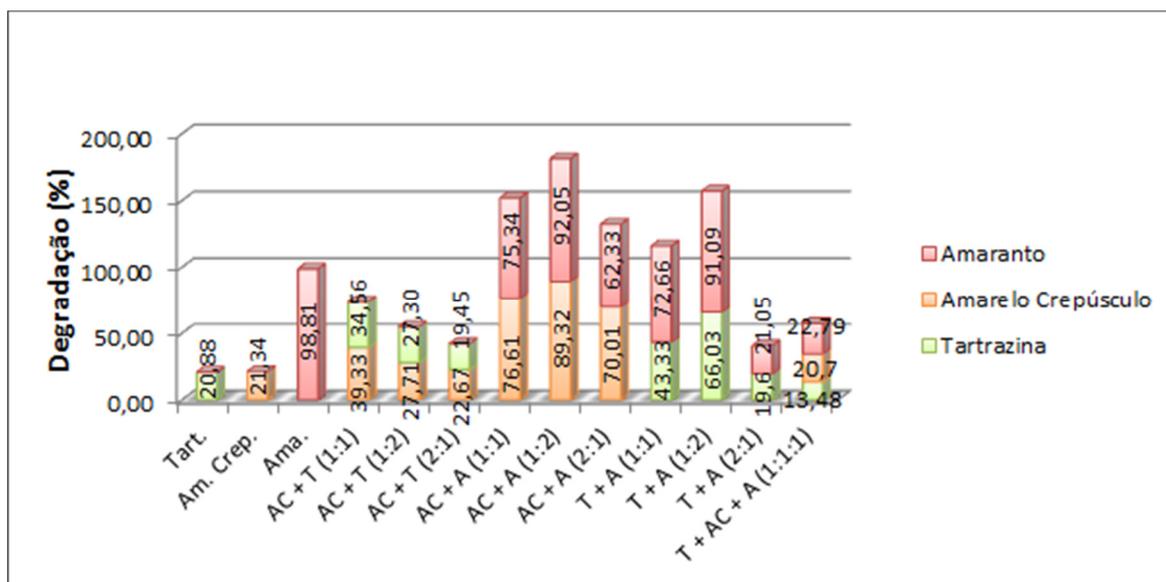


Figura 18. Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição de ácido cítrico expostos à luz solar (grupo B).

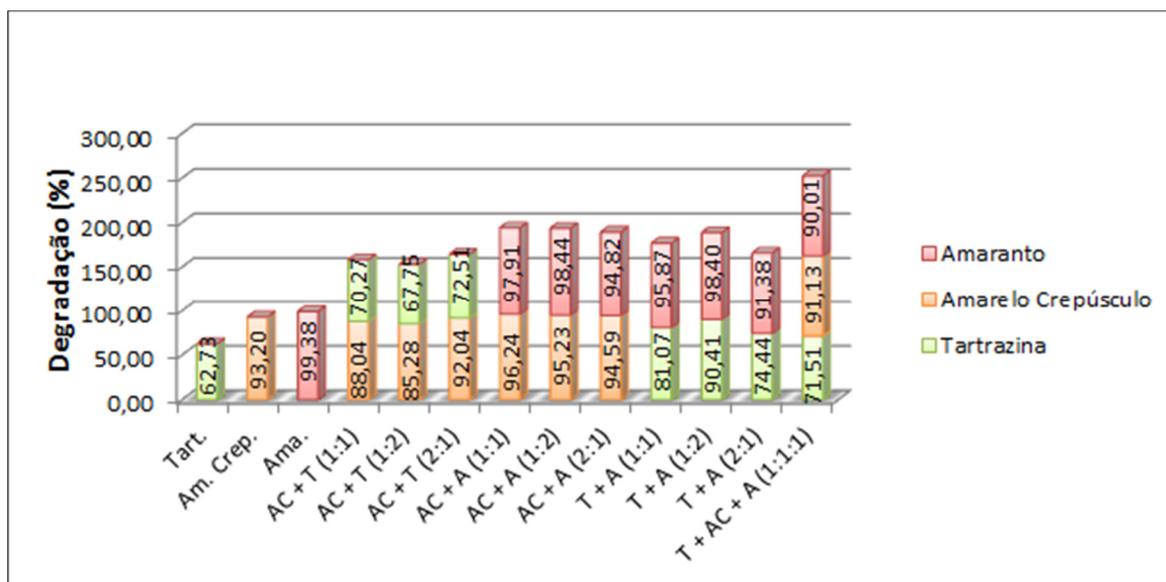


Figura 19. Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição de ácido ascórbico expostos à luz solar (grupo C).

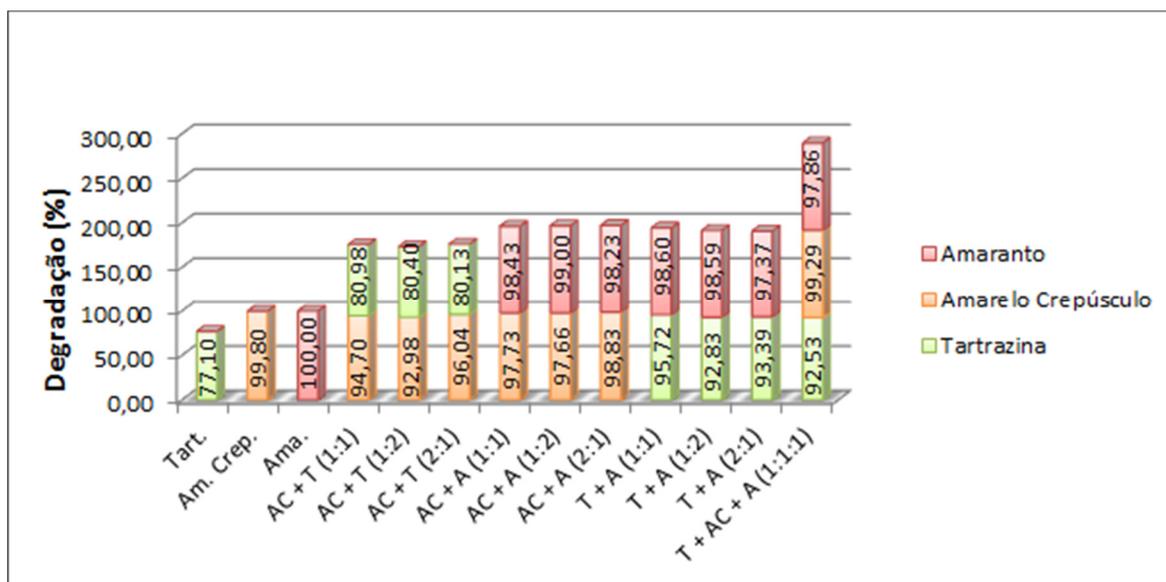


Figura 20. Degradação dos corantes em estudo em soluções modelo com adição dos ácidos cítrico e ascórbico expostos à luz solar (grupo D).

Diferente dos grupos A e B, os grupos C e D apresentaram, no final do experimento, total degradação de seus corantes na maioria das amostras, chegando até à taxas de degradação semelhantes entre amostras com proporções diferentes de dois corantes. Neste caso, a incidência

de radiação solar promoveu um aumento na velocidade de degradação dos corantes. Inclusive, nos grupos C e D, o tempo de 30 dias permitiu com que as soluções com ambos os ácidos e as soluções com apenas ácido ascórbico atingissem resultados de degradação semelhantes. Conforme resultados demonstrados em seu estudo sobre estabilidade dos corantes tartrazina e amarelo crepúsculo, Ostroski *et al.*(2005) observou um aumento significativo na degradação dos corantes quando expostos a luz solar, tendo servido como potencializador na degradação de corantes em meio ácido.

Um tempo de 30 dias na condição de luz solar mostrou-se muito longo para um efeito tão rápido que provocou na degradação dos corantes. Isto certamente não é bom, uma vez que, alimentos e bebidas que apresentem corantes azo em sua composição e são expostos à estas condições podem apresentar perda da qualidade em curto prazo, tendo seu tempo de vida de prateleira diminuída por tal ocasião.

5.3. Estudo comparativo da estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranto.

5.3.1. Influência de condições químicas na estabilidade de corantes azo

A decisão em se estudar a influência do ácido cítrico e ácido ascórbico na degradação dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranto, se deu por se tratarem de compostos químicos facilmente encontrados em bebidas com coloração artificial e comercializadas em garrafas PET. O ácido cítrico, encontrado geralmente em refrigerantes de laranja e uva e em sucos artificiais, tem a função de acidulante, regulando a doçura do açúcar, além de realçar o paladar e diminuir o pH da bebida, inibindo a proliferação de micro-organismos. Já o ácido ascórbico, como já comentado, tem a função de antioxidante, prevenindo a influência negativa do oxigênio na bebida. Compostos

do sabor, como por exemplo, aldeídos e ésteres são susceptíveis a oxidações pelo oxigênio do ar durante o armazenamento, inclusive, a luz solar e o calor são fatores que aceleram as oxidações (LIMA & AFONSO, 2009).

Sendo o alimento uma matriz complexa, é praticamente impossível que os compostos presentes na composição do mesmo permaneçam sem nenhuma alteração, ou melhor, sem terem sofrido qualquer tipo de efeito por fatores internos (químico) e/ou externos (físico).

Conseguiu-se observar por meio deste estudo, comparando-se experimentos do mesmo grupo (A, B, C e D), que o ácido ascórbico contribui de maneira favorável para o processo de degradação dos corantes em estudo. Diferenças entre a degradação de cada um também foi verificada analisando-se os resultados de degradação, tendo o amarantho apresentado menor estabilidade, seguido do amarelo crepúsculo e tartrazina, quando em contato com o ácido ascórbico.

Ao contrário do ácido ascórbico, a presença apenas de ácido cítrico nas soluções modelo não influenciou a estabilidade de nenhum dos corantes testados. Mesmo tendo contribuído para a degradação de alguns deles, este foi muito pouco, não conseguindo-se observar alteração na cor, nem mesmo visualmente.

Fato interessante foi a degradação verificada quando os dois ácidos, cítrico e ascórbico, encontravam-se misturados. Enquanto a estabilidade dos corantes foi verificada em soluções com apenas ácido cítrico, instabilidade foi observada em soluções com presença de ambos os ácidos. Já a instabilidade observada em amostras com presença apenas do ácido ascórbico foi aumentada quando os dois ácidos encontravam-se misturados. A partir disto pode-se concluir que o ácido cítrico na presença de ácido ascórbico atua como potencializador no processo de degradação dos corantes em estudo, principalmente do amarantho. Assim, das quatro condições químicas estudadas, esta foi a que apresentou maior instabilidade dos corantes frente às demais.

Para efeito de comparação entre as quatro condições químicas estudadas, ANOVA seguida do teste de Tukey foi realizada utilizando-se o programa Assistat – versão 7.6 beta (2011). O teste de Tukey consiste em avaliar a diferença entre as médias apresentadas pelas diferentes condições analisadas. Os resultados estão demonstrados por meio de letras, onde letras iguais significam condições sem diferença significativa a um determinado nível de confiança, e letras diferentes, condições que apresentam diferença significativa a um determinado nível de confiança.

Pelo resultado da análise de variância temos que, na maioria dos casos, cada condição interna (química) estudada influencia de modo diferente na estabilidade de um ou mais corantes presentes em uma determinada amostra. Ou seja, soluções pertencentes ao grupo D, quando expostas à todas as condições físicas geralmente apresentam degradação total de seus corantes maior que as soluções pertencentes ao grupo C, ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 6).

Tabela 6. Resultado do teste de Tukey para as condições internas estudadas.

GRUPOS	T	AC	A	AC + T (1:1)		AC + T (1:2)		AC + T(2:1)		AC + A (1:1)		AC + A (1:2)		AC + A (2:1)	
				AC	T	AC	T	AC	T	AC	A	AC	A	AC	A
Controle	0,19700 ^d	0,35500 ^d	1,70150 ^d	0,48200 ^c	0,05450 ^d	0,33550 ^c	0,43700 ^c	0,17150 ^d	0,07850 ^d	0,57450 ^d	0,36350 ^d	0,68400 ^d	0,68500 ^c	0,75450 ^d	0,09000 ^d
Ác. Cítrico	1,258590 ^c	1,27600 ^c	5,30650 ^c	1,31500 ^b	0,96500 ^c	0,46350 ^c	0,72150 ^c	0,63000 ^c	0,30650 ^c	2,09450 ^c	1,90350 ^c	1,75050 ^c	3,29900 ^b	2,56200 ^c	1,21600 ^c
Ác. Ascórbico	7,55050 ^b	10,25400 ^b	11,96050 ^b	5,95350 ^a	3,34970 ^b	3,34350 ^b	5,18900 ^b	7,13700 ^b	1,97450 ^b	6,01300 ^b	4,91850 ^b	4,10100 ^b	7,79250 ^a	7,65200 ^b	2,96300 ^b
Ác. Cítrico + Ascórbico	9,08900 ^a	13,60950 ^a	13,37700 ^a	6,33000 ^a	4,14000 ^a	4,31900 ^a	6,26050 ^a	9,53850 ^a	2,79550 ^a	6,74400 ^a	5,51350 ^a	4,48800 ^a	7,74550 ^a	9,87400 ^a	3,53350 ^a

Tabela 6. Continuação

GRUPOS	T + A (1:1)		T + A (1:2)		T + A (2:1)		T + AC + A (1:1:1)		
	T	A	T	A	T	A	T	AC	A
Controle	1,19050 ^c	1,29700 ^d	0,25700 ^d	1,00600 ^d	0,56400 ^c	0,39750 ^d	0,27200 ^c	0,39350 ^c	0,25400 ^d
Ác. Cítrico	1,28200 ^c	2,13050 ^c	1,19750 ^c	3,40100 ^c	0,36450 ^c	0,73500 ^c	0,31950 ^c	0,47250 ^c	0,50400 ^c
Ác. Ascórbico	3,90900 ^b	5,95150 ^b	2,70200 ^b	8,24500 ^b	4,93700 ^b	3,86450 ^b	1,98250 ^b	3,44550 ^b	3,31350 ^b
Ác. Cítrico + Ascórbico	4,74400 ^a	6,93900 ^a	2,95550 ^a	9,58250 ^a	6,73500 ^a	4,87250 ^a	2,82950 ^a	4,52350 ^a	3,58100 ^a

Observações: Tartrazina (T); Amarelo Crepúsculo (AC); Amaranto (A)

Concentração teórica total de corantes em cada solução: 1 corante apenas -> 25 (mg/L)

2 corantes: 1:1 -> 12,5 : 12,5 (mg/L)

1:2 -> 8,33 : 16,67 (mg/L)

2:1 -> 16,67 : 8,33 (mg/L)

3 corantes: 1:1:1 -> 8,33 : 8,33 : 8,33 (mg/L)

5.3.2. Influência de condições físicas na estabilidade de corantes azo

Degradação por condições físicas estão diretamente relacionadas à maneira com a qual tratamos alimentos e bebidas antes de serem consumidos. Cuidados devem ser tomados desde o momento em que corantes artificiais são adicionados a estes produtos, respeitando sempre informações descritas nos rótulos para manter a qualidade e segurança do produto.

As condições físicas aqui estudadas foram determinadas levando em consideração o circuito do alimento, desde sua saída do setor de produção da indústria até o momento em que são colocados à mesa e consumidos.

O transporte e o armazenamento de alimentos e bebidas coloridos artificialmente têm sido etapas alvos de grande preocupação, já que muitas vezes são facilmente expostos à luz solar e à altas temperaturas, dependendo das condições climáticas caracterizadas por cada região.

Além disso, a exposição direta do produto à luz artificial quando eles se encontram já acomodados em prateleiras de estabelecimentos é muito comum. O tempo de exposição, em alguns casos, pode até chegar à 24 horas por dia, dependendo do funcionamento do estabelecimento.

Neste estudo, foi possível diferenciar as condições físicas de maior e menor impacto na estabilidade de cada um dos corantes estudados.

Experimentos cujas bebidas foram expostas à radiação solar foram os que mais apresentaram descoloração das amostras e o contrário foi obtido quando os experimentos permaneceram em ambiente com ausência de luz e à baixa temperatura ($5 \pm 1^\circ\text{C}$). Estas duas condições foram caracterizadas como sendo os dois extremos do estudo de estabilidade por efeitos físicos naturais.

Um fator em comum observado por estudos de influência física e química foi a alta instabilidade demonstrada pelo corante amaranto frente aos demais corantes, tartrazina e amarelo crepúsculo.

A alta estabilidade dos corantes artificiais, tão comentada na literatura, se torna vulnerável às condições em que são submetidos. Além de provocarem aceleração no processo de degradação dos corantes, existe também a possibilidade de efeitos químicos e físicos naturais promoverem o contrário, o que de certa forma seria o mais favorável, já que uma degradação parcial de corantes artificiais (alteração na coloração) pode levar à formação de compostos que podem apresentar toxicidade maior que os compostos iniciais. Este problema tem sido especialmente encontrado em corantes da classe azo, por apresentarem grupos cromóforos formados pela ligação $-N=N-$ ligados à anéis aromáticos, e por pertencerem ao grupo de corantes reativos (KUNZ *et al.*, 2002).

Resultados de estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranto nas diferentes condições físicas estudadas demonstraram que na, maioria dos casos, a estabilidade destes corantes obedece a seguinte ordem: luz solar < ambiente escuro e temperatura à 55°C < luz artificial < ambiente escuro e temperatura à 25°C < ambiente escuro e temperatura à 5°C. O que nos faz perceber que a melhor forma de se conservar a coloração de alimentos e bebidas coloridas artificialmente é mantendo-as em ambiente refrigerado.

Pelo resultado da análise de variância tem se que, na maioria dos casos, cada condição física (externa) estudada influencia de modo diferente a estabilidade de um ou mais corantes presentes em uma determinada amostra. Ou seja, amostras pertencentes a qualquer um dos grupos, quando expostas à condição de luz solar apresentam instabilidade maior de seus corantes do que quando expostas à condição de baixa temperatura e ambiente escuro, ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 7).

Tabela 7. Resultado do teste de Tukey para as condições externas estudadas.

GRUPOS	T	AC	A	AC + T (1:1)		AC + T (1:2)		AC + T(2:1)		AC + A (1:1)		AC + A (1:2)		AC + A (2:1)	
				AC	T	AC	T	AC	T	AC	A	AC	A	AC	A
Escuro	2,40125 ^d	3,11438 ^d	3,75813 ^d	2,12688 ^c	0,76375 ^d	0,92000 ^d	1,78250 ^d	2,21313 ^d	0,33500 ^d	1,72313 ^d	0,78688 ^d	1,44625 ^d	2,53000 ^c	2,95313 ^d	0,66500 ^d
Estufa	2,92063 ^b	8,35813 ^b	8,21125 ^b	4,57500 ^b	2,61313 ^b	2,58688 ^b	3,96938 ^b	5,83563 ^b	1,48813 ^b	4,28313 ^b	3,35688 ^b	2,77250 ^b	5,05875 ^b	6,01625 ^b	1,86063 ^b
Geladeira	0,67438 ^c	0,72063 ^c	0,66375 ^c	0,25375 ^d	0,22375 ^c	0,18688 ^c	0,23750 ^c	0,67938 ^c	0,16750 ^d	0,31250 ^c	0,40500 ^c	0,15438 ^e	0,27875 ^d	0,45188 ^e	0,19000 ^e
Luz	3,14813 ^c	5,92563 ^c	7,43750 ^c	2,63000 ^c	1,31313 ^c	1,54375 ^c	2,57875 ^c	3,92188 ^c	0,94250 ^c	3,64375 ^c	2,53875 ^c	2,30625 ^c	4,27125 ^b	4,55813 ^c	1,31125 ^c
Luz Solar	10,47437 ^a	13,74938 ^a	20,36125 ^a	8,01500 ^a	5,90688 ^a	5,33938 ^a	7,19188 ^a	9,19625 ^a	3,51063 ^a	9,32000 ^a	8,78625 ^a	7,10000 ^a	12,13875 ^a	12,07375 ^a	5,72625 ^a

Tabela 7. Continuação

GRUPOS	T + A (1:1)		T + A (1:2)		T + A (2:1)		T + AC + A (1:1:1)		
	T	A	T	A	T	A	T	AC	A
Escuro	0,82938 ^d	1,88625 ^d	0,35563 ^d	2,42375 ^d	1,60438 ^d	1,57375 ^d	0,27875 ^d	0,88750 ^d	0,97688 ^d
Estufa	2,78500 ^b	4,45063 ^b	1,45063 ^b	5,62438 ^b	3,62125 ^b	2,72875 ^b	1,59000 ^b	3,07125 ^b	2,37750 ^b
Geladeira	0,11000 ^e	0,35813 ^c	0,10063 ^e	0,97313 ^c	0,40063 ^e	0,34875 ^c	0,32438 ^d	0,51375 ^d	0,11938 ^e
Luz	1,75063 ^c	3,37438 ^c	1,19375 ^c	4,97188 ^c	2,31688 ^c	2,24563 ^c	0,63625 ^c	1,31125 ^c	1,44625 ^c
Luz Solar	8,43188 ^a	10,32813 ^a	5,78938 ^a	13,80000 ^a	7,80750 ^a	5,44000 ^a	3,92500 ^a	5,26000 ^a	4,64563 ^a

Observações: Tartrazina (T); Amarelo Crepúsculo (AC); Amaranto (A)

Concentração teórica total de corantes em cada solução: 1 corante apenas -> 25 (mg/L)

2 corantes: 1:1 -> 12,5 : 12,5 (mg/L)

1:2 -> 8,33 : 16,67 (mg/L)

2:1 -> 16,67 : 8,33 (mg/L)

3 corantes: 1:1:1 -> 8,33 : 8,33 : 8,33 (mg/L)

5.3.3. Interação: condição física X condição química

A idéia em se manter um estudo o mais próximo da realidade é de extrema importância e desta forma verificou-se a necessidade de estudar a estabilidade dos corantes pela interação entre as condições químicas (internas) e físicas (externas) de estudo.

Esta interação pode ser observada quando amostras do mesmo grupo são expostas à diferentes condições físicas ou vice-versa.

O exemplo ilustrado na figura abaixo mostra que a presença de ácido ascórbico nas amostras apresentou diferentes respostas de degradação quando condicionadas a diferentes condições físicas, como também pode ser observado em amostras com presença dos ácidos cítrico e ascórbico misturados (Figura 21).

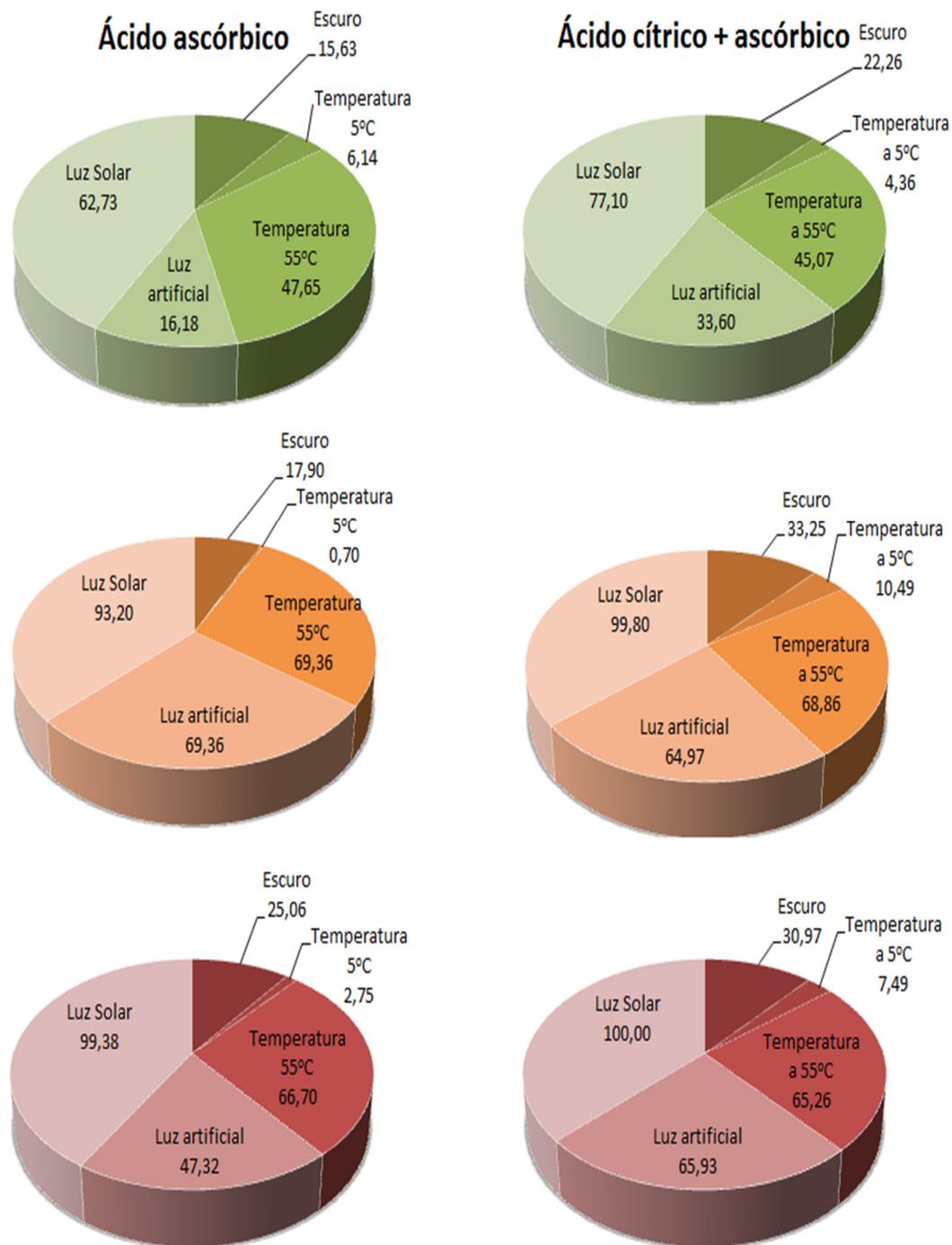


Figura 21. Comparação entre os resultados de degradação, em porcentagem, dos corantes tartrazina (gráfico verde), amarelo crepúsculo (gráfico laranja) e amarantho (gráfico vermelho), em soluções modelo com adição de ácido ascórbico e solução modelo com adição dos ácidos cítrico e ascórbico, nas condições físicas (externas) estudadas.

O contrário pode ser verificado quando submetemos amostras de composição diferente à uma determinada condição física (Figura 22). A influência de condições químicas (internas) nas amostras podem promover ou não diferença nas respostas de degradação para cada grupo.

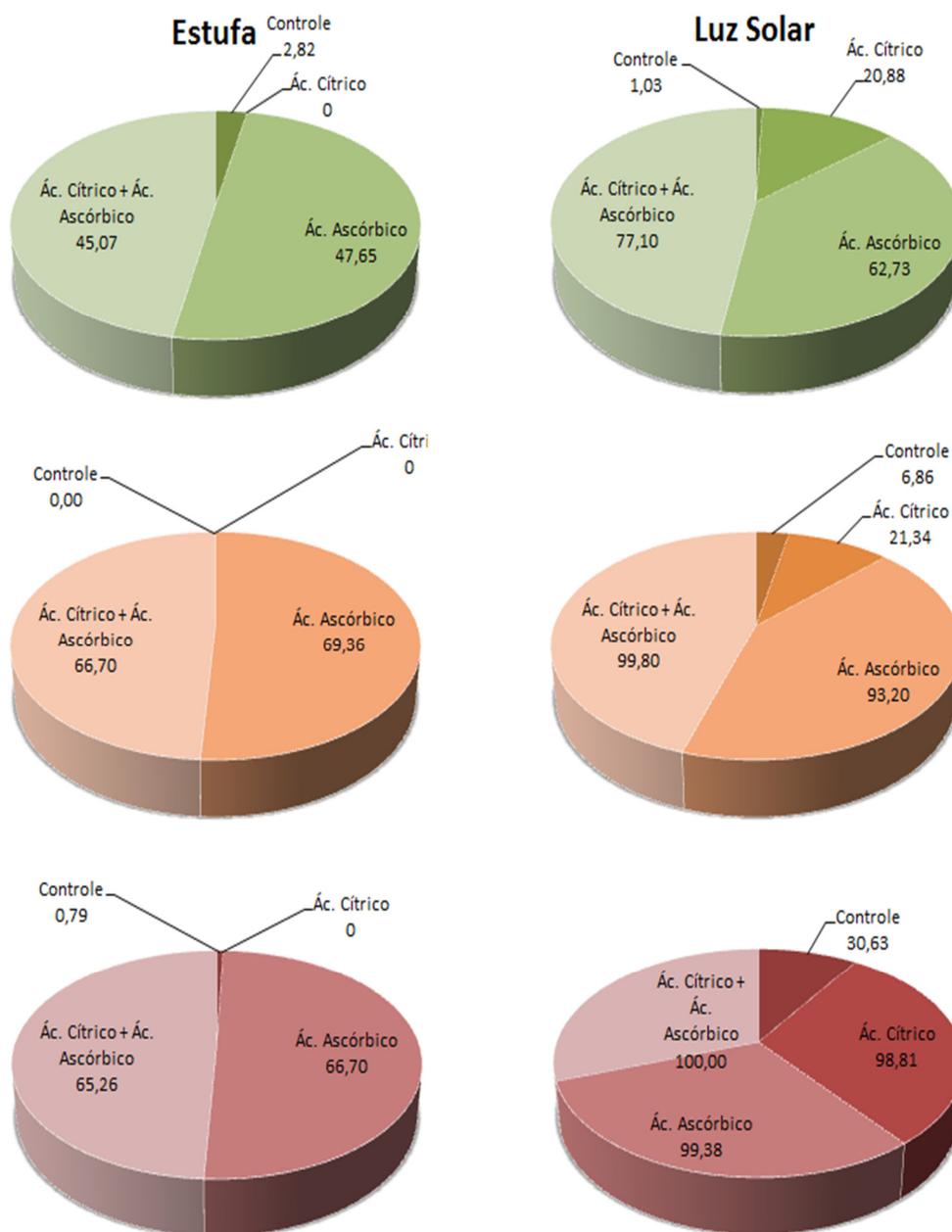


Figura 22. Comparação entre os resultados de degradação, em porcentagem, dos corantes tartrazina (gráfico verde), amarelo crepúsculo (gráfico laranja) e amaranth (gráfico vermelho), em

soluções modelo acondicionadas em ambiente escuro e alta temperatura e soluções modelo expostas à luz solar, nas condições químicas (internas) estudadas.

5.3.4. Efeito da interação de corantes azo na estabilidade

Com a finalidade de se estudar o efeito da interação dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranto na estabilidade dos mesmos, foram preparadas amostras com misturas binárias em diferentes proporções de corante, 1:1; 1:2 e 2:1, e amostras com misturas ternárias.

Avaliou-se este efeito por meio de comparações entre a porcentagem de retenção do corante presente sozinho em solução (ordem 0) e do corante presente em mistura com outro(s) corante(s) (ordem 1 a 7). Estabeleceu-se como critério de avaliação para a ocorrência de interação, retenção maior ou menor que 5% do valor apresentado no final do experimento pelo corante de ordem 0.

Valores em porcentagem de retenção dos corantes nas amostras estão apresentadas nas tabelas a seguir, para cada efeito físico estudado.

Tabela 8. Efeito de ambiente escuro à $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e conservantes (ácido ascórbico e ácido cítrico) na estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranço em misturas (% retenção). Valor abaixo de 5% do corante de ordem zero (-); valor acima de 5% do corante de ordem zero.

Tartrazina																																
Dia	Controle							Ácido cítrico							Ácido ascórbico							Ácido cítrico + ácido ascórbico										
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	93	94	86	95	92	89	96	100	92	92	89	92	92	94	89	97
30	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	88	92	83	95	92	76	93	100	84	87	82	87	87	92	80	92
45	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	84	89	80	95 ⁺	90 ⁺	78 ⁻	90 ⁺	100 ⁺	78	85 ⁺	76	87 ⁺	84 ⁺	91 ⁺	72	88 ⁺
Amarelo Crepúsculo																																
Dia	Controle							Ácido cítrico							Ácido ascórbico							Ácido cítrico + ácido ascórbico										
	AC ₀	AC ₁	AC ₂	AC ₃	AC ₄	AC ₅	AC ₆	AC ₇	AC ₀	AC ₁	AC ₂	AC ₃	AC ₄	AC ₅	AC ₆	AC ₇	AC ₀	AC ₁	AC ₂	AC ₃	AC ₄	AC ₅	AC ₆	AC ₇	AC ₀	AC ₁	AC ₂	AC ₃	AC ₄	AC ₅	AC ₆	AC ₇
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	91	84	95	91	85	80	90	95	86	91	90	85	88	84	80	92
30	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	87	81	91	88	81	76	84	91	75	83	84	76	79	73	67	81
45	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	82	76	87	84	76	73	78	87	67	77 ⁺	78 ⁺	68	74 ⁺	65	55	72
Amaranto																																
Dia	Controle							Ácido cítrico							Ácido ascórbico							Ácido cítrico + ácido ascórbico										
	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	86	98	83	94	86	94	88	93	86	93	86	93	81	84	79	92
30	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	94	78	93	76	87	82	84	76	87	75	87	71	73	65	85
45	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	91 ⁺	74	92 ⁺	78	85 ⁺	77	75	69	84 ⁺	66	81 ⁺	65	66	55	78 ⁺

T₀ = Tartrazina
 T₁ = AC + T (1:1)
 T₂ = AC + T (1:2)
 T₃ = AC + T (2:1)

T₄ = T + A (1:1)
 T₅ = T + A (1:2)
 T₆ = T + A (2:1)
 T₇ = T + AC + A (1:1:1)

AC₀ = Amarelo Crepúsculo
 AC₁ = AC + T (1:1)
 AC₂ = AC + T (1:2)
 AC₃ = AC + T (2:1)

AC₄ = AC + A (1:1)
 AC₅ = AC + A (1:2)
 AC₆ = AC + A (2:1)
 AC₇ = T + AC + A (1:1:1)

A₀ = Amaranço
 A₁ = AC + A (1:1)
 A₂ = AC + A (1:2)
 A₃ = AC + A (2:1)

A₄ = T + A (1:1)
 A₅ = T + A (1:2)
 A₆ = T + A (2:1)
 A₇ = T + AC + A (1:1:1)

Tabela 9. Efeito de ambiente escuro e baixa temperatura ($5^{\circ}\text{C} \pm 1$) e conservantes (ácido ascórbico e ácido cítrico) na estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amarantho em misturas (% retenção). Valor abaixo de 5% do corante de ordem zero (-); valor acima de 5% do corante de ordem zero.

Tartrazina

Dia	Controle								Ácido cítrico								Ácido ascórbico								Ácido cítrico + ácido ascórbico							
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	98	100	98	100	100	96	97	100	98	99	97	99	99	100	100
30	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	99	100	99	100	100	96	98	100	97	100	100	94	93	99	97	98	96	99	99	100	99
45	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	98	100	99	100	100	94	98	100 ⁺	99	100 ⁺	100 ⁺	93	88 ⁻	96	95	95	94	97	96	97	98

Amarelo Crepúsculo

Dia	Controle								Ácido cítrico								Ácido ascórbico								Ácido cítrico + ácido ascórbico							
	AC ₀	AC ₁	AC ₂	AC ₃	AC ₄	AC ₅	AC ₆	AC ₇	AC ₀	AC ₁	AC ₂	AC ₃	AC ₄	AC ₅	AC ₆	AC ₇	AC ₀	AC ₁	AC ₂	AC ₃	AC ₄	AC ₅	AC ₆	AC ₇	AC ₀	AC ₁	AC ₂	AC ₃	AC ₄	AC ₅	AC ₆	AC ₇
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98	100	100	100	100	96	99	99	99	97	100	99	99	98
30	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98	100	100	100	100	91	95	96	98	92	100	98	96	96
45	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	100	98	99	100	100	99	84 ⁻	90	92	94	86	100 ⁺	93	91	95

Amaranto

Dia	Controle								Ácido cítrico								Ácido ascórbico								Ácido cítrico + ácido ascórbico							
	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	96	100	99	100	98	95	100	99	100	99	98	99	98	100	99
30	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	100	100	100	100	100	94	100	97	98	94	93	100	90	97	97	98	98	94	99	97
45	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98	100	100	100	100	97	93	100	99	96	90 ⁻	91 ⁻	100	93	94	93	96	93	88	95	95

Tabela 10. Efeito de ambiente escuro e alta temperatura (55 ± 4) e conservantes (ácido ascórbico e ácido cítrico) na estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranço em misturas (% retenção). Valor abaixo de 5% do corante de ordem zero (-); valor acima de 5% do corante de ordem zero.

Tartrazina

Dia	Controle								Ácido cítrico								Ácido ascórbico								Ácido cítrico + ácido ascórbico							
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15	98	99	98	100	96	100	98	99	100	100	100	100	100	100	100	100	62	64	42	71	66	69	66	73	60	61	57	65	63	68	65	64
30	98	99	99	99	96	100	96	97	100	100	100	100	100	100	100	100	54	57	34	60	58	64	57	71	55	55	52	57	58	61	60	57
45	97	99	99	100	95	100	94	95	100	100	100	100	100	100	100	100	52	56	33 ⁻	62 ⁺	58 ⁺	66 ⁺	57	64 ⁺	55	55	52	60	59	66 ⁺	61 ⁺	60

Amarelo Crepúsculo

Dia	Controle								Ácido cítrico								Ácido ascórbico								Ácido cítrico + ácido ascórbico							
	AC ₀	AC ₁	AC ₂	AC ₃	AC ₄	AC ₅	AC ₆	AC ₇	AC ₀	AC ₁	AC ₂	AC ₃	AC ₄	AC ₅	AC ₆	AC ₇	AC ₀	AC ₁	AC ₂	AC ₃	AC ₄	AC ₅	AC ₆	AC ₇	AC ₀	AC ₁	AC ₂	AC ₃	AC ₄	AC ₅	AC ₆	AC ₇
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15	99	99	98	98	99	100	98	99	100	100	100	100	100	100	100	100	41	44	53	58	40	44	37	41	38	41	54	42	36	36	33	42
30	99	100	99	99	99	100	99	98	100	100	100	100	100	100	100	100	33	37	44	52	33	36	30	36	32	35	48	37	31	31	28	38
45	100	100	100	99	100	100	99	96	100	100	100	100	100	100	100	100	31	35	41 ⁺	50 ⁺	31	35	29	34	31	33	47 ⁺	35	30	31	27	36

Amaranto

Dia	Controle								Ácido cítrico								Ácido ascórbico								Ácido cítrico + ácido ascórbico							
	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	44	51	46	63	42	46	49	54	42	58	52	72	41	41	48	54
30	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	35	42	37	51	32	34	35	48	37	51	45	63	34	34	40	46
45	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33	39 ⁺	34	48 ⁺	31	32	33	40 ⁺	35	50 ⁺	43 ⁺	61 ⁺	34	34	41 ⁺	46 ⁺

Analisando-se as tabelas apresentadas, é possível notar que a interação entre corantes azo é totalmente influenciada pela forma com que as soluções são acondicionadas, bem como pela composição das mesmas.

Não foi observado efeito na estabilidade dos corantes pela interação dos mesmos em soluções controle sob nenhuma condição física, exceto sob condição de luz solar. O mesmo ocorreu para soluções contendo ácido cítrico.

Soluções contendo ácido ascórbico e ácido cítrico combinado com ácido ascórbico atuaram de forma diferente, sendo possível observar o efeito da interação dos corantes na mistura sobre a estabilidade dos mesmos. Essa diferença entre grupos foi observado para todas as condições físicas estudadas. Observa-se também que em todas as condições físicas, a velocidade de degradação dos corantes é maior nas soluções do grupo D, exceto na condição de temperatura alta, na qual os grupos mantiveram uma semelhança na taxa de degradação, reforçando a idéia de que altas temperatura inibem o ácido cítrico de atuar na degradação dos corantes.

Através dos resultados apresentados pela mistura de amarelo crepúsculo e tartrazina não foi possível estabelecer uma idéia conclusiva do efeito que um causa sobre a estabilidade do outro. Sob condição de luz solar, observou-se nos grupos controle e ácido cítrico degradação da tartrazina e do amarelo crepúsculo ao mesmo tempo. Já nos grupos ácido ascórbico e ácido cítrico com ácido ascórbico, observou-se apenas degradação da tartrazina e, em algumas proporções de mistura destes corantes, maior retenção do amarelo crepúsculo em solução. Sob as demais condições físicas estudadas, não houve degradação do corante tartrazina, tendo até, em alguns casos, maior retenção em solução, e o mesmo foi observado para o amarelo crepúsculo. Assim, evidências indicam que a mistura dos corantes tartrazina e amarelo crepúsculo, na maioria dos casos, pode melhorar ou manter a estabilidade de ambos nas quatro soluções testadas.

A mistura do amarelo crepúsculo com amaranto em presença de ácido ascórbico e ácido cítrico com ácido ascórbico, na maioria dos casos, permitiu maior retenção do corante amaranto

frente ao valor retido pelo mesmo corante quando presente sozinho em solução. Estes resultados demonstram a influência do amarelo crepúsculo na inibição da degradação do amaranço, deixando-o mais estável principalmente nestas duas condições. O amarelo crepúsculo, nas condições de luz e escuro à 25°C, apresentou maior instabilidade em mistura com amaranço e ácido ascórbico. O mesmo também foi observado no grupo controle e ácido cítrico sob condição de luz solar. Condições de escuro à 5°C e luz solar não apresentaram praticamente nenhuma influência na estabilidade destes corantes em soluções com mistura e soluções sem mistura.

Através da análise dos resultados da mistura de tartrazina com amaranço não foi possível concluir se este inibe ou estimula a degradação do primeiro. Em condição de luz solar observou-se que em todos os grupos houve maior degradação da tartrazina quando em mistura com o amaranço e que, em apenas algumas proporções de mistura destes corantes, ocorreu aumento da estabilidade do amaranço em presença da tartrazina. Na condição de luz artificial, observou-se também maior estabilidade do amaranço nas misturas. No entanto, nas demais condições físicas, observou-se maior retenção da tartrazina em mistura com o amaranço e em apenas algumas proporções de mistura, na condição de escuro à 25°C, houve degradação do corante tartrazina. Desta forma, a única conclusão possível à partir destes resultados é que o amaranço, em mistura com o corante tartrazina, não chega a sofrer degradação, permanecendo estável nestas condições.

Assim como todas as outras misturas analisadas, diferenças nos resultados entre condições físicas também foram observadas para soluções com mistura dos três corantes em estudo. Neste caso, notou-se semelhança entre o efeito da interação destes corantes na estabilidade de sua coloração para as condições de luz artificial e luz solar. Tanto no grupo ácido ascórbico quanto no grupo ácido cítrico com ácido ascórbico observou-se maior retenção dos três corantes na solução. Nas demais condições físicas notou-se retenção de um ou dois corantes, principalmente tartrazina e amaranço, e degradação foi observada apenas em solução com ácido ascórbico em condição de escuro à 5°C para os corantes tartrazina e amarelo crepúsculo, e no grupo controle sob condição de

luz solar. De modo geral, a mistura dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranço favoreceu a estabilidade destes corantes em soluções com presença de conservantes.

5.4. Estudo da estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranço em bebidas comercializáveis

Esta etapa do estudo teve por finalidade investigar a estabilidade de corantes azo, especificamente tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranço, em amostras de bebidas não-alcoólicas. Para isso, cinco amostras de mesmo lote foram adquiridas e colocadas sob cada condição física estudada. Uma das amostras destinava-se à avaliação inicial para garantia dos resultados dos corantes ao longo do estudo e as demais foram expostas às condições e recolhidas, uma por vez, a cada semana para leitura no espectrofotômetro.

Por se tratarem de amostras adquiridas em estabelecimentos comerciais e não diretamente da indústria, existe alta possibilidade de não apresentarem mesmas concentrações de corantes na composição de produtos de mesma marca, pois já foram transportadas e mantidas em condições desconhecidas até o momento do experimento. Assim, as conclusões formadas a partir dos resultados obtidos neste estudo não se fez de forma tão detalhada como no estudo da estabilidade dos corantes em soluções modelo.

A condução deste estudo foi realizado sob mesmas condições de teste apresentadas pelo experimentos com soluções modelo. O único experimento realizado ao mesmo tempo para todas as amostras de refrigerante e suco artificial foi o teste sob luz solar, que ocorreu no período de 19 de fevereiro à 19 de março de 2011, justamente para manter sob mesmas condições. Além disso, a falta de espaço muitas vezes impossibilitou a condução dos experimentos com todas as amostras ao mesmo tempo e outra razão para tal fato foi a dificuldade, em alguns momentos, para encontrar, nos estabelecimentos comerciais, marcas analisadas neste estudo. Por isso, diferenças entre as

concentrações iniciais dos corantes nas amostras são possíveis de serem notadas observando tabela por tabela.

Logo à seguir estão apresentadas as tabelas referentes ao estudo de estabilidade dos corantes presentes em amostras de refrigerantes e sucos artificiais sob influência das condições físicas estudadas.

Tabela 13. Estudo da estabilidade de corantes presentes em refrigerantes e sucos artificiais quando em ambiente escuro e temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

DEGRADAÇÃO – ESCURO à 25°C					
Refrigerante	Corante	Concentração Inicial (mg/100 mL)	Concentração Final (mg/100 mL)	Degradação (mg/100 mL)	Degradação (%)
Sabor Laranja					
Marca A	AC	4,57	4,31	- 0,26	5,69
Marca B	AC	2,98	2,94	- 0,04	1,34
	A	0,84	0,80	- 0,04	4,76
Marca C	AC	4,90	4,78	- 0,12	2,45
Marca D	AC	4,57	4,47	- 0,10	2,19
Refrigerante					
Sabor Uva					
Marca A	A	6,06	5,75	- 0,31	5,12
Marca B	A	4,08	4,09	-	-
Marca C	T	1,11	1,16	-	-
	A	4,51	4,46	- 0,05	1,11
Marca D	A	6,54	6,46	- 0,08	1,22
Suco					
Marca A	T	10,26	10,38	-	-
	AC	2,09	2,12	-	-
Marca B	T	4,55	4,36	- 0,19	4,18
	AC	2,16	2,03	- 0,13	6,02
Marca C	A	4,09	4,12	-	-

Tabela 14. Estudo da estabilidade de corantes presentes em refrigerantes e sucos artificiais quando em ambiente escuro e baixa temperatura (5 ± 1 °C).

DEGRADAÇÃO – ESCURO à 5°C					
Refrigerante	Corante	Concentração	Concentração Final	Degradação	Degradação
Sabor Laranja		Inicial (mg/100 mL)	(mg/100 mL)	(mg/100 mL)	(%)
Marca A	AC	4,57	4,46	- 0,11	2,41
Marca B	AC	2,98	2,98	-	-
	A	0,84	0,84	-	-
Marca C	AC	4,90	4,88	- 0,02	0,41
Marca D	AC	4,57	4,45	- 0,12	2,62
Refrigerante					
Sabor Uva					
Marca A	A	6,06	5,96	- 0,10	1,65
Marca B	A	4,08	4,12	-	-
Marca C	T	1,11	1,12	-	-
	A	4,51	4,50	- 0,01	0,22
Marca D	A	6,54	6,55	-	-
Suco					
Marca A	T	10,26	10,59	-	-
	AC	2,09	2,21	-	-
Marca B	T	4,55	4,49	- 0,06	1,32
	AC	2,16	2,11	- 0,05	2,31
Marca C	A	4,09	4,14	-	-

Tabela 15. Estudo da estabilidade de corantes presentes em refrigerantes e sucos artificiais quando em ambiente escuro e alta temperatura (55 ± 4 °C).

DEGRADAÇÃO – ESCURO à 55°C					
Refrigerante	Corante	Concentração Inicial (mg/100 mL)	Concentração Final (mg/100 mL)	Degradação (mg/100 mL)	Degradação (%)
Sabor Laranja					
Marca A	AC	4,41	4,27	- 0,14	3,17
Marca B	AC	3,03	2,92	- 0,11	3,63
	A	0,98	0,76	- 0,22	22,45
Marca C	AC	4,75	4,23	- 0,52	10,95
Marca D	AC	4,76	4,66	- 0,10	2,10
Refrigerante					
Sabor Uva					
Marca A	A	5,61	4,76	- 0,85	15,15
Marca B	A	4,26	4,31	-	-
Marca C	T	0,77	1,00	-	-
	A	3,90	3,81	- 0,09	2,31
Marca D	A	6,19	5,99	- 0,20	3,23
Suco					
Marca A	T	9,84	9,72	- 0,12	1,22
	AC	1,96	1,88	- 0,08	4,08
Marca B	T	3,70	3,33	- 0,37	10,0
	AC	2,01	1,73	- 0,28	13,93
Marca C	A	4,05	3,60	- 0,45	11,11

Tabela 16. Estudo da estabilidade de corantes presentes em refrigerantes e sucos artificiais quando em ambiente com incidência de luz fosforescente e temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

DEGRADAÇÃO – LUZ ARTIFICIAL					
Refrigerante Sabor Laranja	Corante	Concentração Inicial (mg/100 mL)	Concentração Final (mg/100 mL)	Degradação (mg/100 mL)	Degradação (%)
Marca A	AC	4,35	4,23	- 0,12	2,76
Marca B	AC	3,13	2,97	- 0,16	5,11
	A	1,02	0,90	- 0,12	11,76
Marca C	AC	5,10	4,58	- 0,52	10,20
Marca D	AC	4,76	4,67	- 0,09	1,89
Refrigerante Sabor Uva					
Marca A	A	5,34	5,07	- 0,27	5,06
Marca B	A	3,87	3,86	- 0,01	0,26
Marca C	T	0,76	0,76	-	-
	A	3,88	3,78	- 0,10	2,58
Marca D	A	6,19	6,12	- 0,07	1,13
Suco					
Marca A	T	9,93	9,66	- 0,27	2,72
	AC	2,00	1,94	- 0,06	3,00
Marca B	T	4,50	4,27	- 0,23	5,11
	AC	2,08	2,00	- 0,08	3,85
Marca C	A	4,05	3,86	- 0,19	4,69

Tabela 17. Estudo da estabilidade de corantes presentes em refrigerantes e sucos artificiais quando sob condições climáticas.

DEGRADAÇÃO – LUZ SOLAR					
Refrigerante	Corante	Concentração	Concentração Final	Degradação	Degradação
Sabor Laranja		Inicial (mg/100 mL)	(mg/100 mL)	(mg/100 mL)	(%)
Marca A	AC	4,17	3,69	- 0,48	11,51
Marca B	AC	2,98	2,62	- 0,36	12,08
	A	0,89	0,77	- 0,12	13,48
Marca C	AC	4,57	3,96	- 0,61	13,35
Marca D	AC	3,87	3,52	- 0,35	9,04
Refrigerante					
Sabor Uva					
Marca A	A	4,96	1,24	- 3,72	75,00
Marca B	A	4,28	3,48	- 0,80	18,69
Marca C	T	1,61	1,34	- 0,27	16,77
	A	4,02	2,04	- 1,98	49,25
Marca D	A	5,98	4,97	- 1,01	16,89
Suco					
Marca A	T	10,74	8,22	- 2,52	23,46
	AC	2,07	1,69	- 0,38	18,36
Marca B	T	4,03	3,59	- 0,44	10,92
	AC	1,77	1,31	- 0,46	25,99
Marca C	A	3,31	2,38	- 0,93	28,10

Assim como observado nos experimentos com soluções modelo, a condição que mais afetou a estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranço foi a exposição à luz solar, seguida da condição de escuro à 55°C. Já a condição de escuro à 5°C permitiu maior estabilidade dos corantes nas amostras tanto de refrigerante quanto de suco artificial.

Valores finais de concentração maiores que valores iniciais apresentados em alguns casos nas tabelas podem ser reflexo das diferenças entre amostras de mesmo lote, mencionado no início, tendo cada amostra seu próprio histórico até o momento de análise para este estudo. Tal ocorrência pode também ser consequência de mudanças na coloração de algumas amostras no final dos experimentos, como por exemplo, a marca C de refrigerante sabor uva que apresentou, no final dos estudos nas condições de luz solar e escuro à 55°C, coloração esverdeada, melhor observada quando a amostra foi colocada contra a luz. Esta mudança de cor, provavelmente ocasionada pela degradação da tartrazina e formação de alguma outra substância que absorve em 425 nm, pode ter permitido uma maior absorção de luz neste comprimento de onda, resultando em interferência e aumento da concentração final do corante tartrazina.

Quanto a degradação de corantes iguais em bebidas de marca diferente, esperava-se que a mesma quantidade fosse degradada, visto que estavam expostos às mesmas condições físicas. Tal fato não ocorreu para todas as amostras de mesmo sabor e esta diferença pode ser devido ao efeito matriz, tendo ela influenciado na estabilidade dos corantes das bebidas analisadas. Sabe-se que refrigerantes de uva e laranja necessitam ter obrigatoriamente 10% do suco natural da fruta em sua composição, desta forma, é provável que com a presença de carotenóides e sua fácil degradação à luz e temperatura, no caso de refrigerantes de laranja, tenham contribuído para a rápida descoloração da bebida, explicando valores discrepantes de degradação entre bebidas de mesmo sabor, porém de marcas diferentes.

Além dos resultados obtidos através de leituras espectrofotométricas, como forma de demonstrar numericamente a influência de algumas condições físicas na estabilidade de corantes artificiais azo nas condições testadas, mudanças na coloração de amostras puderam ser facilmente visualizadas, principalmente quando foram expostas à luz solar. Imagens encontram-se disponibilizadas no item Anexos (4 e 5).

O estudo da estabilidade de corantes artificiais é de extrema importância, uma vez que, o tempo de vida de prateleira de bebidas e alimentos baseia-se por resultados demonstrados à partir deste estudo. Visto que a estabilidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e amarantho torna-se prejudicada sob influência de fatores físicos de luz e aquecimento, principalmente, maior atenção deve ser dada à estes efeitos ao se determinar o tempo de vida de prateleira de produtos que contenham estes corantes, garantindo a qualidade do produto frente ao consumidor.

A qualidade de produtos alimentícios não é só verificada pela estabilidade dos corantes presentes em sua composição, como também é pela quantificação destes compostos, devendo atender às restrições determinadas pela legislação em relação às quantidades permitidas de uso (PRADO & GODOY, 2002).

Comparando-se os valores iniciais de concentração das quatro marcas de refrigerante de uva e laranja, e as três marcas de suco artificial, com a tabela acima, nota-se inadequação de duas marcas de refrigerante de uva, A e D, e uma marca de suco artificial, A. Encontraram-se valores acima do limite máximo aceitável para amarantho em refrigerantes de uva e tartrazina, em suco artificial, estando as demais marcas de acordo com a legislação.

6. CONCLUSÃO

Resultados apresentados neste trabalho concluem que a forma de transporte e armazenamento, bem como a composição de alimentos e bebidas, são fatores influenciáveis na estabilidade de corantes artificiais. As alterações observadas ocorreram por consequência de efeitos físicos e químicos, simultaneamente, e foram analisadas por espectrofotometria UV-visível.

A exposição à luz solar resultou em maior degradação dos corantes, portanto, menor estabilidade frente às demais condições físicas estudadas. Além da alta temperatura, a radiação solar influenciou de forma considerável, diminuindo a estabilidade dos corantes artificiais tartrazina, amarelo crepúsculo e amaranço. Maior instabilidade ainda foi vista quando na presença dos conservantes ácido ascórbico e ácido cítrico, sendo maior que a presença apenas de ácido ascórbico, como já descrito na literatura.

Diferentemente, a conservação de alimentos e bebidas coloridas artificialmente em ambientes refrigerados mantém a estabilidade dos corantes, mesmo na presença dos ácidos ascórbico e cítrico. Em produtos com mistura de corantes, verificou-se aumento na estabilidade do amaranço na presença de tartrazina e/ou amarelo crepúsculo e, que estes dois corantes quando misturados podem ajudar na manutenção da coloração de cada um em solução e até melhor sua estabilidade no produto.

Tendo em vista que a estabilidade de compostos presentes em alimentos e bebidas está relacionada ao seu tempo de vida de prateleira, é importante que estes sejam armazenados e transportados de forma adequada. Havendo descuido neste sentido, o tempo de vida de prateleira conseqüentemente diminui, prejudicando a qualidade do produto frente ao consumidor. Além disso, a descoloração de produtos alimentícios com a formação de produtos de degradação incolores é assunto de grande preocupação para a saúde.

Deste modo, é importante estudar não somente os teores de corantes artificiais presentes em alimentos, como também os produtos de degradação que podem ser formados em alguma etapa da cadeia do alimento, visto que, dependendo da forma que são estocados, podem apresentar perda de coloração, característica da degradação destes compostos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIA - Associação Brasileira da Indústria de Alimentos - **Compêndio da Legislação de Alimentos: Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos**. 8 rev. São Paulo: ABIA, v. 1A, 2001.
- ADAMS, J. B. **Food additive-additive interactions involving sulphur dioxide and ascorbic and nitrous acids: a review**. *Food Chemistry*, v. 59, n. 3, p. 401 – 409, 1997.
- ALTINÖZ, S. ; TOPTAN, S. **Determination of Tartrazine and Ponceau-4R in Various Food Samples by Vierordt's Method and Ratio Spectra First-Order Derivative UV Spectrophotometry**. *J. Food Composition and Analysis*, v. 15, p. 667 – 683, 2002.
- ALTINÖZ, S. ; TOPTAN, S. **Simultaneous determination of Indigotin and Ponceau-4R in food samples by using Vierordt's method, ratio spectra first order derivative UV spectrophotometry**. *J. Food Composition and Analysis*, v. 16, p. 517 – 530, 2003.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Referência bibliográfica de documentos eletrônicos, <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: Janeiro/2012.
- BECERRO, F. ; DOMENQUEZ GONZALES, D. H. ; MANDES, J. **Determination of sunset yellow and tartrazine by differential pulse polarography**. *Talanta*, v. 37, p. 655 – 658, 1990.
- BERZAS NEVADO, J.J. ; GUIBERTEAU CABANILLAS, C. ; SALCEDO, C. **Simultaneous spectrophotometric determination of three food dyes by using the first derivative of ratio spectra**. *Talanta*, v. 42, p. 2043 – 2051, 1995.
- BERZAS NEVADO, J.J. ; GUIBERTEAU CABANILLAS, C. ; SALCEDO, C. **Separation and determination of dyes by ion-pair chromatography**. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, v. 20, p. 3073 – 3088, 1997.

- BERZAS NEVADO, J.J.; RODRÍGUES FLORES, J.; VILLASEÑOR LLERENA, M.J.;
RODRÍGUEZ FARIÑAS, N. **Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of Tartrazine, Patent Blue V and Indigo Carmine in commercial products.** *Analytica Chimica Acta*, v. 391, p. 353 – 364, 1999(a).
- BERZAS NEVADO, J.J. ; RODRÍGUEZ FLORES, J. ; VILLASEÑOR LLERENA, M.J. ;
RODRÍGUEZ FARIÑAS, N. **Simultaneous spectrophotometric determination of tartrazine, patent blue V and indigo carmine in commercial products by partial least squares and principal component regression methods.** *Talanta*, v. 48, p. 895 – 903, 1999(b).
- BHASKAR, M. ; GNANAMANI, A. ; GANESHJEEVAN, R. J. ; CHANDRASEKAR, R. ;
SADULLA, S. ; RADHAKRISHNAN, G. **Analyses of carcinogenic aromatic amines released from harmful azo colorants by *Streptomyces* SP. SS07.** *J. Chromatography A* , v. 1018, p. 117 – 123, 2003.
- CAPITÁN, F. ; CAPITÁN-VALLEY, L.F. ; FERNÁNDEZ, M.D. ; ORBE, I. ; AVIDAD, R.
Determination of colorant matters mixtures in foods by solid-phase spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 331, p. 141 – 148, 1996.
- CENTRO DE PREVISÃO E ESTUDOS CLIMÁTICOS DO INSTITUTO NACIONAL DE
PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). Acesso em: www.cptec.inpe.br.
- CHEN, T. ; ZHENG, Y. ; LIN, J-M ; CHEN, G. **Study on the Photocatalytic Degradation of Methyl Orange in Water Using Ag/ZnO as Catalyst by Liquid Chromatography Electro spray Ionization Ion-Trap Mass Spectrometry.** *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, v. 19, 997–1003, 2008.
- CLYDESDALE, F.M. **Color as a factor in food choice.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 33, n. 1, 83 – 101, 1993.

- DINÇ, E. **A comparative study of the ratio spectra derivative spectrophotometry, Vierordt's method and high-performance liquid chromatography applied to the simultaneous analysis of caffeine and paracetamol in tablets.** *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 21, p. 723 – 730, 1999.
- DOWNHAM, A.; COLLINS, P. **Colouring our Food in The Last and Next Millennium.** *International Journal of Food Science and Technology*, v. 35, p. 5 – 22, 2000.
- DRAKE, J.J.P. **Food Colours - Harmless Aesthetics or Epicurean Luxuries?** *Toxicology*, v. 5, p. 3 – 42, 1975.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United States. <http://www.fao.org>. Acesso em: Julho/2011.
- FOGG, A.G. ; SUMMAN, A.M. **Differential-pulse polarographic monitoring of permitted synthetic food colouring matters and ascorbic acid in accelerated light degradation studies and the spectrophotometric determination of ammonia and simpler amines formed.** *Analyst*, v. 108, p. 691 – 700, 1983a.
- FOGG, A.G. ; SUMMAN, A.M. **Further differential-pulse polarographic and visible spectrophotometric studies of the degradation of permitted synthetic food colouring matters with and without the addition of ascorbic acid: degradation in the dark and in the light without the stabilizing action of EDTA.** *Analyst*, v. 108, p. 1339 – 1344, 1983b.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL, nº 9, 2009. Disponível em: www.revista-fi.org.br. Acesso em: Abril de 2012.
- GOTTLIEB, A. ; SHAW, C. ; SMITH, A. ; WHEATLEY, A. ; FORSYTHE, S. **The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation.** *Journal of Biotechnology*, v.101, n. 1, p. 49 – 56, 2003.

- GOSETTI, F. ; GIANOTTI, V. ; POLATI, S. ; GENNARO, M.C.. **HPLC-MS degradation study of E110 Sunset Yellow FCF in a commercial beverage**, Journal of Chromatography A, v. 1090, p.107 – 115, 2005.
- GOSETTI, F. ; GIANOTTI, V. ; MAZZUCCO, E. ; POLATI, S. ; GENNARO, M.C. **Sunlight induced degradation of E133 in a commercial beverage**. Dyes and Pigments, v. 74, p. 424 – 432, 2007.
- GOSETTI, F ; FRASCAROLO, P. ; MAZZUCCO, E. ; GIANOTTI, V. ; BOTTARO, M. ; GENNARO, M.C. **Photodegradation of E110 and E122 dyes in a commercial aperitif – A high performance liquid chromatography-diode array-tandem mass spectrometry study**. Journal of Chromatography A, v. 1202, p. 58 – 63, 2008.
- HARADA, K. ; MASUDA, K. ; SUZUKI, M. ; OKA, H. **Separation and identification of food dyes by thin-layer chromatography/liquid secondary ion/mass spectrometry**. Biol. Mass Spectrosc., v. 20, p. 522 – 528, 1991.
- HARRIS, D. C. (1948). **Análise química quantitativa/Daniel C. Harris – 7ª edição**. Trad. Sob a direção de Jairo Bordinhão *et al.* Rio de Janeiro : LCT, 2008. 868 p.
- KAPADIA, J.G.; TOKUDA, H.; TAKAYASU, J.; PING, B.; ENJO, F.; TAKASAKI, M.; KONOSHIMA, T.; NISHINO, H. **Cancer chemopreventive activity of synthetic colorants used in foods, pharmaceuticals and cosmetic preparations**. Cancer-Letters, v. 129, n. 1, p. 87 – 95, 1998.
- KAPOR M. A. ; YAMANAKA, H. ; CARNEIRO, P. A. ; ZANONI, M.V.B. **Eletroanálise de corantes artificiais: determinação de índigo carmim e tartrazina**. Eclét. Quím., v. 26, 2001.
- KAYODÉ, A.P.P. ; BARA, C.A. ; DALODÉ-VIEIRA, G. ; LINNEMANN, A.R. ; NOUT, M.J.R. **Extraction of antioxidant pigments from dye sorghum leaf sheaths**. LWT – Food Science and Technology, v. 46, p. 49 – 55, 2012.

- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G.D; DURÁN, N. **Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis.** Química Nova, v. 25, n 1, p. 78 – 82, 2002.
- LEDERER, J. **Alimentação e Câncer.** Ed. Manole Dois – São Paulo, 1990.
- LIMA, A.C.S ; AFONSO, J.C. **A química do refrigerante.** Química Nova na Escola, v. 31, n. 3, p. 210 – 215, 2009.
- LLHAMAS, N.E. ; GARRIDO, M. ; DI NEZIO, M.S. ; BAND, B.S.F. **Second order advantage in the determination of amaranth, sunset yellow FCF and tartrazine by UV-vis and multivariate curve resolution-alternating least squares.** Analytica Chimica Acta, v. 655, p. 38 – 42, 2009.
- MAROVATSANGA, L. ; MACRAE, R. **The determination od added azo dye in soft drinks via its reduction products.** Food Chemistry, v. 24, p. 83 – 98, 1987.
- MARMITT, S. ; PIROTTA, L.V. ; STÜLP, S. **Aplicação de fotólise direta e UV/H₂O₂ a efluente sintético contendo diferentes corantes alimentícios.** Química Nova, v. 33, n. 2, p. 384 – 388, 2010.
- MASLOWSKA, J. **A new chromatographic method for the separation on thin magnesium oxide layers.** J. Chromatogr., v. 20, p. 99 – 101, 1985.
- McWEENY, D. J. **Reactions of some food additives during storage.** Food Chemistry, v. 9, p. 89 – 101, 1982.
- MURTY, M. R. V. S. ; CHARY, N. S. ; PRABHAKAR, S. ; RAJU, N. P. ; VAIRAMANI, M. **Simultaneous quantitative determination of Sudan dyes using liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry.** Food Chemistry, v. 115, p. 1556 – 1562, 2009.
- NI, Y. ; GONG, X. **Simultaneous spectrophotometric determination of mixtures of food colorants.** Analytica Chimica Acta, v.354, p.163-171, 1997.

- OSTROSKI, I. ; BARICCATTI, R. A. ; LINDINO, C. A. **Estabilidade dos corantes Tartrazina e Amarelo Crepúsculo.** Acta Sci. Technol., v. 27, n. 2, p. 101 – 106, 2005.
- OZDEMIR, Y.; AKKAN, A. A. **Determination of Patent Blue Vand Carmoisine in Gelatine Desserts by Derivative Spectrophotometric.** Turkish Journal of Chemistry, v. 23, p. 221-229, 1999.
- PÉREZ-URQUIZA, M.; BELTRÁN, J. L. **Determination of Dyes in Foodstuffs by Capillary Zone Electrophoresis.** Journal Chromatography A, v. 898, p. 271 – 275, 2000.
- PINHEIRO, H.M. ; TOURAUD, E. ; THOMAS, O. **Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters.** Dyes and Pigments, v. 61, p. 121 – 139, 2004.
- PRADO, M. A. ; GODOY, H. T. **Validation of the Methodology to Determine Synthetic Dyes in Foods and Beverages by HPLC.** Journal of Liquid Chromotography & Related Technologies, v. 25, n. 16, p. 2455 – 2472, 2002.
- PRADO, M. A. ; GODOY, H. T. **Corantes artificiais em alimentos.** Alimentos e Nutrição – Brazilian Journal of Food and Nutrition, v.14, n.2, p. 237 – 250, 2003.
- PRADO, M. A. ; GODOY, H. T. **Determinação de corantes artificiais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em pó para gelatina.** Quim. Nova, v. 27, n. 1, p. 22 – 26, 2004.
- PRADO, M. A. ; GODOY, H. T. **Teores de corantes artificiais em alimentos determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.** Quim. Nova, v. 30, n. 2, p. 268 – 273, 2007.
- PRADO, M. A. ; VILAS BOAS, L. F. ; BRONZE, M. R. ; GODOY, H. T. **Validation of methodology for simultaneous determination of synthetic dyes in alcoholic beverages by capillary electrophoresis.** Journal of Chromatography A, v. 1136, p. 231– 236, 2006.
- PREVOT, A.B. ; FABBRI, D. ; PRAMAURO, E. ; BAIOCCHI, C. ; MEDANA, C. **High-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet diode array detection and**

- electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of intermediates produced in the initial steps of the photocatalytic degradation of sulphonated azo dyes.** *J. Chromatography A*, v. 1202, p. 145 – 154, 2008.
- QUEIJA, C.; QUEIRÓS, M. A.; RODRIGUES, L. M. **A cor dos Alimentos.** *Química – Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, v. 80, p. 6 – 11, 2001.
- RAUF, M.A.; ASHRAF, S. S. **Radiation induced degradation of dyes—An overview.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 166, p. 6–16, 2009.
- REYES, F. G. R.; VALIM, M. F. C. F. A.; VERCESI, A. E. **Effect of Organism Synthetic Food Colours on Mitochondrial Respiration.** *Food Additives and Contaminants*, v. 13, n° 1, p. 5 – 11, 1996.
- REYES, F. G. R.; PRADO, M. A. **JECFA - Aditivos e Contaminantes Alimentares.** *Notícias ILSI Brasil*, ano 9, n° 1, setembro 2001.
- REHOREK, A. ; TAUBER, M. ; GEUBITZ, G. **Application of power ultrasound for azo dye degradation.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 11, p. 177–182, 2004.
- ROJAS, F. S. ; OJEDA, C. B. **Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004 – 2008 – A Review.** *Analytica Chimica Acta*, v. 635, p. 22 – 44, 2009.
- SANTOS, M.E. ; NAGATA, N. **Determinação espectrofotométrica simultânea de corante amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo via regressão por componentes principais.** *UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.*, v. 11, n. 1, p. 51 – 60, 2005.
- SANTOS, M.E. ; DEMIATE, I.M. ; NAGATA, N. **Determinação simultânea de amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo em alimentos via espectrofotometria UV-VIS e métodos de calibração multivariada.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 4, p. 903 – 909, 2010.

Silva, L. A. **Estudo do Processo Biotecnológico de Produção, Extração e Recuperação do Pigmento Ficocianina da *Spirulina platensis***. MSc Dissertation. UFPR, Curitiba, Paraná, Brasil, 2008.

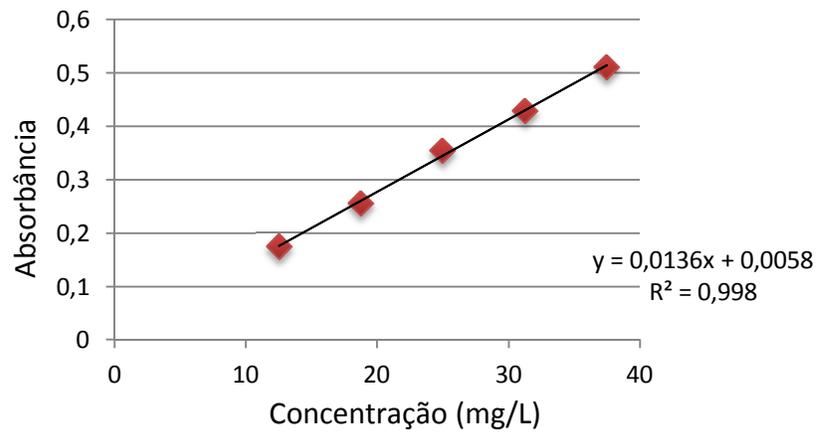
SUZUKI, S. ; SHIRAO, M. ; NAKAZAVA, H. ; SASA, K. ; SASAQAWA, H. **Determination of synthetic food dyes by capillary electrophoresis**. J. Chromatography A, v. 680, p. 541 – 547, 1994.

THAKUR, B.R. ; ARYA, S.S. **Stability of sunset yellow FCF and tartrazine in liquid model food systems**. Die Nahrung, v. 37, n. 1, p. 15 – 19, 1993.

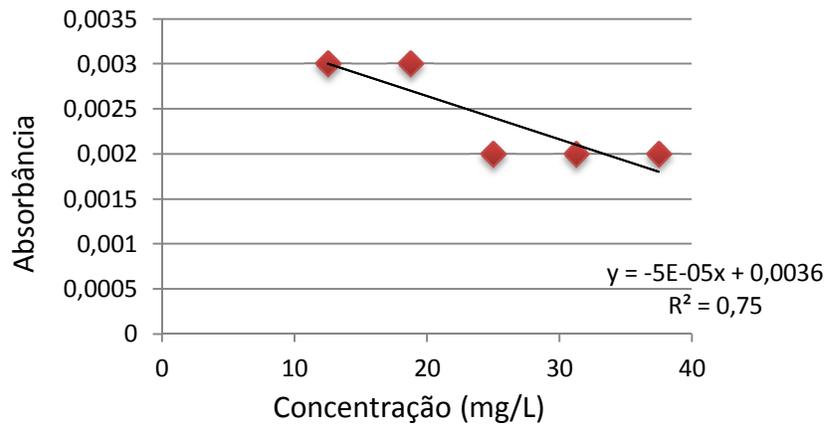
VIDOTTI, E.C. ; ROLLEMBERG, M.C.E. **Espectrofotometria derivativa: uma estratégia simples para a determinação simultânea de corantes em alimentos**. Química Nova, v. 29, n. 2, p. 230 – 233, 2006.

ANEXOS

Tartrazina - 480 nm

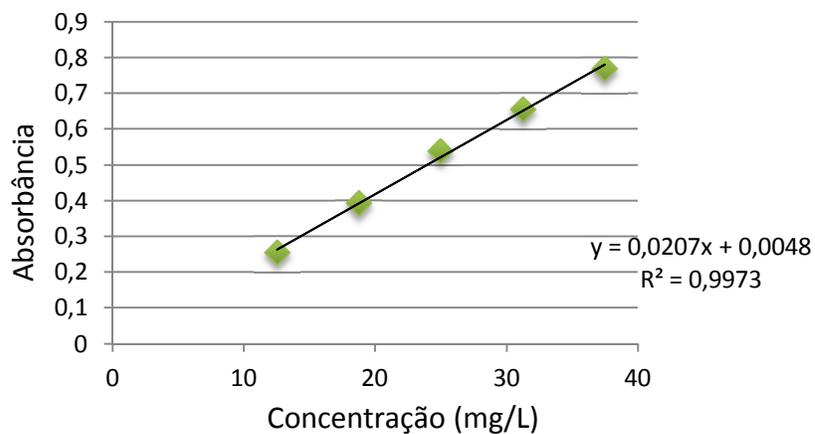


Tartrazina - 525 nm

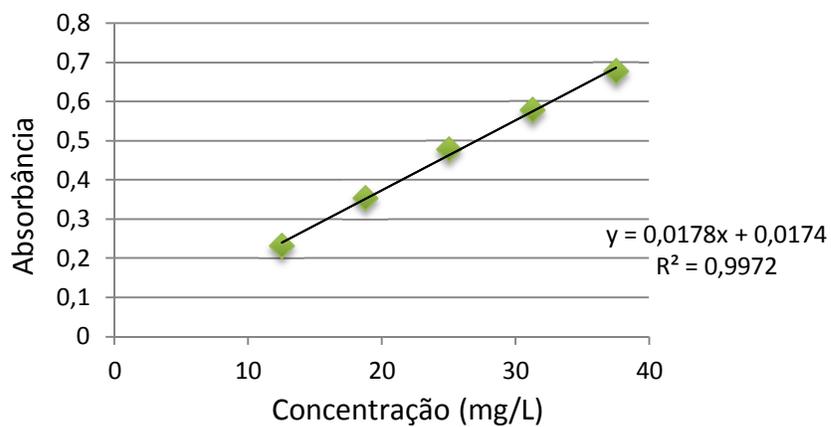


Anexo 1. Curvas de calibração do corante Tartrazina à 480 nm e à 525 nm.

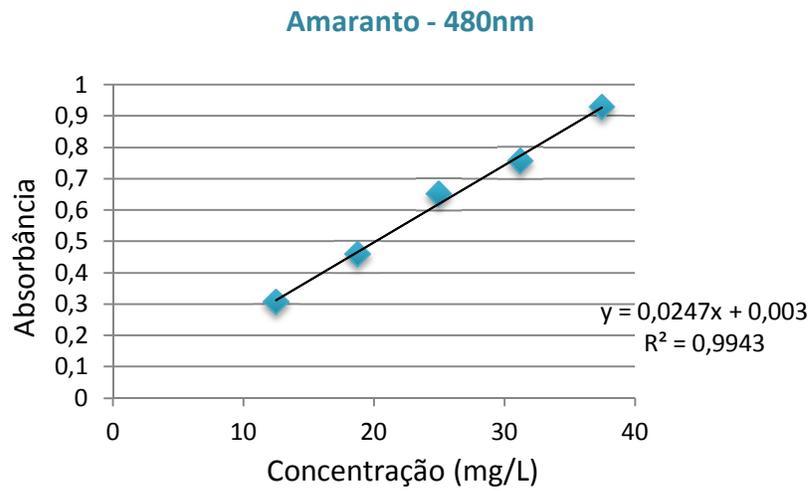
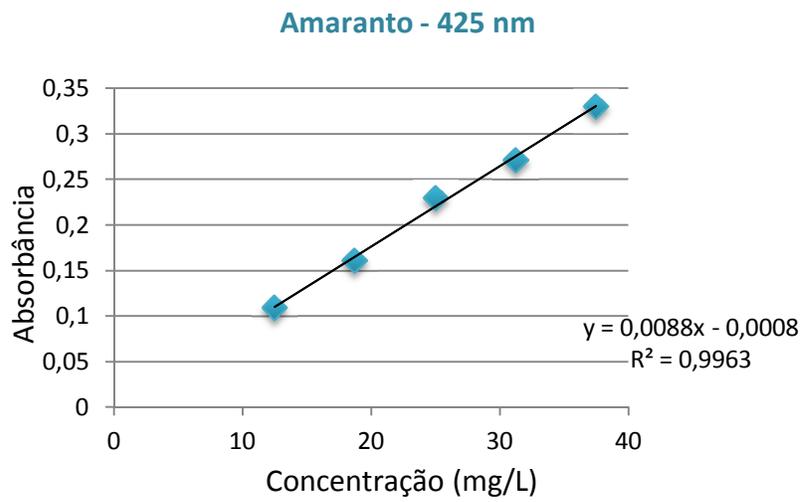
Amarelo Crepúsculo - 425nm



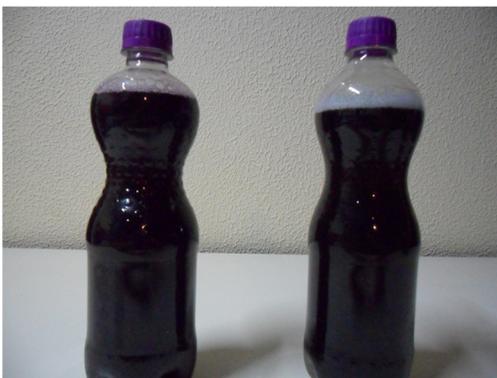
Amarelo Crepúsculo - 525 nm



Anexo 2. Curvas de calibração do corante amarelo crepúsculo à 425 nm e à 525 nm.



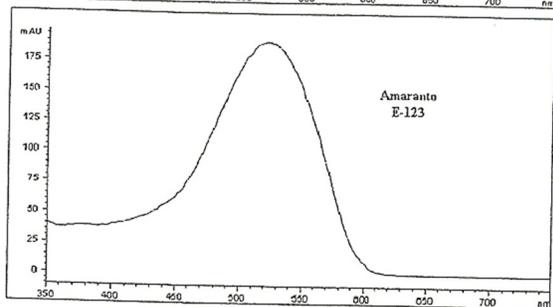
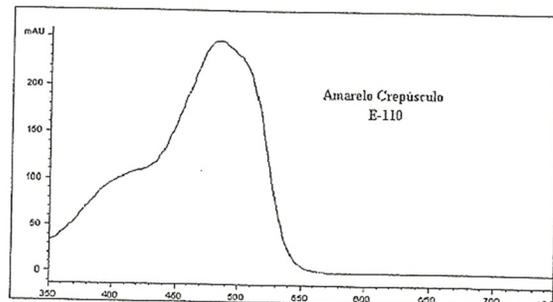
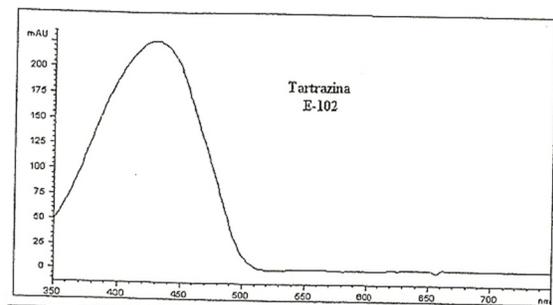
Anexo 3. Curvas de calibração do corante amaranço à 425 nm e à 480 nm.



Anexo 4. Resultado da exposição de amostras de refrigerante de uva e laranja por 30 dias ao sol.



Anexo 5. Resultado da exposição de amostras de sucos artificiais por 30 dias ao sol.



Anexo 6. Espectros de absorção dos padrões de corantes artificiais.