

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO E COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS
ANALÍTICAS, CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA
EFICIÊNCIA E ELETROFORESE CAPILAR, NA
DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Marcelo Alexandre Prado**, aprovada pela Comissão Julgadora em 09 de junho de 2003.

Campinas, 09 de junho de 2003.

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Presidente da Banca

Marcelo Alexandre Prado
Mestre em Ciência de Alimentos

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Orientadora

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para obtenção
do Título de Doutor em Ciência de Alimentos**

**Campinas - SP
2003**

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

200326307

UNIDADE	BE
Nº CHAMADA	UNICAMP
	P882d
V	EX
TOMBO DCI	54996
PREC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/08/03
Nº CPD	

CM00187124-0

BIB W 295978

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

P882d Prado, Marcelo Alexandre
Desenvolvimento e comparação de técnicas analíticas, cromatografia a líquido de alta eficiência e eletroforese capilar, na determinação de corantes artificiais / Marcelo Alexandre Prado. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Helena Teixeira Godoy
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Corantes. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência.
3. Eletroforese capilar. 4. Bebidas. 5. Alimentos – Análise.
I. Godoy, Helena Teixeira. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
FEA-UNICAMP - Campinas
Presidente



Dra. Shirley M. P. Abrantes
INCQS-FIOCRUZ – Rio de Janeiro
Membro



Profa. Dra. Célia M. Silos
FCF-UNESP - Araraquara
Membro



Profa. Dra. Délia Rodriguez-Amaya
FEA-UNICAMP - Campinas
Membro



Profa. Dra. Heloisa M. Cecchi
FEA-UNICAMP - Campinas
Membro

Profa. Dra. Hilary C. Menezes
FEA-UNICAMP - Campinas
Membro

Profa. Dra. Marina F. M. Tavares
IQ-USP – São Paulo
Membro

Você é assim
um sonho pra mim
e quando eu não te vejo
eu penso em você
desde o amanhecer
até quando eu me deito
eu gosto de você
e gosto de ficar com você
meu riso é tão feliz contigo
o meu melhor amigo é o meu AMOR
e a gente cantar
e a gente dançar
e a gente não se cansa
de ser criança
da gente brincar
na nossa velha infância
seus olhos, meu clarão
me guia dentro da escuridão
seus pés me abrem o caminho
eu sigo e nunca me sinto me sinto só
você é assim
um sonho pra mim
você é assim...

(Tribalistas)

À Simone, minha esposa, por tudo de bom
e especial que trouxe à minha vida.

O Signore, fa di me uno strumento della tua Pace
Dove è odio, fa ch'io porti l'Amore
Dove è offesa, ch'io porti il Perdono
Dove è discordia, ch'io porti l'Unione
Dove è dubbio, ch'io porti la Fede
Dove è errone, ch'io porti la Verità
Dove è disperazione, ch'io porti la Speranza
Dove è tristezza, ch'io porti la Gioia
Dove sono le tenebre, ch'io porti la LUCE
O Maestro, fa ch'io non cerchi tanto:
Essere consolato, quanto consolare
Essere compreso, quanto comprendere
Essere amato, quanto amare
Poiché
Si è: Dando, che si riceve
Perdonando che si è perdonati
Morendo, che si resuscita a Vita Eterna.

San Francesco d'Assisi

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao CNPq pela bolsa sanduíche concedida, para a realização do estágio no Laboratório do ITQB da Universidade Nova de Lisboa, em Oeiras - Portugal.

À banca examinadora desta tese, pelas opiniões e correções, que em muito valorizaram este trabalho.

Agradeço em especial à Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy, que mais que uma orientadora, sempre foi e será uma amiga incondicional.

Agradeço ao Prof. Dr. Luis Filipe Vilas Boas e à Profa. Dra. Maria do Rosário Bronze, pela oportunidade e orientação que me ofereceram em Portugal.

Aos meus amigos portugueses, Mário, Antero, Clara, Jérico, enfim a todos que tornaram minha estada em Portugal o mais agradável e produtiva possível.

Ao pessoal do Laboratório de Análise de Alimentos – DCA, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.

Ao pessoal da secretaria do DCA, Marcão, Marquinhos, Jardete e Carlinha pela ajuda em muitos momentos e pelas horas de descontração e alegria.

À secretaria de pós-graduação da FEA.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial à Marcos Vasconcelhos, pela ajuda, apoio incondicional e principalmente por incentivar e acreditar em meu potencial e trabalho.

Agradeço a todos de minha família, por tudo...

A todos, que de certa forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

Resumo Geral	xv
Summary	xvii
Introdução Geral	1
Objetivos	2
 Capítulo 1. Corantes Artificiais em Alimentos	5
Resumo.....	7
Abstract.....	8
Introdução.....	9
Corantes Artificiais.....	11
Histórico.....	11
Importância da Cor.....	13
Riscos à Saúde.....	14
Legislações.....	18
Legislação Brasileira.....	19
Corantes Azo.....	20
Amaranto.....	20
Ponceau 4R.....	22
Vermelho 40.....	22
Azorrubina.....	23
Tartrazina.....	23
Amarelo Crepúsculo.....	24
Corantes Trifenilmetanos.....	25
Azul Patente V.....	25
Verde Rápido.....	25
Azul Brilhante.....	26
Corantes Indigóides.....	26
Azul de Indigotina.....	26
Corantes Xantenos.....	27
Eritrosina.....	27

Métodos de Análise para Corantes Artificiais.....	28
Métodos Clássicos.....	28
Métodos por Espectrometria.....	30
Métodos por CLAE.....	31
Métodos por Eletroforese Capilar.....	33
Referências Bibliográficas.....	35
 Capítulo 2. Desenvolvimento de Metodologia para Determinação, por CLAE, de Corantes Artificiais em Bebidas Alcoólicas.....	 49
Resumo.....	51
Abstract.....	52
1. Introdução.....	53
1.1. Exatidão.....	54
1.2. Precisão.....	54
1.3. Sensibilidade.....	54
2. Experimental.....	55
2.1. Material e equipamentos.....	55
2.1.1. Amostras.....	55
2.1.2. Padrões.....	55
2.1.3. Reagentes.....	56
2.1.4. Equipamentos.....	56
3. Método.....	56
4. Validação do Método.....	57
5. Resultados e discussão.....	58
6. Conclusões.....	63
7. Agradecimentos.....	65
8. Referências Bibliográficas.....	65
 Capítulo 3. Validação e Aplicação de Metodologia para Determinação Simultânea, por Eletroforese Capilar, de Corantes Artificiais em Bebidas Alcoólicas.....	 69
Resumo.....	71

Abstract.....	72
1. Introdução.....	73
2. Experimental.....	75
2.1. Materiais e Equipamentos.....	75
2.1.1. Amostras.....	75
2.1.2. Padrões.....	75
2.1.3. Preparação do tampão.....	75
2.2 Equipamento.....	76
3. Métodos.....	76
3.1. Metodologia Analítica.....	76
4. Validação do método.....	77
5. Resultados e discussão.....	78
6. Conclusões.....	83
7. Agradecimentos.....	85
8. ReferênciasBibliográficas.....	85

Capítulo 4. Otimização da Metodologia para Determinação de Corantes Artificiais em Bebidas Alcoólicas por Eletroforese Capilar Através da Análise de Superfície de Resposta.....	89
Resumo.....	91
Abstract.....	92
1. Introdução.....	92
2. Experimental.....	94
2.1. Materiais e Equipamentos.....	94
3. Método.....	95
3.1. Planejamento experimental e análise de superfície de resposta.....	95
4. Resultados e Discussão.....	96
5. Conclusão.....	106
6. Referências Bibliográficas.....	106

Capítulo 5. Comparação da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e da Eletroforese Capilar na Determinação de Corantes Artificiais em Bebidas Alcoólicas.....	107
Resumo.....	109
Abstract.....	110
1. Introdução.....	111
2. Materiais e Equipamentos.....	113
2.1. Amostras.....	113
2.2. Padrões.....	113
2.3. Preparação de amostras e padrões.....	113
2.1 Equipamentos.....	114
2.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	114
2.2. Metodologia Analítica.....	114
2.2.1. Eletroforese Capilar.....	115
2.2.2. Metodologia Analítica.....	115
2.2.3. Preparação da solução tampão.....	115
3. Resultados e discussão.....	116
4. Conclusões.....	120
5. Agradecimentos.....	122
6. Referências Bibliográficas.....	122
Conclusões Gerais.....	125
Anexos.....	127
Anexo 1.....	129
Anexo 2.....	130

RESUMO GERAL

O uso de corantes artificiais pelas indústrias de alimentos em todo o mundo é bastante difundido, isto porque os corantes permitem suplementar ou repor a coloração perdida durante o processamento e ou estocagem, e assim garantir a aceitabilidade do produto frente ao consumidor, sendo utilizados ainda como um importante instrumento para garantir a uniformidade dos produtos em linhas de produção de larga escala. Do ponto de vista da saúde pública, existem diferentes opiniões quanto à inocuidade dos diversos corantes artificiais utilizados em alimentos. Muitos estudos mostram que esses aditivos podem causar uma série de males à saúde da população quando consumidos de forma incorreta, seja por abusos da indústria ou exagero no consumo. O fato é que, técnicas analíticas para a determinação desses corantes devem ser desenvolvidas, e principalmente validadas, para garantir a segurança alimentar dos produtos que ingerimos. No presente trabalho foram desenvolvidos e validados dois métodos para a determinação de corantes artificiais em bebidas alcoólicas, utilizando duas diferentes técnicas, a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar (EC). Os métodos foram desenvolvidos para a separação simultânea dos onze corantes artificiais permitidos para uso em alimentos no Brasil. No método por CLAE, para a separação dos corantes, utilizou-se coluna de fase reversa e eluição por gradiente, com fase móvel composta por água/metanol. Na EC a separação ocorreu utilizando um capilar de sílica, com 73 cm de comprimento efetivo, preenchido com uma solução tampão composta por fosfato (10mmol/L) e dodecil sulfato de sódio (10mmol/L), a pH 11, com aplicação de voltagem de 25 kV. Nos dois métodos, a detecção dos corantes foi feita na região do visível e a quantificação através de curvas de calibração externa. Os limites de detecção obtidos ficaram na faixa de 0,1 a 0,4 µg/mL e 0,4 a 2,5 µg/mL, enquanto os limites de quantificação foram de 0,2 a 1,3 µg/mL e 1,3 a 7,1 µg/mL para a CLAE e EC, respectivamente. As taxas de recuperação, em dois níveis de concentração, para todos os corantes foram de 95,2 a 103,2% para a CLAE, e de 92,6 a 104,0% para a EC. Os valores de repetibilidade calculado para padrões e amostras demonstraram a boa precisão para os dois métodos desenvolvidos. As metodologias propostas e validadas foram aplicadas em 45 amostras de bebidas alcoólicas de diferentes fabricantes brasileiros, sendo: 6 aguardentes aromatizadas, 9 *coolers*, 7 aperitivos, 3

coquetéis, 8 licores e 12 vinhos tinto. Não houve diferença significativa entre os dados obtidos pelos dois métodos. Em todas as amostras analisadas, os teores de corantes artificiais encontrados estavam em conformidade com a legislação brasileira.

SUMMARY

The use of synthetic dyes for the food industries in the whole world is sufficiently spread out, it is because the colors allow to supplemental or to replace the lost coloration during the processing and or storage, and thus to guarantee the acceptability of the product front to the consumer, being used still as an important instrument to guarantee the uniformity of the products in the production. Of the point of view of the public health, there are different opinions about the safety of the different synthetic dyes used in foods. Much of the studies show that these additives can be dangerous for the health of the population when consumed inadequately, either for abuses of the industry or exaggerate in the consumption. The fact is that, analytical methods for the determination of these colors must be developed, and mainly validated, to guarantee the alimentary security of the products that we ingest. In the present work they had been developed and validated two methods for synthetic dyes determination in alcoholic beverages, using two different techniques, the high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary eletrophoresis (CE). The methods had been developed for the simultaneous separation of the eleven synthetic dyes allowed for use in foods in Brazil. In the method for HPLC, for the separation of the synthetic dyes, a reverse phase column was used with gradient elution system composed by water/methanol. In the EC method the separation occurred using a silica capillary with 73 cm of effective length, filled with buffer phosphate solution (10mmol/L) with sulphate dodecyl sodium (SDS) (10mmol/L), at pH 11, with application 25kV of voltage. The detection and quantification were done made in same manner for the two methods, using absorption in the visible region and external standardization, respectively. The detection limits were 0.1 to 0.4 $\mu\text{g/mL}$ and 0.4 to 2.5 $\mu\text{g/mL}$, while quantification limits were 0.2 to 1.3 $\mu\text{g/mL}$ and 1.3 to 7.1 $\mu\text{g/mL}$ for HPLC and CE, respectively. Recovery percentage at two levels of concentration for all the synthetic dyes were of the order of 95.2 to 103.2% for HPLC, and of 92.6 to 104.0% for CE. The values of repeatability calculated for standards and samples demonstrated the precision of the two methods. The proposed and validated methods were used to analyses 45 alcoholic beverage samples of different Brazilian manufacturers, being: 6 perfumed spirits, 9 coolers, 7 bitters, 3 cocktails, 8 liquors and 12 red wines. The data obtained were the two methods did not present significant difference. It was observed that the limits

permitted by Brazilian Legislation for the use of these synthetic dyes were respected in the analyzed samples.

INTRODUÇÃO GERAL

Colorir alimentos já era uma prática utilizada pelos povos antigos. Egípcios retiravam da natureza substâncias, como as especiarias e condimentos, para essa finalidade. Com o passar do tempo essas substâncias foram sendo substituídas por outras com o objetivo específico de conferir cor (REYES, et al., 1996; VALIM, 1989; IFT, 1986).

Nos dias de hoje, a utilização de aditivos é sem dúvida um dos mais polêmicos avanços alcançados pela indústria de alimentos, principalmente o emprego de corantes artificiais, que na maioria das vezes justifica-se apenas por questões de hábitos alimentares. A importância da aparência do produto para sua aceitabilidade é a maior justificativa para o emprego dos corantes.

Sem valor nutritivo, os corantes artificiais são introduzidos nos alimentos e bebidas com o único objetivo de conferir cor, tornando os alimentos mais atrativos. Sob o aspecto da saúde, esses corantes, em geral, não são recomendados, justificando seu uso por questões comerciais e tecnológicas (RIEDEL, 1987). Do ponto de vista toxicológico, dezenas de estudos demonstraram os efeitos nocivos que esses aditivos podem causar ao homem, uma vez que não são totalmente inofensivos, o que torna necessário conhecer onde esses corantes são utilizados e controlar suas aplicações para evitar possíveis malefícios à saúde dos consumidores.

Devido ao grande uso e à grande diversidade de substâncias com poder corante, cada país possui sua própria legislação pertinente sobre o assunto. Com o aumento do comércio entre os países, o controle dos produtos que são importados e exportados torna ainda mais prioritário o conhecimento do uso desses aditivos.

Embora, vários produtos coloridos artificialmente estão no mercado, e novos são lançados a cada dia, o controle desses produtos tem sido dificultado, principalmente, pela falta de metodologias analíticas adequadas. A utilização de métodos confiáveis, eficientes e rápidos para a detecção, identificação e principalmente quantificação dos corantes sintéticos não só é um desejo dos analistas de alimentos, mas também das autoridades governamentais, no sentido de garantir a comercialização de alimentos seguros no país.

A AOAC (Association of Official Analytical Chemists) vem estimulando o desenvolvimento e a validação de novos métodos, que possam vir de encontro às necessidades e realidades de cada laboratório. No Brasil, também, a validação dos métodos analíticos tem sido

uma preocupação dos pesquisadores (SOARES, 2001), mas pouco se tem feito em relação aos métodos de determinação de corantes artificiais (PRADO e GODOY, 2002).

Várias técnicas analíticas têm sido empregadas na determinação de corantes sintéticos. Alguns métodos de identificação espectrofotométrica de corantes artificiais, por exemplo, são baseados em cálculos computacionais, com a comparação com espectros de padrões na região ultravioleta/visível (UV/VIS) e quantificados por regressão linear (HOFER et al. 1997; ÖZDEMİR e AKKAN, 1999).

Outra técnica empregada para determinação desses aditivos é a CLAE (cromatografia a líquido de alta eficiência), hoje uma das mais utilizadas na determinação e de grande importância no controle do uso de corantes artificiais em alimentos e bebidas (PRADO e GODOY, 1998; GRATZFELD-HÜSGEN e SCHUSTER, 1995). No entanto, novas técnicas e métodos vêm sendo desenvolvidos. Nos últimos anos, a eletroforese capilar (EC) vem se destacando como uma técnica bastante satisfatória para a determinação simultânea de diferentes compostos nas mais diferentes matrizes, entre eles os corantes artificiais em alimentos e bebidas (PRADO et al., 2002; FRAZIER et al., 1999; NEVADO et al., 1999).

Mesmo com todos esses avanços analíticos existem poucos estudos sobre a utilização de corantes artificiais em alimentos, bem como os teores empregados, principalmente, em bebidas. Isto, aliado ao fato do aumento do consumo de bebidas alcoólicas no Brasil, cerca de 23% nos últimos dez anos (DATAMARK, 2002), demonstra que há uma necessidade de se estudar quais são os corantes utilizados e em que quantidade estão sendo adicionados às bebidas alcoólicas.

Este trabalho dará aos pesquisadores, subsídios e maneiras alternativas na determinação dos corantes sintéticos artificiais presentes em bebidas, de forma a satisfazer às necessidades atuais sobre o controle desses aditivos.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho podem ser resumidos em:

- desenvolvimento e validação de métodos por CLAE e EC para a determinação simultânea dos corantes artificiais permitidos no Brasil;

- comparação dos desempenhos dos métodos validados; e
- determinação dos teores de corantes artificiais em bebidas alcoólicas, utilizando os dois métodos analíticos (CLAE e EC)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DATAMARK Market Intelligence Brazil - Referência bibliográfica de documentos eletrônicos, <http://www.datamark.com.br/> 10/01/2002.
- FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. – The Development and Application of Capillary Electrophoresis Method for Food Analysis. *Electrophoresis*, v. 20, 3156-3180, 1999.
- GRATZFELD-HÜSGEN, A. ; SCHUSTER, R. Sensitive Analysis Synthetic Colors using HPLC and Diode-Array Detection at 190-950 nm. Application Note , *catalog Hewlett Packard*, publication number 12-5964-3559E, 1995.
- HOFER, K.; JENEWEIN, D., QUICK - Spectrophotometric identification of synthetic food colorants by linear regression analysis. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung A/Food Research and Technology*; v. 204, nº 1, 32-38, 1997.
- IFT- Food Colours. A Scientific Status Summary by the Institute of Food Technologists's Expert Panel of Food Safety and Nutrition and the Comitê of Public Information, 1986.
- NEVADO, J. J. B.; FLORES, J.R.; LLERENA, M. J. V.; FARINAS, N.R. – 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, 895-903, 1999.
- ÖZDEMİR, Y.; AKKAN, A. A. – Determination of Patent Blue V and Carmoisine in Gelatine Desserts by Derivative Spectrophotometric. *Turkish Journal of Chemistry*, v. 23, 221-229, 1999.
- PRADO, M.A.; GODOY, H.T. Determinação dos corantes artificiais em pó para gelatina por CLAE. *Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Rio de Janeiro/RJ, Brasil, nº 384, 1998.

- PRADO M. A.; GODOY H. T. - Validation of the Methodology to Determine Synthetic Dyes in Foods and Beverages by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 25, nº 16, 2455–2472, 2002.
- PRADO, M. A.; VILAS BOAS, L. F.; BRONZE, M. R., GODOY, H. T. - Controle Analítico de Corantes Artificiais em Bebidas Alcoólicas por Eletroforese Capilar. *Analytica*, v. 1, nº 1, 52-56, 2002.
- 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, nº 1, 5-11, 1996.
- RIEDEL, G. - Controle Sanitário dos Alimentos, São Paulo, Loyola, 445 p, 1987.
- SOARES, L. M. V.- Como Obter Resultados Confiáveis em Cromatografia. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 60, nº 1, 79-84, 2001.
- VALIM, M. F. C. F. A. - Avaliação do efeito de corantes orgânicos sintéticos artificiais na função respiratória mitocondrial (Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

CAPÍTULO 1

CORANTES ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS

Marcelo Alexandre Prado, Helena Teixeira Godoy

Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos –

Unicamp – Campinas - C.P. 6121 - CEP 13083-970- Brasil

CORANTES ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS

Marcelo Alexandre Prado, Helena Teixeira Godoy

Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos –

Unicamp – Campinas - C.P. 6121 - CEP 13083-970- Brasil

RESUMO

O desenvolvimento de novos produtos, aliado ao grau de conhecimento acumulado, é o grande responsável pela expansão do mercado de alimentos processados, que inclui o segmento fornecedor de insumos elaborados para alimentos, como por exemplo os aditivos, e entre eles os corantes. O emprego de aditivos químicos é, sem dúvida, um dos mais polêmicos avanços alcançados pela indústria de alimentos. Na verdade é um assunto que gera bastante controvérsia envolvendo os consumidores, as indústrias, os pesquisadores e o governo. Os corantes artificiais pertencem a uma dessas classes de aditivos alimentares e têm sido objeto de muitas críticas, já que seu uso em muitos alimentos justifica-se apenas por questões de hábitos alimentares. Muitos alimentos industrializados originalmente não apresentam cor e em outros a coloração natural é alterada ou destruída após colheita e, principalmente, durante o processamento e ou a estocagem, havendo a necessidade de se adicionar o corante a fim de suplementar ou repor a coloração perdida para, principalmente, aumentar a aceitabilidade do produto frente ao consumidor. Ainda sob o ponto de vista tecnológico, esses compostos exercem também um importante papel garantindo uma uniformidade na produção em larga escala. Por essas razões, fica claro o grande emprego dos corantes sintéticos pelas indústrias de alimentos. Ainda existem diferentes opiniões quanto à inocuidade dos diversos corantes artificiais, conseqüentemente, diversos países ou regiões permitem o uso de diferentes corantes e em quantidades diferentes devido ao maior ou menor consumo de alimentos presentes na dieta da população, aos quais os corantes são adicionados. Visando, principalmente, o controle no uso dos corantes sintéticos, mas tendo em vista que produtos coloridos artificialmente são exportados e importados, a análise desses aditivos requer métodos eficientes e rápidos para a detecção, identificação e

quantificação. Vários métodos têm sido desenvolvidos para esse fim, sendo hoje a cromatografia a técnica mais empregada, embora existam métodos por espectrofotometria capazes de identificar e quantificar os teores dos corantes, mas que tem sua aplicação limitada a determinadas misturas de corantes. A cromatografia em papel e em camada delgada, apesar de serem técnicas relativamente rápidas, apresentam dados com baixa exatidão e precisão. Já na cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) as maiores dificuldades encontram-se nas etapas de extração, mas principalmente no alto custo do equipamento. A eletroforese capilar apresenta os mesmos problemas da CLAE, aliados ao fato de se tratar de uma técnica relativamente recente para a análise desse tipo de substância e, portanto, existem poucos estudos a cerca da determinação e quantificação.

Palavras-chaves: corantes, CLAE, EC

ABSTRACT

The development of new products, ally to the degree of knowledge, is great the responsible one for the expansion of the market of foods processed, that includes the supplying segment of elaborated pre-products for foods, for example additives and between them the colors. The use of chemical additives is, without a doubt, one of the most controversial advances obtained for the food industry. In the truth it is a subject that generates controversy sufficiently involving the consumers, the industries, the researchers and the government. The synthetic dyes belong to one of these classes of alimentary additive and have been object of many critical ones, since its use in many foods is justified only for alimentary customs. Many industrialized foods originally do not present color and in others the natural coloration is modified or destroyed after harvest and, mainly, during the processing and or the storage, having the necessity of to add the colors to supplemental or enhancing the lost coloration for, mainly, increasing the acceptability of the product front to the consumer. Still under the technological point of view, these compounds have an important action for guaranteeing an uniformity in the production in wide scale. For these reasons, it is clearly the great use of the synthetic dyes for the food industries. Still there are different about the safety of safety of the different synthetic dyes used in the foods, consequently, the countries

or regions allow the use of different colors and in different amounts had to the greater or minor food consumption in the diet of the population, to which the colors are added. Aiming, mainly, the control in the use of the synthetic dyes, but in view of that products with synthetic dyes are exported and mattered, the analysis of these additives requires efficient and fast methods for the detention, identification and quantification. Some methods have been developed for this end, being the chromatography the technique more employee, even so there are methods for spectrophotometric capable to identify and to quantify the levels of colors, but that have their limited application the determined mixtures of colors. The chromatography in paper and thin layer, although to be relatively fast techniques, given data with low accuray and precision. In the high performance liquid chromatography (HPLC) the biggest difficulties are in the extraction, but mainly in the high cost of the equipment. Capillary eletrophoresis has the same problems of the HPLC, besides being one relatively recent technique for the analysis of this compounds and, therefore, there are few studies used this tecnique.

Keywords: dyes; HPLC, CE

INTRODUÇÃO

Há muitos séculos o homem vem colorindo os alimentos para torná-los mais atrativos e saborosos. No início, muitas dessas substâncias, como as especiarias e condimentos, já tinham a função de colorir os alimentos, mas com o passar do tempo foram gradativamente substituídas por outras substâncias, algumas sintéticas, com o objetivo específico de colorir (REYES, et al., 1996; VALIM, 1989; IFT, 1986).

O emprego de aditivos químicos, como os corantes, é um dos mais polêmicos avanços da indústria de alimentos, já que seu uso em muitos alimentos justifica-se apenas por questões de hábitos alimentares, em geral, a importância da aparência do produto para sua aceitabilidade é a maior justificativa para o seu emprego.

Sob o ponto de vista toxicológico, vários estudos têm sido realizados para verificar os efeitos nocivos ao homem, já que esses aditivos não são totalmente inofensivos à saúde. Os corantes artificiais estão sempre na mira das investigações científicas devido às reações

adversas que alguns consumidores podem apresentar (RING, et al. 2001; TOLEDO e GUERCHON, 1990; RIEDEL, 1987).

Devido à diversidade de substâncias com poder corante, a lista dos corantes permitidos em cada país varia substancialmente. Em virtude do aumento no número de compostos com poder corante e de seu uso estendido aos alimentos e bebidas, tornou-se necessário o controle de suas aplicações e surgiu uma maior preocupação com possíveis efeitos à saúde humana.

Com o aumento do comércio de produtos alimentícios entre os países, o desenvolvimento de métodos de análises cada vez mais confiáveis, eficientes e rápidos, é uma necessidade maior a cada dia. Para os corantes artificiais não basta, simplesmente, provar que o produto é colorido artificialmente, cada corante, ou mistura desses, deve ser detectado e quantificado individualmente, assim, o controle desses produtos tem sido dificultado, principalmente, pela falta de metodologias analíticas adequadas.

Alguns métodos, utilizando diferentes técnicas analíticas, têm sido empregados na determinação de corantes sintéticos. Métodos de identificação espectrofotométrica de corantes artificiais permitem a análise por comparação com espectros de padrões na região ultravioleta/visível (UV/VIS) e a quantificação baseada em cálculos computacionais por regressão linear (ÖZDEMIR e AKKAN, 1999; HOFER et al. 1997). Técnicas cromatográficas, como a cromatografia em papel (PEARSON, 1976; CHO et al., 1975), camada delgada (QUEIJA, et al., 2001; RIBEIRO-CUNHA et al., 1996) e coluna aberta (GRAICHEN e MOLITOR, 1963; YANUKA et al., 1963) foram bastante utilizadas, porém essas técnicas são muito demoradas e produzem dados com baixa exatidão e precisão. A CLAE (cromatografia a líquido de alta eficiência), uma técnica atrativa e um importante instrumento no controle desses aditivos (PRADO e GODOY, 1998; PRADO, 1998; GRATZFELD-HUSGEN e SCHUSTER, 1995) é, atualmente, uma das principais técnicas para análise de corantes em alimentos. Mais recentemente, a eletroforese capilar (EC) vem sendo apontada como uma técnica bastante atrativa para a determinação simultânea de diferentes compostos, entre eles os corantes artificiais (PRADO et al, 2002; FRAZIER et al., 1999; NEVADO et al., 1999).

A qualidade dos dados analíticos é um fator importante para o conhecimento dos teores reais existentes nos alimentos, com vistas, principalmente, a garantia da segurança

alimentar. Nos últimos anos, a AOAC (Association of Official Analytical Chemists) vem estimulando o controle de qualidade analítica através de planejamentos e análises estatísticas variadas (WILRICH, 1993 a e b; ULBERTH, 1992). No Brasil, também, a validação dos métodos analíticos tem sido uma preocupação dos pesquisadores (SOARES, 2001, AGOSTINI, 1997), mas pouco se tem feito em relação à validação de novos métodos para os corantes artificiais (PRADO e GODOY, 2002).

CORANTES ARTIFICIAIS

Existe uma grande semelhança entre o que chamamos “ingrediente” e “aditivo”, ambos são substâncias químicas que fazem partes integrantes dos produtos. De uma forma geral, se considera como ingredientes as substâncias básicas incluídas na fórmula em maior volume e aditivos as substâncias complementares, que em pequeno volume se destinam a preservar ou produzir determinadas características nos alimentos formulados. Assim, pode-se considerar os aditivos como toda a substância ou mistura, dotada ou não de valor nutritivo, adicionada ao alimento com a finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor e sabor, modificar ou manter seu estado físico geral ou exercer qualquer ação exigida para uma boa tecnologia de fabricação do alimento (RIEDEL, 1987).

Os corantes artificiais são uma classe de aditivos sem valor nutritivo, introduzidos nos alimentos e bebidas com o único objetivo de conferir cor, tornando-os mais atrativos. Por esse motivo, do ponto de vista da saúde, os corantes artificiais em geral não são recomendados, justificando seu uso, quase que exclusivamente, do ponto de vista comercial e tecnológico (RIEDEL, 1987). Mesmo assim, os corantes são amplamente utilizados nos alimentos e bebidas devido à sua grande importância no aumento da aceitação dos produtos, alimentos coloridos e vistosos aumentam nosso prazer em consumi-los.

HISTÓRICO

As civilizações antigas já tinham o hábito de retirar substâncias da natureza para colorir seus alimentos, e assim melhorar sua aparência. Egípcios adicionavam extratos

naturais e vinhos para melhorar a aparência de seus produtos (DOWNHAM e COLLINS, 2000). Muitas substâncias de origem animal, vegetal ou mineral utilizadas como especiarias e condimentos, já tinham o objetivo de colorir os alimentos, mas foram gradualmente substituídas por outras com o objetivo específico de conferir cor (QUEIJA et al., 2001; DOWNHAM e COLLINS, 2000; IFT, 1986; VALIM, 1989).

Com a descoberta dos corantes sintéticos nos séculos XVIII e XIX, bem como da influência da cor na aparência e, conseqüentemente, de uma maior aceitação dos produtos pelos consumidores, o interesse das indústrias pelo uso dos corantes artificiais aumentou, inclusive na tentativa de mascarar alimentos de baixa qualidade. Desde então, os corantes sintéticos foram cada vez mais usados, especialmente por apresentarem maior uniformidade, estabilidade e poder tintorial em relação às substâncias naturais, incentivando novas descobertas (QUEIJA et al., 2001; BOLEY et al., 1980).

Vários alimentos sofreram abusos, sendo coloridos até com substâncias altamente tóxicas. Na Inglaterra, no início do século XIX foram relatados casos do uso de sulfato de cobre para colorir de verde as conservas de pickles, de chumbo negro em folhas de chá para parecerem novas e, para realçar a coloração alaranjada de alguns queijos, do chumbo vermelho. Em 1860 foi relatada a morte de duas pessoas que consumiram esses produtos (DOWNHAM e COLLINS, 2000; IFT, 1986).

O emprego de materiais sintéticos, principalmente para colorir, iniciou em 1856 com a síntese do primeiro corante derivado da hulha, desenvolvido por Sir William Henry Perkin (WALFORD, 1980). Desde então, nos Estados Unidos e Europa mais de uma centena de corantes foram desenvolvidos e lançados no mercado sem qualquer controle ou monitoramento. Muitos alimentos foram coloridos indiscriminadamente, como ketchup, mostardas, geléias, e ainda outros, que mesmo sendo proibido, tiveram adição de corantes, como por exemplo vinhos brancos de má qualidade que foram transformados em vinhos tintos, acrescentando-se a eles taninos e Bordeaux S. Já foram relatados acréscimos de corantes artificiais em cervejas, cidras e aperitivos.

Na Índia, 61,6% dos alimentos analisados em alguns estudos apresentavam em suas composições corantes não permitidos por aquele país, sendo somente em Calcutá 13,1% dos alimentos (DIXIT et al., 1995; BISWAS et al., 1994). No Egito ocorreram casos de adulteração de olivas negras com o uso de corantes artificiais, o que é uma prática ilegal

segundo sua legislação (ZIENA et al., 1997). Muitos desses aditivos nunca foram testados para verificar sua toxicidade ou outros efeitos adversos à saúde da população (DOWNHAM e COLLINS, 2000; LEDERER, 1990).

A **Figura 1** apresenta a distribuição do uso de corantes em alimentos e bebidas no mundo, mostrando claramente o grande emprego desses aditivos pelas indústrias de alimentos.

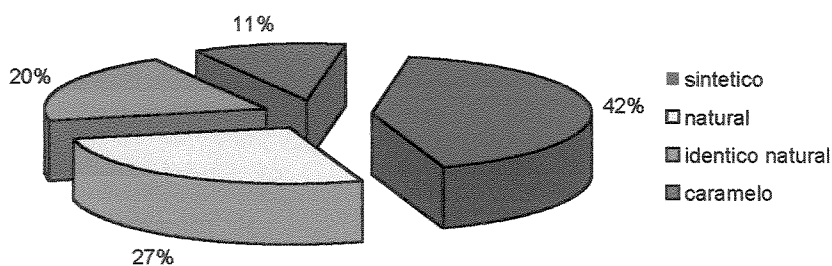


Figura 1: Porcentagem de uso de corantes, no mundo, pelas indústrias de alimentos e bebidas (fonte: DOWNHAM e COLLINS, 2000).

IMPORTÂNCIA DA COR

As cores estão intimamente ligadas a vários aspectos da nossa vida e são capazes de influenciar as nossas decisões do dia-a-dia, principalmente, as que envolvem os alimentos. A aparência, segurança, características sensoriais e aceitabilidade dos alimentos são todas afetadas pela cor (QUEIJA et al., 2001; DOWNHAM e COLLINS, 2000; CLYDESDALE, 1993; LEDERER, 1990). Existe uma relação entre certas cores com os alimentos, e isto está relacionado com o nosso desenvolvimento cognitivo, que depende de nossa memória e de nossas experiências, por exemplo, cores azuis ou verdes sugestionam queijos mofados e cores marrons (escuras) frutas podres ou estragadas. Esse mecanismo de advertência, em casos extremos, pode ocasionar aversões. Em alguns estudos, alimentos foram coloridos de forma anormal, como por exemplo, pêras vermelhas, bifes azuis e ovos verdes, causando aversões em quase todos os provadores (CLYDESDALE, 1993).

A cor pode afetar outras características sensoriais e essa interrelação pode influenciar no aceite ou não do alimento (CLYDESDALE, 1993). Isto pode estar associado ao fato de que o homem “enxergar” sabores através da cor. De uma forma geral, o verde está associado a frutas pouco maduras e, portanto, mais amargas. Já o sabor salgado, no entanto, não apresenta uma relação direta com as cores. Soluções salgadas coloridas não apresentaram diferentes valores de *threshold* com relação às soluções padrões incolores, embora se tenha observado que mudanças nas cores causam confusão com relação às estimativas deste sabor salgado.

A cor influencia no sabor, na aceitabilidade e, conseqüentemente, na preferência por certos alimentos e bebidas (DOWNHAM e COLLINS, 2000; CLYDESDALE, 1993). Embora esses 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 (CLYDESDALE, 1993).

RISCOS À SAÚDE

Muitos estudos tentaram demonstrar as reações adversas que os corantes podem causar, assim o monitoramento dos teores destes em alimentos tem, continuamente, contribuído para alertar para um consumo consciente desses produtos alimentícios (DOWNHAM e COLLINS, 2000).

Existem diferentes opiniões quanto à inocuidade dos diversos corantes artificiais, conseqüentemente, diversos países ou regiões permitem o uso de diferentes corantes e em quantidades diferentes, devido ao maior ou menor consumo de alimentos presentes na dieta da população, aos quais os corantes são adicionados.

Os aditivos são inofensivos à saúde desde que obedecendo aos percentuais máximos estabelecidos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e ou pelo *Codex Alimentarius*. Estes estabelecem para cada aditivo a quantidade diária aceitável de ingestão (IDA). Todos os corantes artificiais permitidos pela Legislação Brasileira já possuem valores definidos de IDA (ANVISA, 2002), embora esses valores estejam sujeitos a

alterações contínuas dependendo dos resultados de estudos toxicológicos. O comitê de peritos da FAO (Food and Agriculture Organization) e da OMS (Organização Mundial da Saúde) para 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 não ultrapasse os valores determinados na IDA (REYES e PRADO, 2001; MACHINSKI, 1998)

Os estudos sobre os efeitos nocivos causados pelos corantes artificiais à saúde são insuficientes e bastante contraditórios. Os corantes podem causar desde simples urticárias, passando por asma e reações imunológicas, chegando até ao câncer em animais de laboratórios (RING et al., 2001; PÉREZ-URQUIZA e BELTRÁN, 2000; BEAUDOUIN et al., 1995; LEDERER, 1990). O amaranço, por medida de segurança, é proibido nos Estados Unidos devido aos estudos naquele país demonstrarem seu poder carcinogênico, porém seu uso é liberado no Canadá, onde testes não apresentaram problemas de carcinogenicidade (DOWNHAM e COLLINS, 2000; LEDERER, 1990; BERDICK, 1982).

KAPADIA et al. (1998) estudaram a ação antitumoral *in vitro* de 29 corantes artificiais permitidos pelo FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos para alimentos, fármacos e cosméticos sobre o vírus Epstein-Barr (EBV) que produz o indutor de tumores 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TBA). Em 10 amostras foi efetiva a ação antitumoral, sendo 6 substâncias do grupo azo, 2 derivadas da tartrazina e o índigo, com significativa inibição do indutor do EBV, durante ensaios *in vitro*. Efeitos da eritrosina também foram avaliados. Esses três corantes apresentaram atividade quimiopreventiva, apresentando uma redução de até 50% na formação de papiloma em ratos.

Outros estudos realizados por YAMAZAKI et al. (1997 e 1994) demonstraram que alguns corantes amarelos, entre eles a tartrazina e o amarelo crepúsculo, podem inibir a síntese de tromboxano, e que alguns corantes vermelhos, utilizados no Japão, também podem interferir na coagulação sanguínea, assim como os amarelos, apresentando com isso um risco potencial à saúde.

Pesquisas realizadas em 486 crianças hiperativas, entre 7 e 13 anos, demonstraram que 60% reportavam problemas de aumento da hiperatividade quando do consumo de alimentos e bebidas coloridos artificialmente. Em contraste, de 172 crianças controle

apenas 12% apresentavam problemas associados a corantes artificiais. A hiperatividade das crianças pode ser associada à diminuição de Zn e Fe no plasma sanguíneo e conseqüente aumento destes na urina, quando em comparação com as crianças controle. Somente crianças hiperativas apresentaram redução nos níveis de Zn no soro sanguíneo e aumento de Zn na urina, após consumir os corantes tartrazina e amarelo crepúsculo. O amaranço não apresentou alterações significativas durante o tempo de observação do experimento, que era de 120 minutos após a ingestão dos alimentos. De 23 crianças que consumiram bebidas contendo tartrazina, 18 aumentaram os níveis de hiperatividade, 16 se tornaram agressivas e 4 se tornaram violentas, 2 diminuíram seus movimentos, 12 tiveram diminuição da coordenação motora e 8 desenvolveram asma ou eczema (WARD, 1997).

Em 1906, surgiram as primeiras suspeitas da ação cancerígena dos corantes. Ao injetar um corante azóico (vermelho escarlata) sob a pele da orelha de um coelho observou-se um crescimento celular atípico sob a pele. Em 1924, foi observado que a ingestão desse corante por camundongos podia provocar a formação de adenomas hepáticos (LEDERER, 1990). Desde então várias pesquisas sobre a ação tóxica e cancerígena de diversos corantes foram empreendidas.

Dada a estrutura química dos corantes azóicos suspeita-se que a parte ativa da molécula causadora de tumores seja, possivelmente, formada pela sua degradação. Desde o início do século XX tem sido demonstrado que moléculas originadas dos corantes azóicos apresentam ação cancerígena, principalmente pela formação do amino-azobenzeno (**Figura 2**) (LEDERER, 1990).

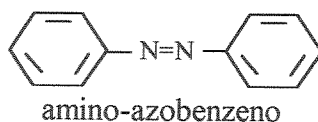


Figura 2 : Provável porção cancerígena dos corantes azóicos.

A partir de então, algumas pesquisas tentam definir com mais clareza qual é a estrutura química causadora de tumores e como é a ação carcinogênica propriamente dita, e qual é a sua via de ação. Sabe-se que a presença de grupamentos básicos funcionais, a

função amina NH_2 por exemplo, é indispensável à atividade cancerígena dos corantes (LEDERER, 1990; DRAKE, 1975). Assim, tentou-se eliminar essas propriedades maléficas dos corantes azóicos, introduzindo em suas estruturas grupamentos carboxílicos (COOH) ou sulfonados (SO_3H) no lugar desses grupamentos funcionais aminas. Além de uma diminuição da ação carcinogênica, isto os tornava hidrossolúveis, o que permitia serem rapidamente eliminados, enquanto que a matriz original era lipofílica, retendo-os no organismo durante muito tempo. Assim, pesquisadores conseguiram demonstrar que os corantes azóicos sulfonados se apresentavam inócuos, mesmo em altas doses por longos períodos (COOK et al., 1940 e 1933 citados por LEDERER, 1990).

Há ainda a possibilidade de transformações metabólicas de corantes azóicos por redução do grupo $\text{N}=\text{N}$ e formação de amino-compostos tóxicos, alguns cancerígenos. Este é o principal processo pelo qual o amaranto, segundo alguns autores, se torna cancerígeno (ANDRIANOVA, 1975 citado por LEDERER, 1990; DRAKE, 1975). A **Figura 3** apresenta os possíveis sais formados da degradação do amaranto.

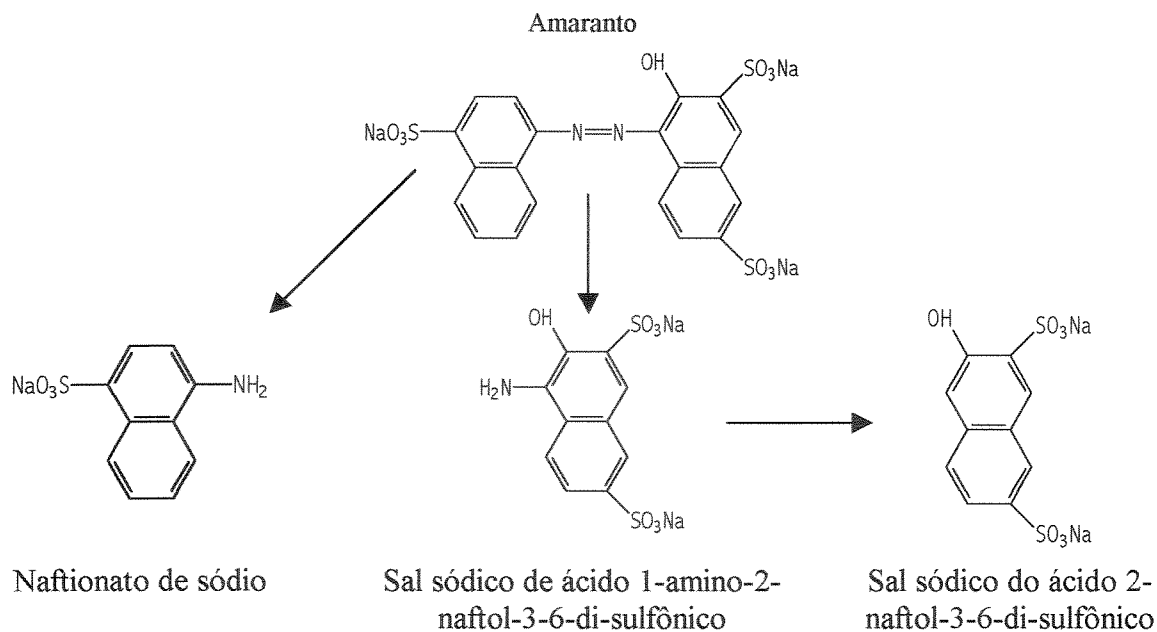


Figura 3 : Prováveis sais formados pela degradação do amaranto (LEDERER, 1990).

Ao lado dos corantes azóicos, existem outros corantes que podem agir da mesma forma, entre eles estão muitos derivados do trifenilmetano. Alguns pesquisadores (SCHILLER, 1937; HARRIS, 1947; GROSS, 1961 - todos citados por LEDERER, 1990) provocaram tumores em ratos e em camundongos através de injeções subcutâneas de corantes derivados do trifenilmetano, como o verde rápido e o azul brilhante. Ao contrário, o azul patente V, que é um sal de cálcio, não mostrou nenhum efeito carcinogênico nas experiências realizadas (TRUHAUT et al., 1973 - citado por LEDERER, 1990).

Outro grupo, que parece ser suspeito de propriedades cancerígenas é o das ftaleínas, embora muitos estudos têm demonstrado o contrário. A eritrosina, um sal dissódico da tetraiodofluoresceína, jamais provocou tumores malignos (UMEDA, 1957, 1956, 1955, 1953; NELSON e HAGAN, 1953 – todos citados por LEDERER, 1990), embora se tenha a suspeita, não comprovada, da liberação de iodo de sua estrutura, o que poderia levar a disfunções da tireóide (DRAKE, 1975).

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

LEGISLAÇÕES

Nas primeiras décadas do século XX já existiam em todo o mundo mais de oitenta corantes sintéticos disponíveis para alimentos, entretanto não existiam quaisquer regulamentações de seus usos ou graus de pureza. Devido a essa diversidade de substâncias com poder corante, a lista dos permitidos em cada país variava substancialmente (QUEIJA et al., 2001, COULSON, 1980).

Com a utilização cada vez maior desses aditivos, os países começaram a estabelecer legislações para controlar seu uso. Assim, comites internacionais, tais como a Comissão do *Codex Alimentarius*, organismo 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 os corantes sintéticos (QUEIJA et al., 2001; REYES e PRADO, 2001; VALIM, 1989).

Os Estados Unidos que chegou a ter no início do século XX mais de 700 substâncias com poder corante, hoje reduziu a quantidade de corantes sintéticos permitidos em alimentos para 9, sendo 2 de uso restrito (DOWNHAM e COLLINS, 2000). No Japão, segundo a legislação, permite-se o uso de 11 corantes sintéticos (REYES, et al. 1996).

Com a criação da União Européia, houve a necessidade de uma harmonização das legislações dos países membros. Assim, foram elaboradas as diretrizes que controlam o uso de aditivos em alimentos, sendo as que englobam os corantes são as diretrizes 94/36/EC e a 95/45/EC. Atualmente 17 corantes artificiais são permitidos na União Européia para uso em alimentos e bebidas. Cabe destacar que alguns países, como a Noruega e Suécia, proíbem o uso de corantes artificiais nos alimentos (QUEIJA et al., 2001; REYES e PRADO, 2001).

Legislação Brasileira

No Brasil, o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, dispunha sobre as normas técnicas especiais reguladoras do emprego de aditivos químicos em alimentos, sendo alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. A legislação foi alterada novamente por conta do Decreto nº 55.871 de março de 1965. Em 1977, a resolução CNNPA nº 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 nº 02 DINAL/MS, de 28 de janeiro de 1987, excluiu da Tabela I 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, 2002; BRASIL, 1988 e 1965).

Pela legislação atual, através das Resoluções nº 382 a 388, de 9 de agosto de 1999, da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), são permitidos no Brasil para alimentos e bebidas o uso de apenas onze corantes artificiais sendo eles: Amaranto, Vermelho de Eritrosina, Vermelho 40, Ponceau 4R, Amarelo Crepúsculo, Amarelo Tartrazina, Azul de Indigotina, Azul Brilhante, Azorrubina, Verde Rápido e Azul Patente V

(ANVISA, 2002; ABIA, 2001). 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, bem como a Resolução GMC nº 52/98 que trata dos critérios para determinar funções de aditivos, aditivos e seus máximos para todas as categorias de alimentos (ANVISA, 2002).

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, 2002; ABIA, 2001)

A **Tabela 1** mostra algumas propriedades físicas e químicas dos corantes artificiais permitidos no Brasil, bem como algumas classificações de uso internacional.

Corantes Azo

Esta classe compreende vários compostos que apresentam um anel naftaleno ligado a um segundo anel benzeno por uma ligação azo ($N=N$). O sistema cromóforo desta classe de corantes é apresentado em destaque nas figuras a seguir. Esses anéis podem conter um, dois ou três grupos sulfônicos (DRAKE, 1975). Esse grupo representa a classe de corantes sintéticos em alimentos mais importante e utilizada. Pertencem a essa classe os corantes:

AMARANTO - Esse corante apresenta boa estabilidade à luz, calor e ácido, mas descolore em presença de agentes redutores como o ácido ascórbico e SO_2 . Alguns estudos são contraditórios quanto à inocuidade carcinogênica deste corante, sendo, por medida de segurança, proibido nos Estados Unidos desde 1976. No Canadá é permitido, pois sua estrutura química (**Figura 4**) é bastante semelhante a outros corantes considerados não carcinogênicos. Na Inglaterra seu uso é permitido em caráter provisório até que se apresentem estudos mais conclusivos, no Japão foi voluntariamente banido pelas indústrias de alimentos e na União Européia seu uso é permitido (DOWNHAM e COLLINS, 2000; BERDICK, 1982).

Tabela 1

Propriedades dos corantes utilizados no Brasil

Nome Usual	Tartrazina	Amarelo Crepúsculo	Azorrubina	Amaranto	Ponceau 4R	Eritrosina	Vermelho 40	Azul Patente V	Azul Indigotina	Azul Brillante	Verde Rápido
Nome Químico	sal tri-sódico 5-hidroxi-1-(4- sulfonfenil)-4-[(4- sulfonfenil) azo]- pirazole-3- carboxilato	sal di-sódio 6- hidroxi-5-[(4- sulfonfenil) azo]- naftaleno-2- sulfonato	sal di-sódico 4- hidroxi-3- [(4-sulfo-1-naftil) azo]-naftaleno-1- sulfonato	sal tri-sódico do ácido 3-hidroxi-4- (4-sulfo-1-naftil azo)-naftaleno- 2,7-di-sulfonato	sal tri-sódico 7- hidroxi-8- (4-sulfo-1-naftil azo)-naftaleno- 1,3-di-sulfonato	sal di-sódico 2,4,5,7-tetraidro fluoresceína	sal di-sódico de 1-(2-metoxi-5-metil- 4-sulfofenilazo)- 2-naftol-6- sulfonato	sal de cálcio di-4- [dietilamino ciclohexa-2,5- dienilideno-(4- dietilaminofenil) metil]-6- hidroxibenzeno - 1,3-di-sulfonato	sal di-sódico do ácido 5,5'- indigotino sulfonato	sal tri-sódico de 4',4"-di (N-etil-3- sulfonatobenzil amino)-trifenil metil-2-sulfonato	sal tri-sódico 4- [4-(N-etil-p- sulfobenzil amino) fenil]-(4-hidroxil-2 -sulfonfenil- metileno)-1- (N-etil-N-p- sulfobenzil)- Δ 2,5-ciclohexa dienimina.
Classe	monoazo	monoazo	monoazo	monoazo	monoazo	xanteno	monoazo	trifenilmetano	indigóide	trifenilmetano	trifenilmetano
Fórmula	$C_{16}H_{10}N_4Na_3O_9S_2$	$C_{16}H_{10}N_4Na_3O_7S_2$	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	$C_{20}H_{14}N_4Na_2O_5$	$C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$	$C_{27}H_{31}N_2Na_2O_6S_2$	$C_{16}H_{18}N_2Na_2O_8S_2$	$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_6S_3$	$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$
Massa Molar	534,35781	452,36374	502,42354	604,46361	604,46361	879,86194	496,41674	566,66147	466,34734	792,84314	808,84234
CAS Number	1934-21-0	2783-94-0	3567-69-9	915-67-3	2611-82-7	16423-68-0	25956-17-6	3536-49-0	860-22-0	3844-45-9	2353-45-9
Color Index (C.I.)	19140	15985	14720	16185	16255	45430	16035	42051	73015	42090	42053
Código Brasil	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-127	E-129	E-131	E-132	E-133	E-143
Absorção Máxima	$\lambda_{max} = 426nm$	$\lambda_{max} = 480nm$	$\lambda_{max} = 515nm$	$\lambda_{max} = 523nm$	$\lambda_{max} = 505nm$	$\lambda_{max} = 526nm$	$\lambda_{max} = 502nm$	$\lambda_{max} = 635nm$	$\lambda_{max} = 610$	$\lambda_{max} = 629nm$	$\lambda_{max} = 625nm$
Absortividade (em água)	1% $E_{1cm} = 527$	1% $E_{1cm} = 551$	1% $E_{1cm} = 545$	1% $E_{1cm} = 438$	1% $E_{1cm} = 431$	1% $E_{1cm} = 1154$	1% $E_{1cm} = 556$	1% $E_{1cm} = 2000$	1% $E_{1cm} = 498$	1% $E_{1cm} = 1637$	1% $E_{1cm} = 1560$
Solubilidade (g/100mL) a 25°C	água 20 glicerina 18 propileno 7 etanol <0,1	água 19 glicerina 20 propileno 2,2 etanol <0,1	água 8 glicerina 1,5 propileno 0,4 etanol <0,1	água 25 glicerina 1,4 propileno 1,4 etanol 0,02	água 9 glicerina 20 propileno 20 etanol 1	água 22 glicerina 3 propileno 1,5 etanol 0,001	água 22 glicerina 3 propileno 1,5 etanol 0,001	água <10	água 1,6 glicerina 1 propileno 0,1 etanol <0,1	água 20 glicerina 20 propileno 20 etanol 0,15	água <10
IDA (mg/Kg peso corpóreo)	7,5	2,5	4,0	0,5	4,0	0,1	7,0	15,0	5,0	10,0	10,0
Sinônimos	Tartrazine, FD&C Yellow No. 5, Food Yellow No.4	Sunset yellow FCF; Food Yellow No.5, FD&C Yellow No.6	Carmoisine, Food Red 3, Acid ed 14	Amaranth, Food Red No.2; Bordeaus S	New coccine, Food Red 7; Food Red No.102	Erythrosine B, Food Red 14, Acid Red 18	Allura Red AC, Food Red 17	Acid blue 3; Patent Blue V, Food Blue 5	Indigo carmine, FD&C Blue No. 2, Food Blue No.2	FD&C Blue No.1, Food Blue 2, Brilliant blue FCF	Fast green FCF, Food Green 3, FD&C Green No 3

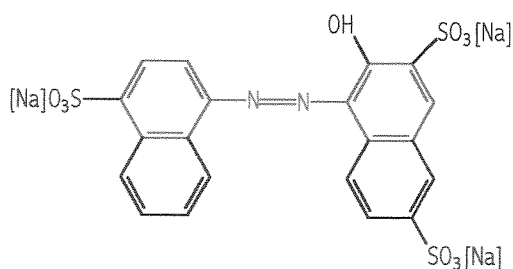


Figura 4: Estrutura química do corante amaranth, porção cromófora da classe em destaque.

PONCEAU 4R - Apresenta boa estabilidade ao calor, à luz e ao ácido, descolore parcialmente na presença de alguns agentes redutores como o ácido ascórbico e SO_2 . Não é permitido nos Estados Unidos, na Inglaterra seu uso é provisório e restrito, nos países da UE (União Européia) e no Japão seu uso é permitido, mas foi voluntariamente banido pelos industriais japoneses. Isso se deve aos poucos estudos relevantes realizados sobre sua toxicidade (DOWNHAM e COLLINS, 2000; BERDICK, 1982). A **Figura 5** mostra a estrutura química deste corante.

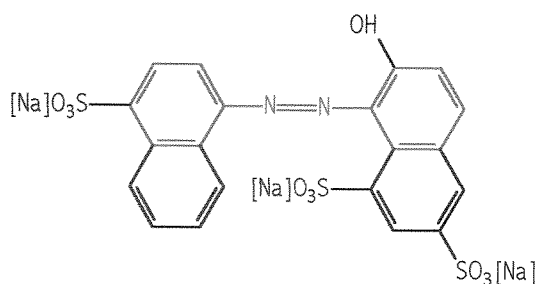


Figura 5. Estrutura química do corante ponceau 4R, porção cromófora da classe em destaque.

VERMELHO 40 - Este apresenta boa estabilidade à luz, calor e ácido, além de ser o corante vermelho mais estável para bebidas na presença do ácido ascórbico, um agente redutor. Países da UE permitem seu uso. Estudos metabólicos mostraram que o vermelho

40 (**Figura 6**) é pouco absorvido pelo organismo e em estudos de mutagenicidade não apresentou potencial carcinogênico, desta forma tendo seu uso liberado para alimentos no Canadá e Estados Unidos (DOWNHAM e COLLINS, 2000; IFT, 1986).

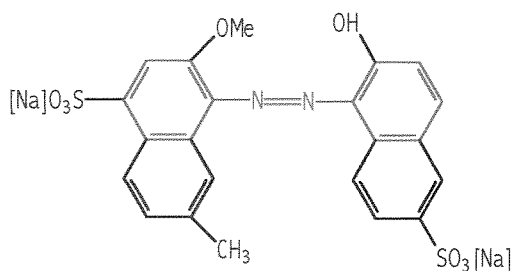


Figura 6. Estrutura química do corante vermelho 40, porção cromófora da classe em destaque.

AZORRUBINA - Possui boa estabilidade à luz, calor e ácido. Seu uso é liberado para alimentos nos países da UE, porém é proibido nos Estados Unidos. Mesmo com seu uso liberado necessita de estudos adicionais sobre o seu metabolismo (DOWNHAM e COLLINS, 2000; MARMION, 1991; WALFORD, 1980). A **Figura 7** mostra a estrutura química deste corante.

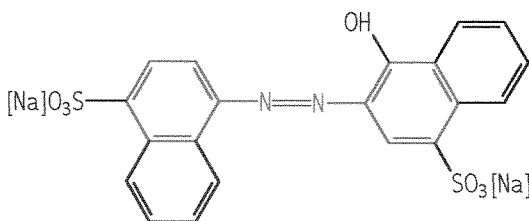


Figura 7. Estrutura química do corante azorrubina, porção cromófora da classe em destaque.

TARTRAZINA - Apresenta excelente estabilidade à luz, calor e ácido, descolore em presença de ácido ascórbico e SO₂. Dentre os corantes azo, a tartrazina tem despertado

uma maior atenção dos toxicologistas e alergistas (DOWNHAM e COLLINS, 2000; CROCE, 1965), sendo apontada como a responsável por várias reações adversas, causando desde urticária até asma. Estima-se que uma em cada 10 mil pessoas apresenta reações a esse corante (BERDICK, 1982). Provavelmente, de 8 a 20% dos consumidores sensíveis à aspirina, são também sensíveis a tartrazina (**Figura 8**). Entretanto, é um dos corantes mais empregado em alimentos e é permitido em muitos países, como Canadá, Estados Unidos e União Européia (DOWNHAM e COLLINS, 2000; BERDICK, 1982).

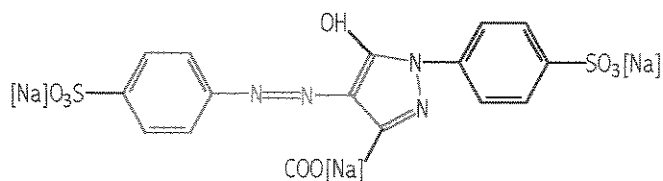


Figura 8. Estrutura química do corante tartrazina, porção cromófora da classe em destaque.

AMARELO CREPÚSCULO - Possui boa estabilidade na presença de luz, calor e ácido, apresentando descoloração na presença de ácido ascórbico e SO_2 . Os Estados Unidos, Japão e países da UE permitem seu emprego em alimentos, já o Canadá permite seu emprego em alguns produtos específicos e numa concentração máxima de 300 ppm (partes por milhão) (DOWNHAM e COLLINS, 2000; BERDICK, 1982). A **Figura 9** mostra a estrutura química deste corante.

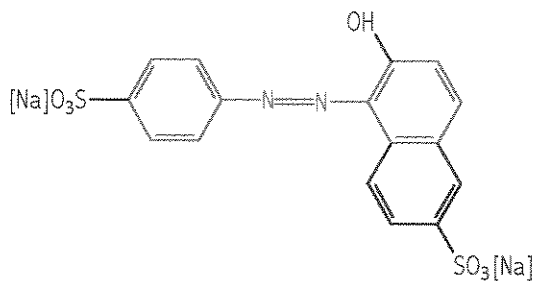


Figura 9. Estrutura química do corante amarelo crepúsculo, porção cromófora da classe em destaque.

Corantes Trifenilmetanos

Esse grupo apresenta estrutura básica de três radicais arila, em geral grupos fenólicos, ligados a um átomo de carbono central e apresentam, ainda, grupos sulfônicos que lhes conferem alta solubilidade em água. O sistema cromóforo desta classe de corantes é apresentado em destaque nas figuras a seguir. Com a legislação das normas do MERCOSUL, passam a integrar esse grupo além do azul brilhante, o verde rápido e o azul patente V.

AZUL PATENTE V - Excelente estabilidade à luz, ácido e calor, mas apresenta descoloração na presença de ácido ascórbico e SO_2 . Seu uso não é permitido nos Estados Unidos, porém é liberado para uso em alimentos nos países da UE. É um dos corantes utilizados em alimentos (**Figura 10**) que também apresenta a necessidade de mais estudos sobre seu metabolismo (DOWNHAM e COLLINS, 2000; MARMION, 1991; WALFORD, 1980).

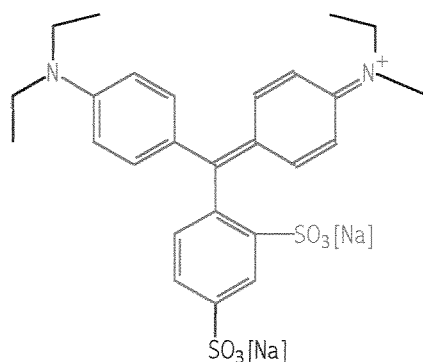


Figura 10. Estrutura química do corante azul patente V, porção cromófora da classe em destaque.

VERDE RÁPIDO - Razoável estabilidade à luz, calor e ácido, mas possui baixa estabilidade oxidativa. Seu uso é permitido nos Estados Unidos desde 1927, mas proibido nos países da UE (DOWNHAM e COLLINS, 2000; MARMION, 1991; WALFORD, 1980). A **Figura 11** mostra a estrutura química do corante.

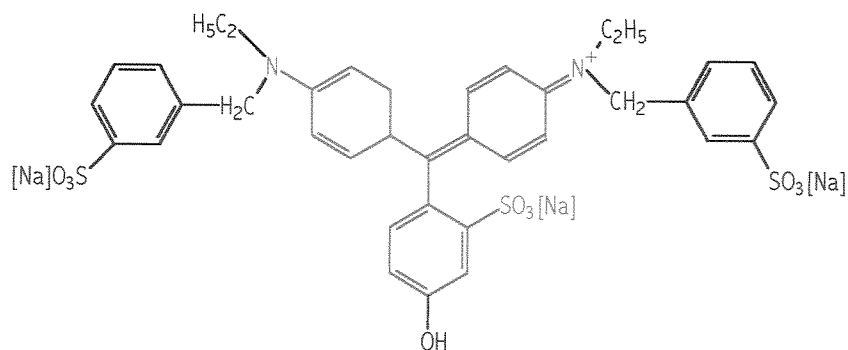


Figura 11. Estrutura química do corante verde rápido, porção cromófora da classe em destaque.

AZUL BRILHANTE - Apresenta as mesmas características de estabilidade do verde rápido. Seu uso é incondicional nos Estados Unidos, no Canadá seu limite máximo é de 100 ppm, na Inglaterra pode ser utilizado apenas em alguns alimentos e na União Européia seu uso é liberado (DOWNHAM e COLLINS, 2000; BERDICK, 1982). A estrutura química é apresentada na **Figura 12**.

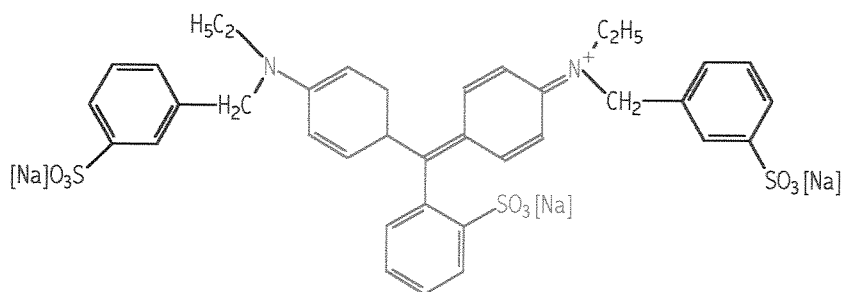


Figura 12. Estrutura química do corante azul brilhante, porção cromófora da classe em destaque.

Corantes Indigóides

AZUL DE INDIGOTINA - Possui baixa estabilidade à luz, calor e ácido, baixa estabilidade oxidativa e descolore na presença de SO₂ e ácido ascórbico. A UE considera

seu uso seguro, sendo também empregado no Japão, Estados Unidos e Inglaterra (DOWNHAM e COLLINS, 2000; BERDICK, 1982; VETORAZZI, 1981). O sistema cromóforo desta classe de corantes possui uma estrutura tetrapólo (**Figura 13**).

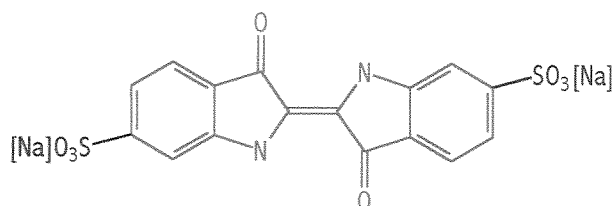


Figura 13. Estrutura química do corante indigotina, porção cromófora da classe em destaque.

Corantes Xantenos

ERITROSINA - Insolúvel em pHs abaixo de 5. É o único representante dessa classe permitido no Brasil. É também permitido nos Estados Unidos, países da UE, Reino Unido e Canadá (DOWNHAM e COLLINS, 2000; BERDICK, 1982). Existem estudos de uma possível associação com tumores na tiróide pela provável liberação de iodo no organismo, porém esses estudos não foram conclusivos (FDA, 2000; DRAKE, 1975). O sistema cromóforo desta classe de corantes é apresentado em destaque a seguir na **Figura 14**.

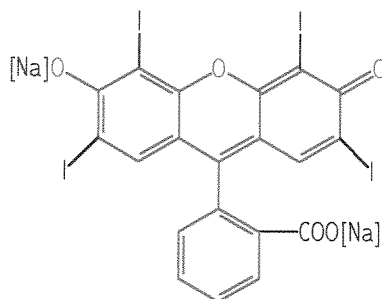


Figura 14. Estrutura química do corante eritrosina, porção cromófora da classe em destaque.

MÉTODOS DE ANÁLISE PARA CORANTES ARTIFICIAIS

Métodos Clássicos

As análises se iniciam com a extração dos corantes das matrizes alimentícias, seguidas de etapas de limpeza, para a retirada de prováveis interferentes (açúcares, ácidos, corantes naturais, etc.), e por fim a separação por técnicas analíticas, com posterior identificação e quantificação dos corantes artificiais.

Durantes muitos anos, vários métodos, principalmente envolvendo cromatografia em papel (PEARSON, 1976; LEES, 1971; CHIANG, 1969; GRIFFITHS, 1966; YANUKA et al., 1963) e cromatografia em camada delgada (QUEIJA et al. 2001; BRANCA e SPAGNOLINI, 1980; LEPRI et al., 1978; CLERQ e MASSART, 1974; PEARSON, 1973; HOODLESS et al., 1971; CHIANG e LIN, 1969; GRAHAN e NYA, 1969; PERRY e WOOLEY, 1969), foram descritos para análises desses aditivos.

Os primeiros trabalhos de separação e identificação dos corantes artificiais foram baseados nos trabalhos de ARATA. Esta técnica, com algumas modificações, é até hoje empregada no mundo inteiro e se baseia na adsorção dos corantes artificiais pela lã natural. Depois de extraídos com solução amoniacal, os corantes são separados através da cromatografia em papel (BOLEY et al., 1980; CORRADI e MICHELI, 1979; PEARSON, 1973; LEHMANN et al., 1970). Corantes naturais não se ligam à lã ou não são desorvidos, tornando essa etapa de extração também uma etapa de limpeza (BOLEY et al., 1980; LEHMANN et al., 1970; YANUKA et al., 1963; DOLINSKI e STEIN, 1962). Alguns pesquisadores apontam desvantagens desse método, como por exemplo a lenta e incompleta adsorção que alguns corantes podem apresentar, mudanças irreversíveis na estrutura dos corantes pelo uso de altas temperaturas e exposição a valores extremos de pH, além de longos períodos necessários para se obter um extrato puro. Existem ainda algumas dificuldades relacionadas com a matriz alimentícia, como alimentos insolúveis em água, ricos em lipídeos, contendo amido ou alto teor protéico. A presença dessas substâncias dificulta a fixação do corante à lã, por exemplo, as proteínas em meio ácido formam

coágulos que aprisionam os corantes artificiais, dificultando a extração destes (CORRADI e MICHELI, 1979; LEHMANN et al., 1970).

Há outros métodos que se baseiam na extração dos corantes por solventes orgânicos, como o álcool iso-amílico, o éter de petróleo, o álcool benzílico, a metil ciclohexanona e a quinoleína (CHO et al., 1975; MOTTIER e POTERRAT, 1955), seguida de separação da mistura de corantes utilizando a cromatografia de camada delgada com fase estacionária de alumina. Entretanto, o uso desses solventes como extratores não apresentou resultados muito satisfatórios, embora a alumina permitisse uma boa separação das estruturas de interesse (BIZZOZERO e MICHELI, 1996; MOTTIER e POTERRAT, 1955).

Métodos empregando a CCDAE (cromatografia de camada delgada de alta eficiência), com análise densitométrica para a quantificação de corantes artificiais em bebidas alcoólicas e não alcoólicas, apresentaram bons resultados em termos quantitativos (CSERHÁTI et al., 1998; ANDERTON et al. 1997; RIZOVA e STAFILOV, 1995; DUGAR et al. 1994).

A cromatografia em coluna aberta também foi utilizada para a análise de corantes artificiais em alimentos. Resinas trocadoras de ânions foram as mais empregadas nas determinações (BOLEY et al., 1980; GRAICHEN e MOLITOR, 1963; DOLINSKI e STEIN, 1962), entretanto, havia a necessidade de uma separação prévia dos interferentes antes da introdução da mistura de corantes na coluna. A utilização da lã pura, por si só já era uma purificação bastante satisfatória na maioria dos casos, mas poderia causar degradação dos corantes. A técnica de limpeza com o uso de coluna de poliamida parece ser superior e não apresenta o problema de degradação (GILHOOLEY et al., 1972; LEHMANN et al., 1970). A purificação pode ser feita através de sucessivas lavagens da coluna de poliamida com água e acetona para retirada de açúcares, ácidos, flavorizantes e possíveis corantes naturais básicos. A desorção dos corantes sintéticos da coluna é feita com uma solução metanólica de hidróxido de amônio (TOLEDO e GUERCHON, 1990). A poliamida adsorve, preferencialmente, os corantes sintéticos devido à presença de pontes de hidrogênio com ácidos e com hidroxilas fenólicas, sendo mínima a presença de contaminantes (LEHMANN et al., 1970). Os cartuchos de sep-pak C₁₈ também proporcionam uma rápida limpeza e concentração dos corantes (LOVE, 1984; YOUNG,

1984; LAWRENCE et al., 1981; BOLEY et al., 1980), mas devido ao seu alto custo são pouco utilizados.

O uso da cromatografia em coluna aberta com fase estacionária de celulose e poliamida, ajustada para diferentes pHs, permite a separação dos corantes por adsorção ou troca iônica, dependendo das condições escolhidas. É um método que possibilita a obtenção dos corantes de forma quimicamente pura, através do uso de diversos grupos de eluentes, podendo a seguir serem facilmente identificados e quantificados (SCLAR e FREEMAN, 1990; BRANCA e SPAGNOLINI, 1980; YANUKA et al., 1963).

Métodos por Espectrofotometria

Quando se realiza a separação dos corantes artificiais por outras técnicas analíticas, estes podem ser quantificados por espectrofotometria (QUEIJA et al., 2001; BIZZOZERO e MICHELI, 1996; BRANCA e SPAGNOLINI, 1980). Outra forma de identificação e quantificação de corantes artificiais dispensa a necessidade de separação dos mesmos. As determinações são baseadas em análises computacionais e cálculos por regressão linear (HOFER et al. 1997), porém esse método necessita que os corantes não apresentem uma alta sobreposição de seus espectros, e assim possam ser identificados e quantificados de maneira satisfatória. (NI e GONG, 1997; TAKAHASHI et al., 1988; OHLWEILER, 1981; PALLOTTI et al., 1977).

O grande problema enfrentado nesses métodos é quando se tem grupos de corantes que apresentam máximos de absorvância muito próximos, ou espectros com grande área de sobreposição. Nos últimos anos diversos trabalhos tentaram desenvolver, com algum sucesso, técnicas usando a espectrofotometria aliada a um recurso matemático de análise das derivadas dos espectros dos corantes. A visualização do espectro nada mais é que uma representação gráfica no espaço, então são realizadas derivadas desta curva, que é o produto da mistura de corantes, e assim é possível obter novas curvas onde o cálculo de concentração é realizado, não mais no máximo de absorvância dos compostos, mas sim numa região do novo espectro onde o composto calculado absorve e os outros não. Assim através de equações matemáticas é possível determinar as concentrações de cada corante presente na mistura (ÖZDEMIR e AKKAN, 1999; NEVADO et al., 1999, 1998a e 1998b,

1997, 1994; BERZAS-NEVADO et al., 1999 a e b, BERZAS et al., 1999; SAYAR e ÖZDEMİR, 1997). A **Figura 15** ilustra de que forma isto pode ser realizado.

Na Figura 15 (a) pode-se observar a sobreposição dos espectros e, conseqüentemente, a dificuldade em se avaliar qualitativamente e quantitativamente os corantes presentes. Já na Figura 15 (b) o que se tem é o espectro da primeira derivada, que apresenta agora regiões do espectro onde praticamente não há interferência de absorção entre os corantes, assim são escolhidos novos comprimentos de onda e desta forma é possível determinar a concentração de cada corante sem a necessidade prévia de separação.

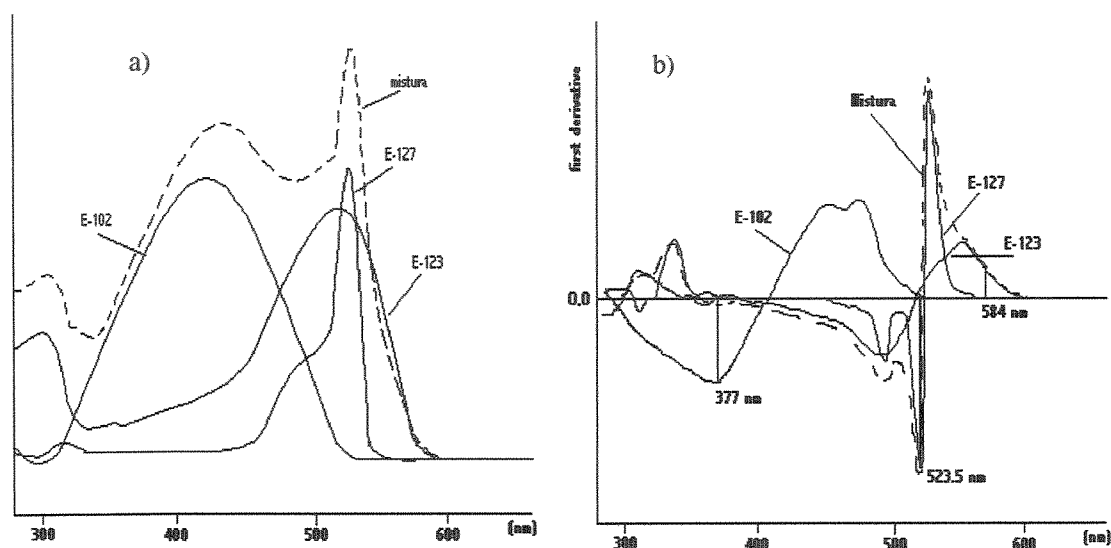


Figura 15. Espectros de absorção (a) e espectros da primeira derivada (b) de três corantes e de sua mistura.

Métodos por CLAE

Quando não é possível ou quando não se obtém resultados satisfatórios em separações por cromatografia em papel e por camada delgada (SINGH, 1982; MACRAE, 1981; PUTTERMANS et al., 1981), ou para estudos mais detalhados dos corantes (GOLDBER e CALVEY et al., 1982; CALVEY et al., 1981; COX e REED, 1981;

BIBEAU e CLYDESDALE, 1978), o uso da CLAE (cromatografia a líquido de alta eficiência) tem apresentado resultados bastante satisfatórios, graças ao seu alto poder de separação e sua grande capacidade de detectar limites muito baixos (1 a 5 ppm), com valores de recuperação na ordem de 95 % (GOLDBER e CALVEY, 1982; SINGH, 1982). Com tempos de análise muito mais curtos, em comparação aos observados em outras técnicas tradicionais (SINGH, 1982; MARMION, 1977), a aplicação em separações e identificações dos corantes artificiais tem aumentado nos últimos anos (PRADO e GODOY, 2002; LOVE, 1984; YOUNG, 1984; MACRAE, 1981; SINGH, 1982; PUTTERMANS et al., 1981).

O uso de colunas de sílica nas primeiras determinações de corantes artificiais por CLAE apresentou alguns inconvenientes. Como os corantes são compostos muito polares, a adsorção era irreversível ou o tempo de análise muito longo, além de se obter picos irregulares e com extensa cauda. Separações mais rápidas e eficientes foram obtidas com colunas de troca-iônica (PASARELLI e JACOBS, 1975). As colunas de troca iônica para CLAE apresentaram bons resultados, principalmente com o uso de fases móveis com eluição por gradiente, melhorando assim os problemas ocorridos com o uso da sílica. A cromatografia de troca iônica é uma boa alternativa para análise de soluções com forte hidrofobicidade, este método sendo aplicado a bebidas possibilitou a separação de oito corantes (CHEN et al., 1998).

Outra alternativa para análise de corantes artificiais é a utilização de colunas de fase reversa C₁₈ com gradiente de eluição (LANCASTER e LAWRENCE, 1991; LOVE, 1984; YOUNG, 1984; PUTTERMANS et al., 1981; LAWRENCE et al., 1981;BOLEY et al., 1980) e ou eluentes tamponados, que apresentam uma melhora significativa na seletividade, retenção e simetria dos picos (BOLEY et al., 1980). A fase móvel tamponada pode alterar de duas maneiras a afinidade do analito pela a fase estacionária, o tampão pode suprir a ionização ou pode reduzir a solubilidade do corante na fase móvel (CIOLA, 1998; McKRONE e IVIE, 1980).

A uso de par-iônico foi desenvolvido para separações de compostos fortemente polares e tem se mostrado uma técnica bastante adequada para o uso nas determinações dos corantes artificiais (PÉREZ-URQUIZA e BELTRÁN, 2000; BERZAS-NEVADO et al., 1997; GENARO et al., 1997; PUTTERMANS et al., 1982; LAWRENCE et al., 1981,

BOLEY et al., 1980; COULSON, 1980, PASARELLI e JACOBS, 1975). No caso dos corantes, o par-iônico mais utilizado é o brometo de cetiltrimetilamônio (cetrimida) (KNOX E LAIRD, 1976), podendo também ser utilizado o fosfato de tetra-n-butilamônio (TBAP) (LANCASTER e LAWRENCE, 1983, 1982). O uso deste tipo de sistema tem apresentado bons níveis de detecção, sendo na ordem de 1 a 8 ng, com análises bastante rápidas, com tempos inferiores a 10 minutos (NEVADO, 1997). No entanto, essa técnica apresenta inconvenientes de longos períodos de condicionamento das colunas.

Embora a CLAE seja uma das principais técnicas para análise de corantes em alimentos, poucos sistemas foram desenvolvidos para a separação simultânea de todos os corantes permitidos pela Legislação Brasileira. Somente PRADO e GODOY (2002, 1998) desenvolveram e validaram métodos para separação simultânea de corantes artificiais em alimentos e bebidas utilizando a CLAE.

Métodos por Eletroforese Capilar

A determinação analítica de cátions e ânions encontra extensa aplicação nos vários segmentos das indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos. Desde 1990, a eletroforese capilar (EC) vem sendo apontada como uma alternativa bastante satisfatória para a determinação desses compostos (JAGER e TAVARES, 2001; FRAZIER et al. 1999; JANDIK e BONN, 1993). A EC tem demonstrado maior versatilidade e simplicidade que as demais técnicas usualmente empregadas, além de menores custos e maior durabilidade da coluna e menores tempo de análise, volume de amostra e custo final de análise. A conclusão que prevalece nesses estudos é que a eletroforese capilar apresenta inúmeras vantagens, o que a tem destacado entre as técnicas analíticas de separação (JAGER e TAVARES, 2001; COLOMBARA et al., 1997).

As aplicações da EC em alimentos demonstraram claramente a versatilidade da técnica. Os tipos de alimentos e analitos analisados podem ser os mais diversos, desde águas, bebidas, cereais, carnes, leites, etc., nas determinações de íons, ácidos orgânicos, proteínas, vitaminas, pesticidas, herbicidas, açúcares, corantes e outros (JAGER et al., 2001; FRAZIER et al. 1999; COLOMBARA et al., 1997; CANCELON, 1995).

A eletroforese capilar por zona (CZE) funciona como uma extensão da eletroforese típica aplicada à bioquímica. Muitos trabalhos confirmam que a CZE pode ser aplicada com sucesso em análise de alimentos na determinação de várias substâncias, como, os corantes artificiais; as vitaminas hidrossolúveis, incluindo a C, B₁, B₂, B₃; conservadores como o ácido benzóico e sórbico; adoçantes artificiais, incluindo o ciclamato, sacarina aspartame e acessulfame K; ácidos orgânicos; e ânions como os cloretos, nitritos e nitratos (ISSAQ, 1999; FRAZIER et al. 1999; CANCALON, 1995).

A eletroforese capilar (EC) oferece vantagens sobre a CLAE e outras técnicas cromatográficas devido ao pouco uso de solventes químicos, baixo custo das colunas capilares em relação às colunas de CLAE, velocidade de análise e maior eficiência de separação. Entretanto, as limitações da EC incluem sua baixa sensibilidade e limpeza freqüente das colunas. A faixa de aplicação da EC foi rapidamente expandida com o aproveitamento dos mesmos detectores utilizados em outros equipamentos, como a CLAE (CHEMKEYS, 2002; TAVARES, 1996; BUICK e TRENERRY, 1995).

Há na literatura poucos trabalhos utilizando esta técnica para determinações de corantes artificiais, entre eles umas poucas publicações técnicas (HEWLETT PACKARD, 1996 e 1995) que demonstram o potencial, a importância e a versatilidade da técnica. Em mais de 200 trabalhos revisados utilizando a EC, FRAZIER et.al. (1999) encontraram apenas seis que envolviam corantes artificiais em alimentos.

Das diferentes técnicas existentes em eletroforese capilar, a Eletroforese Capilar por Zona e a Eletroforese Capilar por Micelas são as duas técnicas utilizadas para a separação de corantes artificiais em alimentos. As variações existentes nas técnicas apresentadas vão desde o simples uso do tampão (borato ou fosfato) até o uso destes com tensoativos. Em todos os trabalhos revisados, ambas técnicas apresentaram bons resultados, sendo eficientes na separação e quantificação desses aditivos em alimentos e bebidas (PRADO et al, 2002; PÉREZ-URQUIZA e BELTRÁN, 2000; FRAZIER et al., 2000; NEVADO et al., 1999; FRAZIER et al., 1999; KUO et al., 1998; MAZÁR et al., 1996; LIU et al., 1995; SUZUKI et al., 1994).

Embora não seja uma técnica recente, somente nas últimas décadas a eletroforese capilar vem se destacando como uma possível técnica a ser aplicada na rotina dos laboratórios. A CLAE tem sido usada como principal parâmetro de comparação das

performances da EC, seja em termos de limites de detecção ou quantificação, seja em termos de teores dos analitos (NEVADO et al., 1999; WYNIA et. al, 1997; KUNKEL et al., 1997; HADDAD 1997; JANDERA et al. , 1996; BRESSOLE et al., 1996; BUICK e TENERRY, 1995; BRUMLEY et al.,1994; JIMIDAR et al. 1993).

Ambos, o desenvolvimento da teoria e aplicação da eletroforese capilar, tem que ser ainda melhor estudados. Isto implica, por exemplo, que métodos precisam ser desenvolvidos, otimizados e validados para cada aplicação. Com as pesquisas mais recentes, algumas padronizações da técnica têm alcançado avanços significativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIA - Associação Brasileira das Industrias da Alimentação - *Compêndio da Legislação de Alimentos: Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos*. 8 rev. São Paulo: ABIA, v. 1^A, 2001.
- AGOSTINI, T.A - *Desenvolvimento de Metodologia para Determinação Simultânea, por CLAE, das Vitaminas B₁, B₂, B₆, Ácido Nicotínico e Nicotinamida em Alimentos Enriquecidos*. (Tese de doutorado em ciências de alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
- ANDERTON, S. M.; INCARVITO, C. D.; SHERMA, J. - Determination of natural and synthetic colors in alcoholic and non-alcoholic beverages by quantitative HPTLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*; v. 20, nº 1 101-110, 1997.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Referência bibliográfica de documentos eletrônicos, <http://www.anvisa.gov.br> , 20/10/2002.
- BEAUDOUIN, E.; KANNY, G.; LAMBERT, H.; FREMONT, S.; MONERETVAUTRIN, D. A. – Food Anaphylaxis Following Ingestion of Carmine. *Annals of Allergy Asthma & Immunology*, v. 74, 427-430, 1995.
- BERDICK, M. - Safety of Food Colors In: Hanthcock, J. N. ed. *Nutritional Toxicology*. New York, Academic Press, v. 1, 383-434, 1982.

- BERZAS, J. J.; FLORES, J. R.; LLERENA, M. J. V.; FARINAS, N. R. – Spectrophotometric Resolution of Ternary Mixtures of Tartrazina, Patent Blue V, and Indigo Carmine in Commercial Products. *Analytica Chimica Acta*, v. 391, 353-364, 1999.
- BERZAS-NEVADO, J. J.; GUIBERTEAU-CABANILLAS, C.; CONTENTO-SALCEDO, A. M.; MARTIN-VILLAMUELAS, R. - Spectrophotometric Simultaneous Determination of Amaranth, Ponceau 4R, Allura Red and Red2G by Partial Least Squares and Principal Component Regression Multivariate Calibration. *Analytical Letters*, v. 32, 1879-1898, 1999a.
- BERZAS-NEVADO, J. J.; GUIBERTEAU-CABANILLAS, C.; CONTENTO-SALCEDO, A. M. - Method Development and Validation for the Simultaneous Determination of Dyes in Foodstuffs by Capillary Zone Electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, v. 378, 63-71, 1999b.
- BERZAS-NEVADO, J. J.; GUIBERTEAU-CABANILLAS, C.; CONTENTO-SALCEDO, A. M. - Separation and Determination of Dyes by Ion-Pair Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 20, 3073-3088, 1997.
- BIBEAU, T. C.; CLYDESDALE, F.M. - Thermal Stability of Subsidiary Dyes Associated with FD and C Yellow n° 6. *Journal of Food Science*, v. 43, 521-534, 1978.
- BISWAS, G.; SARKAR, S.; CHATTERJEE, T. K. - Surveillance on artificial colours in food products marketed in Calcutta and adjoining areas. *Journal of Food Science and Technology*, India; v. 31, n° 1, 66-67, 1994.
- BIZZOZERO, N.; MICHELI, G. - Research and Identification of Natural and Synthetic Colouring Agents in Sample of Gnochì. *Industria Alimentare*, v. 35, 1300-1303, 1996.
- BOLEY, N. P.; BUNTON, N. G.; CROSBY, N. T.; JOHNSON, A. E.; ROPER, P.; SOMMERS, L. - Determination of Synthetic Colours in Food Using High Performance Liquid. Chromatography. *Analyst*, v. 105, 589-593, 1980.
- BRANCA, P.; SPAGNOLINI, G. P. - Identificazione e Dosaggio Spectrofometrico di Alcuni Coloranti di Sintesi in Prodotti Alimentari. Estratto Dalla Rivista *Industria Delle Bevande*. Dicembre, - Chiriotti Editori, 1980.
- BRASIL, Leis e Decretos, Dec. Lei 55871. Regulamenta normas de aditivos intencionais. Diário Oficial da União. 29/04/1965.

- BRASIL, Leis e Decretos, Resolução 04. Regulamenta normas de aditivos intencionais. Diário Oficial da União. 19/12/1988.
- BRESSOLLE, F.; AUDRAN, M.; PHAM, T.; VALLON, J. - Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: basic principles and new developments. *Journal Of Chromatography B*, v. 687, 303-336, 1996.
- BUICK, D. R.; TRENNERY, V. C. - Capillary electrophoresis: competitor or complementary to HPLC in food analysis. International Rice Research Inst. Library, Los Banos, Laguna Philippines. 30 pg, 1995.
- BRUMLEY, W. C.; BROWNRINGG, C. M.; GRANGE, A. H. - Capillary Liquid-Chromatography Mass-Spectrometry and Micellar Electrokinetic Chromatography as Complementary Techniques in Enviromental-Analysis. *Journal Chromatography A*, v. 680, 635-644, 1994.
- CALVEY, R. J.; GOLDBERG, A. L.; MADIGAN, E. A. - HPLC Determination of Intermédiate / Side Reaction Products in FD and C Yellow nº 5. *Journal of the Association Official Analytical Chemists*, v. 64, nº 3, 665-669, 1981.
- CANCALON, P. F. - Capillary Electrophoresis: A Useful Technique for Food Analysis. *Food Technology*, June, 52-58, 1995.
- CIOLA, R. - Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho HPLC ed. Edgard Blücher, 1ª ed., São Paulo, SP, 1998.
- CHEMKEYS, O. Seu Site de Química - Referência bibliográfica de documentos eletrônicos, http://chemkeys.com/bra/md/mds_11/elecap_4/elecap_4.htm 11/05/2002
- CHEN, Q. C.; MOU, S. F.; HOU, X. P.; RIVIELLO, J. M.; NI, Z. M. - Determination of Eight Synthetic Food Colorants in Drinks by High-Performance Ion Chromatography. *Journal Chromatography A*, v. 827, 73-81, 1998.
- CHIANG, H. C. - Polyamide - Silica Gel Thin - Layer Chromatography of Red Food Dyes. *Journal of Chromatography*, v. 40, 189-190, 1969.
- CHIANG, H. C.; LIN, S. L. - Polyamide Kieselguhr Thin - Layer Chromatography of Yellow Food Dyes. *Journal of Chromatography*, v. 44 1, 203-204, 1969.

- CHO, T. H.; CHO, J. H.; YANG, Y. K. - Analysis of Artificial Colouring Matter in Sausage and Ham by Paper Chromatography and Spectrophotometry. Reprinted from: *The Research Reports of Office of Rural Development*, v. 17, n° 5, 87-93, 1975.
- CLERQ, H.; MASSART, D. L. - The Thin-Layer Chromatography Separation of Water Soluble Food Dyes on Silica Gel Layer. *Journal of Chromatography*, v. 93, n° 1, 243-247, 1974.
- CLYDESDALE, F.M. - Color as a factor in food choice, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 33, n° 1, 83-101, 1993.
- COLOMBARA, R. ; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S. - Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. *Química Nova*, v. 20, n° 5, 512-518, 1997.
- CORRADI, C.; MICHELI, G. - Método Rápido di Ricerca ed Identificazione dei Coloranti Acidi Artificiali Idrosolubili Nei Prodotti Alimentari. *Boletino dei Chimici dei Laboratori Provinciali*, v. 5, n° 1, 188-200, 1979.
- COULSON, J. - Synthetic Organic Colours for Food. In: *Developements in Food Colours - I*, Walford, J. Ed Appl. Sc. Publ. Ltd, London, 1980.
- COX, E. A.; REED, G. F. - HPLC Determination of Intermédiate and Two Reaction By-Products in FD and C Red n° 40: Colaborative Study. *Journal of the Association Official Analytical Chemists*, v. 64, n° 2, 324-331, 1981.
- CROCE, J. - Muita cor e algum risco nas balas. *Consumidor S.A.* - Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor, v. 2, 5-8, 1965.
- CSERHÁTI, T.; FORGÁCS, E.; KOSA, A.; CSIKTUSNADI-KISS, G.; CANDAIS, M. - Use of Multistep Gradient elution TLC to Model Gradient Separation in HPLC. *Journal of Planar Chromatography*, v. 11, 34-37, 1998.
- DIXIT, S.; PANDEY, R. C.; DAS, M.; KHANNA, S. K. - Food quality surveillance on colours in eatables sold in rural markets of Uttar Pradesh. *Journal of Food Science and Technology*, India; v. 32, n° 5, 373-376, 1995.
- DOLINSKY, M.; STEIN, C. - Application of a Liquid Anion Exchange Resin to the Separation of FD and C Colours from Foods. *Journal of the Association Official Analytical Chemists*, v. 45, n° 3, 767-769, 1962.

- DOWNHAM, A.; COLLINS, P. - Colouring our Food in The Last and Next Millennium. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 35, 5-22, 2000.
- DRAKE, J. J. P. Food Colours - Harmless Aesthetics or Epicurean Luxuries ? *Toxicology*, v. 5, 3-42, 1975.
- DUGAR, S. M.; LEIBOWITZ, J. N.; DYER, R. H. - Identification of synthetic colors in beverage alcohol products by solid phase extraction and thin layer chromatography. *Journal of the Association Official Analytical Chemists International*; v. 77, n° 5, 1335-1337, 1994.
- FDA. Food and Drug Administration – Referência bibliográfica de documentos eletrônicos. <http://vm.cfsan.fda.gov/list.html>. 12/07/2000.
- FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. - The Development and Application of Capillary Electrophoresis Method for Food Analysis. *Electrophoresis*, v. 20, 3156-3180, 1999.
- FRAZIER, R. A.; INNS, E. L.; DOSSI, N.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. - Development of a Capillary Electrophoresis Method for the Simultaneous Analysis of Artificial Sweeteners, Preservatives and Colours in Soft Drinks. *Journal Chromatography A*, v. 876, 213-220, 2000.
- GILHOOLEY, R. A.; HOODLESS, R. A.; PITMAN, K. G.; THONSON, J. - Separation and Identification of Food Colours, IV. Extraction of Synthetic Water - Soluble Food Colours. *Journal of Chromatography*, v. 72, 325-331, 1972.
- GENARO, M. C.; GIANNINI, E.; ANGELINO, S.; AIGOTTI, R.; GIACOSA, D. - Identification and determination of red dyes in confectionery by ion-interaction high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A*, v. 767, 87-92, 1997.
- GOLDBER, A. L.; CALVEY, R. J. - Automated HPLC Determination of Intermediates and Side Reaction Products in FD C Red n° 3. *Journal of the Association Official Analytical Chemists*, v. 65, n° 1, 103-107, 1982.
- GRAHAN, R. J. T.; NYA, A. E. - The Partition Chromatography of Food Dyes on Polycarbonate - Coated Foils. *Journal of Chromatography*, v. 43, 547-559, 1969.

- GRAICHEN, C.; MOLITOR, J. C. - Determination of Certifiable FD&C Colors Additives in Food and Drugs. *Journal of the Association Official Analytical Chemists*, v. 46, n° 6, 1022-1029, 1963.
- GRATZFELD-HÜSGEN, A.; SCHUSTER, R. - Sensitive Analysis Synthetic Colors using HPLC and Diode-Array Detection at 190-950 nm. Application Note , *catalog Hewlett Packard*, publication number 12-5964-3559E, 1995.
- GRIFFITHS, M. H. E. - Systematic Identification of Food Dyes Using Paper Chromatography Techniques. *Journal of Food Technology*, v. 1, 63-72, 1966.
- HADDAD, P. R. - Comparison of Ion Chromatography and Capillary Electrophoresis for the Determination of Inorganic Ions. *Journal Chromatography A*, v. 770, 281-290, 1997.
- HEWLETT PACKARD - Applications of the HP ^{3d} Capillary Electroforesis System Publication number 12-5963-7140E, 1, 107p, 1995.
- HEWLETT PACKARD – Applications of the HP ^{3D} Capillary Electroforesis System - Publication number 12-5962-6957E, 1, 84p, 1996.
- HOFER, K.; JENEWEIN, D.; QUICK, J. - Spectrophotometric identification of synthetic food colorants by linear regression analysis. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung A/Food Research and Technology*, v. 204, n° 1, 32-38, 1997.
- HOODLESS, R. A.; PITMAN, K. G.; STEWART, T. E.; THONSON, J.; ARNOLD, J. E. - Separation and Identification of Food Colours-Identification of Synthetic Water-Soluble Food Colours Using Thin-Layer Chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 54, 393-404, 1971.
- IFT- Food Colours. A Scientific Status Summary by the Institute of Food Technologist's Expert Panel of Food Safety and Nutrition and the Comite of Public Information, 1986.
- ISSAQ, H. J. – Capillary Electrophoresis of Natural Products-II. *Electrophoresis*, v. 20, 3190-3202, 1999.
- JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. – Determinação Simultânea de Cátions por Eletroforese Capilar: Fundamentos e Aplicações. *Química Nova*, v. 24, n° 3, 363-373, 2001.

- JANDIK, P.; BONN, G. - Capillary Electroforesis of Small Molecules and Ions - *VCH Publishers; New York*, 1993.
- JANDERA, P.; FISCHER, J.; KUCEROVA, M.; ZVONICEK, P. - Separation of Aromatic Sulphonic Acid Dye Intermediates by High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Zone Electrophoresis. *Journal Chromatography A*, v. 738, 201-213, 1996.
- JIMIDAR, M.; HAMOIR, T. P.; FORRIES, A.; MASSART, D. L. - Comparison of Capillary Zone Electrophoresis with High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Additives in Foodstuffs. *Journal Chromatography*, v. 636, 179-186, 1993.
- 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, 87-95, 1998.
- KNOX, J. H.; LAIRD, G. R. - Soap Chromatography - A New HPLC Technique for Separation of Ionizable Materials. *Journal of Chromatography*, v. 122, 17-34, 1976.
- KUNKEL, A.; GÜNTHER, S.; DETTE, C.; WÄTZIG, H. - Quantitation of insulin by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography Method comparison and validation. *Journal of Chromatography A*, v. 781, 445-455, 1997.
- KUO, K. L.; HUANG, H. Y.; HSIEH, Y. Z. - High-Performance Capillary Electrophoretic Analysis of Synthetic Food Colorants. *Chromatographia*, v. 47, 249-256, 1998.
- LANCASTER, F. E.; LAWRENCE, J. F. - Ion-Pair HPLC Separation and Detection of Subsidiary Dyes in Synthetic Food Colors. *Journal of the Association Official Analytical Chemists*, v. 65, n° 6, 1305-1310, 1982.
- LANCASTER, F. E.; LAWRENCE, J. F. - Ion-Pair Liquid Chromatography Determination of Uncombined Intermediates in Three Synthetic Food Colors. *Journal of the Association Official Analytical Chemists*, v. 66, n° 6, 1424-1428, 1983.
- LANCASTER, F. E.; LAWRENCE, J. F. - Determination of total non-sulphonated aromatic amines in tartrazine, sunset yellow FCF and allura red by reduction and derivation followed by HPLC. *Food Additives and Contaminants*, v. 8, n° 3, 249-264, 1991.

- LAWRENCE, J. F.; LANCASTER, F. E.; CONACHER, H. B.S. - Separation and detection of synthetic food colours by ion-pair HPLC. *Journal of Chromatography*, v. 210, 168-172, 1981.
- LEDERER, J. - Alimentação e Câncer, ed. Manole Dois – São Paulo 1990.
- LEES, R. - Colour - Identification of Food Dyes. In: *Laboratory Handbook of Methods of Food Analysis*. 2nd Ed., Leonard Hill, London, 1971.
- LEHMANN, G.; COLLET, P.; HANH, H. G.; ASHWORTH, M. R. F. - Rapid Method for Detection and Identification of Synthetic Water-Soluble Coloring Matter in Food and Drugs. *Journal of the Association Official Analytical Chemists*, v. 53, n° 6, 1182-1189, 1970.
- LEPRI, L.; DESIDERE, P. G.; COAS, V. - Separation and Identification of Water-Soluble Food Dyes by Ion exchange and Soap Thin-Layer Chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 161, 279-286, 1978.
- LIU, H.; ZHU, T.; ZHANG, Y.; QI, S.; HUANG, A.; SUN, Y.; - Determination of Synthetic Colourant Food Additives by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal Chromatography A*, v. 718, 448-453, 1995.
- LOVE, J. L. - A Simple Method to Identify Added Synthetic Colour in Foods. *New Zeland Journal of Science*, v. 27, 113-116, 1984.
- MACKINSKI-Jr, M. - Estimates of Maximum Limits of Food Colors Use in Brazil Through the Danish Budget Method and the Baerand Wuertzen-Modified Method. *Food Additives and Contaminants*, v. 15, n° 4, 481-486, 1998.
- MACRAE, R. - Recent Applications of HPLC to Food Analysis. *Journal of Food Technology*, v. 16, 1-11, 1981.
- MARMION, D. M. - HPLC Determination of 4,4-diazoamino of Dibenzenesulfonic Acid in FD and C Yellow n° 6. *Journal of the Association Official Analytical Chemists*, v. 60, n° 1, 168-172, 1977.
- MARMION, D. M. - Handbook of U.S. colorants: foods, drugs, cosmetics, and medical devices, 3rd edition, 1991.
- MAZAR, M.; KANIANSKY, D.; MADAJOVA, V. - Separation of Synthetic Food Colourants by Capillary Zone Electrophoresis in a Hydrodynamically Closed Separation. *Journal Chromatography A*, v. 724, 327-336, 1996.

- McKONE, H. T.; IVIE, K. - An Introduction to HPLC: Separation of Some FD&C Dyes. *Journal of Chemical Education*, v. 57, nº 4, 321-322, 1980.
- MOTTIER, M.; POTERRAT, M. - De L'extraction des Colorants pour Denrées Alimentaires Avec la Quinoleina et de leur Identification par Chromatographie sur Plaque d'Alumine. *Analytica Chimica Acta*, v. 13, 46-56, 1955.
- NEVADO, J. J. B.; FLORES, J. R.; LLERENA, M. J. V.; FARINAS, N. R. - 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, 895-903, 1999.
- NEVADO, J. J. B.; FLORES, J. R.; LLERENA, M. J. V. - Simultaneous Spectrophotometric Determination of Tartrazine, Sunset Yellow and Ponceau 4R in Commercial Products by Partial Least Squares and Principal Component Regression Multivariate Calibration Methods. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 361, 465-472, 1998a.
- NEVADO, J. J. B.; FLORES, J. R.; LLERENA, M. J. V.; SALCEDO, A. C. - Resolution of Ternary Mixture of Tartrazine, Sunset Yellow and Ponceau 4R by Derivative Spectrophotometric Ratio Spectrum-Zero Crossing Method in Commercial Foods. *Talanta*, v. 46, 933-942, 1998b.
- NEVADO, J. J. B.; CABANILLAS, C. G.; FLORES, J. R.; SALCEDO, A. C.; LLERENA, M. J. V. - Rapid Spectrophotometric Method for Determination Erythrosine, Amaranth and Tartrazine in Ternary Mixture. *Analytical Letters*, v. 30, nº 14, 2565-2578, 1997.
- NEVADO, J. J. B.; FLORES, J. R.; LLERENA, M. J. V.; SALCEDO, A. C. - Simultaneous Determination of Carmine Acid, Riboflavin, Curcumin and Erythrosine by Derivative Spectrophotometric and Ratio Spectra Derivative. *Talanta*, v. 41, 789-797, 1994.
- NI, Y.; GONG, X. - Simultaneous spectrophotometric determination of mixtures of food colorants. *Analytica Chimica Acta*, v. 354, 163-171, 1997.
- OHLWEILER, O. A. - Fundamentos da Análise Instrumental Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro, RJ, 486p, 1991.

- OZDEMIR, Y.; AKKAN, A. A. - Determination of Patent Blue V and Carmoisine in Gelatine Desserts by Derivative Spectrophotometric. *Turkish Journal of Chemistry*, v. 23, 221-229, 1999.
- PALLOTTI, G.; BENCIVENGA, B.; MAURIZIO, G.; GIABBAI, M.; PALMIOLI, A.; ROSATELLI, I. - Método Spetrofotometrico por la Determinazione Simultanea di Coloranti Sinteci Idrosolubili Negli Alimenti e nelle Bevande. *Bolletino dei Chimici dell'Unione Italiana Dei Laboratori Provinciali*, v. 7, 217-230, 1977.
- PASARELLI, R. J.; JACOBS, E. S. - High pressure liquid chromatography analysis of dyes and intermédiates. *Journal of Chromatography Science*, v. 13, 153-157, 1975.
- PEARSON, D. - The identification of EEC Food Colours. *Journal Association Publish Analysis*, v. 11, 127-134, 1973.
- PEARSON, D. - General Methods for Additives and Contaminants. In: *The Chemical Analyses of Food*. 7th ed. Churchill Livingstone - Edimburgh, London, N. Y, 1976.
- PÉREZ-URQUIZA, M.; BELTRÁN, J. L. - Determination of Dyes in Foodstuffs by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal Chromatography A*, v. 898, 271-275, 2000.
- PERRY, A. R.; WOOLEY, D. G. - The Identification of Some Water-Soluble Food Colors by Thin-Layer Chromatography. *Journal of Association Publish Analysts*, v. 7, 94-98, 1969.
- PRADO, M. A. - Metodologia para determinação de corantes artificiais em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência. (Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, capítulo 2, 1998.
- PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Determinação dos corantes artificiais em pó para gelatina por CLAE. *Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Rio de Janeiro/RJ, Brasil, nº 384, 1998.
- 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, nº 16, 2455-2472, 2002.
- PRADO, M. A.; VILAS BOAS, L. F.; BRONZE, M. R.; GODOY, H. T. - Controle Analítico de Corantes Artificiais em Bebidas Alcoólicas por Eletroforese Capilar. *Analytica*, v. 1, nº 1, 52-56, 2002.

- PUTTERMANS, M. L.; DRYON, L.; MASSART, D. L. - Ion-Pair HPLC of Synthetic Water-Soluble Acid Dyes. *Journal of the Association Official Analytical Chemists*, v. 64, 1-8, 1981.
- PUTTERMANS, M. L.; DRYON, L.; MASSART, D. L. - Isolation, Identification and Determination of Food Dyes Following Ion-Pair Extraction. *Journal of the Association Official Analytical Chemists*, v. 65, 737-744, 1982.
- QUEIJA, C.; QUEIRÓS, M. A.; RODRIGUES, L. M. - A cor dos Alimentos. *Química – Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, v. 80, 6-11, 2001.
- 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, nº 1, 5-11, 1996.
- REYES, F. G. R.; PRADO, M. A. - JECFA - Aditivos e Contaminantes Alimentares - *Notícias ILSI Brasil*, ano 9, nº 1, setembro 2001.
- RIBEIRO-CUNHA, M. R.; CARDOSO, M. G.; NELSON, D. L. ; JOKL, L. - Alguns métodos qualitativos para diferenciar corantes vermelhos e amarelos estruturalmente semelhantes em alimentos. *Revista Ciência Tecnologia de Alimentos*, v. 16, nº 1, 6-11, 1996.
- RIEDEL, G. - Controle Sanitário dos Alimentos, São Paulo, Loyola, 445 p, 1987.
- RING, J.; BROCKOW, K.; BEHRENDT, H. - Adverse Reactions to Foods. *Journal Chromatography B*, v. 756, 3-10, 2001.
- RIZOVA, V.; STAFILOV, T. - XAD-2 HPTLC Method of Identification and Determination of Some Synthetic Food Colorings. *Analytical Letters*, v. 28, 1305-1316, 1995.
- SAYAR, S.; OZDEMIR, Y. - First-Derivative Spectrophotometric Determination of Ponceau 4R, Sunset Yellow and Tartrazine in Confectionery Products. *Food Chemistry*, v. 61, 367-372, 1998.
- SCLAR, R. N.; FREEMAN, K. A. - Chromatographic Procedures for the Separation of Water-soluble Acid Dyes Mixtures. *Journal of the Association Official Analytical Chemists*, v. 73, nº 6, 829-837, 1990.

- SINGH, M. - Automation HPLC Determination of Uncobined Intermédiantes of in FD and C Red nº 40. *Journal of the Association Official Analytical Chemists*, v. 72, nº 6, 1342-1347, 1982.
- SOARES, L. M. V.- Como Obter Resultados Confiáveis em Cromatografia. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 60, nº 1, 79-84, 2001.
- SUZUKI, S.; SHIRAO, M.; AIZAWA, M.; NAKAZAWA, H.; SASA, K.; SASAKAWA, H. - Determination of Synthetic Food Dyes by Capillary Electrophoresis. *Journal Chromatography A*, v. 680, 541-547, 1994
- TAKAHASHI, M. Y.; YABIKU, H. Y.; MARSIGLIA, D. A. P. - Determinação quantitativa de corantes artificiais em alimentos. *Revista Instituto Adolfo Lutz* v. 48, nº 1/2, 7-15 1988.
- TAVARES, M. F. M. - Eletroforese capilar: Conceitos Básicos. *Química Nova*, v. 19, nº 2, 173-181, 1996.
- TOLEDO, M. C. .F.; GUERCHON, M. S. - Corantes artificiais em alimentos. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 10, nº 1, 120-136, 1990.
- ULBERTH, F. - Optimizing methods by ruggedness testing. In: Analytical quality assurance and good laboratory practice in dairy laboratories. *International Seminar of Association Official Analytical Chemists*. Association Official Analytical Chemists International, CEC, IDF, VDM, Germany, Int. Dairy Federation, Belgium, v. 9302, 202-203, 1992.
- VALIM, M. F. C. F. A. - Avaliação do efeito de corantes orgânicos sintéticos artificiais na função respiratória mitocondrial (dissertação de mestrado em ciências de alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.
- VETORAZZI, G. - Toxicological profiles of food colorants In: *Handbook of international food regulatory toxicology*. Lancaster, MTP Press, v. 2, 13-86, 1981.
- WALFORD, J. - Developments in food colours.- The developments series , v. 1, 259p, *Applied Science Publishers LTD*, 1980.
- WARD, N. I. - Assessment of chemical factors in relation to child hyperactivity. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*; v. 7, nº 4, 333-342, 1997.

- WILRICH, P. - Role of statistic in analytical quality assurance. In: Analytical quality assurance and good laboratory practice in dairy laboratories. *International Seminar of Association Official Analytical Chemists*. Association Official Analytical Chemists International, CEC, IDF, VDM, Germany, 1992, Int. Dairy Federation, Belgium, v. 9302, 61-79, 1993a.
- WILRICH, P. - Importance of the limit of detection and the limit of determination in chemical analysis and their statistical assessment. In: Analytical quality assurance and good laboratory practice in dairy laboratories. *International Seminar of Association Official Analytical Chemists*. Association Official Analytical Chemists International, CEC, IDF, VDM, Germany, 1992, Int. Dairy Federation, Belgium, v. 9302, 190-201, 1993b.
- WYNIA, G. S.; WINDHORST, G.; POST, P. C.; MARIS, F. A. - Development and validation of a capillary electrophoresis method within a pharmaceutical quality control environment and comparison with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 773, 339-350, 1997.
- YAMAZAKI, H.; ITO, M.; FUJIWARA, M.; YAMAGUCHI, T.; YAMAUCHI, A.; KAKIUCHI, Y. - Effect of food additives on rabbit platelet function. II. *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 40, n° 1, P41, 1994
- YAMAZAKI, H.; AKIEDA, S.; TANAKA, Y.; YOKOI, T.; YAMAGUCHI, T. - Effect of food additives yellow colors on rabbit platelet function. *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 43, n° 1, P6, 1997.
- YANUKA, Y.; SHALON, Y.; WEISSENBERG, E.; NIR-GROSFELD, I. - The Isolation and Separation of Dyes from Foodstuffs by Column Chromatography. *Analyst*, v. 88, 872-876, 1963.
- YOUNG, M. L. - Rapid Determination of Color Additives, Using the C₁₈ Cartridge, *Journal of the Association Official Analytical Chemists*, v. 67, n° 5, 1022-1024, 1984.
- ZIENA, H. M. S.; YOUSSEF, M. M.; AMAN, M. E. - Quality attributes of black olives as affected by different darkening methods. *Food Chemistry*, v. 60, n° 4, 501-508, 1997.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de Metodologia para Determinação, por CLAE, de Corantes Artificiais em Bebidas Alcoólicas

**Marcelo Alexandre Prado^a, Luis Felipe Vilas Boas^b, Maria do Rosário Bronze^b,
Helena Teixeira Godoy^a**

^aDepartamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp – Campinas -
C.P. 6121 - CEP 13083-970- Brasil

^bDepartamento de Química, Instituto de Tecnologia Química e Biológica – Universidade Nova de Lisboa -
Apartado 127 Av. da República (EAN) 2781-901 - Oeiras - Portugal

Desenvolvimento de Metodologia para Determinação, por CLAE, de Corantes Artificiais em Bebidas Alcoólicas

**Marcelo Alexandre Prado^{a*}, Luis Felipe Vilas Boas^b, Maria do Rosário Bronze^b,
Helena Teixeira Godoy^a**

^aDepartamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp – Campinas -
C.P. 6121 - CEP 13083-970- Brasil

^bDepartamento de Química, Instituto de Tecnologia Química e Biológica – Universidade Nova de Lisboa -
Apartado 127 Av. da República (EAN) 2781-901 - Oeiras - Portugal

*Bolsista CNPq - Brasil

Resumo

Corantes artificiais foram determinados por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) em amostras de bebidas alcoólicas. As análises foram realizadas com coluna Microsorb-MV, da marca Varian, ODS-2, de 250 mm x 4,6 mm d.i., com 5 µm de diâmetro de partícula. Foi utilizado um sistema de gradiente para a eluição de todos os corantes artificiais composto de água e metanol. Utilizaram-se três comprimentos de onda na região do visível para a detecção e quantificação dos onze corantes artificiais permitidos no Brasil, sendo 450 nm para os corantes amarelos, 525 nm para os vermelho e 625 nm para os azuis. Os limites de detecção obtidos ficaram na faixa de 0,1 a 0,4 µg/mL e os limites de quantificação na ordem de 0,2 a 1,3 µg/mL. Taxas de recuperação, em dois níveis de concentração para todos os corantes, foram da ordem 96,4 a 102,2%. Os valores de repetibilidade calculados para padrões e amostra demonstraram a precisão do método. Analisaram-se 45 amostras de bebidas alcoólicas de diferentes fabricantes brasileiros, sendo: 6 aguardentes aromatizadas, 9 *coolers*, 7 aperitivos, 3 coquetéis, 8 licores e 12 vinhos tinto. Em nenhuma das amostras de aperitivo e vinho foi encontrado corante artificial, já nos licores foram encontrados corantes artificiais em seis das oito amostras analisadas. Coquetéis e aguardentes aromatizadas, todos apresentaram corantes em sua composição. Em uma amostra de *cooler* foi encontrado traços do corante tartrazina (E-102), e em uma amostra de aperitivo um corante não identificado. Observou-se que foram

respeitados os limites determinados pela legislação brasileira para o uso desses corantes nas amostras analisadas.

Palavras-chaves: corantes, validação, CLAE

Abstract

Synthetic dyes were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) in alcoholic beverages. Analyses were carried out with Microsorb- MV column, Varian, ODS-2, of 250 mm x 4,6 mm i.d., with 5 μ m of particle diameter. A gradient system for the elution of all dyes was used, composed of water and methanol. Three wavelengths in the visible region were utilized for the detection and the quantification of the eleven synthetic dyes permitted for use in Brazil: 450, 525 and 625 nm for the yellow, red and blue dyes, respectively. The detection and quantification limits were 0.1 to 0.4 μ g/mL and 0,2 to 1,3 μ g/mL, respectively. Recovery percentages at two levels of concentration for all dyes were of the order of 96,4 102,2%. The values of repeatability calculated for standards and samples demonstrated the precision of the method. Forty-five alcoholic beverage samples of different Brazilian manufacturers were analyzed: 6 perfumed spirits, 9 coolers, 7 bitters, 3 cocktails, 8 liquors and 12 red wines. Synthetic dyes were not found in samples of aperitif and wine but were encountered in six of the eight samples of liquors analyzed. Perfumed cocktails and spirits all presented dyes in their composition. A traces of the tartrazine (E-102) was found in a sample of cooler and an unidentified dye in an bitter sample. It was observed that the limits permitted by Brazilian Legislation for the use of these synthetic dyes were respected in the analyzed samples.

Key-words: colors, validation, HPLC

1. Introdução

O emprego de corantes artificiais em bebidas, assim como nos alimentos em geral, é bastante difundido, principalmente para aumentar sua aceitabilidade frente aos consumidores, tendo em vista o grande número de produtos deste gênero disponíveis no mercado.

Desta forma vários métodos, utilizando diferentes técnicas analíticas, têm sido empregados na determinação desses aditivos. Entre essas técnicas estão os métodos espectrofotométricos ^{1, 2} e os clássicos métodos cromatográficos, como a cromatografia em papel ^{3, 4}, camada delgada ^{5, 6} e coluna aberta ^{7, 8}. Embora a simplicidade dos equipamentos utilizados e o baixo custo sejam o maior atrativo dessas técnicas, os métodos que as empregam são demorados e produzem dados com baixa exatidão e precisão.

Os desenvolvimentos de equipamentos e de colunas cromatográficas mais eficientes fizeram da CLAE (cromatografia a líquido de alta eficiência) uma técnica bastante atrativa no controle desses aditivos ⁹⁻¹⁶. Corantes sintéticos em produtos alimentícios são predominantemente compostos azos e trifênilmetanos, formando sais de ácido em solução, o que torna os tampões e pares iônicos bastante utilizáveis nos métodos por CLAE, para a separação dos mesmos.

Atualmente busca-se desenvolver metodologias analíticas que permitam a determinação simultânea de vários compostos, com rapidez, custos relativamente baixos e que garantam resultados confiáveis ¹⁷. Neste sentido, a CLAE apresenta-se como uma das técnicas mais apropriadas, incluindo precisão, exatidão e alta capacidade de detecção, mesmo para compostos presentes em quantidades muito baixas e em matrizes complexas, como os alimentos ¹⁸.

A qualidade dos dados analíticos é um fator importante para o conhecimento dos teores reais existentes nos alimentos, visando a garantia da segurança alimentar. A AOAC (Association of Official Analytical Chemists) vem estimulando o controle da qualidade analítica através de planejamentos e análises estatísticas variadas ¹⁹⁻²¹. No Brasil, a validação dos métodos analíticos tem sido uma preocupação dos pesquisadores, mas pouco se tem relatado sobre a validação de novos métodos para corantes artificiais.

A validação visa garantir que o método a ser utilizado esteja adequado ao que se propõe identificar e quantificar, assegurando resultados que se enquadrem às necessidades dos problemas em questão. Existem várias maneiras de se validar um método analítico, as quais dependem do objetivo da análise²²⁻²⁴. Para isto são necessários vários parâmetros^{21, 24,25}, onde os mais utilizados são:

1.1.Exatidão

Pode ser interpretada como o quão distante está o valor encontrado do valor real para a amostra em estudo, quanto menor a distância mais exato é o método. Esses valores podem ser avaliados através de análises de materiais de referência, comparação com métodos considerado exatos ou pela avaliação das taxas de recuperação em amostras adicionadas de padrões^{22, 24, 26, 27}.

1.2. Precisão

Pode ser definida como o grau de concordância entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições experimentais²⁷. Ao desenvolver um método analítico, vários fatores intrínsecos podem contribuir para os erros, afetando de forma aleatória a precisão²⁴. Essa variabilidade pode ser avaliada através da repetibilidade e da reprodutibilidade do método^{22-24,28}. A repetibilidade é a maior diferença aceitável entre duas medições sucessivas, nas mesmas condições analíticas, mesmo laboratório, equipamentos e em intervalos curtos de tempo. A reprodutibilidade difere da repetibilidade por utilizar laboratórios, operadores e equipamentos diferentes, entre outros^{23, 24}.

1.3. Sensibilidade

Definida como a capacidade que um método apresenta em diferenciar duas medidas próximas de concentração de seus analitos, com um certo nível de confiança. Será mais sensível o método quanto maior for a inclinação de sua curva de calibração²²⁻²⁴. Parâmetros como a relação sinal/ruído, propriedades físico-químicas do analito e composição da matriz podem afetar a sensibilidade. Os limites de detecção e quantificação são os principais indicativos da sensibilidade do método²⁴.

No presente trabalho foi validado um método utilizando a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna de fase reversa C₁₈ e sistema de gradiente de eluição água/metanol, para a separação e quantificação simultânea dos 11 corantes alimentícios usados como aditivos em bebidas. Depois de validado, este método foi aplicado a várias amostras de bebidas alcoólicas para a determinação dos teores de corantes artificiais.

2. Experimental

2.1. Material e equipamentos.

2.1.1. Amostras

Para o desenvolvimento e validação do método utilizou-se uma amostra de vinho tinto nacional. Na aplicação da metodologia validada foram utilizadas como amostras 6 aguardentes aromatizadas, 9 *coolers*, 3 coquetéis, 7 aperitivos (*bitters*), 8 licores e 12 vinhos tinto de diversos fabricantes brasileiros. Para cada amostra foram adquiridos três diferentes lotes. Cada lote foi formado pela homogeneização completa de duas garrafas. As amostras de bebidas foram filtradas em filtro tipo HAWP0013 (Millipore) de 0,45µm de poro (com sistema de seringa) e degaseificadas por agitação mecânica. Todas as análises foram feitas em duplicata.

2.1.2. Padrões

Os padrões de corantes artificiais, tartrazina (E-102), amarelo crepúsculo (E-110), azorrubina (E-122), amarantho (E-123), ponceau 4R (E-124), eritrosina (E-127), vermelho 40 (E-129), azul patente V (E-131), indigo carmim (E-132), azul brilhante FCF (E-133) e verde rápido (E-143) foram adquiridos da Importadora Brastóquio Ltda. Preparou-se uma solução estoque contendo todos os corantes na concentração de 40 µg/mL cada, e a partir desta, foram feitas outras soluções diluídas de menor concentração. As soluções de corantes artificiais foram preparadas usando água do sistema Milli-Q (Millipore).

2.1.3. Reagentes

Foram utilizados metanol grau cromatográfico (Omnisolv) e acetato de amônio (Merck). As fases móveis foram todas filtradas em filtros HAWP0047 (Millipore), com diâmetro de poro de 0,45 μm e degaseificadas com sistema de borbulhamento com hélio.

2.1.4. Equipamento

Trabalhou-se com um cromatógrafo a líquido de alta eficiência UNICAM modelo Crystal, com amostrador automático Crystal 230, com injetor de alça de amostragem de 10 μL de capacidade, e sistema de bomba quaternária Crystal 200, acoplado a um detector de arranjo de diodos Crystal 240. O sistema foi controlado, assim como a aquisição de dados, por um computador Shine 486 através do programa UICS (Unicam Integrated Control Software) da UNICAM.

Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna analítica Microsorb-MV, marca Varian, ODS-2 de 250 mm x 4,6 mm d.i., com 5 μm de diâmetro de partícula, protegida por uma coluna de guarda Micropore 30 mm x 4,6 mm d.i., ODS-2 de 5 μm .

3. Método

Após a filtração e degaseificação, de aproximadamente 200 mL, as amostras foram injetadas diretamente no equipamento. Os onze corantes sintéticos foram separados na CLAE através de um sistema de eluição por gradiente, com vazão de 0,5 mL/min. Antes de cada injeção uma fase móvel preparativa, H_2O /Metanol (80:20 v/v) + 0,08 mol/L de acetato de amônio, era passada pela coluna durante 5 min. Após esse período, a amostra era injetada e ocorria a mudança de fase móvel para 80% de água e 20% de metanol que permanecia durante 4 min., trocando para 70% de água e 30% de metanol, e permanecendo assim até 27 min., em seguida outra mudança para 30% de água e 70% de metanol até 32 min. E, retornando a 80% de água e 20% metanol após 35 min. Após o retorno às condições iniciais a coluna era re-equilibrada por 5 min. com a fase móvel preparativa. Os corantes artificiais foram detectados na região do visível, usando o detector de arranjo de diodos (DAD) operando a 450 nm para os amarelos, 525 nm para os vermelhos e 625 nm para os azuis. A identificação foi feita através da comparação dos tempos de retenção dos padrões

analisados nas mesmas condições analíticas, co-cromatografia e espectros de absorção obtidos pelo detector de arranjo de diodos. A quantificação foi realizada por padronização externa, sendo a curva construída utilizando-se 7 (sete) níveis de concentração, onde cada ponto foi representado pela média de três determinações ²⁹.

4. Validação do Método

Os limites de detecção (LOD) foram inicialmente estimados com padrões realizando-se sucessivas diluições e determinando a menor quantidade detectável, aproximadamente aquela que apresenta o sinal (S) três vezes o valor da amplitude do ruído (R) do equipamento ($3 \times S/R$). Para a determinação do LOD nas amostras, concentrações próximas, maiores e menores, ao limite de detecção encontrado para cada padrão de corante foram adicionadas ao vinho. Após a adição utilizaram-se os mesmos critérios para os limites aplicados aos padrões. Os limites de quantificação foram considerados as concentrações correspondentes a dez vezes o valor da relação sinal/ruído ($10 \times S/R$) para cada corante ^{24, 29, 30}.

Foram realizados testes de recuperação de padrões, adicionados ao vinho, em dois diferentes níveis de concentração ²⁴. A repetibilidade foi avaliada através de dez determinações realizadas em soluções padrão e na amostra de vinho. A repetibilidade foi calculada segundo Caulcutt e Boddy ²⁷ através da fórmula:

$$R = t (2\sigma)^{1/2}$$

onde: t - 2,26 (de acordo com a Tabela B de Caulcutt e Boddy)

R - repetibilidade, com 5% de significância

σ - estimativa de desvio padrão

5. Resultados e discussão

A **Tabela 1** mostra os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação para onze corantes artificiais quando adicionados ao vinho. Os limites de detecção e quantificação foram comparáveis aos encontrados por Prado e Godoy ^{9, 24}, e inferiores aos apresentados por Chen et al. ³¹.

Tabela 1

Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) determinados no vinho adicionado de padrões.

	Corantes (µg/mL)										
	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-127	E-129	E-131	E-132	E-133	E-143
LOD (3 x S/R)	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,2	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1
LOQ (10 x S/R)	0,6	0,9	1,3	0,8	1,1	0,6	0,9	0,2	0,8	0,4	0,3

As equações das curvas de padronização externa estão apresentadas na **Tabela 2**. Através do coeficiente de correlação (r^2) pode-se observar a boa linearidade na faixa de trabalho utilizada, com valores acima de 0,998.

Tabela 2

Equações de Regressão Linear* para corantes sintéticos na concentração de 0,5 a 40 µg/mL

corante	<i>a</i>	<i>b</i>	r^2
E-102	3,0083	-1,9564	0,9997
E-110	2,0651	-1,2612	0,9993
E-122	1,6217	-5,7793	0,9994
E-123	2,5628	4,9569	0,9998
E-124	2,4273	1,0797	0,9989
E-127	4,4346	4,4319	0,9993
E-129	3,2740	-4,7091	0,9999
E-131	5,1858	1,8817	0,9992
E-132	3,0832	-4,4545	0,9999
E-133	4,8169	14,28	0,9987
E-143	6,0607	1,1947	0,9999

* $y = ax + b$, onde: y corresponde à área do pico; a é a inclinação da reta; b é a interseção no eixo; x é a concentração de corante na amostra em µg/mL e r^2 é o coeficiente de correlação.

As taxas de recuperação, para os onze corantes analisados (**Tabela 3**), variaram entre 95-103%, nos dois níveis de enriquecimento realizados no vinho. Esses valores indicam uma taxa de recuperação adequada, nos níveis analisados. As porcentagens de recuperação encontradas neste trabalho são um pouco superiores às determinadas por Graichen ³³ e Graichen e Molitor ⁸, mas muito próximas às obtidas por Prado e Godoy ²⁴ e Ashkenazi et al. ³⁴.

Tabela 3

Recuperação dos padrões adicionados ao vinho em dois diferentes níveis de concentração.

NÍVEIS	Corantes										
	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-127	E-129	E-132	E-133	E-131	E-143
I*											
(µg/mL)	26,1	24,9	25,0	25,6	24,5	26,0	25,2	24,8	24,7	25,0	25,1
recuperação											
%	99,5	99,1	98,2	100,1	96,8	96,5	102,2	95,2	98,1	100,0	97,7
II*											
(µg/mL)	54,0	50,0	48,0	63,0	54,1	54,2	50,0	62,1	46,3	51,2	57,0
recuperação											
%	99,8	98,5	97,8	103,2	96,4	97,0	101,3	97,4	97,4	99,3	98,0

I e II representam os dois diferentes níveis de concentração (µg /mL)

*média de determinações em duplicata

Para que a metodologia apresente bons índices de repetibilidade é necessário que a diferença entre os valores observados (desvio padrão) sejam menores que os valores calculados pela equação $R=t(2\sigma)^{1/2}$ ²⁷. Através da **Tabela 4** pode-se observar que a metodologia apresentou bons níveis de repetibilidade, já que para todos os corantes os valores calculados foram sempre superiores aos observados.

Tabela 4

Repetibilidade dos corantes adicionados ao vinho e em solução padrão

		Corantes										
	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)*	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-127	E-129	E-132	E-133	E-131	E-143
vinho		26,1	24,9	25,0	25,6	24,6	26,0	25,3	24,8	24,7	25,1	25,1
	desvio padrão	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,6	0,1	0,1	0,1
	repetibilidade	1,0	1,4	1,4	1,4	1,4	2,0	2,0	2,5	2,0	2,0	2,0
padrão	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)*	24,0	25,1	28,0	23,1	24,2	24,3	25,1	22,1	26,3	25,3	27,0
	desvio padrão	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1
	repetibilidade	1,0	1,4	1,4	1,0	1,0	1,8	1,4	2,0	1,0	1,0	1,0

nível de confiança de 95%

* média de dez determinações

A **Figura 1** mostra os cromatogramas da amostra de vinho adicionado dos onze padrões de corantes artificiais, analisada pela metodologia aqui descrita.

Na CLAE, a utilização de sistemas com fases móveis tamponadas apresentam grande vantagem, principalmente pela não utilização do par-iônico e pelo menor tempo de condicionamento necessário para o sistema cromatográfico.

O uso de uma fase móvel tamponada no condicionamento da coluna foi significativo, pois a presença do tampão melhorou a resolução entre os corantes E-102, E-110, E-123, E-124 e E-132. Tais dados coincidem com os encontrados para sistemas tamponados para separação de misturas de padrões de corantes artificiais³⁵. A fase móvel tamponada pode afetar de duas maneiras a afinidade do composto para com a fase estacionária, o tampão pode ser utilizado para suprir a ionização e/ou para reduzir a solubilidade do corante pela fase móvel³⁶. Esses dados confirmaram a eficiência de fases móveis tamponadas na separação dos corantes artificiais^{36,37}.

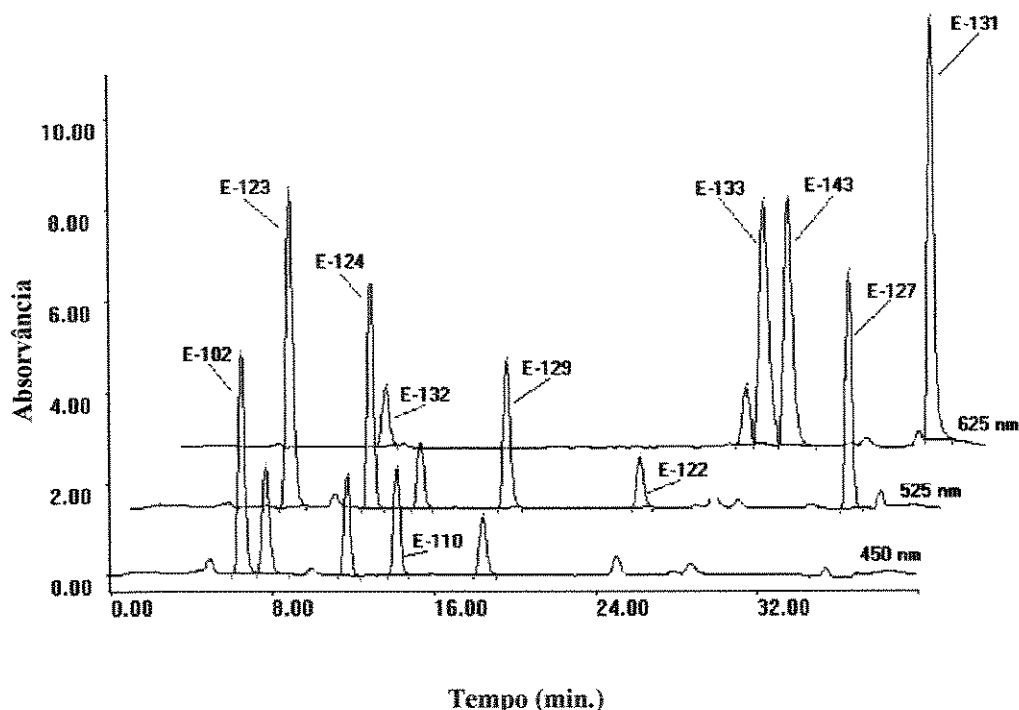


Figura 1. Cromatogramas de amostra de vinho adicionado de corantes artificiais. Condições cromatográficas descritas no texto.

Embora a técnica utilizando o par-iônico seja a mais recomendada para a análise de corantes artificiais ^{7, 36}, o uso desses compostos apresenta sempre o inconveniente de longos períodos de condicionamento. A utilização de brometo de cetiltrimetilamônio (cetrimida) pode necessitar de um período equivalente a dois dias para condicionamento do sistema ⁹.

O sistema por gradiente desenvolvido garantiu a separação dos onze corantes artificiais utilizados no Brasil, num espaço de tempo equivalente aos encontrados em outros sistemas de eluição por gradiente, no entanto para a separação de um menor número de corantes artificiais ³¹. O aumento da concentração de metanol após 26 minutos de corrida se justifica para melhorar a eluição dos últimos corantes (nomeadamente E-127 e E-131), assim alterando-se a força cromatográfica da fase móvel foi possível eluir esses corantes de forma mais rápida.

Os dados de quantificação das amostras analisadas pelo método aqui validado estão na **Tabela 5**. Nesta não estão apresentadas as amostras em que não foi detectada a presença de corantes artificiais.

Tabela 5

Teores de corantes artificiais presentes em bebidas alcoólicas (µg/mL)

produto	amostra	E-102	E-110	Corante* E-123	E-127	E-133
aguardente	amt1			10,0±0,1		
	amt2	9,7±0,2				
	amt3	36,85±0,02	40,3±0,4			
	amt5	37,7±0,4				
	amt6				10,7±0,3	
	amt7	34,8±0,3				
cooler	amt8	traços				
coquetel	amt24					14,1±0,2
	amt25			43,4±0,3		
	amt26	14,3±0,3				16,0±0,3
liquor	amt27					36,2±0,4
	amt28		35,3±0,4	28,3±0,3		
	amt29	31,3±0,4				14,1±0,2
	amt30	55,6±0,6				44,7±0,5
	amt31					
	amt32					41,2±0,5
	amt33					
	amt34	20,7±0,2				30,5±0,3

*média e estimativa de desvio padrão (n=6)

As aguardentes aromatizadas são bebidas à base de aguardente de cana, aromas e corantes, sendo que em todas as amostras aqui analisadas foram encontrados corantes artificiais em sua composição. O mesmo ocorreu com as três amostras de coquetéis que são bebidas alcoólicas artificiais, produzidas misturando-se principalmente aromas, corantes e álcool. Nos licores o uso de corantes artificiais também é bastante difundido. Em seis, das oito amostras de licores analisadas constatou-se a presença de corantes artificiais em sua composição.

Nas amostras de aperitivo não foram encontrados corantes artificiais. Em uma das amostras de aperitivo (amt19), há suspeita da presença de um corante natural, a cochonilha (E-120), que é declarado no rótulo pelo fabricante. Sua confirmação não pode ser realizada pela ausência do padrão.

Os *coolers* são bebidas alcoólicas carbonatadas à base de vinhos e sucos de frutas, assim é de se esperar a ausência de corantes artificiais em sua composição, fato confirmado

em oito das nove amostras. Em apenas uma amostra (amt8) encontrou-se traços do corante tartrazina (E-102).

Em nenhuma das 12 amostras de vinhos tinto analisadas foi encontrado corante artificial, o que demonstra que essa prática não vem sendo adotada no Brasil pelos vinicultores.

Em nenhuma das amostras os teores determinados ultrapassaram os valores estabelecidos pela legislação brasileira.

Os espectros de absorção, utilizados como um dos parâmetros de identificação, dos onze corantes artificiais analisados neste trabalho se encontram no **Anexo 1**. Na **Figura 2** estão apresentados os cromatogramas de três amostras analisadas.

6. Conclusões

O método utilizando a cromatografia a líquido de alta eficiência desenvolvido, validado e aplicado para a determinação de corantes artificiais em bebidas mostrou-se bastante eficiente na separação e quantificação desses aditivos. Para os onze corantes estudados, os parâmetros analisados na validação apresentaram bons índices, mostrando a aplicabilidade da metodologia para a determinação dos corantes sintéticos em bebidas.

O emprego de corantes pelas indústrias fabricantes de bebidas alcoólicas demonstrou estar dentro das normas exigidas pela legislação brasileira, garantindo assim um bom controle nos processos de fabricação desses produtos.

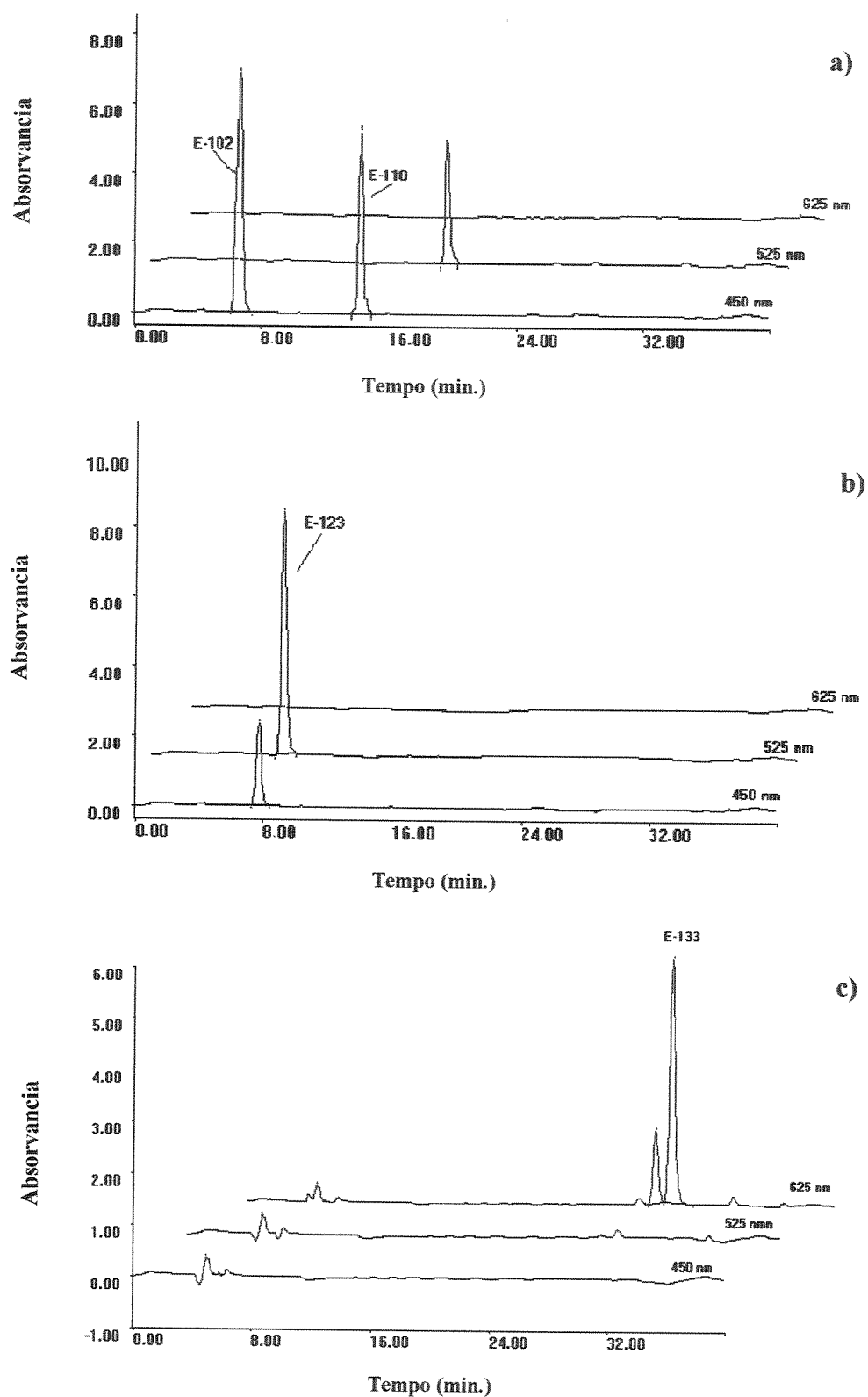


Figura 2. Cromatogramas de amostras de (a) aguardente (amt3); (b) coquetel (amt25); e (c) licor (amt27). Condições cromatográficas descritas no texto

7. Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Luis Vilas Boas e à Profa. Maria do Rosário Bronze pela oportunidade e orientações prestada durante o estágio, decorrido em seus laboratórios em Oeiras, Portugal. Agradecemos também ao CNPq pela bolsa sanduíche e à CAPES pela bolsa de doutorado concedidas ao aluno M.A. Prado.

8. Referências Bibliográficas

1. HOFER, K.; JENEWEIN, D., QUICK - *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung A/Food Research and Technology*. **1997**, 204 (1), 32.
2. KAGUEI, S.; SATO, H. - *Analytical Chimica Acta*. **1992**, 265, 55.
3. CHO, T.H.; CHO, J. H.; YANG, Y.K. - Reprinted from: *The Research Reports of Office of Rural Development*. **1975**, 17 (5), 87.
4. PEARSON, D. - In: *The Chemical Analyses of Food*. 7th ed. Churchill Livingstone - Edimburgh, London, N. Y, 1976.
5. TOLEDO, M.C.F.; GUERCHON, M.S. - *Revista Ciência Tecnologia de Alimentos*. **1990**, 10, (1), 120.
6. RIBEIRO-CUNHA, M.R.; CARDOSO, M.G.; NELSON, D.L.; JOKL, L. - *Revista Ciência Tecnologia de Alimentos*. **1996**, 16, (1), 6.
7. YANUKA, Y.; SHALON, Y.; WEISSENBERG, E.; NIR-GROSFELD, I. - *Analyst*. **1963**, 88, 872.
8. GRAICHEN, C.; MOLITOR, J.C. - *Journal of the AOAC*. **1963**, 46 (6), 1022.
9. PRADO, M.A.; GODOY, H.T. - *Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos*. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas 1998.
10. GRATZFELD-HÜSGEN, A.; SCHUSTER, R. - Application Note, catalog Hewlett Packard, publication number. **1995**, 12-5964-3559E.
11. GREENWAY, G.M.; KOMETA, N.; MACRAE, R. - *Analytical Methods Section*. **1992**, 43, 137.
12. WHITE, P.C.; HARBIN, A. - *Analyst*. **1989**, 114, 877.

13. BERZAS, J.J.; GUIBERTEAU, C.; CONTENTO, A.M. - *Journal Of Chromatography A*. **1997**, 20 (18), 3073.
14. GENARO, E.M.C. - *Journal Of Chromatography A*. **1997**, 767, 87.
15. ISHIKAWA, F.; SAITO, K.; NAKAZATO, M.; FUJIMUMA, K., MORIYASU, T.; NISHIMA, T. – Kenkyu Nempo-Tokyo-Toritsu Eisei Kenkyusho, 42 (1990) 141, C.A. 115 (1990) 27802t.
16. ISHIKAWA, F.; SAITO, K.; NAKAZATO, M.; FUJIMUMA, K., MORIYASU, T.; NISHIMA, T. – Kenkyu Nempo-Tokyo-Toritsu Eisei Kenkyusho, 42 (1991) 141; C.A. 117 (1991) 210874y..AGOSTINI,T.A. - *Tese de doutorado em Ciência de Alimentos*, Faculdade de Engenharia de Alimentos UNICAMP, Campinas (1997).
17. MACRAE, R. - *HPLC in food analysis*” Academic Press, London, 2th, 1990.
18. ULBERTH, F. *International Seminar of AOAC*. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Alemanha, Int. Dairy Federation, Belgium. **1992**, 9302, 202.
19. WILRICH, P. - *International Seminar of AOAC*. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Alemanha, Int. Dairy Federation, Belgium. **1992**, 9302, 61.
20. WERMINONT, G.T. - *Use of statistics to development and evaluate analytical method*. AOAC, Virginia, 183p, 1985.
21. CHASIN, A.A.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVATORI,M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO,S. - *Revista Brasileira de Toxicologia*. **1998**, 11 (1), 37.
22. LEITE, F. - *Validação em Análise Química*. 3 ed., Editora Átomo, 224p, 1998.
23. RAMOS, K.L. - *Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos*, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas. (2002).
24. PRADO M.A.; GODOY H.T. - *Journal of Liquid Chromotography & Related Technologies*. **2002**, 25 (16), 2455.
25. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S. ; ROY, E.B. - *Planejamento e Otimização de Experimentos*, 2ª ed., Campinas SP, editora UNICAMP, 1996.
26. CIOLA, R. *Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho HPLC*, 1st Ed.; Blücher, E., Ed.; São Paulo, SP, 1998.
27. CAULCUTT, R.; BODDY, R. - *Statistic for analytical chemists*. 1st. Ed., Chapman and Hall, London, 253 p, 1983.

-
28. SOARES, L.M.V.- *Revista Instituto Adolf Lutz*. **2001**, 60 (1), 79.
29. KAYALI-SAYADI, M.N.; RUBIO-BARROSO, S.; GARCIA-IRANZO, R.; POLO-DIEZ, L.M. - *Journal of Liquid Chromotography & Related Technologies*. **2000**, 23 (12), 1913.
30. FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; MARQUES, E.M.J.; FERREIRA, M.A. *Journal of Liquid Chromotography & Related Technologies*. **2000**, 23 (13), 2057.
31. CHEN, Q.; MOU, S.; HOU, X.; RIVIELLO, J.M.; Z. NI - *Journal Of Chromatography A*. **1998**, 827, 73.
32. GRAICHEN, C.- *J. Assoc. Off. Anal. Chem*, 58 (2), (1975) 278.
33. ASHKENAZI, P.; YARNITZKI, C.; CAIS, M.- *Analytical Chimica Acta*. 1991, 248, 289.
34. PUTTERMANS, M.L.; DRYON, L.; MASSART, D.L. - *Journal of the AOAC*. **1981**, 64, 1.
35. BOLEY, N.P.; BUNTON, N.G.; CROSBY, N.T.; JOHNSON, A.E.; ROPER, P.; SOMMERS, L. - *Analyst*. **1980**, 105, 589.
36. LAWRENCE, J.F.; LANCASTER, F.E.; CONACHER, H.B.S. - *Journal of Chromatography*. **1981**, 210, 168.

CAPÍTULO 3

Validação e Aplicação de Metodologia para Determinação Simultânea, por Eletroforese Capilar, de Corantes Artificiais em Bebidas Alcoólicas

**Marcelo Alexandre Prado^a, Luis Felipe Vilas Boas^b, Maria do Rosário Bronze^b,
Helena Teixeira Godoy^a**

^aDepartamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp – Campinas -
C.P. 6121 - CEP 13083-970- Brasil

^bDepartamento de Química, Instituto de Tecnologia Química e Biológica – Universidade Nova de Lisboa -
Apartado 127 Av. da República (EAN) 2781-901 - Oeiras - Portugal

Validação e Aplicação de Metodologia para Determinação Simultânea, por Eletroforese Capilar, de Corantes Artificiais em Bebidas Alcoólicas

**Marcelo Alexandre Prado^{a*}, Luis Felipe Vilas Boas^b, Maria do Rosário Bronze^b,
Helena Teixeira Godoy^a**

^aDepartamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp – Campinas -
C.P. 6121 - CEP 13083-970- Brasil

^bDepartamento de Química, Instituto de Tecnologia Química e Biológica – Universidade Nova de Lisboa -
Apartado 127 Av. da República (EAN) 2781-901 - Oeiras - Portugal

*Bolsista CNPq - Brasil

Resumo

Neste trabalho foi desenvolvido um método de análise para corantes artificiais utilizando a eletroforese capilar em bebidas alcoólicas. As análises foram realizadas com capilar de sílica com 73 cm de comprimento efetivo a 35°C, solução tampão de 10 mmol/L de fosfato e 10 mmol/L SDS, a pH 11 e 25 kV de voltagem. Para o sistema de detecção, três comprimentos de onda na região do visível foram utilizados para a determinação qualitativa e quantitativa dos onze corantes artificiais permitidos no Brasil, sendo que para os corantes amarelos usou-se 450 nm, para os vermelhos 525 nm e para os azuis 625 nm. Os limites de detecção e quantificação obtidos ficaram na faixa de 0,4 a 2,5 µg/mL e de 1,3 a 7,1 µg/mL, respectivamente. As taxas de recuperação dos corantes realizada em dois níveis de concentração foram da ordem de 92,6 a 104,0%. Na repetibilidade avaliada para padrões e amostra os valores calculados foram maiores que os observados, demonstrando dessa forma a precisão do método. Utilizando a metodologia desenvolvida e validada, analisaram-se várias amostras de bebidas alcoólicas, compondo-se de 12 vinhos tinto, 9 *coolers*, 6 aguardentes aromatizadas, 7 aperitivos, 3 coquetéis e 8 licores de diferentes fabricantes brasileiros. Os resultados mostraram que nos *coolers*, aperitivos e vinhos não há a presença de corantes artificiais, já nos licores foram encontrados corantes sintéticos em seis das oito

amostras analisadas. Em todas as amostras de coquetéis e aguardentes foi observada a presença de corantes artificiais. Em nenhuma amostra analisada o limite determinado pela legislação brasileira foi ultrapassado.

Palavras-chaves: corantes artificiais, validação, eletroforese capilar

Abstract

In this work a method of analysis for synthetic dyes was developed using capillary electrophoresis in alcoholic beverages. The analyses were carried out with fused silica capillary, with 73 cm of effective length, at 35°C, buffer phosphate solution of 10 mmol/L with SDS 10 mmol/L, pH 11, and 25 kV of voltage. For dye analyses, three wavelengths in the visible region were used for the qualitative and quantitative determination of the eleven synthetic dyes allowed in Brazil: 450 nm, 525 nm and 625 nm for the yellow, red and blue dyes, respectively. The detection limits varied from 0.4 to 2.5 µg/mL and the quantification limits varied from 1.3 to 7.1 µg/mL. The average recovery was 92.6% and 104.0% at two levels of concentration. Repeatability for standards and spiked sample showed that the calculated values were greater than the observed values, demonstrating the precision of the method. The proposed and validated method was used to analyse some alcoholic beverage samples, consisting of 12 red wines, 9 coolers, 6 aromatized spirits, 7 bitters, 3 cocktails and 8 liquors from different Brazilian manufacturers. The results showed the coolers, bitters and red wines did not have synthetic dyes, but in liquors synthetic dyes were found in six of the eight analyzed samples. In all the samples of cocktails and spirits the presence of dyes were observed. No analyzed sample exceeded the limit established by Brazilian Legislation.

Key-words: synthetic dyes, validation, capillary electrophoresis

1. Introdução

Vários métodos, utilizando diferentes técnicas analíticas, têm sido empregados na determinação de corantes sintéticos. Entre essas técnicas estão os métodos de identificação espectrofotométrica, baseados em cálculos computacionais e quantificação por regressão linear ^{1, 2}. No entanto, as técnicas mais comumente empregadas utilizam os métodos cromatográficos clássicos, como a cromatografia em papel ^{3, 4}, camada delgada ^{5, 6} e coluna aberta ^{7, 8}. Porém, análises quantitativas utilizando essas técnicas são muito demoradas e produzem dados com baixa exatidão e precisão, embora a simplicidade dos equipamentos utilizados seja inquestionável.

Uma das técnicas mais utilizadas para a análise de corantes artificiais, e considerada por muitos pesquisadores como sendo a mais importante, é a CLAE (cromatografia a líquido de alta eficiência), devido ao grande desenvolvimento dos equipamentos e recheios de colunas, tornando-as mais eficientes, fazendo da CLAE uma técnica bastante atrativa para o controle desses aditivos em alimentos e bebidas ⁹⁻¹⁶.

Nos últimos anos, a eletroforese capilar (EC) também vem sendo apontada como uma técnica bastante satisfatória para determinações simultâneas de diferentes compostos, entre eles os corantes artificiais ^{17, 18, 21}. Esta nova técnica tem apresentado maior versatilidade e simplicidade que as demais técnicas de separação empregadas, além de menores custos e maior durabilidade das colunas e menores tempos de análise e volumes de amostra ^{17, 19, 20, 22}.

Hoje em dia, a eletroforese é um nome genérico dado para uma série de técnicas de separação que envolvem a aplicação de um campo elétrico em um capilar preenchido com uma solução tampão ²³. A eletroforese capilar micelar (MEKC, do inglês micellar electrokinetic chromatography), por exemplo, foi inicialmente desenvolvida para a resolução de compostos neutros, os quais não podem ser separados usando simplesmente a eletroforese capilar por zona, onde o princípio de separação se baseia na presença de cargas, mas atualmente os tensoativos tem sido usados para resolver problemas nas separações, não só de compostos neutros, mas também de compostos com cargas elétricas, como os corantes artificiais ^{18, 17, 23, 24}.

As condições de separação envolvem o uso de eletrólitos contendo níveis de tensoativos, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), acima de uma determinada concentração denominada concentração micelar crítica (CMC), onde as moléculas do tensoativos começam a agregar-se formando as micelas. A separação se baseia na partição das moléculas entre a fase micelar (pseudo-fase estacionária) e o tampão aquoso. As micelas de SDS têm cargas negativas e migram contra o fluxo eletro-osmótico (FEO). Entretanto, o FEO é suficientemente forte para forçar as micelas passarem pelo detector. Espécies carregadas positivamente são retardadas pela associação com micelas carregadas negativamente, moléculas neutras ou com pouca polaridade tem uma partição entre as fases micelar e aquosa do tampão e têm uma mobilidade intermediária, enquanto que moléculas carregadas negativamente são repelidas pelas micelas ²³. As separações são conduzidas em pHs onde há um FEO apreciável, em geral em pHs acima de 7 ²⁵.

Os corantes artificiais utilizados em produtos alimentícios e bebidas são, predominantemente, compostos azo e triafenilmetanos. Contém grupos carboxílicos e sulfônicos, além de grupos hidroxilas, o que possibilita a formação de íons com cargas negativas em pHs básicos ²⁶, tornando a eletroforese capilar uma ferramenta ideal para a análise desses compostos. Apesar disto, existem poucos métodos desenvolvidos para análise de corantes e poucos dados sobre a performance da metodologia sobre esses compostos, sendo portanto essencial não só o desenvolvimento mas a validação de metodologias empregando tal técnica.

De várias formas um método analítico pode ser avaliado, as quais vão depender dos objetivos da análise. Para se desenvolver, avaliar e validar um método analítico são necessários vários procedimentos, onde os mais importantes são a exatidão, precisão e sensibilidade ²⁷⁻³⁵.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver, validar e aplicar uma metodologia utilizando a eletroforese capilar micelar (MEKC) para a análise de corantes artificiais usados como aditivos em bebidas.

2. Experimental

2.1. Materiais e Equipamento

2.1.1. Amostras

Para a validação do método procurou-se uma matriz, entre as bebidas, que apresentasse uma composição mais complexa, inclusive com a presença de corantes naturais, por isso o vinho tinto foi escolhido para esses testes. Após a validação, o método foi aplicado em diferentes amostras de bebidas alcoólicas, sendo utilizadas seis aguardentes aromatizadas, nove *coolers*, três coquetéis, sete aperitivos (*bitters*), oito licores e doze vinhos tinto de diversos fabricantes brasileiros. Para cada amostra foram adquiridos três diferentes lotes. Cada lote foi formado pela homogenização completa de duas garrafas. As amostras de bebidas foram filtradas em filtro tipo HAWP0013 (Millipore) de 0,45 µm de poro (com sistema de seringa) e degaseificadas por agitação mecânica. Todas as análises foram feitas em duplicata.

2.1.2. Padrões

Os padrões de corantes artificiais, tartrazina (E-102), amarelo crepúsculo (E-110), azorrubina (E-122), amaranto (E-123), ponceau 4R (E-124), eritrosina (E-127), vermelho 40 (E-129), azul patente V (E-131), indigo carmim (E-132), azul brilhante FCF (E-133) e verde rápido (E-143) foram adquiridos da Importadora Brastóquio Ltda. Todos os padrões apresentaram índices de pureza acima de 85%. Na preparação da solução estoque, foram utilizados todos os padrões juntos, com uma concentração de 40 µg/mL de cada corante e a partir desta, foram preparadas soluções diluídas de menor concentração. As soluções de corantes artificiais foram preparadas usando água do sistema Milli-Q (Millipore).

2.1.4. Preparação do tampão

O tampão utilizado no sistema de EC foi preparado com 10 mmol/L de fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) e 10 mmol/L de SDS (dodecil sulfato de sódio), ajustado com NaOH para pH 11 em balão de 100 mL. A solução foi filtrada utilizando filtro tipo HAWP0013 (Millipore) de 0,45 µm de poro, antes de ser utilizada.

2.2. Equipamento

As análises foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar, marca Prince Technology série 600, com sistema de detecção UV/VIS Lambda 1000; capilar de sílica com 73 cm de comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno, operando a 35°C e voltagem de 25 kV. As amostras foram introduzidas no equipamento por injeção hidrodinâmica com aplicação de 35 mbar de pressão por 9 segundos. O sistema de aquisição e tratamento de dados foi através do programa 4880 da Prince Technology.

3. Métodos

3.1. Metodologia Analítica

Após a filtração e degaseificação de aproximadamente 200 mL, as amostras foram introduzidas no equipamento, utilizando-se um sistema hidrodinâmico por pressão. Os corantes sintéticos na EC foram separados através de um capilar de sílica preenchido com a solução tampão fosfato descrita anteriormente, aplicando-se uma voltagem ao sistema de 25 kV, resultando numa corrente eletroforética de 53 μA . A temperatura do sistema foi mantida a 35°C com ventilação forçada. Para as análises dos corantes foi utilizado um detector UV-VIS e foram necessárias três injeções, sendo os eletroforegramas monitorados em diferentes comprimentos de onda, 450 nm para os corantes amarelos, 525 nm para os corantes vermelhos e 625 nm para os corantes azuis. A identificação dos corantes foi feita por comparação dos tempos de migração obtidos com padrões analisados nas mesmas condições e por adição de padrões às amostras. A quantificação dos corantes foi feita por padronização externa, com curvas construídas com 7 (sete) níveis de concentração, sendo cada ponto representado pela média de três determinações³⁶.

Um sistema de limpeza entre injeções foi desenvolvido e introduzido na metodologia para minimizar possíveis interferentes resultantes de resíduos de amostras anteriores. Os melhores resultados foram obtidos com a passagem de uma sequência de soluções, iniciando com NaOH 1mol/L, seguido de NaOH 0,2 mol/L e água, para a eliminação do hidróxido de sódio, finalizando com a solução tampão fosfato. Todas as

soluções foram deixadas passar por um tempo igual a 1 min. cada e com uma pressão de 1000mbar.

4. Validação do Método

Os limites de detecção foram inicialmente estimados com padrões, realizando-se sucessivas diluições e determinando a menor quantidade detectável, aproximadamente àquela que representa o sinal (S) três vezes o valor da amplitude do ruído (R) do equipamento ($3 \times S/R$). Concentrações próximas, maiores e menores, ao limite de detecção encontrado para cada padrão de corante, foram adicionadas ao vinho. Após a adição dos corantes ao vinho, as amostras foram analisadas nas mesmas condições descritas anteriormente, e determinado os limites de detecção. Os limites de quantificação foram considerados como sendo as concentrações correspondentes a dez vezes o valor da relação sinal/ruído ($10 \times S/R$) para cada corante^{32, 37, 38}.

Foram realizados testes de recuperação de padrões adicionados ao vinho, em dois diferentes níveis de concentração³⁶. A repetibilidade foi avaliada através de dez determinações realizadas em soluções padrão e amostras de vinho adicionadas de padrão. A repetibilidade foi calculada segundo Caulcutt e Boddy³⁵ através da fórmula:

$$R = t (2\sigma)^{1/2}$$

onde: t - 2,26 (de acordo com a Tabela B de Caulcutt e Boddy)
R - repetibilidade, com 5% de significância
 σ - estimativa de desvio padrão

5. Resultados e discussão

A **Tabela 1** apresenta os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação para os onze corantes artificiais adicionados ao vinho. O valores são comparáveis com os apresentados na literatura ^{18, 24}, e se mostram inferiores aos apresentados por Frazier ¹⁷.

Tabela 1

Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) determinados no vinho adicionados de padrões.

	Corante (µg/mL)										
	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-127	E-129	E-131	E-132	E-133	E-143
LOD (3 x S/R)	2,0	2,5	1,3	0,8	0,8	0,5	1,5	0,4	1,5	0,6	0,7
LOQ (10 x S/R)	6,6	7,1	4,3	2,7	2,7	1,7	5,0	1,3	5,0	2,0	2,3

A quantificação das amostras foi realizada por calibração externa. As equações das curvas estão apresentadas na **Tabela 2**. Através do coeficiente de correlação (r^2) pode-se observar a boa linearidade na faixa de trabalho utilizada, com valores acima de 0,988.

Tabela 2

Equações de Regressão Linear para corantes sintéticos na concentração de 0,5 a 40µg/mL

corante	<i>a</i>	<i>b</i>	r^2
E-102	3,6024	8,0435	0,9992
E-110	1,6871	3,4336	0,9994
E-122	1,951	1,914	0,9998
E-123	2,8242	2,6398	0,9994
E-124	4,0441	-2,5386	0,9999
E-127	3,1429	-7,5092	0,9987
E-129	1,5078	5,5722	0,9991
E-131	3,1292	8,1415	0,9989
E-132	0,8252	0,5476	0,9987
E-133	4,2481	-29,701	0,9883
E-143	6,1521	-8,6726	0,9992

* $y = ax + b$, onde: y corresponde à área do pico; a é a inclinação da reta; b é a interseção no eixo; x é a concentração de corantes na amostra em µg/mL e r^2 é o coeficiente de correlação.

As taxas de recuperação (**Tabela 3**), para os onze corantes analisados variaram entre 92,6-104,0%, nos dois níveis de enriquecimento realizados no vinho. Esses valores indicam uma taxa de recuperação adequada, nos níveis analisados. As porcentagens de recuperação encontradas neste trabalho são um pouco superiores às determinadas por Graichen ³⁹ e Graichen e Molita ⁸, mas muito próximas às obtidas por Prado e Godoy ³² e Ashkenazi et al. ⁴⁰, embora esses autores tenham utilizado a CLAE. Apenas Nevado et al. ¹⁸, nos trabalhos revisados, realizou testes de recuperação para corantes artificiais em EC, e observaram níveis ligeiramente superiores aos apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3

Recuperação dos padrões adicionados ao vinho em dois diferentes níveis de concentração.

Corantes											
NÍVEIS	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-127	E-129	E-132	E-133	E-131	E-143
I*(µg/mL)	24,9	25,9	25,7	25,2	24,8	25,2	25,1	24,4	25,7	25,1	25,1
recuperação (%)	99,6	103,6	102,8	100,8	99,2	100,8	100,4	97,6	102,8	100,4	100,4
II*(µg/mL)	50,4	52,0	51,9	50,5	49,7	50,4	46,2	51,0	49,8	50,9	50,9
recuperação (%)	100,9	104,0	103,9	100,9	99,3	100,8	92,6	102,1	99,8	101,8	101,9

I e II representam os dois diferentes níveis de concentração (µg /mL)

*média de determinações em duplicata

Segundo cálculos matemáticos, para que a metodologia apresente bons índices de repetibilidade é necessário que a diferença entre os valores observados (desvio padrão) sejam menores que os valores calculados pela equação $R=t(2\sigma)^{1/2}$ ³⁵. Através da **Tabela 4** pode-se observar que a metodologia apresentou bons níveis de repetibilidade, com os valores de médias menores que os valores calculados. Nos trabalhos revisados não foram encontrados valores de repetibilidade dos métodos usando a EC para corantes artificiais.

Tabela 4

Repetibilidade dos corantes adicionados ao vinho e em solução padrão.

		Corantes										
		E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-127	E-129	E-132	E-133	E-131	E-143
vinho	concentração (µg/mL)*	25,2	25,8	25,5	24,6	25,7	26,4	25,9	25,8	25,4	25,4	25,2
	desvio padrão	0,5	0,4	0,2	0,2	0,1	0,4	0,3	0,6	0,1	0,2	0,3
	repetibilidade	2,3	2,0	1,4	1,4	1,0	2,0	1,8	2,5	1,0	1,4	1,8
padrão	concentração (µg/mL)*	25,2	26,0	26,0	24,8	25,5	25,5	24,9	25,2	25,8	25,1	25,5
	desvio padrão	0,7	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,2	0,7	0,2	0,2	0,3
	repetibilidade	2,7	2,0	1,8	1,0	1,0	1,8	1,4	2,7	1,4	1,4	1,8

nível de confiança de 95%

* média de dez determinações

A **Figura 1** mostra eletroforegramas de padrões de corantes artificiais adicionados à amostra de vinho. Os eletroforegramas nos 3 comprimentos de onda apresentados neste trabalho foram sobrepostos para melhor visualização.

Apesar dos tempos de migração parecerem superiores aos apresentados na literatura ¹⁸, poucos são os trabalhos que utilizam misturas de mais de seis corantes ^{17, 18, 21}. Na metodologia aqui apresentada foi utilizada uma mistura de onze corantes artificiais, ou seja, todos os corantes artificiais permitidos pela Legislação Brasileira, desta forma, é de se esperar um maior tempo de análise, devido ao maior número de composto analisados.

Optou-se trabalhar na região do visível ao invés do ultravioleta, que é a mais utilizada pela literatura ^{17, 18, 21}, pelo menor número de interferente apresentado. As bebidas alcoólicas, em especial os vinhos e licores, contém um grande número de compostos que absorvem na região do ultravioleta, assim testes realizados nas etapas de desenvolvimento da metodologia mostraram que a simples troca da região de absorção era suficiente para eliminar esses interferentes.

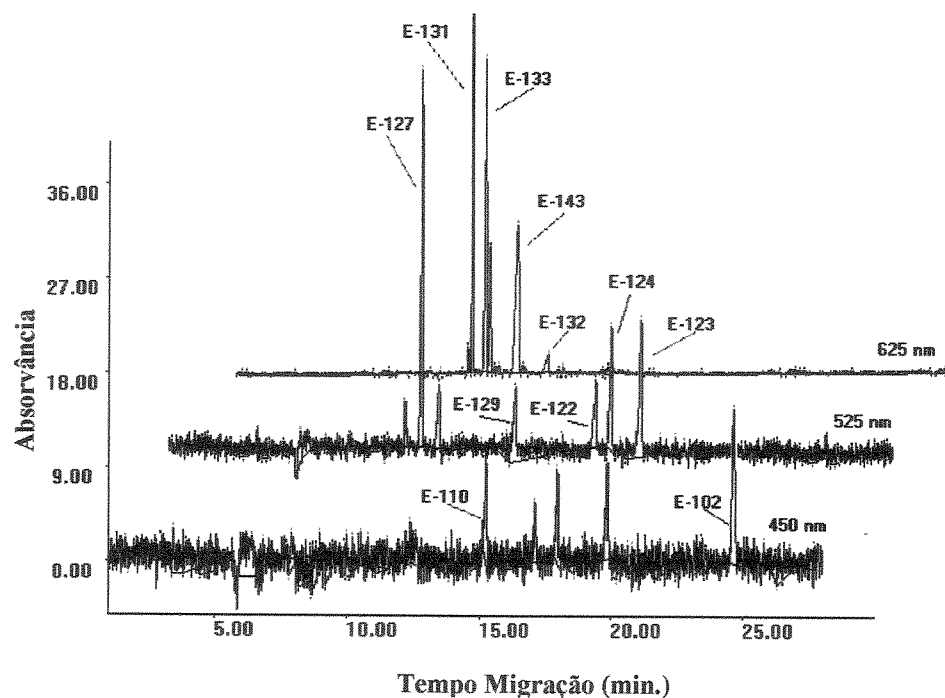


Figura 1. Eletroforegramas de amostra de vinho adicionada de padrões de corantes artificiais. Condições de operação: 10 mmol/L Fosfato e 10 mmol/L SDS (pH=11); 25 kV e 35 °C.

O uso do fosfato como solução tampão se mostrou bastante eficiente para a separação dos corantes artificiais. Embora na literatura possam ser encontradas diversas soluções tampão, sendo os mais comuns o borato, o carbonato e o fosfato^{17, 18, 37}, a utilização dos dois primeiros não resultou em separações satisfatórias. A utilização de pH 11 também se mostrou bastante eficiente na separação desses compostos, facilitando assim sua migração quando aplicada uma diferença de potencial^{18, 37}. A esse pH todas as estruturas se apresentam ionizadas. Isto ocorre devido à presença de grupos de ácidos sulfônicos nas moléculas que em pH>4 se dissociam em ânions sulfônicos, e grupos carboxílicos que só se dissociam em pH>7. Com o aumento do pH (pH>10) os grupos fenólicos, presentes nos corantes E-110, E-123 e E-124 por exemplo, também se dissociam e assim melhoram a separação²⁶.

Mesmo com valor de pH elevado, o uso de SDS na composição do tampão foi indispensável para a separação dos corantes artificiais, principalmente entre os corantes vermelhos que apresentam grande semelhança entre suas estruturas, sendo dois deles o E-123 e o E-124 isômeros de posição. Essa separação já foi descrita em outros trabalhos, onde o uso de tensoativos apresentou melhoras na separação desses compostos ^{17, 18, 24}.

O procedimento de limpeza utilizado nesta metodologia se mostrou bastante satisfatório e confirmou as observações de Frazier ¹⁷ e Nevado ¹⁸ quanto ao uso de NaOH para a limpeza dos capilares ^{17, 18}.

Os dados de quantificação, apenas das amostra em que se detectou a presença de corantes artificiais, estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5

Teores de corantes artificiais presentes em bebidas alcoólicas (µg/mL).

produto	amostras	Corantes (µg/mL)				
		E-102	E-110	E-123	E-127	E-133
aguardente	amt1			9,9±0,3		
	amt2	9,9±0,5				
	amt3	39,8±0,9	39,5±0,7			
	amt5	35,9±0,9				
	amt6				9,2±0,3	
	amt7	33,4±0,7				
coquetel	amt24					12,0±0,0
	amt25			42,3±0,5		
	amt26	13,3±0,4				16,9±0,6
liquor	amt27					36,3±0,9
	amt28		36,5±0,8	28,1±0,6		
	amt29	30,9±0,4				11,2±0,4
	amt30	54,1±0,9				42,9±0,2
	amt31					
	amt32					39,8±0,3
	amt33					
	amt34	19,9±0,4				29,7±0,6

média e estimativa de desvio (n=6)

A Legislação Brasileira proíbe imitar ou produzir vinhos de forma artificial, bem como a produção da enocianina nos próprios locais de vinificação, artigo 33 e artigo 39 respectivamente ⁴¹. Isto significa que não se pode fabricar vinho e enocianina para adicionar ao seu próprio vinho, esta deve ser comprada de terceiros e seu custo no Brasil é

bastante elevado. Desta maneira, poderia se induzir um fabricante a adicionar corantes artificiais em seu produto, uma vez que eles apresentam um custo bastante inferior quando comparados aos naturais. Mas em nenhuma das 12 amostras de vinho tinto analisadas foi encontrado corante artificial em sua composição, o que demonstra que essa prática não vem sendo adotada no Brasil pelos vinicultores. Da mesma forma, nas amostras de *coolers* também não foram encontrados nenhum corante artificial.

Em todas as amostras de coquetéis e aguardentes aromatizadas foram encontrados corantes artificiais. Já nos licores, seis das oito amostras analisadas apresentavam corantes. Porém em nenhuma das amostras os teores ultrapassaram os limites permitidos pela legislação brasileira.

Nos aperitivos não foram encontrados corantes artificiais, em apenas uma amostra encontrou-se um corante que não pode ser identificado. Há suspeita que este seja a cochonilha (E-120), cuja presença foi declarada no rótulo pelo fabricante. A confirmação, no entanto, não pode ser realizada pela falta do padrão. Nevado et al.¹⁸ em seu trabalho apresentaram um método para corantes por EC onde eles determinaram corantes artificiais junto com o E-120, demonstrando que seria possível uma metodologia para a análise simultânea de corantes artificiais e naturais. Na **Figura 2** estão apresentados os eletroforegramas de três amostras analisadas

6. Conclusões

O emprego de corantes pelas indústrias de bebidas se mostrou dentro das normas exigidas pela Legislação Brasileira, demonstrando um controle nos processos de fabricação.

O método de eletroforese capilar aplicado para a determinação de corantes artificiais em bebidas alcoólicas aqui apresentado se mostrou bastante satisfatório na separação destes aditivos. Dados da eficiência podem ser demonstrados através das análises dos valores de recuperação, repetibilidade e valores de limites de detecção e quantificação, recomendando a aplicação da metodologia na determinação de corantes artificiais em bebidas. A técnica se mostrou bastante simples e eficiente para ser aplicada, sem a necessidade de um tratamento prévio para as amostras, facilitando assim em muito as análises.

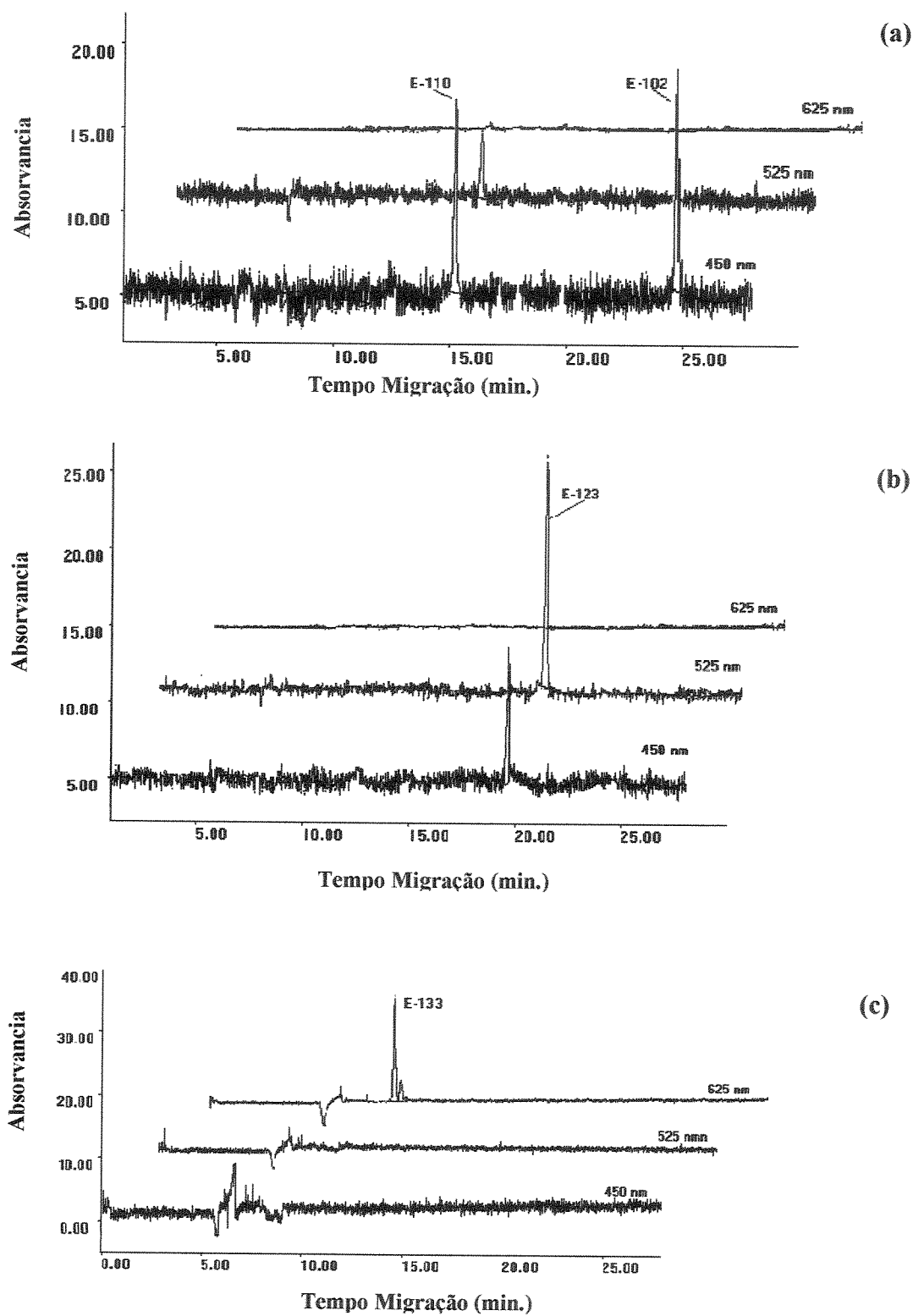


Figura 2. Eletroforegramas de uma amostra de (a) aguardente (amt3); (b) coquetel (amt25); e (c) licor (amt27). Condições de operação descritas no texto.

7. Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Luis Vilas Boas e à Profa. Maria do Rosário Bronze, pela oportunidade e orientação prestada durante o estágio, decorrido em seus laboratórios em Oeiras, Portugal. Agradecemos também ao CNPq pela concessão da bolsa sanduíche e à CAPES pela bolsa de doutorado ao aluno M.A. Prado.

8. Referências

1. HOFER, K.; JENEWEIN - QUICK, D. - Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung A/*Food Research and Technology*. **1997**; 204 (1), 32.
2. KAGUEI, S.; SATO, H. - *Analytical Chimica Acta*. **1992**, 265, 55.
3. CHO, T. H.; CHO, J. H.; YANG., Y. K. - Reprinted from: *The Research Reports of Office of Rural Development*. **1975**, 17 (5), 87.
4. PEARSON, D. - In: *The Chemical Analyses of Food*. 7th ed. Churchill Livingstone - Edimburgh, London, N. Y, 1976.
5. TOLEDO, M. C. F.; GUERCHON, M. S. - *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **1990**, 10 (1), 120.
6. RIBEIRO-CUNHA, M. R.; CARDOSO, M. G.; NELSON, D. L.; JOKL., L. - *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **1996**, 16 (1), 6.
7. YANUKA, Y.; SHALON, Y.; WEISSENBERG, E.; NIR-GROSFELD, I. - *Analyst*. **1963**, 88, 872.
8. GRAICHEN, C.; MOLITOR, J. C. - *Journal of the AOAC*. **1963**, 46 (6), 1022.
9. PRADO, M. A.; GODOY, H. T. - *Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos*, FEA, UNICAMP, Campinas,. 1998
10. GRATZFELD-HÜSGEN, A.; SCHUSTER, R. - Application Note, catalog Hewlett Packard, publication number (1995), 12-5964-3559E.
11. GREENWAY, G. M.; KOMETA, N.; MACRAE, R. - *Analytical Methods Section*. **1992**, 43, 137.
12. WHITE, P. C.; HARBIN, A. - *Analyst*. **1989**, 114, 877.

13. BERZAS, J. J.; GUIBERTEAU, C.; CONTENTO, A. M. - *Journal of Chromatography A*. 1997, 20(18), 3073.
14. GENARO, E. M. C. - *Journal of Chromatography A*. 1997, 67, 87.
15. ISHIKAWA, F.; SAITO, K.; NAKAZATO, M.; FUJIMUMA, K.; MORIYASU, T.; NISHIMA, T. - *Kenkyu Nempo-Tokyo-toritsu Eisei Kenkyusho*, 42 (1990) 141, C.A. 115 (1990) 27802t,
16. ISHIKAWA, F.; SAITO, K.; NAKAZATO, M.; FUJIMUMA, K.; MORIYASU, T.; NISHIMA, T. - *Kenkyu Nempo-Tokyo-toritsu Eisei Kenkyusho*, 42 (1991) 141; C.A. 117 (1991) 210874y.
17. FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. - *Electrophoresis*. **1999**, 20, 3156.
18. NEVADO, J. J. B.; CABANILLAS, C.G.; SALCEDO, A. M. C. - *Analytical Chimica Acta*. **1999**, 378, 63.
19. COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S. - *Química Nova*. **1997**, 20 (5), 512.
20. BUICK, D. R.; TRENERRY, V. C. - *International Rice Research Inst. Library*, Los Banos, Laguna (Philippines). (1995), 30 pg.,
21. SUZUKI, S.; SHIRAO, M.; AIZAWA, M.; NAKAZAWA, H.; SASA, K.; SASAGAWA, H. - *Journal of Chromatography A*. 1994, 680, 541.
22. GASPARIC, J.; SEDMIKOVA, A. - *Journal of Chromatography A*. 1994, 665, 197.
23. TAVARES, M. F. M. - *Química Nova*. **1997**, 20, 493.
24. PÉREZ-URQUIZA, M.; PRAT, M. D.; BELTRÁN, J. L. - *Journal of Chromatography A*. 2000, 871, 227.
25. CHEMKEYS, O. Seu Site de Química - Referência bibliográfica de documentos eletrônicos, http://chemkeys.com/bra/md/mds_11/elec_4/elec_4.htm
11/05/2002
26. HUWEI, L.; TAO, Z.; YINGNAN, Z.; SHIZE, Q.; AIJIN, H.; YILIANG, S. - *Journal of Chromatography A*. **1995**, 718, 448.
27. WILRICH, P. - "Role of statistic in analytical quality assurance". In: Analytical quality assurance and good laboratory practice in dairy laboratories". *International Seminar of AOAC*. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Germany, Int. Dairy Federation, Belgium. **1992**, 9302, 61.

28. WERMINONT, G.T. - *Use of statistics to develop and evaluate analytical methods*. AOAC, Virginia, 183p (1985).
29. CHASIN, A. A.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVATORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. - *Revista Brasileira de Toxicologia*. **1998**, 11(1), 37.
30. LEITE, F. - *Validação em Análise Química*. 3 ed., Editora Átomo, 224p, 1998
31. RAMOS, K. L. - *Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos*, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas. (2002).
32. PRADO, M. A.; GODOY, H. T. - *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **2002**, 25 (16), 2455.
33. BARROS NETO, B. ; SCARMINIO, I. S. ; ROY, E. B. - *Planejamento e Otimização de Experimentos*, 2^a ed., Campinas SP, editora UNICAMP, (1996).
34. CIOLA, R. - *Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho HPLC*, 1st Ed.; Blücher, E., Ed.; São Paulo, SP, 1998.
35. CAULCUTT, R.; BODDY, R. - *Statistic for analytical chemists*. 1st. Ed., Chapman and Hall, Londres, 253 p, (1983).
36. SOARES, L. M. V. - *Rev. Inst. Adolf Lutz*. **2001**, 60 (1), 79.
37. KAYALI-SAYADI, M. N.; RUBIO-BARROSO, S.; GARCIA-IRANZO, R.; POLO-DIEZ, L. M. - *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **2000**, 23 (12), 1913.
38. FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; MARQUES, E. M. J.; FERREIRA, M. A. - *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **2000**, 23 (13), 2057.
39. GRAICHEN, C. Q. - *Journal of the AOAC*. **1975**, 58 (2), 278.
40. ASHKENAZI, P.; YARNITZKI, C.; CAIS, M - *Analytical Chimica Acta*. **1991**, 248, 289.
41. PACHECO, A. O. - *Iniciação à Enologia*, Editora SENAC, São Paulo, 2^a ed., 1999.

CAPÍTULO 4

Otimização da Metodologia para Determinação de Corantes Artificiais em Bebidas Alcoólicas por Eletroforese Capilar Através da Análise de Superfície de Resposta

**Marcelo Alexandre Prado^a, Luis Felipe Vilas Boas^b, Maria do Rosário Bronze^b,
Helena Teixeira Godoy^a**

^aDepartamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp – Campinas -
C.P. 6121 - CEP 13083-970- Brasil

^bDepartamento de Química, Instituto de Tecnologia Química e Biológica – Universidade Nova de Lisboa -
Apartado 127 Av. da República (EAN) 2781-901 - Oeiras - Portugal

Otimização da Metodologia para Determinação de Corantes Artificiais em Bebidas Alcoólicas por Eletroforese Capilar Através da Análise de Superfície de Resposta

**Marcelo Alexandre Prado^{a*}, Luis Felipe Vilas Boas^b, Maria do Rosário Bronze^b,
Helena Teixeira Godoy^a**

^aDepartamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp – Campinas -
C.P. 6121 - CEP 13083-970- Brasil

^bDepartamento de Química, Instituto de Tecnologia Química e Biológica – Universidade Nova de Lisboa -
Apartado 127 Av. da República (EAN) 2781-901 - Oeiras - Portugal

*Bolsista CNPq - Brasil

Resumo

No desenvolvimento de novos métodos analíticos nem sempre é possível aliar todos os parâmetros envolvidos na determinação de forma eficiente, principalmente, quando se trata de determinações simultâneas de compostos de uma matriz complexa como os alimentos. Com base nestas observações, é de interesse investigar a interação dos efeitos e otimizar os parâmetros. Assim, para a análise e otimização do processo, utilizou-se a metodologia multivariada de superfície de resposta na investigação das alterações dos principais parâmetros envolvidos na determinação dos teores de corantes artificiais por eletroforese capilar. Foi utilizado um delineamento estatístico completo 2^4 , com avaliação de quatro parâmetros: concentração de tampão fosfato (mmol/L); concentração de tensoativos (dodecil sulfato de sódio) (mmol/L); variação de pH; e voltagem aplicada (kV). De acordo com os resultados obtidos nos gráficos de superfície de resposta, os valores para os parâmetros escolhidos na determinação dos teores de corantes em bebidas se encontram dentro das faixas teóricas ótimas.

Palavras-chaves: corantes, bebidas, análise de superfície de resposta

Abstract

In the development of new analytical methods, it is not always possible to unite all the parameters involved in the determination in an efficient manner, especially in the simultaneous determination of compounds of a complex matrix such as foods. Based on these comments, it is of interest to investigate the interaction of the effects and to optimize the parameters. Thus, for the analysis and optimization of the process, a multivaried methodology of response surface was applied in the investigation of the alterations of the main parameters involved in the determination of the levels of synthetic dyes by capillary eletrophoresis. A complete statistical delineation 2^4 was used, with evaluation of four parameters: phosphate buffer concentration (mmol/L); surfactante concentration (dodecil sodium sulphate) (mmol/L); variation of pH; and voltage applied (kV). According to the results obtained in the graphs by response surface analysis, the values for the parameters chosen in the determination of dyes in drinks were within of the optimum theoretical ranges.

Keywords: synthetic dyes, drinks, response surface analysis

1-Introdução

Nas últimas duas décadas, a eletroforese capilar (EC) vem despontando como uma técnica bastante atrativa, principalmente para determinações simultâneas de diferentes compostos, entre eles os corantes artificiais. Esta nova técnica tem apresentado grande versatilidade e simplicidade em relação às demais técnicas de separação, além de menores custos e maior durabilidade das colunas e menores tempos de análise, volumes de amostra e custos finais ¹⁻⁴.

Quando se desenvolvem novos equipamentos e técnicas de análise, o que se procura é versatilidade, praticidade, economia e rapidez. Fica claro que nem sempre é possível aliar todos esses parâmetros, principalmente quando o intuito é a determinação simultânea de vários compostos numa mesma amostra. Esta dificuldade é gerada principalmente pela

grande variabilidade química e física que os analitos apresentam, mesmo sendo estes de uma mesma classe, como vitaminas, corantes, etc. Nas determinações por eletroforese, por exemplo, as separações ocorrem levando-se em consideração justamente essas diferenças que cada composto apresenta e assim é possível, numa mesma amostra, separar e quantificar esses compostos. A maior dificuldade está em descobrir quais são os parâmetros ideais para que esta análise possa ocorrer.

É prática entre os pesquisadores a fixação de parâmetros e a variação de um específico até se atingir o maior rendimento. Depois que é encontrado "esse máximo" para um parâmetro, fixá-lo e variar outro até a obtenção de um novo máximo e assim com os "máximos" obtidos para esses parâmetros o trabalho é desenvolvido. Este pode ser o senso comum, mas certamente não é a forma certa de agir. O procedimento correto, ao contrário do que se pensa, é variar todos os parâmetros ao mesmo tempo. A razão pela qual isto é feito, é que os parâmetros podem sofrer influências mútuas e o valor ideal para um deles podem depender diretamente do valor dos outros. Esse comportamento é chamado de *interação entre variáveis*, e é um fenômeno que ocorre frequentemente, raras são às vezes que os parâmetros atuam independentemente ⁵.

O emprego de conhecimentos estatísticos pode ajudar a resolver alguns desses problemas de forma racional e econômica, usando para isso planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, onde se pode extrair o máximo de informações com um número mínimo de experimentos ⁵. Esses métodos são ferramentas poderosas, com as quais é possível alcançar vários objetivos, como otimizar processos, diminuir tempos de análises, maximizar rendimentos, e assim por diante. É claro que não devemos menosprezar os conhecimentos que o especialista já possui, ele é insubstituível. As ferramentas estatísticas, embora valiosas, são apenas um complemento a esse conhecimento, o ideal é que as duas coisas, conhecimento básico e estatístico, andem juntas.

A exemplo de outros alimentos, os corantes tem sido muito empregados em bebidas, principalmente para torná-las mais atrativas para o consumo ⁶. O emprego de corantes artificiais em bebidas, assim como nos alimentos em geral, é controlado por leis e regulamentos que estabelecem níveis para adição nesses produtos. Desta forma, foi desenvolvido um método de análise por eletroforese capilar para a determinação desses

aditivos, o que permitirá um melhor controle do emprego de corantes artificiais em alimentos ⁷.

O objetivo deste estudo foi o de avaliar as condições de análise para a determinação simultânea dos onze corantes artificiais permitidos no Brasil a partir do método por eletroforese capilar micelar desenvolvido por Prado et al. ⁷, utilizando uma metodologia de superfície de resposta para a otimização dos parâmetros escolhidos.

2. Experimental

2.1. Materiais e Equipamento

Foi utilizada como amostra para o estudo de superfície de resposta uma marca de vinho tinto a qual foi adicionada uma mistura dos 11 corantes artificiais. A amostra de vinho foi filtrada em filtro tipo HAWP0013 (Millipore) de 0,45 µm de poro (com sistema de seringa) e degaseificada por agitação mecânica.

Os padrões de corantes artificiais, Tartrazina (E-102), Amarelo Crepúsculo (E-110), Azorrubina (E-122), Amaranto (E-123), Ponceau 4R (E-124), Eritrosina (E-127), Vermelho 40 (E-129), Azul Patente V (E-131), Indigo Carmim (E-132), Azul Brilhante FCF (E-133), Verde Rápido (E-143) foram adquiridos da Importadora Brastóquio Ltda. Todos os padrões apresentaram índices de pureza acima de 85%. A concentração de cada corante adicionado ao vinho está apresentada na **Tabela 1**.

Tabela 1

Concentração (µg/mL) de padrões de corantes utilizado no preparo da mistura adicionada à amostra de vinho tinto

Corantes artificiais											
	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-127	E-129	E-131	E-132	E-133	E-143
concentração (µg/mL)	50,4	52,0	51,9	50,5	49,7	50,4	46,2	51,0	49,8	50,9	50,9

O tampão, utilizado no sistema de eletroforese capilar, foi preparado com 10 mmol/L de fosfato (Na₂HPO₄.12H₂O) e 10 mmol/L de SDS (dodecil sulfato de sódio),

ajustado com NaOH para pH 11 em balão de 100mL, e filtrado em filtro de seringa HAWP0013 (Millipore) de 0,45 μm de poro.

As análises foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar marca Prince Technology, série 600, com sistema de detecção UV/VIS Lambda 1000; capilar de sílica com 73 cm de comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno, operando a 35°C e voltagem de 25 kV. As amostras foram introduzidas no equipamento por injeção hidrodinâmica com aplicação de 35 mbar de pressão por 9 segundos. O sistema de aquisição de dados foi através do programa 4880 da Prince Technology.

3. Método

Foi adicionado, em 80 mL de vinho, 20 mL da mistura de corantes, resultando numa concentração de aproximadamente 50 $\mu\text{g/mL}$ para cada corante na solução final. Após a adição dos corantes na amostra, a mesma foi filtrada e degaseificada, e introduzida no equipamento, utilizando-se um sistema hidrodinâmico por pressão. Os corantes sintéticos na EC foram separados através de um capilar de sílica preenchido com a solução tampão fosfato, aplicando-se uma voltagem ao sistema de 25 kV, originando uma corrente eletroforética de 53 μA . A temperatura do sistema foi mantida a 35°C com sistema de ventilação forçada. Para as análises dos corantes foi utilizado um detector UV-VIS e foram necessárias três injeções, sendo os eletroforegramas monitorados em diferentes comprimentos de onda na região do visível, sendo 450 nm para os corantes amarelos, 525 nm para os corantes vermelhos e 625 nm para os corantes azuis. A identificação dos corantes foi feita por comparação dos tempos de migração, obtidos com padrões analisados nas mesmas condições e por adição de padrão à amostra. A quantificação dos corantes foi feita por padronização externa, com curvas construídas com 7 (sete) níveis de concentração, sendo cada ponto representado pela média de três determinações⁸.

4. Planejamento experimental e análise de superfície de resposta

Para o planejamento estatístico foram observados os fatores que mais influenciam na separação simultânea de todos os onze corantes artificiais na técnica de eletroforese

capilar. Os parâmetros considerados foram: concentração de fosfato, concentração de SDS, pH e intensidade de voltagem. O delineamento estatístico utilizado foi o fatorial completo 2^4 (Tabela 2). Para a estimativa do erro experimental foram realizadas 6 replicatas correspondendo aos pontos centrais. Foram adicionados 8 pontos axiais para verificar a existência de não-linearidade dos valores de concentração dos corantes artificiais relacionados às quatro variáveis ⁹⁻¹¹. Os dados obtidos foram analisados no Programa *Statistica* versão 5.0.

Tabela 2

Valores pré-estabelecidos das variáveis independentes [nível superior (+), nível inferior (-), intermediário (0) e ponto axial (α)]

Variáveis codificadas	Variáveis reais	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
X1	Concentração fosfato (mmol/L)	6	8	10	12	14
X2	Concentração SDS (mmol/L)	6	8	10	12	14
X3	pH	10,0	10,5	11,0	11,5	12,0
X4	Voltagem (kV)	23	24	25	26	27

O planejamento experimental com os valores reais e codificados está apresentado na Tabela 3. As 16 primeiras linhas da Tabela 3 determinam o modelo linear e são referentes ao experimento completo; da linha 17 até a 24 do planejamento são os pontos axiais; e as 6 replicatas dos pontos centrais estão apresentadas das linhas 25 a 30.

5. Resultados e Discussão

Os valores apresentados na Tabela 4 representam as concentrações observadas para cada ensaio de cada corante analisado pelo delineamento experimental, com esses dados foram analisadas as estimativas de efeitos e análise de variância (ANOVAs) para verificação da validade do modelo experimental proposto.

Tabela 3

Modelo experimental com valores reais e codificados

Ensaio	Reais ^a				Codificado ^b			
	Fosfato (mmol/L)	SDS (mmol/L)	pH	Volts (kV)	X1	X2	X3	X4
1	8	8	10,5	24	-	-	-	-
2	12	8	10,5	24	+	-	-	-
3	8	12	10,5	24	-	+	-	-
4	12	12	10,5	24	+	+	-	-
5	8	8	11,5	24	-	-		-
6	12	8	11,5	24	+	-		-
7	8	12	11,5	24	-	+		-
8	12	12	11,5	24	+	+		-
9	8	8	10,5	26	-	-	-	+
10	12	8	10,5	26	+	-	-	+
11	8	12	10,5	26	-	+	-	+
12	12	12	10,5	26	+	+	-	+
13	8	8	11,5	26	-	-	+	+
14	12	8	11,5	26	+	-	+	+
15	8	12	11,5	26	-	+	+	+
16	12	12	11,5	26	+	+	+	+
17	6	10	11	25	-2	0	0	0
18	14	10	11	25	+2	0	0	0
19	10	6	11	25	0	-2	0	0
20	10	14	11	25	0	+2	0	0
21	10	10	10	25	0	0	-2	0
22	10	10	12	25	0	0	+2	0
23	10	10	11	23	0	0	0	-2
24	10	10	11	27	0	0	0	+2
25	10	10	11	25	0	0	0	0
26	10	10	11	25	0	0	0	0
27	10	10	11	25	0	0	0	0
28	10	10	11	25	0	0	0	0
29	10	10	11	25	0	0	0	0
30	10	10	11	25	0	0	0	0

^a Concentração de fosfato (mmol/L); Concentração de SDS (mmol/L); valor de pH; Voltagem aplicada Volts(kV).^b De acordo com a Tabela 2.

Tabela 4

Valores de concentração ($\mu\text{g/mL}$) dos corantes artificiais obtidos do delineamento experimental.

*ensaio	Corantes Artificiais ($\mu\text{g/mL}$)										
	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-127	E-129	E-131	E-132	E-133	E-143
1	40,32	41,44	40,18	40,29	43,72	40,18	41,29	35,05	40,33	49,57	39,66
2	45,54	41,56	45,41	45,51	45,00	45,41	46,42	40,77	45,55	44,86	44,94
3	46,97	43,38	46,84	46,94	46,41	46,83	47,87	42,05	46,98	46,27	45,88
4	42,44	48,02	42,32	42,41	47,97	42,32	43,25	37,99	42,45	41,80	46,91
5	38,55	39,63	38,41	38,51	41,93	38,41	43,48	36,46	42,56	47,82	40,35
6	39,09	39,96	38,98	39,06	45,62	38,98	39,84	34,99	39,10	38,50	38,58
7	42,47	43,42	42,35	42,44	41,97	42,35	43,29	38,02	42,48	41,84	41,92
8	45,41	46,20	45,31	35,38	44,99	35,31	46,09	41,70	45,42	34,88	45,95
9	43,16	44,12	40,03	40,13	42,64	40,03	43,99	38,64	43,17	42,51	40,59
10	46,07	47,09	45,93	46,03	45,52	45,93	46,95	41,24	46,08	45,38	45,46
11	46,69	47,73	46,56	46,65	46,13	46,55	45,59	39,80	44,70	45,99	46,08
12	42,85	43,80	42,72	45,81	42,33	46,58	43,67	38,36	42,86	42,20	42,28
13	46,71	47,76	42,18	41,68	46,16	42,72	42,61	36,82	41,72	46,01	41,17
14	45,77	46,79	45,64	45,74	45,22	45,64	46,65	40,97	45,78	45,08	45,10
15	50,13	45,25	49,99	43,10	49,53	42,18	43,10	30,88	42,14	49,38	49,48
16	48,30	49,25	46,58	49,27	45,80	49,99	47,84	40,87	46,31	41,67	48,75
17	40,24	41,14	40,13	40,21	39,76	40,13	41,02	36,03	40,25	39,64	39,72
18	47,92	48,99	47,78	47,88	47,35	47,78	48,84	42,90	47,93	47,20	47,29
19	36,94	37,99	36,81	36,90	46,38	36,80	43,12	33,02	42,95	46,23	37,17
20	41,72	42,65	41,60	41,69	41,22	41,60	45,52	40,35	44,73	41,09	41,32
21	35,20	46,21	35,07	35,17	44,66	35,07	46,07	40,47	45,21	44,53	35,61
22	45,53	46,55	45,40	45,50	44,99	45,40	46,41	40,76	45,54	44,85	44,93
23	44,68	40,68	44,56	44,65	44,15	44,55	45,54	40,00	44,69	44,01	44,10
24	44,96	45,96	44,83	44,93	44,42	44,83	40,82	36,25	40,97	44,28	44,37
25	51,35	51,35	51,45	50,58	49,44	49,75	52,61	45,01	50,79	50,04	50,35
26	50,14	50,14	50,44	51,23	49,89	51,04	51,28	46,05	51,31	49,72	50,54
27	50,72	50,72	50,11	51,22	50,74	50,76	51,76	46,50	51,22	49,97	50,60
28	51,72	51,72	51,13	51,93	50,90	50,65	51,67	46,45	51,93	50,54	50,17
29	51,50	51,50	51,14	49,90	51,22	52,86	52,75	44,63	49,90	50,55	49,63
30	50,79	50,79	51,08	51,14	50,37	50,28	52,04	45,50	51,14	50,81	50,92

*referente a Tabela 3.

Os valores de r^2 apresentados na **Tabela 5**, explicam o modelo em termos da porcentagem da variação dos dados observados, quanto mais próximo de 1 ou 100% mais preditivo é o modelo ¹⁰. Na **Tabela 5** observa-se que alguns valores de coeficiente de correlação (r^2) são baixos, isto porque o modelo desenvolvido apresenta falta de ajuste em alguns valores (**Tabelas 6 e 7**), como o método de análise deve atender a todos os corantes simultaneamente, e cada um possui uma estrutura físico-química diferente, é de se esperar uma variação dos dados observados e os previstos, uma vez que o sistema desenvolvido pode funcionar melhor para um composto do que para outro nas mesmas condições.

Tabela 5

Porcentagem de explicação do modelo para a variação dos dados observados (valores de r^2) para cada corante artificial.

	Corantes										
	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-127	E-129	E-131	E-132	E-133	E-143
valores de r^2	0,9129	0,8747	0,9104	0,8839	0,8791	0,8077	0,9069	0,8268	0,8809	0,8552	0,8369
% explicada	91,29	87,47	91,04	88,39	87,91	80,77	90,69	82,68	88,09	85,52	83,69
% explicável	99,89	99,83	99,78	99,61	99,70	99,19	99,65	99,35	99,18	99,60	99,40

As **Tabelas 6 e 7** de análise de variância (ANOVA) apresentadas mostram a validade do modelo estudado para cada um dos corantes utilizados neste estudo, pelo teste de F e pelo resíduo, que identificam a grandeza do erro experimental. Assim pode-se verificar que os valores de F calculados ($F_{cal.}$) são maiores que os valores de F tabelados ($F_{tab.}$) mostrando que em todos os casos o modelo experimental é válido. Os baixos valores do erro puro indicam uma boa reprodutibilidade das análises envolvidas no modelo experimental. Os valores de resíduos foram considerados, em geral, baixos quando em comparação com os valores obtidos pela regressão.

Nas **Tabelas 8 e 9** estão apresentados os valores de estimativas de efeitos para os corantes artificiais estudados conforme modelo experimental.

Tabela 6

ANOVA para os corantes azo

fonte variação	SQ						GL*	SQM						Fcal.						Ftab.*
corante	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-129		E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-129	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-129	
regressão	419,79	481,9	551,36	398,57	521,56	619,62	14	29,99	34,42	39,38	28,47	37,25	44,26	11,24	7,48	10,89	8,16	7,96	10,44	2,46
resíduo	40,01	69,01	54,25	52,35	70,2	63,56	15	2,67	4,60	3,65	3,49	4,68	4,24							
falta de ajuste	39,12	68,04	52,97	50,6	68,46	61,19	10	3,91	6,80	5,30	5,06	6,85	6,12							
erro puro	0,89	0,97	1,28	1,75	1,74	2,37	5	0,18	0,19	0,26	0,35	0,35	0,47							
total SS	459,8	550,91	605,61	450,92	591,76	683,18	29	15,86	19,00	20,88	15,55	20,41	23,56							

GL* e Fiab. São os mesmos para todos os corantes

SQ - Soma dos Quadrados; GL - Grau de Liberdade; SQM - Soma do Quadrado Médio; Fcal. - Valor de F calculado;

Fiab. - Valor de f tabelado

Tabela 7

ANOVA para os corantes trifênilmetanos, xanteno e indigóide.

fonte variação	SQ										GL*	SQM										Fcal.	Fiab.*
corante	E-127	E-131	E-132	E-133	E-143		E-127	E-131	E-132	E-133	E-143	E-127	E-131	E-132	E-133	E-143							
regressão	221,49	383,57	611,72	347,91	320,4	14	15,82	27,40	43,69	24,85	22,89	5,50	5,12	7,93	6,33	5,50	2,46						
resíduo	52,73	80,31	82,7	58,91	62,44	15	3,52	5,35	5,51	3,93	4,16												
falta de ajuste	50,52	77,33	77,05	57,29	60,17	10	5,05	7,73	7,71	5,73	6,02												
erro puro	2,21	2,98	5,65	1,62	2,27	5	0,44	0,60	1,13	0,32	0,45												
total SS	274,22	463,88	694,42	406,82	382,84	29	9,46	16,00	23,95	14,03	13,20												

GL* e Fiab. são os mesmos para todos os corantes valor de Fiab. segundo Barros Neto et al. ¹

SQ - Soma dos Quadrados; GL - Grau de Liberdade; SQM - Soma do Quadrado Médio; Fcal. - Valor de F calculado;

Fiab. - Valor de f tabelado

Tabela 8
Estimativas de Efeitos para os Corantes azo

Fator	Estimativa de Efeito					Erro Puro					t(5)					p								
	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-129	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-129	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-129	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-129
Média	50,27	50,37	50,89	51,04	51,04	51,00	0,17	0,18	0,21	0,24	0,24	0,28	292,15	279,78	246,31	211,62	211,62	181,37	8,92E-12	1,11E-11	2,09E-11	4,47E-11	4,47E-11	9,67E-11
Fosfato (L)	-3,77	1,76	1,33	1,60	0,83	1,59	0,17	0,18	0,21	0,24	0,24	0,28	-21,94	9,79	6,43	6,65	3,46	5,65	3,66E-6	1,89E-4	1,35E-3	1,16E-3	1,80E-2	2,42E-3
Fosfato (Q)	-3,30	-4,85	-5,28	-5,05	-5,10	-5,54	0,16	0,17	0,19	0,23	0,23	0,26	-20,52	-28,80	-27,32	-22,37	-22,62	-21,05	5,09E-6	9,45E-7	1,23E-6	3,32E-6	3,14E-6	4,48E-6
SDS (L)	-1,26	4,17	3,88	1,61	3,39	2,98	0,17	0,18	0,21	0,24	0,24	0,28	-7,29	23,16	18,77	6,69	14,07	10,59	7,59E-4	2,79E-6	7,90E-6	1,13E-3	3,27E-5	1,30E-4
SDS (Q)	-2,79	-4,34	-4,76	-2,01	-4,58	-5,02	0,16	0,17	0,19	0,23	0,23	0,26	-17,34	-25,76	-24,64	-8,93	-20,32	-19,08	1,17E-5	1,65E-6	2,05E-6	2,93E-4	5,34E-6	7,29E-6
pH (L)	-1,07	-	-	0,97	-	-1,50	0,17	-	-	0,24	-	0,28	-6,22	-	-	4,03	-	-5,34	1,57E-3	-	-	9,98E-3	-	3,08E-3
pH (Q)	-3,06	-2,36	-2,54	-3,54	-2,36	-2,79	0,16	0,17	0,19	0,23	0,23	0,26	-19,01	-14,00	-13,12	-15,71	-10,45	-10,61	7,42E-6	3,34E-5	4,60E-5	1,90E-5	1,39E-4	1,28E-4
Volts (L)	2,32	2,49	2,93	3,66	3,69	3,60	0,17	0,18	0,21	0,24	0,24	0,28	13,47	13,83	14,18	15,16	15,29	12,81	4,03E-5	3,55E-5	3,14E-5	2,26E-5	2,17E-5	5,16E-4
Volts (Q)	-3,42	-2,72	-2,90	-2,67	-2,73	-3,16	0,16	0,17	0,19	0,23	0,23	0,26	-21,27	-16,17	-15,03	-11,85	-12,09	-12,02	4,25E-6	1,65E-5	2,36E-5	7,55E-5	6,85E-5	7,04E-5
Fosfato x SDS	-1,35	-1,47	-3,00	-	-1,87	-2,75	0,21	0,22	0,25	-	0,30	0,34	-6,42	-6,67	-11,84	-	-6,35	-7,98	1,36E-3	1,14E-3	7,58E-5	-	1,44E-3	4,99E-4
Fosfato x pH	-1,85	-	-	-	-	-	0,21	-	-	-	-	-	-8,79	-	-	-	-	-	3,16E-4	-	-	-	-	-
Fosfato x Volts	1,99	-	-	-	-0,98	2,64	0,21	-	-	-	0,30	0,34	9,42	-	-	-	-3,33	7,66	2,27E-4	-	-	-	2,07E-2	6,02E-4
SDS x pH	-	1,30	1,52	-	1,54	-	-	0,22	0,25	-	0,30	-	-	-	5,89	6,00	-	5,22	-	-	1,84E-3	-	3,39E-3	-
SDS x Volts	2,03	-	-	-2,27	-0,94	0,93	0,21	-	-	0,30	0,30	0,34	9,63	-	-	-7,68	-3,18	2,71	2,05E-4	2,00E-3	-	5,95E-4	2,44E-2	4,23E-2
pH x Volts	3,19	2,59	2,36	1,44	2,74	2,61	0,21	0,22	0,25	0,30	0,30	0,34	15,14	11,73	9,31	4,86	9,27	7,58	2,28E-5	7,91E-5	2,41E-4	4,62E-3	2,45E-4	6,32E-4

confiança de 95%, t(5) de Student; p - significância
valores em branco (-) indicam interação não significativa entre os parâmetros

Tabela 9

Estimativas de Efeitos para os Corantes trifenilmetanos, xanteno e indigoide.

Fator	Estimativa de Efeito					Erro Puro					t(5)					p				
	E-127	E-131	E-132	E-133	E-143	E-127	E-131	E-132	E-133	E-143	E-127	E-131	E-132	E-133	E-143	E-127	E-131	E-132	E-133	E-143
Média	50,43	45,69	50,89	52,02	51,05	0,27	0,32	0,43	0,23	0,28	185,53	144,84	117,27	223,91	185,62	8,63E-11	2,98E-10	8,55E-10	3,37E-11	8,61E-11
Fosfato (L)	-	2,82	1,71	1,19	1,08	-	0,32	0,43	0,23	0,28	-	8,94	3,93	5,13	3,94	-	2,92E-4	1,10E-2	3,67E-3	1,09E-2
Fosfato (Q)	-3,00	-4,61	-5,49	-3,91	-3,75	0,25	0,30	0,41	0,22	0,26	-11,80	-15,61	-13,52	-17,98	-14,57	7,69E-5	1,96E-5	3,96E-5	9,77E-6	2,75E-5
SDS (L)	0,83	-2,64	2,96	0,84	0,81	0,27	0,30	0,43	0,23	0,28	3,05	-8,95	6,81	3,64	2,94	2,82E-2	2,90E-4	1,04E-3	1,49E-2	3,22E-2
SDS (Q)	-2,49	-	-4,97	-2,95	-2,98	0,25	-	0,41	0,22	0,26	-9,78	-	-12,25	-13,56	-11,58	1,90E-4	-	6,42E-5	3,91E-5	8,41E-5
pH (L)	-	-1,72	-1,48	-1,30	-1,17	-	0,32	0,43	0,23	0,28	-	-5,46	-3,40	-5,58	-4,25	-	2,80E-3	1,92E-2	2,54E-3	8,06E-3
pH (Q)	-2,76	-3,89	-2,74	-4,48	-4,25	0,25	0,30	0,41	0,22	0,26	-10,84	-13,17	-6,76	-20,59	-16,53	1,16E-4	4,51E-5	1,08E-3	4,99E-6	1,48E-5
Volts (L)	1,74	1,19	3,76	2,04	1,94	0,27	0,32	0,43	0,23	0,28	6,41	3,77	8,67	8,79	7,04	1,37E-3	1,29E-2	3,37E-4	3,16E-4	8,90E-4
Volts (Q)	-3,12	-3,22	-3,11	-3,60	-3,62	0,25	0,30	0,41	0,22	0,26	-12,28	-10,90	-7,67	-16,58	-14,08	6,34E-5	1,13E-4	6,01E-4	1,46E-5	3,25E-5
Fosfato x SDS	-1,23	-	-2,29	-0,94	-1,00	0,33	-	0,53	0,28	0,34	-3,70	-	-4,32	-3,29	-2,97	1,39E-2	-	7,60E-3	2,18E-2	3,13E-2
Fosfato x pH	-	1,69	-	0,80	-	-	0,39	-	0,28	-	-	4,38	-	2,81	-	-	7,17E-3	-	3,77E-2	-
Fosfato x Volts	-1,89	1,43	2,80	1,27	1,14	0,33	0,39	0,53	0,28	0,34	-5,68	3,70	5,27	4,46	3,39	2,35E-3	1,40E-2	3,27E-3	6,61E-3	1,95E-2
SDS x pH	-	-	-	0,75	-	-	-	-	0,28	-	-	-	-	2,64	-	-	-	-	4,62E-2	-
SDS x Volts	-	-2,53	-	-1,19	-1,32	-	0,39	-	0,28	0,34	-	-6,55	-	-4,17	-3,90	-	1,24E-3	-	8,76E-3	1,14E-2
pH x Volts	2,33	-	2,64	0,77	-	0,33	-	0,53	0,28	-	7,01	-	4,97	2,70	-	9,08E-4	-	4,22E-3	4,29E-2	-

confiança de 95%; t(5) de Student; p - significância
valores em branco (-) indicam interação não significativa entre os parâmetros

Para o corante E-102 o único efeito positivo sobre o modelo é a voltagem aplicada ao sistema, assim um aumento desta melhoraria o seu desempenho, porém esse aumento não pode ser muito elevado, uma vez que o valor quadrático da voltagem apresenta um efeito negativo sobre o modelo, limitando assim esse aumento. O efeito negativo que contribui em menor escala para a diminuição da variável de resposta no modelo foi o pH.

No corante E-110 ocorreram os mesmos efeitos para os valores de fosfato, SDS e voltagem, um aumento desses valores contribuem positivamente para os valores de resposta do modelo, porém com a limitação dos valores quadráticos destes efeitos. Novamente o pH contribui de forma negativa para o modelo estudado para o corante E-110.

Assim como para o corante E-110 os efeitos foram os mesmos para os corantes E-122, E-123, E-124, E-129, E-132, E-133 e E-143, tanto para os efeitos positivos para o fosfato, SDS e voltagem como para o efeito negativo para o pH, podemos deduzir que esses corantes apresentam respostas semelhantes para os efeitos estudados para este modelo, mesmo apresentado estruturas químicas diferentes, com a exceção em que o valor de pH também apresenta um efeito positivo para o corante E-123.

No caso do corante E-127 os efeitos mais importantes positivamente são o SDS e a voltagem, os demais efeitos contribuem negativamente para os valores de resposta do modelo. Já para o corante E-131 os valores que contribuem para um efeito positivo de seus valores de resposta são o fosfato e a voltagem, os demais valores de SDS e pH contribuem negativamente para os valores encontrados neste modelo

De um modo geral podemos concluir que os efeitos estudados apresentam um efeito positivo sobre a resposta do valor do modelo, com exceção do pH que contribui, de um modo geral, de forma negativa. Mas esse aumento nos valores dos efeitos positivos é limitado pelos valores quadráticos que contribuem de forma negativa para a resposta do modelo. Assim esses valores podem ser aumentados, mas com um fator limitante que é o valor quadrático desses efeitos.

As equações que representam os modelos experimentais da determinação dos teores de corantes artificiais em função das variáveis estudadas, são apresentadas no **Anexo2**.

Neste estudo cada corante apresentou um grupo de variáveis que mais os influenciou, os gráficos apresentados nas **Figuras 1 e 2**, foram construídos com os valores que mais contribuíram para cada corante. Os fatores que mais contribuíram para esses

gráficos foram as concentrações de fosfato e SDS (corantes E-110, E-122, E-124, E-129 e E-132), concentração de fosfato e pH (corantes E-123, E131, E133 e E143) e concentração de fosfato e voltagem (corantes E-102 e E-127). Essas figuras mostram que os ensaios no ponto central (0), para todos os corantes analisados, estiveram dentro das faixas ótimas de resposta, indicando assim que os valores escolhidos para o delineamento do modelo experimental foram adequados para a realização deste ensaio, sendo eles 10 mmol/L fosfato, 10 mmol/L de SDS, pH 11 e 25 kV.

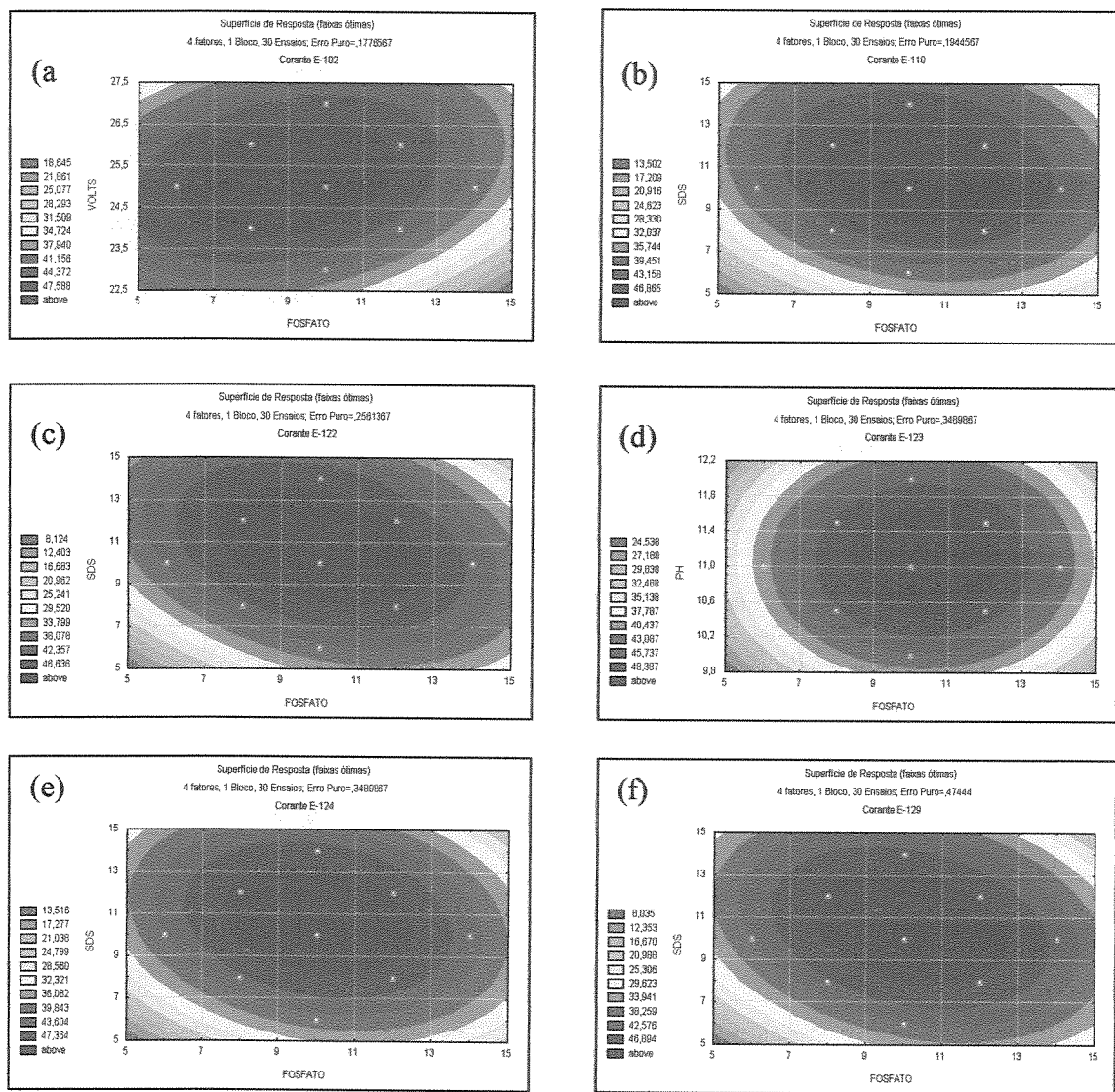


Figura 1. Análise da superfície de resposta (faixas ótimas) corantes azo: (a) E-102; (b) E-110; (c) E-122; (d) E-123; (e) E-124; e (f) E-129.

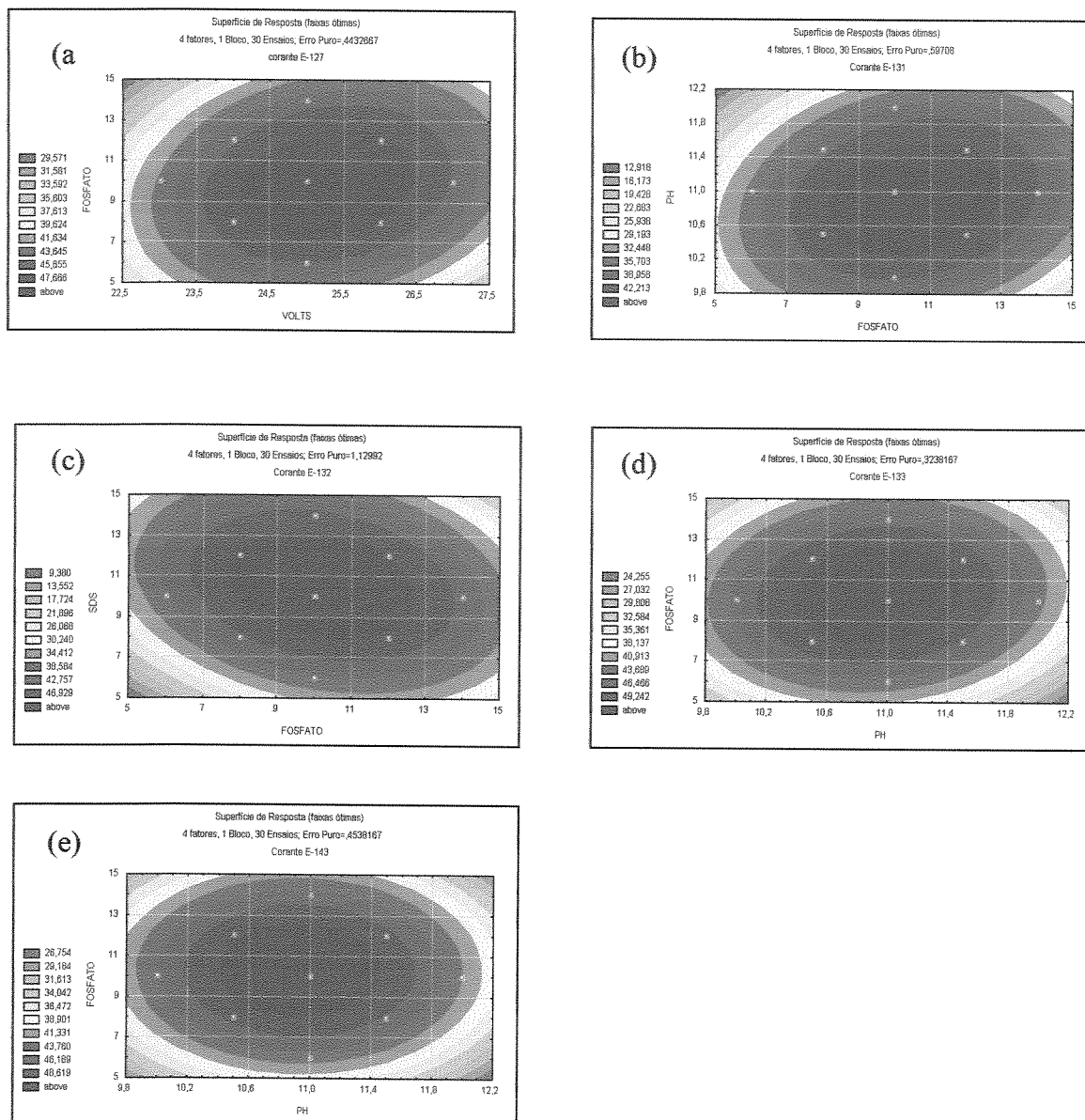


Figura 2. Análise da superfície de resposta (faixas ótimas) corantes trifênilmetanos, xanteno e indigoide: (a) E-127; (b) E-131; (c) E-132; (d) E-133; e (e) E-143.

5. CONCLUSÃO

Através das análises de superfície de respostas das faixas ótimas de trabalho, verificou-se que os valores que melhor apresentaram resultados na determinação da concentração de corantes artificiais foram: 9 a 11mmol/L de fosfato; 9 a 11mmol/L de SDS; 10,5 a 11,5 para o pH; e 24 a 26kV de voltagem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. - *Electrophoresis*. **1999**, 20, 3156.
2. NEVADO, J. J. B.; CABANILLAS, C. G.; SALCEDO, A. M. C. - *Analytical Chimica Acta*. **1999**, 378, 63.
3. COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S. - *Química Nova*. **1997**, 20, (5), 512.
4. SUZUKI, S.; SHIRAO, M.; AIZAWA, M.; NAKAZAWA, H.; SASA, K.; SASAGAWA, H. - *Journal of Chromatography A*. **1994**, 680, 541.
5. BARROS NETO B.; SCARMINIO, I. S.; ROY, E. B. - *Planejamento e Otimização de Experimentos*, 2nd Ed., Campinas SP, editora UNICAMP, 1996.
6. CLYDESDALE, F. M. - *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **1993**, 33 (1), 83.
7. PRADO, M. A.; VILAS BOAS, L. F.; BRONZE, M. R.; GODOY, H. T. - *Analytica*. **2002**, 1 (1), 52.
8. SOARES, L. M. V. - *Revista Instituto Adolfo Lutz*. **2001**, 60 (1), 79.
9. BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. - *Statistic for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building*. NovaYork; Wiley, 1978.
10. BARROS NETO, B; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. - *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e indústria* - Campinas -SP, UNICAMP, 401p, 2001
11. CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. - *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **2001**, 21 (3), 326.

CAPÍTULO 5

COMPARAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E DA ELETROFORESE CAPILAR NA DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAS EM BEBIDAS ALCOÓLICAS

**Marcelo Alexandre Prado^a, Luis Felipe Vilas Boas^b, Maria do Rosário Bronze^b,
Helena Teixeira Godoy^a**

^aDepartamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp – Campinas -
C.P. 6121 - CEP 13083-970- Brasil

^bDepartamento de Química, Instituto de Tecnologia Química e Biológica – Universidade Nova de Lisboa -
Apartado 127 Av. da República (EAN) 2781-901 - Oeiras - Portugal

COMPARAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E DA ELETROFORESE CAPILAR NA DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAS EM BEBIDAS ALCOÓLICAS

**Marcelo Alexandre Prado^{a*}, Luis Felipe Vilas Boas^b, Maria do Rosário Bronze^b,
Helena Teixeira Godoy^a**

^aDepartamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp – Campinas -
C.P. 6121 - CEP 13083-970- Brasil

^bDepartamento de Química, Instituto de Tecnologia Química e Biológica – Universidade Nova de Lisboa -
Apartado 127 Av. da República (EAN) 2781-901 - Oeiras - Portugal

*Bolsista CNPq - Brasil

Resumo

Muitas são as técnicas analíticas para a determinação de corantes artificiais em alimentos e bebidas, mas poucos são os trabalhos que fazem uma análise comparativa dos resultados, facilitando dessa forma a escolha do método de análise. Neste trabalho comparou-se a performance de dois métodos de análise utilizando duas técnicas, a eletroforese capilar (EC) e a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). Os dois métodos foram utilizados para a separação dos corantes artificiais utilizados em alimentos no Brasil. Para a CLAE empregou-se um sistema de gradiente composto por água e metanol numa coluna Microsorb-MV, marca Varian, ODS-2, de 250 mm x 4,6 mm d.i., com 5 µm de diâmetro de partícula. Na EC utilizou-se um capilar de sílica com 73 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno, operando a 35°C, preenchido com solução tampão fosfato de 10 mmol/L contendo 10 mmol/L SDS, a pH 11, e aplicando-se 25 kV de voltagem. A detecção e a quantificação foram feitas da mesma forma para os dois métodos, utilizando a absorção dos compostos na região do visível e padronização externa, respectivamente. Os métodos foram comparados através dos resultados de 12 amostras de bebidas alcoólicas. Os

dados obtidos pelos dois métodos não apresentaram diferença significativa. As diferenças marcantes entre as técnicas ficaram a cargo de outras observações, que podem justificar a escolha de uma técnica em relação à outra. Para a CLAE os tempos de análise foram maiores, na EC o uso de tampão, além da menor quantidade utilizada, implicou em resíduos após a análise não tóxicos. A grande desvantagem sentida na EC foi os maiores limites de detecção, ficando evidente a impossibilidade de percepção de traços, como em uma amostra de *cooler* (amt8) onde a tartrazina (E-102) foi detectada apenas pela CLAE.

Palavras-chaves: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar (EC), métodos

Abstract

There are many analytical techniques for synthetic dye determination in foods and drinks, but few papers make a comparative analysis of the results, which can facilitate the choice of the analytical method. In this work the performance of two methods of analysis using two techniques, capillary electrophoreses (EC) and high performance liquid chromatography (HPLC) was compared. The two methods were used for the separation of synthetic dyes in foods in Brazil. For the HPLC method a gradient elution system with water and methanol made possible the separation of all dyes, in a Microsorb-MV column, Varian, ODS-2, of 250 mm x 4.6 mm i.d., with 5µm of particle diameter. In the EC method a silica capillary with 73 cm of effective length and 75 µm i.d., filled with buffer phosphate solution 10 mmol/L with 10 mmol/L SDS, at pH 11, 35°C, and 25 kV of voltage, carried through the same separation. The detection and quantification were done made in the same manner for the two methods, using absorption in the visible region and external standardization, respectively. The methods were compared through the results obtained with 12 alcoholic beverage samples. The data obtained with the two methods did not present significant difference. Marked differences between the two techniques can be observed in other aspects, that can justify the choice of one technique in relation to the other. For HPLC the analysis time was larger; in EC the use of drain plug as mobile phase, aside from the lesser

amount used, implied non-toxic residues after analysis. The great disadvantage in EC was the higher limits of detection, making evident the impossibility of perception of traces, as in a sample of cooler (amt8) where tartrazina (E-102) was detected only by HPLC.

Key-words: high performance liquid chromatography (HPLC), capillary eletrophoresis (CE), methods

1. Introdução

O principal objetivo dos pesquisadores quando desenvolvem metodologias analíticas é a separação simultânea de vários compostos, com rapidez, precisão, exatidão e alta sensibilidade, além de resultados de qualidade ¹. Desta forma as técnicas de CLAE e EC são tidas como as mais indicadas, mesmo em matrizes complexas e para compostos presentes em quantidades muito baixas ²⁻⁵.

Produtos alimentícios apresentam uma larga variedade de moléculas com diferentes propriedades químicas. A análise desses compostos muitas vezes requer métodos de separação, baseados principalmente em técnicas cromatográficas, sendo a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) uma das mais utilizadas ^{6,7}, principalmente, pelo seu alto poder de separação e capacidade de detectar níveis muito baixos. Recentemente, a eletroforese capilar (EC) vem sendo apresentada como uma técnica capaz de efetuar separações compatíveis às realizadas pela CLAE ⁸⁻¹⁴.

Embora a eletroforese e a CLAE tenham se desenvolvido em campos completamente diferentes, já que os mecanismos de separação se baseiam em princípios diferentes, pode-se considerar que a terminologia e alguns componentes apresentam um desenvolvimento convergente.

Na CLAE os componentes das amostras são separados por diferença de afinidade entre as fases móvel e estacionária. Na eletroforese capilar as separações ocorrem porque os componentes da amostra em presença de um campo elétrico apresentam diferentes mobilidades. Assim pode-se afirmar que as duas técnicas são similares no contexto em que se apresentam, são nomeadamente técnicas de separação.

Diversos autores têm apresentados resultados comparativos entre essas duas técnicas de separação, para os mais diversos compostos presentes em alimentos e bebidas, desde aditivos, passando por íons inorgânicos, até compostos funcionais etc, e em todos eles as conclusões indicam uma similaridade entre os resultados^{6,8-14}.

Uma vez que seus valores em termos de resultados analíticos são semelhantes, o analista deve então questionar qual técnica apresenta melhores condições de trabalho em uma esfera geral. Na **Tabela 1** são abordados vários aspectos essenciais relacionados com a própria concepção dos equipamentos e vantagens e desvantagens de utilização.

Tabela 1

Vantagens e inconvenientes da eletroforese capilar (EC) relativamente à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

	EC	CLAE
eficiência	maior	menor
tempo de análise	curto	mais longo
sensibilidade	menor	maior
instrumentação	fonte alta voltagem	bomba
separação	capilar	coluna
volume de amostra injetada	nL	µL
volume de reagentes	µL	mL
por análise		
tempo de estabilização	curto	mais longo
coleta de frações	difícil	fácil

Na verdade o que deve ser levado em consideração não é apenas se uma técnica é melhor que a outra, mas qual a finalidade a que se destina. De uma forma geral a eletroforese é mais rápida e a CLAE mais sensível.

Alguns autores que trabalharam com corantes artificiais em alimentos relatam as similaridades existentes entre essas técnicas, apenas quando comparadas em termos quantitativos^{9, 10}.

2-Material e equipamentos.

2.1-Amostras

Para as análises utilizaram-se 2 aguardentes aromatizadas, 2 *coolers*, 2 coquetéis, 2 aperitivos (*bitters*), 2 licores e 2 vinhos tinto, todos de diferentes fabricantes brasileiros. Foram adquiridos três diferentes lotes, sendo cada lote formado pela homogeneização completa de duas embalagens. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

2.2.-Padrões

Os corantes utilizados foram fornecidos pela empresa Brastóquio Ltda, com um grau de pureza mínimo de 85%, sendo eles: Tartrazina (E-102), Amarelo Crepúsculo (E-110), Azorrubina (E-122), Amaranto (E-123), Ponceau 4R (E-124), Eritrosina (E-127), Vermelho 40 (E-129), Azul Patente V (E-131), Indigo Carmim (E-132), Azul Brilhante FCF (E-133), Verde Rápido (E-143).

2.3-Reagentes

Os reagentes utilizados foram obtidos da MERCK sendo eles: metanol com grau cromatográfico (*Ominsolv*), hidróxido de amônio e o acetato de amônio. Para o preparo das soluções e fases móveis utilizou-se a água purificada no sistema Milli-Q (Millipore). As fases móveis foram degaseificadas por sistema de borbulhamento com hélio.

2.4-Preparação de amostras e padrões

A preparação de uma única solução estoque ocorreu misturando-se todos os onze corantes artificiais, onde a concentração final foi de, aproximadamente, 40 µg/mL de cada corante presente. Soluções mais diluídas foram preparadas a partir da diluição com água da solução estoque.

As amostras de bebidas foram simplesmente filtradas em filtro HAWP0047 (Millipore), 0,45 µm de poro (com sistema de seringa) e degaseificadas por agitação mecânica, antes de serem introduzidas nos equipamentos.

3. Equipamentos

3.1-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A metodologia se desenvolveu com um cromatógrafo Crystal, com amostrador automático Crystal 230, com alça de amostragem com capacidade de 10 μ L, bomba quaternária Crystal 200, acoplado a um detector de arranjo de diodos Crystal 240, todos os módulos da UNICAM. O sistema controlador e de aquisição de dados foi um computador Shine 486 com programa UICS (Unicam Integrated Control Software) da UNICAM.

Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna analítica Microsorb-MV, marca Varian, ODS-2 de 250 mm x 4,6 mm d.i., com 5 μ m com diâmetro de partícula, protegida por uma coluna de guarda Micropore 30 mm x 4,6 mm d.i., ODS-2 de 5 μ m.

3.1.1. Metodologia Analítica

Os corantes artificiais na CLAE foram separados através de eluição por gradiente, com uma vazão de 0,5 mL/min. Antes de cada injeção uma fase móvel preparativa, H₂O/Metanol (80:20 v/v) + 0,08 mol/L de acetato de amônio, era passada pela coluna durante 5 min. Após esse período a amostra era injetada e ocorria a mudança de fase móvel para 80% de água e 20% de metanol que permanecia durante 4 min, trocando para 70% de água e 30% de metanol, e permanecendo assim até 27 min, em seguida outra mudança para 30% de água e 70% de metanol até 32 min, e retornando a 80% de água e 20% metanol. Após o retorno às condições iniciais a coluna era re-equilibrada por 5 min com a fase móvel preparativa. Um detector de arranjo de diodos (DAD), ajustado para a região do visível foi utilizado para a detecção dos corantes artificiais, os comprimentos escolhidos foram: 450 nm para os amarelos, 525 nm para os vermelhos e 625 nm para os azuis. As identificações foram por comparação dos tempos de retenção, usando padrões analisados nas mesmas condições analíticas, co-cromatografia e espectros de absorção. A quantificação foi conduzida por padronização externa, construída com 7 (sete) níveis de concentração, sendo cada ponto representado pela média de três determinações ¹⁵.

3.2. Eletroforese Capilar

As análises se realizaram em um equipamento marca Prince Technology série 600, com capilar de sílica com 73 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno, operando a 35°C, e voltagem de 25 kV. As amostras foram introduzidas no equipamento por injeção hidrodinâmica com aplicação de 35 mbar de pressão por 9 segundos.

3.2.1. Metodologia

Após a filtragem e degaseificação as amostras foram introduzidas no equipamento, utilizando-se um sistema hidrodinâmico por pressão. Os corantes sintéticos foram separados em um capilar de sílica preenchido com a solução tampão fosfato, aplicando-se uma voltagem de 25 kV, resultando numa corrente eletroforética de 53 µA. A temperatura do sistema foi mantida a 35°C com ventilação forçada. Foi utilizado um detector UV-VIS sendo os eletroforegramas monitorados nos mesmos comprimentos de onda utilizados na CLAE. A identificação foi feita por comparação dos tempos de migração obtidos com padrões analisados nas mesmas condições e por adição de padrões às amostras. A quantificação dos corantes foi feita por padronização externa, com curvas construídas com 7 (sete) níveis de concentração, sendo cada ponto representado pela média de três determinações. A passagem de soluções de NaOH 1 mol/L, NaOH 0,2 mol/L, água e solução tampão, como sistema de limpeza entre as injeções, foi introduzido para minimizar efeitos de possíveis interferentes resultantes de resíduos de amostras anteriores, cada solução durou 1 min. cada com uma pressão de 1000 mbar.

3.2.2. Preparação da solução tampão

O tampão para o sistema de eletroforese capilar foi preparado com 10 mmol/L de fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) e 10 mmol/L de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) ajustado com NaOH para pH 11 em balão de 100 mL, e filtrado em seringa com filtro tipo HAWP0013 (Millipore) de 0,45 µm de poro.

4. Resultados e discussões

A técnica de eletroforese capilar para a determinação de corantes artificiais em bebidas se mostrou bastante satisfatória, com bons limites de detecção e quantificação (**Tabela 2**), com valores comparáveis com os apresentados em literatura ^{16, 17}, e inferiores aos apresentados por Frazier ¹⁸. Na CLAE os limites de detecção e quantificação (**Tabela 2**) foram ainda menores, comparáveis aos encontrados por Prado e Godoy ^{7, 8}, e inferiores aos apresentados por Chen et.al. ¹⁹. Esses valores estão em concordância com os encontrados na literatura, que indicam limites menores para a CLAE, que para a EC ⁹⁻¹².

Tabela 2

Comparação dos limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) obtidos na CLAE e na EC.

	Método	Corantes										
		E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-127	E-129	E-131	E-132	E-133	E-143
LOD (3 X S/R) (µg/mL)	CLAE	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,2	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1
	EC	2,0	2,5	1,3	0,8	0,8	0,5	1,5	0,4	1,5	0,6	0,7
LOQ(10 X S/R) (µg/mL)	CLAE	0,6	0,9	1,3	0,8	1,1	0,6	0,9	0,2	0,8	0,4	0,3
	EC	6,6	7,1	4,3	2,7	2,7	1,7	5,0	1,3	5,0	2,0	2,3

As equações das curvas de calibração utilizadas na padronização externa apresentaram coeficientes de correlação entre 0,9987 e 0,9999 para a CLAE, e 0,9883 a 0,9999 para a EC. Através do coeficiente de correlação (r^2) pode-se observar a boa linearidade na faixa de trabalho utilizada tanto para a CLAE como para a EC, sendo a CLAE com valores ligeiramente melhores.

O uso de tampão fosfato para as análises de EC se mostrou bastante eficiente na separação dos corantes utilizados em bebidas. Para melhor separação dos corantes a utilização de pH 11 também se mostrou bastante eficiente, quando aplicado uma diferença

de potencial ^{16, 17}. A esse pH os corantes artificiais se ionizam, devido a presença de grupos sulfônicos, carboxílicos e fenólicos ²⁰.

Apesar da utilização de pH elevado, foi necessário a utilização de SDS na composição do tampão para melhorar a separação dos corantes artificiais, principalmente para o E-123 e o E-124, que são isômeros de posição. Essa separação já foi descrita em outro trabalho, onde o uso de tensoativos apresentou resultados positivos na separação desses compostos ¹⁸.

O procedimento de limpeza utilizado confirmou as observações de Frazier ¹⁸, Nevado ¹⁶ e Bronze ¹¹ quanto ao uso de NaOH para a limpeza dos capilares ^{11, 18, 20}.

Nas figuras dos eletroforegramas apresentados, os três comprimentos de onda utilizados para uma mesma amostra, foram sobrepostos para uma melhor visualização. A **Figura 1** mostra a mistura de corantes artificiais utilizados.

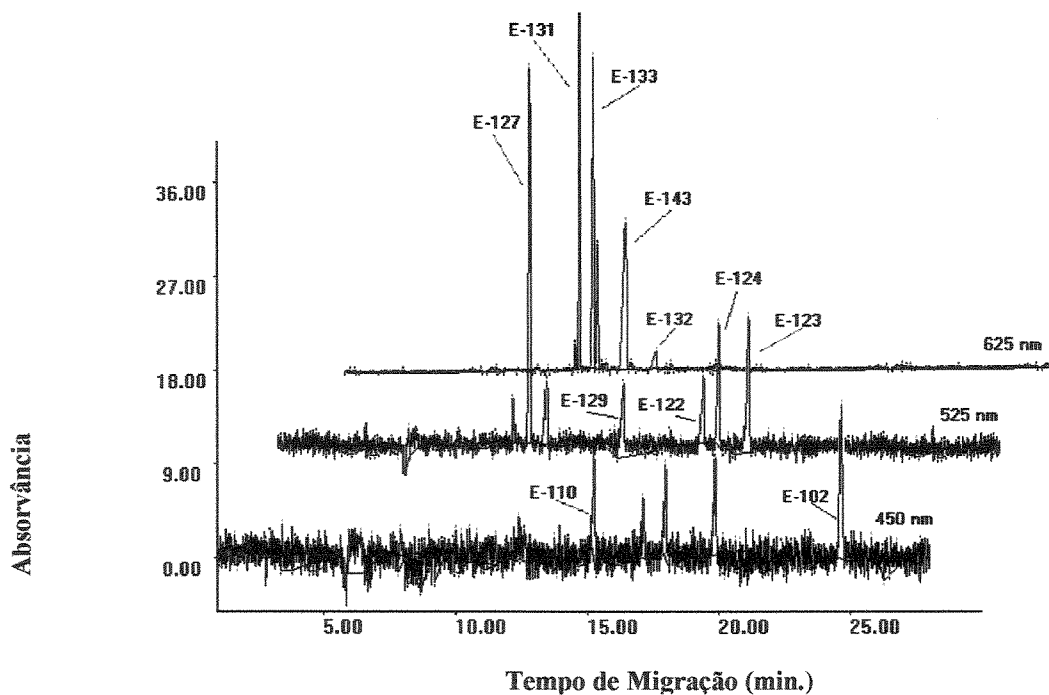


Figura 1. Eletroforegrama de padrões de corantes artificiais. Condições de operação: 10mmol/L Fosfato e 10 mmol/L SDS (pH=11); 25 kV e 35 °C

Para a CLAE, um sistema com fase móvel tamponada apresentou enorme vantagem no condicionamento da coluna analítica, melhorando a resolução dos corantes E-102, E-110, E-123, E-124 e E-132. Outros autores já relataram esse fato quando do uso de fases móveis tamponadas, onde o tampão pode agir inibindo a ionização dos corantes ou diminuindo sua solubilidade²¹⁻²³.

O sistema por gradiente desenvolvido garantiu a separação de todos os corantes num espaço de tempo considerado bom, embora na literatura não haja dados comparáveis, pois nos trabalhos revisados apenas um máximo de oito corantes foram separados numa única determinação^{19, 23, 24}. A **Figura 2** apresenta os cromatogramas da mistura dos onze padrões de corantes artificiais.

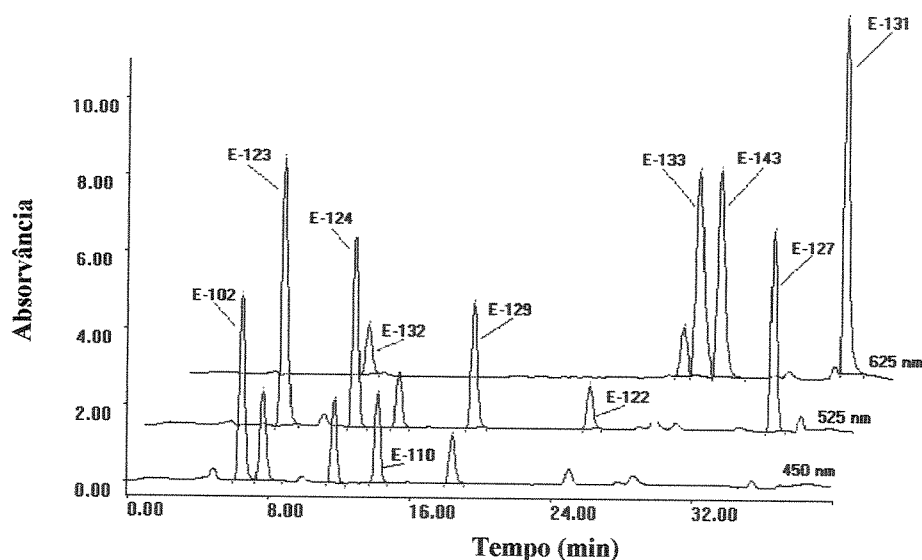


Figura 2. Cromatogramas de padrões de corantes artificiais. Condições de operação descritas no texto.

Observando as **Figuras 1 e 2** podemos verificar que a EC possui um tempo de análise total menor que a CLAE, 28 min contra 40 min, respectivamente. Alguns autores também relatam a maior eficiência da EC devido ao maior número de pratos teóricos^{14,-26}, o que permite a obtenção de picos mais finos.

Com relação às amostras estudadas, para os vinhos, segundo a legislação no Brasil, em seu artigo 33, é proibido imitar ou produzir vinhos artificialmente, portanto o uso de corantes artificiais em vinhos é proibido por lei ²⁵. Mas em nenhuma das 2 amostras de vinhos tinto analisadas pelas duas técnicas, CLAE e EC, foram encontrados corantes artificiais em sua composição, o mesmo ocorrendo para as amostras de aperitivos. Para os *coolers* em uma amostra foi detectada pela CLAE traços do corante Tartrazina, mas não na EC, isto se deve ao menores limites de detecção da CLAE que para EC.

Para os licores e coquetéis o uso de corantes artificiais é permitido e eles são bastante utilizados pelos fabricantes de bebidas. Pelas duas técnicas, CLAE e EC, nas duas amostras de licores, coquetéis e aguardente aromatizadas analisadas foram detectados corantes artificiais em sua composição, mas em nenhum caso encontraram-se teores acima dos determinados pela legislação. Os dados de quantificação das amostras estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3

Resultados de quantificação de diferentes produtos estudados (concentração em µg/mL)

Produto	amostra	método	Corante*				
			E-102	E-110	E-123	E-127	E-133
Aguardente	amt1	CLAE EC			10,0±0,1 ^a 9,9±0,3 ^a		
	amt2	CLAE EC	9,7±0,2 ^a 9,9±0,5 ^a				
Cooler	Amt8	CLAE EC	Traços -				
Coquetel	amt24	CLAE EC					14,1±0,2 ^a 12,0±0,0 ^a
	amt25	CLAE EC			43,4±0,3 ^a 42,3±0,5 ^a		
Licor	amt28	CLAE EC		35,3±0,4 ^a 36,5±0,8 ^a	28,3±0,3 ^a 28,1±0,6 ^a		
	amt29	CLAE EC	31,3±0,4 ^a 30,9±0,4 ^a				14,1±0,2 ^a 11,2±0,4 ^a

*média e estimativa de desvio padrão (n=6).

letras iguais para uma mesma amostra indica não haver diferença significativa, a 5% de significância, entre os métodos.

Foi aplicada uma análise estatística nas amostras para verificar se haviam diferenças significativas entre os resultados obtidos pela CLAE e EC para uma mesma amostra. Como se pode observar na **Tabela 4**, os teores de corantes artificiais encontrados nas amostras, apresentaram valores equivalentes para EC e CLAE, sem diferenças significativas. Esses dados estão de acordo com os encontrados por outros autores^{9,10,12}, que demonstram que, tanto a técnica de eletroforese capilar como a cromatografia a líquido de alta eficiência são equivalentes na determinação dos níveis de corantes artificiais em alimentos e bebidas.

Outro fator importante, que não aparece com os dados, é a não geração de resíduos tóxicos pela EC, pois as soluções utilizadas são tampões de sais em água. Para um mesmo número de análises na EC gerou-se um resíduo de cerca de 10 mL de solução tampão, enquanto que para a CLAE esse volume chegou a 200mL de uma solução metanol:água. Isto torna a EC uma técnica ecologicamente correta.

As principais desvantagens observadas na EC foram a menor repetibilidade e sensibilidade e maiores valores de limites de detecção e quantificação, verificados também por outros autores^{9,10,16,26}.

Um eletroforegrama e um cromatograma da amostra amt29 são apresentados nas **Figuras 3 e 4**, respectivamente.

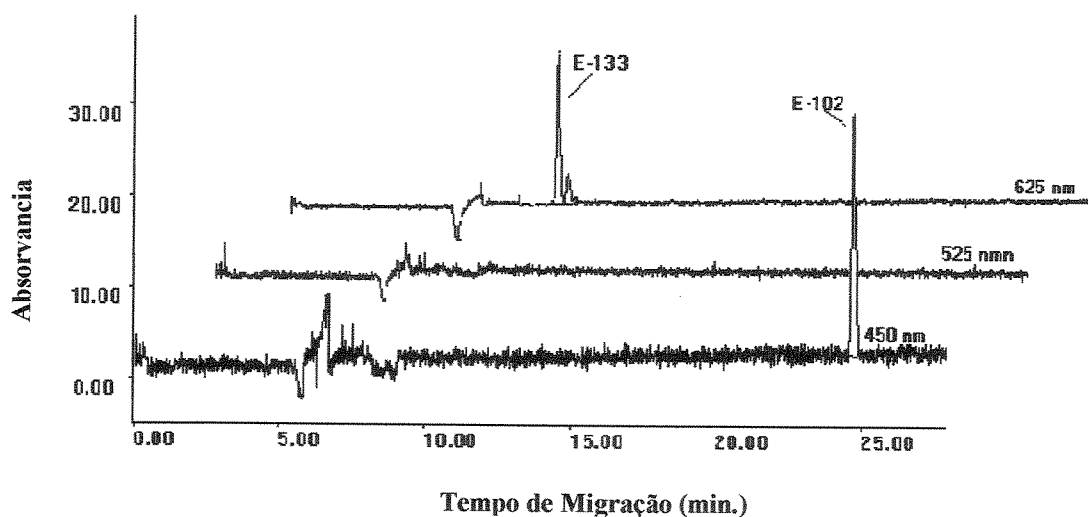


Figura 3. Eletroforegramas da amostra amt29. Condições de operação: 10 mmol/L Fosfato e 10 mmol/L SDS (pH=11); 25 kV e 35 °C

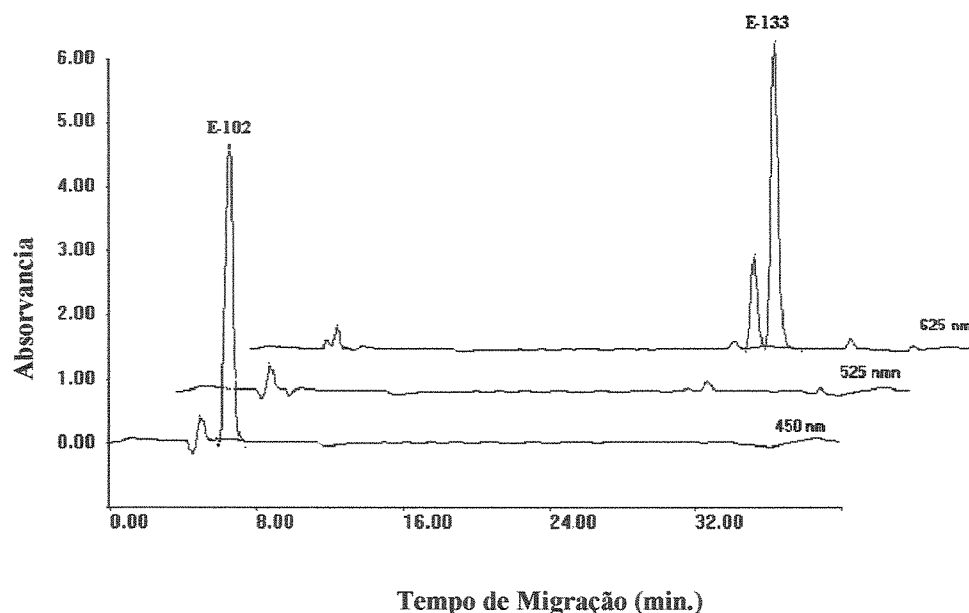


Figura 4. Cromatogramas da amostra of amt29. Condições de operação descritas no texto

5. Conclusões

Tanto o método de eletroforese capilar como o método de cromatografia a líquido de alta eficiência, aplicados para as determinações de corantes artificiais em bebidas aqui apresentados se mostram bastante satisfatórios na separação desses aditivos, sendo simples e eficientes para serem aplicadas, sem a necessidade de um tratamento prévio para as amostras, facilitando assim em muito as análises.

O emprego de corantes pelas indústrias de bebidas se mostrou dentro das normas exigidas pela legislação brasileira, demonstrando assim um bom controle nos processos de fabricação desses produtos.

Desta forma, como muitos autores relatam ambas as técnicas, de EC e CLAE, são similares, conforme observado. Assim a utilização de uma ou outra técnica vai depender mais da escolha particular do analista do que propriamente as vantagens de uma técnica sobre a outra.

6. Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Luis Vilas Boas e à Profa. Maria do Rosário Bronze, pela oportunidade e orientação prestada durante o estágio, decorrido em seus laboratórios em Oeiras, Portugal. Agradecemos também ao CNPq pela concessão da bolsa ao aluno M.A. Prado .

7. Referências

1. AGOSTINI, A. T.; GODOY, H. T. - *Tese de doutorado*. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas. 1997.
2. MACRAE, R. - *HPLC in food analysis*. Academic Press, London, 2th, 1990.
3. COLOMBARA, R. ; TAVARES, M.F.M.; MASSARO, S. – *Química Nova*. **1997**, 20 (5), 512.
4. SUZUKI, S.; SHIRAO, M.; AIZAWA, M.; NAKAZAWA, H.; SASA, K.; SASAKAWA, H. – *Journal of Chromatography A*. **1994**, 680, 541.
5. TAVARES, M. F. M. – *Química Nova*. **1996**, 19 (2), 173.
6. DONG, Y. - *Trends in Food Science & Technology*, **1999**, 10, 87.
7. PRADO M. A.; e GODOY H. T. - *Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos*, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1998.
8. PRADO M. A.; e GODOY H. T. - *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **2002**, 25 (16), 2455.
9. JANDERA, P.; FISCHER, J.; STANEK, V.; KUCEROVÁ, M.; ZVONICEK, P. – *Journal Chromatography A*, **1996**, 738, 201.
10. PÉREZ-URQUIZA, M.; BELTRÁN, J.L.; - *Journal Chromatography A*, **2001**, 914, 331.
11. BRONZE, M. R.; VILAS BOAS, L. F.; BELCHIOR, A. P. - *Journal of Chromatography A*. **1997**, 768, 143.
12. WYNIA, G. S., WINDHORST, G., POST, P. C., MARIS, F.A., *Journal of Chromatography A*. **1997**, 773, 339.
13. KUNKEL, A., GÜNTTE, S., DETTE, C., WÄTZIG, H. - *Journal of Chromatography A*. **1997**, 781, 445

14. HALL III, C. A.; ZHU, A.; ZEECE, M. G. - *Journal Agric. Food Chemistry*. 1994, 42, 919
15. SOARES, L. M. V.- *Revista do Instituto Adolf Lutz*. 2001, 60 (1), 79.
16. NEVADO, J. J. B.; CABANILLAS, C.G.; SALCEDO, A. M. C. -*Analytical Chimica Acta*. 1999,, 378, 63.
17. PÉREZ-URQUIZA, M.; PRAT, M.D.; BELTRÁN, J.L. - *Journal of Chromatography A*. 2000, 871, 227.
18. FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. – *Electrophoresis*. 1999, 20, 3156.
19. CHEN, Q; MOU, S. HOU, X. RIVIELLO, J.M.; NI, Z. *Journal of Chromatography A*. 1998, 827, 73,.
20. HUWEI, L.; TAO, Z.; YINGNAN, Z.; SHIZE, Q.; AIJIN, H.; YILIANG, S. - *Journal of Chromatography A*. 1995, 718, 448.
21. PUTTERMANS, M. L.; DRYON, L.;MASSART, D. L. - *Journal of the AOAC*. 1981, 64, 1.
22. BOLEY, N, P. : BUNTON, N. G.; CROSBY, N. T.; JOHNSON, A. E.; ROPER, P.; SOMMERS, L. – *Analyst*. 1980, 105, 589.
23. LAWRENCE, J. F.; LANCASTER, F. E.; CONACHER, H. B.S. - *Journal of Chromatography*. 1981, 210, 168.
24. YANUKA, Y.; SHALON, Y.; WEISSENBERG, E., NIR-GROSFELD, I. – *Analyst*. 1963, 88, 872.
25. PACHECO, A. O. – *Iniciação à Enologia*, Editora SENAC, São Paulo, 2ª ed., 1999.
26. BRESSOLLE, F., AUDRAN, M., PHAM, T., VALLON, J., *Journal of Chromatography B*. 1996, 687, 303.

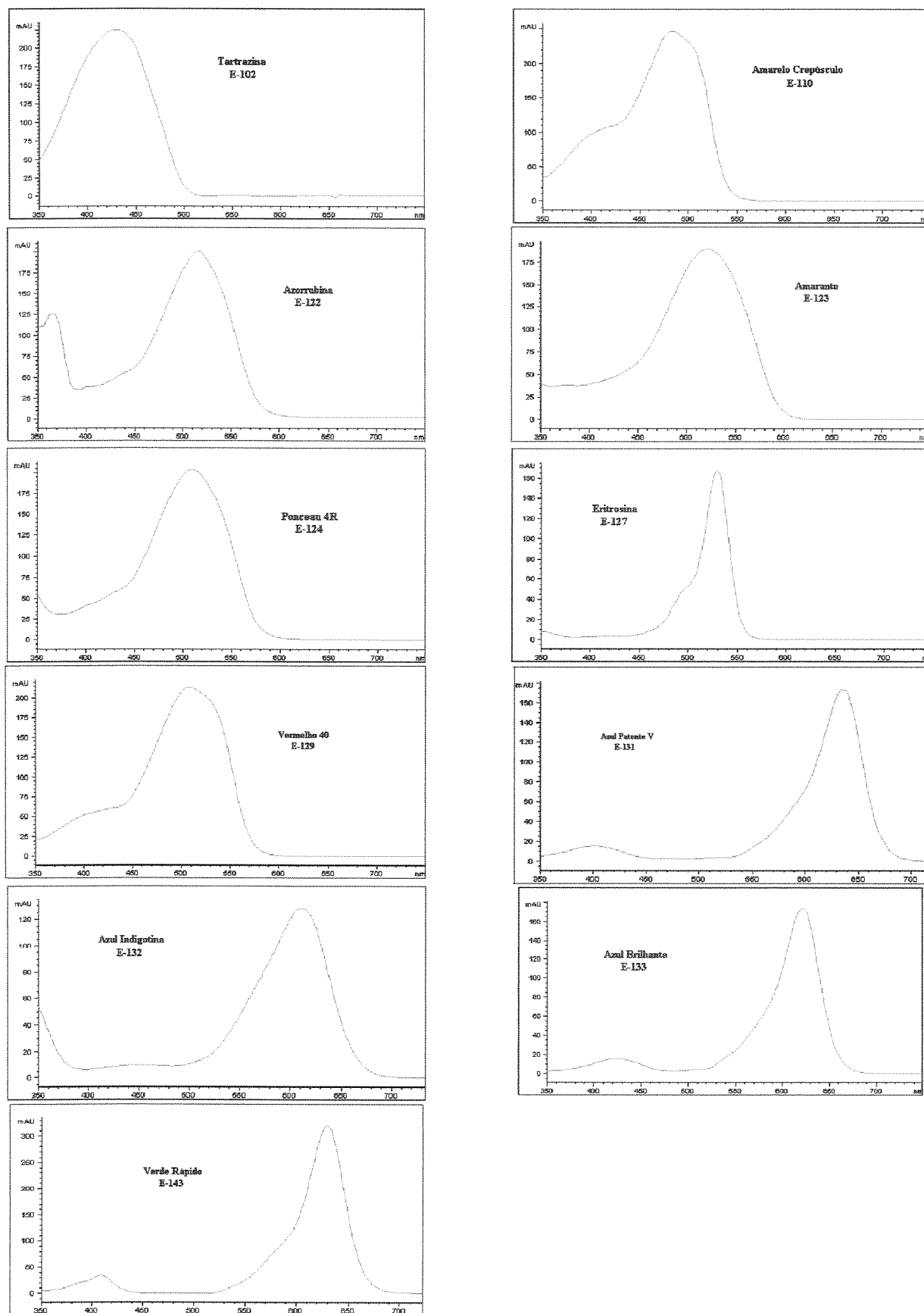
CONCLUSÕES GERAIS

Os métodos desenvolvidos e validados, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar (EC) demonstraram a sua aplicabilidade para a determinação de corante artificiais em bebidas alcoólicas, em virtude do parâmetros obtidos.

Pode-se comprovar, através das amostras analisadas, que as técnicas de CLAE e EC são equivalentes, no aspecto da determinação quantitativa, não apresentando diferenças significativas nos teores de corantes artificiais para uma mesma amostra.

O presente estudo demonstrou uma adequada utilização dos corantes artificiais pelas indústrias de bebidas alcoólicas, uma vez que não foram encontrados teores acima dos permitidos pela legislação brasileira.

ANEXOS



ANEXO 1: Espectros de absorção dos padrões de corantes artificiais

Equação 1 - Corante Artificial E-102

$$Y = 50,27 - 1,89 \text{ Fosfato} - 1,65 \text{ Fosfato}^2 - 0,63 \text{ SDS} - 1,40 \text{ SDS}^2 - 0,53 \text{ pH} - 1,53 \text{ pH}^2 + 1,16 \text{ Volts} - 1,71 \text{ Volts}^2 - 0,68 \text{ Fosfato} \times \text{SDS} - 0,93 \text{ Fosfato} \times \text{pH} + 0,99 \text{ Fosfato} \times \text{Volts} + 1,01 \text{ SDS} \times \text{Volts} + 1,60 \text{ pH} \times \text{Volts}$$

Equação 2 - Corante Artificial E-110

$$Y = 50,37 + 0,88 \text{ Fosfato} - 2,43 \text{ Fosfato}^2 + 2,08 \text{ SDS} - 2,17 \text{ SDS}^2 - 1,18 \text{ pH}^2 + 1,24 \text{ Volts} - 1,36 \text{ Volts}^2 - 0,74 \text{ Fosfato} \times \text{SDS} + 0,65 \text{ SDS} \times \text{pH} + 1,29 \text{ pH} \times \text{Volts}$$

Equação 3 - Corante Artificial E-122

$$Y = 50,89 + 0,66 \text{ Fosfato} - 2,64 \text{ Fosfato}^2 + 1,94 \text{ SDS} - 2,38 \text{ SDS}^2 - 1,27 \text{ pH}^2 + 1,47 \text{ Volts} - 1,45 \text{ Volts}^2 - 1,50 \text{ Fosfato} \times \text{SDS} + 0,76 \text{ SDS} \times \text{pH} + 1,18 \text{ pH} \times \text{Volts}$$

Equação 4 - Corante Artificial E-123

$$Y = 51,04 + 0,80 \text{ Fosfato} - 2,52 \text{ Fosfato}^2 + 0,81 \text{ SDS} - 1,01 \text{ SDS}^2 + 0,49 \text{ pH} - 1,77 \text{ pH}^2 + 1,83 \text{ Volts} - 1,34 \text{ Volts}^2 - 1,13 \text{ SDS} \times \text{Volts} + 0,72 \text{ pH} \times \text{Volts}$$

Equação 5 - Corante Artificial E-124

$$Y = 51,04 + 0,42 \text{ Fosfato} - 2,55 \text{ Fosfato}^2 + 1,70 \text{ SDS} - 2,29 \text{ SDS}^2 - 1,18 \text{ pH} + 1,84 \text{ Volts} - 1,36 \text{ Volts}^2 - 0,94 \text{ Fosfato} \times \text{SDS} - 0,49 \text{ Fosfato} \times \text{Volts} + 0,77 \text{ SDS} \times \text{pH} - 0,47 \text{ SDS} \times \text{Volts} + 1,37 \text{ pH} \times \text{Volts}$$

Equação 6 - Corante Artificial E-127

$$Y = 50,43 - 1,50 \text{ Fosfato}^2 + 0,42 \text{ SDS} - 1,24 \text{ SDS}^2 - 1,38 \text{ pH}^2 + 0,87 \text{ Volts} - 1,56 \text{ Volts}^2 - 0,62 \text{ Fosfato} \times \text{SDS} - 0,95 \text{ Fosfato} \times \text{Volts} + 1,17 \text{ pH} \times \text{Volts}$$

Equação 7 - Corante Artificial E-129

$$Y = 51,00 + 0,79 \text{ Fosfato} - 2,77 \text{ Fosfato}^2 + 1,49 \text{ SDS} - 2,51 \text{ SDS}^2 - 0,75 \text{ pH} - 1,40 \text{ pH}^2 + 1,80 \text{ Volts} - 1,58 \text{ Volts}^2 - 1,37 \text{ Fosfato} \times \text{SDS} + 1,32 \text{ Fosfato} \times \text{Volts} + 0,47 \text{ SDS} \times \text{Volts} + 1,31 \text{ pH} \times \text{Volts}$$

Equação 8 - Corante Artificial E-131

$$Y = 45,69 + 1,41 \text{ Fosfato} - 2,30 \text{ Fosfato}^2 - 1,32 \text{ SDS}^2 - 0,86 \text{ pH} - 1,94 \text{ pH}^2 + 0,60 \text{ Volts} - 1,61 \text{ Volts}^2 + 0,85 \text{ Fosfato} \times \text{pH} + 0,71 \text{ Fosfato} \times \text{Volts} - 1,27 \text{ SDS} \times \text{Volts}$$

Equação 9 - Corante Artificial E-132

$$Y = 50,89 + 0,85 \text{ Fosfato} - 2,74 \text{ Fosfato}^2 + 1,48 \text{ SDS} - 2,49 \text{ SDS}^2 - 0,74 \text{ pH} - 1,37 \text{ pH}^2 + 1,88 \text{ Volts} - 1,56 \text{ Volts}^2 - 1,15 \text{ Fosfato} \times \text{SDS} + 1,40 \text{ Fosfato} \times \text{Volts} + 1,32 \text{ pH} \times \text{Volts}$$

Equação 10 - Corante Artificial E-133

$$Y = 52,02 + 0,60 \text{ Fosfato} - 1,95 \text{ Fosfato}^2 + 0,42 \text{ SDS} - 1,47 \text{ SDS}^2 - 0,65 \text{ pH} - 2,24 \text{ pH}^2 + 1,02 \text{ Volts} - 1,80 \text{ Volts}^2 - 0,47 \text{ Fosfato} \times \text{SDS} + 0,40 \text{ Fosfato} \times \text{pH} + 0,64 \text{ Fosfato} \times \text{Volts} + 0,37 \text{ SDS} \times \text{pH} - 0,59 \text{ SDS} \times \text{Volts} + 0,38 \text{ pH} \times \text{Volts}$$

Equação 11 - Corante Artificial E-143

$$Y = 51,05 + 0,54 \text{ Fosfato} - 1,87 \text{ Fosfato}^2 + 0,40 \text{ SDS} - 1,49 \text{ SDS}^2 - 0,58 \text{ pH} - 2,13 \text{ pH}^2 + 0,97 \text{ Volts} - 1,81 \text{ Volts}^2 - 0,50 \text{ Fosfato} \times \text{SDS} + 0,57 \text{ Fosfato} \times \text{Volts} - 0,66 \text{ SDS} \times \text{Volts}$$

ANEXO 2: Equações que representam os modelos experimentais da determinação dos teores de corantes artificiais em função das variáveis estudadas.