

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA
Departamento de Ciência de Alimentos

METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Marcelo Alexandre Prado aprovada pela Comissão Julgadora em 03 de agosto de 1998.

Campinas, 03 de agosto de 1998.

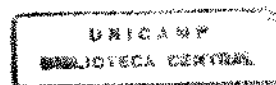

Prof. Dra. HELENA T. GODOY
Presidente da Banca

Marcelo Alexandre Prado
Engenheiro de Alimentos

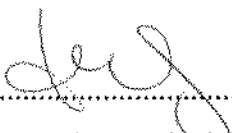
Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas, 1998.



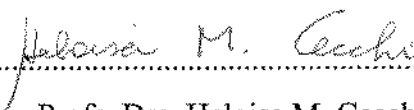
Membros da Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada junto à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.



Profª. Dra. Helena Teixeira Godoy

FEA/UNICAMP

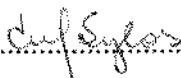
Presidente



Profª. Dra. Heloisa M. Cecchi

FEA/UNICAMP

Membro



Profª. Dra. Célia M. Sylos

UNESP/ARARAQUARA

Membro

Profª. Dra. Adilma R. P. Scamparini

FEA/UNICAMP

Membro

Campinas, 1998

*Dedico este trabalho a meus pais Brasil (in memoriam)
e Natalina, a meus irmão e sobrinhos,
pelo amor e carinho !*

*Dedico à Simone, meu amor,
Pelo companheirismo, amor e compreensão.*

*...Quem me dera ao menos uma vez,
que o mais simples fosse visto
como o mais importante...*

Renato Russo

AGRADECIMENTOS

À Helena Godoy pela orientação e acima de tudo, pelo apoio e carinho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

À banca examinadora pelas críticas e sugestões.

Aos meus amigos Alessandra (Berta), Selma, Gabriela (Gabit) pela ajuda em tudo.

Ao pessoal do laboratório de Análise de Alimentos, pela paciência e companheirismo.

Ao pessoal da secretaria do departamento de Ciências de Alimentos pela ajuda e paciência.

A todos que de certa forma ajudaram na realização deste trabalho.

Muito Obrigado,

MARCELO ALEXANDRE PRADO

CONTEÚDO

RESUMO.....	i
SUMMARY.....	iii
INTRODUÇÃO.....	1
Referências Bibliográficas.....	3
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
Aditivos para Alimentos.....	4
Corantes e Importância da Cor.....	4
Corantes Artificiais para Alimentos.....	7
Corantes Artificiais Permitidos no Brasil.....	8
Corantes azo.....	9
Corantes xantenos.....	13
Corantes trifenilmetanos.....	14
Corantes indigóides.....	15
Métodos para Análise de Corantes Artificiais.....	15
Métodos clássicos.....	15
Métodos por CLAE.....	18
Validação da Metodologia.....	19
Referências Bibliográficas.....	22
 CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS E BEBIDAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	 29
Resumo.....	29
Summary.....	30
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	34
Material.....	34
Reagentes.....	34
Equipamentos.....	34
Método.....	35
Metodologia analítica.....	35
Validação do método.....	36
Limites de Detecção e Quantificação.....	36
Recuperação de Padrões.....	38
Repetibilidade.....	38
Rusticidade.....	38
Resultados e Discussão.....	39

Etapas analíticas.....	39
Validação da metodologia.....	50
Conclusões.....	54
Referências Bibliográficas.....	54

CAPÍTULO 3 - TEORES DE CORANTES ARTIFICIAIS DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM PÓ PARA GELATINA..... 59

Resumo.....	59
Summary.....	60
Introdução.....	61
Material e Métodos.....	63
Material.....	63
Reagentes.....	63
Equipamentos.....	63
Método.....	64
Etapa cromatográfica.....	64
Detecção e identificação.....	65
Resultados e Discussão.....	65
Conclusões.....	76
Referências Bibliográficas.....	76

CAPÍTULO 4 - TEORES DE CORANTES ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS..... 79

Resumo.....	79
Summary.....	80
Introdução.....	81
Material e Métodos.....	82
Material.....	82
Reagentes.....	83
Equipamentos.....	83
Método.....	84
Método Analítico.....	84
Cromatografia.....	85
Detecção e Identificação.....	85
Resultados e Discussão.....	88
Conclusões.....	103
Referência Bibliográficas.....	103

CONCLUSÕES..... 105

SUGESTÕES..... 107

ANEXOS.....	108
Anexo 1 - Curvas de padronização externa do amarelo crepúsculo e tartrazina.....	108
Anexo 2 - Curvas de padronização externa da eritrosina e vermelho 40..	109
Anexo 3 - Curvas de padronização externa do ponceau 4R e amarantho...	110
Anexo 4 - Curvas de padronização externa do azul indigotina e azul brilhante.....	111
Anexo 5 - Espectro dos corantes artificiais presentes nas amostras.....	112
Anexo 6 - Gráficos das proporções usadas dos corantes artificiais nos produtos analisados.....	113
Anexo 7 - Gráficos das proporções usadas dos corantes artificiais nos produtos analisados.....	114
Anexo 8 - Gráficos das proporções usadas dos corantes artificiais nos produtos analisados.....	115
Anexo 9 - Gráficos das proporções usadas dos corantes artificiais nos produtos analisados.....	116
Anexo 10 - Gráficos das proporções usadas dos corantes artificiais nos produtos analisados.....	117

RESUMO GERAL

O controle dos níveis de corantes artificiais utilizados em alimentos não é um procedimento rotineiro, especialmente, pela falta de metodologia adequada capaz de responder à demanda do número de análises e a determinações quantitativas nos mais variados tipos de alimentos, além de se tornar viável para implantação nos laboratórios de controle de nosso país. Visando superar esse problema, foi desenvolvida e avaliada uma metodologia para a determinação qualitativa e quantitativa dos oito corantes artificiais, permitidos para a utilização em alimentos pela legislação brasileira, utilizando a técnica de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). O método desenvolvido foi aplicado na determinação dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo, amaranço, ponceau 4R, vermelho 40, eritrosina, azul indigotina e azul brilhante, em 10 (dez) diferentes tipos de produtos alimentícios, como pós para gelatina, refrescos em pó, refrigerantes, bebidas isotônicas, sucos concentrados artificiais, sucos natural de frutas, cereais matinais coloridos, balas, gomas de mascar e confeitos.

Principalmente, em relação aos métodos oficiais e outros empregados, as vantagens da nova metodologia podem ser resumidas, além da determinação simultânea dos 8 (oito) corantes, na simplicidade da etapa de extração, na utilização de reagentes mais comuns e com menores níveis de toxicidade, na eluição isocrática e na não necessidade do uso de pares iônicos na fase móvel. Todos esse parâmetros em conjunto tornaram a análise rápida, além de alta reprodutibilidade, característica inerente à técnica empregada. Os corantes são extraídos com água aquecida a 40-50°C. As amostras de os cereais matinais os corantes são extraídos com solução amoniacal (10% em etanol). Bebidas isotônicas e refrigerantes são apenas degaseificados. Após o ajuste do volume com água, uma pequena porção é coletada e centrifugada a 15.000 rpm por um período de 10 minutos. O sobrenadante é filtrado em filtro fluopore FHLP 01300 de 0,5 µm e injetado no cromatógrafo. O condicionamento da coluna, realizado pela passagem de uma solução de água/metanol (70:30) + 0.08M de acetato de amônio, por 12,5 minutos, entre cada injeção, é importante para a obtenção de uma boa resolução entre os corantes. Após o condicionamento da coluna, ocorre uma mudança de fase móvel, apenas com a

retirada do acetato de amônio, e os corantes são eluídos em 20 minutos de corrida. A detecção é feita na região do visível, com a utilização de um detector de arranjo de diodos, e a quantificação é feita através de curvas de padronização externa. Os limites de detecção e recuperação foram respectivamente: 0.51 µg/mL e 96.3% para o azul de indigotina; 1.30 µg/mL e 98.2 % para o azul brilhante; 1.02 µg/mL e 102% para o amaranço; 0.57 µg/mL e 96.8 % para o ponceau 4R; 1.10 µg/mL e 100.3 % para o vermelho 40; 0.51 µg/mL e 96 % para a eritrosina; 0.70 µg/mL e 99.7% para a tartrazina e 1.83 µg/mL e 98.9 % para o amarelo crepúsculo.

Entre os alimentos analisados, as misturas de pós para gelatina, bebidas isotônicas, refrigerantes, sucos concentrados artificiais e confeitos de chocolate estavam abaixo do limite quantitativo estabelecido pela legislação brasileira, de 10mg/100g ou 10mg/100mL, entretanto, todas as amostras de cereais matinais coloridos apresentaram níveis superiores a esses limites. Trinta e sete por cento das amostras analisadas de preparados sólidos para refresco, 63% das gomas de mascar, 30% das balas duras e 18% das balas mastigáveis tiveram o conteúdo de corantes acima do permitido. Nas amostras de sucos naturais de frutas não foi observada a presença de corantes sintéticos. Apenas algumas amostras de refresco em pó, goma de mascar e confeitos de chocolate apresentaram mistura de mais de três corantes. Em nenhuma das amostras analisadas foi observada a presença de corante não permitido. Os resultados obtidos neste trabalho, além de demonstrarem as vantagens e aplicabilidade da metodologia desenvolvida, aponta para a necessidade de maior rigor no controle dos níveis de corantes artificiais nos alimentos.

GENERAL SUMMARY

The control of level of synthetic dyes food isn't a routine procedure, specially by the lack of adequate methodology capable of answering the demand of the number of analyses and the quantitatives determination in the most different kinds of food, besides making available to the implantation in control labs in our country. Trying to overcome this problem, it was developed and avaliated a methodology to a qualified and quantified of eight artificial colourants allowed to be used by the brazilian legislation, using the technique of high performance liquid chromatography (HPLC). The developed method was applied in the determination of the yellow nº 5, sunset yellow, bordeaux S, red nº 17, red nº 40, red nº 3, indigo carmin and brilhant blue colouring, in ten different kinds of food products, as jelly powder, soft drinks, isotonic drinks,artificially concentrated juice, natural fruit juice, mormning colored cereals, candies, chewing gums and sweet.

Most of all, in relation to the offial methods and other used ones, the advantage of the new technology can be resumed, besides the simultaneous determination of the eight colours, in the simplicity at the point of extraction, in the use of more common reactors and with lower levels of toxicity, in the isocratic elution and on the no need of using ionic pairs in the mobil fase. All these parameters in group become the analyses quick, besides the high reproductivety, intrinsical characteristic to the used technique. The colouring were taken with heated to 40 – 50° C. For the samples of the morning cereals the colouring were taken with the amonical solution (10% in ethanol) Isotonic drinks and soft drinks were only ungasified. After the adjustment of the volume with water, a small portion was collected and untrifuged to 15.000 rpm for a period of ten minutes. The surface was filtered in a fluopore filter FHLP 01300 of 0.5 cm and put in the chromatography. The regulation of the columm done by the fluid of a solution of water/methanol (70/30) + 0.08 M of ammonium acetate, by 12.5 minutes, between each injection, is important to the obtainance of a good resolution among the colouring. After the regulation of the column, there was a change in the motive fase, only with removal of the ammonium acetate, and the colouring were eluted in a 20 minute race. The detection was made in the visible region, with the help of a diode array detector and the quantification was done through the curves of outside

padronization the limits of detection and recuperation were respectively 0.51 ug/ml and 96.3% to the indigo carmin, 1.30 ug/ml and 98.2% to the brilliant blue , 1.02 ug/ml and 102% to the bordeaux S, 0.57 ug/ml and 96.8% to the red nº 17, 1.10 ug/ml and 100.3% to the red nº 40, 0.51 ug/ml and 96% to the red nº3 , 0.70 ug/ml and 99.7% to the yellow nº 5 and 1.83 ug/ml and 98.9% to the sunset yellow.

Among the tested food, all the samples of jello powder, isotonic drinks, concentrated artificial price and chocolate sweet were beyond the quantified stablished by the brazilian legislation, of 10 mg/100g, although, all the samples of morning colored cereal showed higher levels to these limits 37% of the analysed samples of solid preparation to refreshment, 63% of the chewing gum, 30% of the hard candies and 18% of the chewing candies had the colouring containing above allowed. The results obtained in this work, besides showing the advantages and application of the developed methodology, aim to the necessity of bigger severity in the control levels of synthetic dyes in food.

INTRODUÇÃO

O padrão de desenvolvimento adotado no Brasil, principalmente, nas últimas três décadas, proporcionou a formação de um mercado de alimentos elaborados cuja diversificação e sofisticação reflete o poder aquisitivo de uma parcela da população significativa ao mercado. Reflete, também, o intensivo marketing da indústria de alimentos, chegando a provocar mudanças de hábitos de consumo na população das grandes cidades.

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 os aditivos, entre eles os corantes, conservadores, aromatizantes, enzimas, fermentos, e de matérias-primas intermediárias, como amido, farinha, dentre outros (SATO et al., 1992).

Segundo ALVAREZ (1989), o crescente emprego de insumos, como os aditivos intencionais, no desenvolvimento de novos produtos e processos da indústria de alimentos, tem demonstrado que a indústria de insumos adquiriu maior importância no desenvolvimento de inovações tecnológicas que a indústria de bens de capital. Isso leva a uma alta especialização no segmento de insumos, pois a indústria passa a exigir maior qualidade no produto final.

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 consumidores, indústria, pesquisadores e 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.

A indústria de corantes artificiais para alimentos assumiu um papel muito importante. A manutenção da cor natural do alimento se constitui num fator fundamental para o marketing do produto, em face da primeira avaliação do consumidor. Antes do paladar os alimentos coloridos seduzem as pessoas pela visão. A lógica do consumo desses produtos se inicia pelos olhos, alimentos coloridos, vistosos, atraentes só podem

ser deliciosos. Em geral, a importância da aparência do produto para sua aceitabilidade é a maior justificativa para o emprego de corantes.

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 estocagem, havendo a necessidade de se adicionar o corante afim de suplementar ou realçar a coloração perdida e, principalmente, para 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 de alimentos de origem diversa quanto à região geográfica, cultivares, condições climáticas, grau de amadurecimento, hábitos alimentares e outros.

Por essas razões fica claro o grande emprego dos corantes sintéticos pelas indústrias de alimentos, além do que, os corantes artificiais possuem um custo relativamente mais baixo que os corantes naturais, maior faixa de coloração e estabilidade melhor, tudo isso associado à pouca disponibilidade dos corantes naturais. O uso indiscriminado desses corantes artificiais, no entanto, pode mascarar ou disfarçar o consumo de produtos mal processados ou já deteriorados. Infelizmente, o consumidor por si só é incapaz de controlar a própria exposição aos diferentes corantes presentes nos alimentos e, conseqüentemente, não pode avaliar se o benefício recebido justifica o risco a que está exposto (TOLEDO, 1990)

Nutricionalmente os corantes artificiais não acrescentam nada ao alimento. 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 humana. Os corantes artificiais estão sempre na mira das investigações científicas devido às reações adversas que alguns consumidores podem apresentar.

Os aditivos são inofensivos à saúde desde que obedecendo os percentuais máximos estabelecidos pelo DINAL (Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos) e/ou Codex Alimentarius. Esses estabelecem para cada aditivo a quantidade diária aceitável de ingestão (IDA). Todos os corantes artificiais permitidos pela Legislação Brasileira já possuem valor definido de IDA, embora esses valores estão sujeitos a alterações contínuas, dependendo dos resultados de estudos toxicológicos. O comitê de peritos da FAO/OMS em Aditivos Alimentares (JECFA), a nível internacional,

recomenda que cada país verifique periodicamente o consumo total de cada aditivo, com base em estudos de dieta, para se assegurar que a ingestão total do aditivo não ultrapasse a IDA.

Ainda existem diferentes opiniões quanto à inocuidade dos diversos corantes artificiais. Consequentemente, 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 dos corantes presentes. Não basta provar que o produto é colorido artificialmente, cada corante deve ter sua identidade estabelecida e quantificado individualmente. A técnica por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) possui, certamente, as características necessárias para essa finalidade, não só pela rapidez e exatidão, mas também pela alta sensibilidade, mesmo para analitos presentes em quantidades baixas, como os corantes, e em matrizes complexas, tais como os alimentos, além de permitir análises diretas sem a necessidade de técnicas de limpeza do extrato.

Os objetivos deste trabalho foram, portanto, o desenvolvimento de uma metodologia por CLAE para a determinação simultânea dos oito diferentes corantes sintéticos permitidos para alimentos no Brasil, através de condições cromatográficas mais simples, validação intralaboratorial da metodologia desenvolvida e sua aplicação na determinação de corantes artificiais em alimentos variados.

Referências Bibliográficas

- . ALVAREZ, V.M.D. *A participação da indústria de insumos na dinâmica da produção da indústria de alimentos: o setor de massas e biscoitos*. Campinas-UNICAMP, 1989, 56p.
- . SATO, G.S. ; CHABARIBERY, D. ; MAIA, M.L. ; CARVALHO, F.C. ; NETO, A.N. ; MARQUES, S.A. *Tendências de mercado para corantes na indústria de alimentos, Agricultura em São Paulo, SP, 39(1): 1-50, 1992.*
- . TOLEDO, M.C.F. & GUERCHON, M.S. Corantes artificiais em alimentos. *Ciência e tecnologia de Alimentos, 10(1): 120-136, 1990.*

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ADITIVOS PARA ALIMENTOS

Grande parte dos alimentos industrializados são resultantes de uma fórmula de vários ingredientes destinados a dar consistência, cor, sabor e valor nutritivo desejados.

Existe uma grande semelhança entre “ingrediente” e “aditivo”, já que ambos são substâncias químicas que constituem a fórmula do produto (RIEDEL, 1987).

Normalmente, se considera como ingrediente os produtos básicos incluídos na fórmula em maior volume, e aditivos os produtos complementares em pequeno volume destinados a preservar ou produzir determinadas características no alimento formulado. Portanto, podemos definir os aditivos como sendo: “toda substância ou mistura, dotadas ou não de valor nutritivo, adicionadas 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”.

Os corantes são uma classe de aditivos sem valor nutritivo, introduzidos nos alimentos e bebidas com o único objetivo de conferir cor, tornando os alimentos mais atrativos. Por esse motivo, do ponto de vista da saúde, os corantes em geral não são recomendados, justificando seu uso, quase que exclusivamente, do ponto de vista comercial (RIEDEL, 1987).

CORANTES e IMPORTÂNCIA DA COR

Adicionar corantes aos alimentos para torná-los mais atrativos é uma prática de longa data. Civilizações antigas retiravam substâncias da natureza para colorir seus alimentos. 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 (IFT, 1986; VALIM, 1989).

Com a descoberta no séculos XVIII e XIX dos corantes sintéticos e a constatação da influência da cor na aparência e, conseqüentemente, uma melhor aceitação dos produtos pelos consumidores, o interesse pelo uso dos corantes artificiais aumentou enormemente, inclusive na tentativa de mascarar alimentos de má qualidade. Vários alimentos sofreram esses abusos, sendo coloridos até com substâncias altamente tóxicas (IFT, 1980). Na Inglaterra, no começo do século foram relatados casos do uso de sulfato de cobre para colorir de verde conservas de picles, chumbo negro em folhas de chá para parecerem novas e, para realçar a coloração alaranjada de alguns queijos, o chumbo vermelho (IFT, 1986).

O emprego de materiais sintéticos, principalmente para colorir, iniciou em 1856 com a síntese do primeiro corante derivado da hulha. Desde então os corantes sintéticos tem sido cada vez mais usados, principalmente por apresentarem maior uniformidade, estabilidade e poder de tingimento em relação às substâncias naturais, incentivando novas descobertas (BOLEY et al., 1980).

A cor é associada a muitos aspectos da nossa vida e influência bastante as nossas decisões do dia-a-dia, incluindo aquelas que envolvem os alimentos. A aparência, segurança, características sensoriais e aceitabilidade dos alimentos são todas afetadas pela cor.

A associação da aceitação de certas cores com certos alimentos esta relacionada com o nosso desenvolvimento cognitivo. Cores azuis ou verdes sugestionam queijos mofados, cores marrons (escuras) frutas podres. Esse mecanismo de advertência, em casos extremos, pode ocasionar aversões a determinados alimentos. Em alguns estudos, alimentos foram coloridos de forma anormal, como por exemplo peras vermelhas, bifes azuis e ovos verdes, o que causou aversões em quase todos os provadores (CLYDESDALE, 1993).

Muitos estudos mostram o efeito da cor sobre outras características sensoriais, indicando uma interrelação que resultará no aceite ou não do alimento. Estudos realizados por GIFFORD et al. (1987), GIFFORD E CLYDESDALE (1986), CLYDESDALE (1984), JOHNSON E CLYSDASDE (1982), JOHNSON et al. (1983), ROTH et al. (1988) e TOURILA-OLLIKAINUM (1982) (todos citados por CLYDESDALE, 1993) demonstraram, claramente, que a cor afeta a percepção de

outras características sensoriais, como o doce, salgado e o *flavor*. Isto pode estar associado ao fato de que o consumidor “enxerga” sabores pela cor. O verde em geral está associado a frutas pouco maduras e portanto mais azedas. O sabor salgado, no entanto, não apresenta uma relação direta com as cores, isto foi demonstrado, onde soluções salgadas coloridas não apresentaram diferentes valores de *threshold* com relação às soluções padrões incolores, embora se tenha notado que mudanças de cores cause confusão com relação as estimativas de sabor salgado.

Em estudos realizados por HALL (citado por CLYDESDALE, 1993) com sorvetes de limão, laranja, abacaxi e outros, indicaram uma relação da cor com o flavor dos alimentos. Quando foram submetidos aos provadores sorvetes de lima com coloração verde, 75% deles acertaram o flavor, mas quando essa coloração foi alterada para púrpura, apenas 45% identificaram corretamente o flavor de lima. Por esses estudos, podemos verificar que a cor certamente influencia no flavor. Outros trabalhos indicam que, quanto maior a coloração maior a percepção da intensidade do flavor.

Diversos estudos relacionaram, diretamente ou indiretamente, a influência da cor na aceitabilidade e preferência dos alimentos e bebidas, apontando que, uma redução na cor resulta na diminuição da aceitabilidade. Bebidas de laranja e cereja, quanto mais intensa a cor (até um certo ponto) maior é a aceitação e preferência pela bebida mais colorida. Isto pode ser notado em diversos alimentos, em batatas, por exemplo, a coloração escura sugere excesso de fritura e portanto alteração no sabor, e com isso menor aceitação.

Embora esses efeitos sejam associações inerentes às características psicológicas, eles interferem na escolha e dificultam a quantificação do sabor. Isto causa problemas pois a relação causa-efeito não pode ser ignorada ou minimizada nas formulações de novos alimentos e bebidas que visam suprir nossas necessidades (CLEYDESDALE, 1993).

CORANTES ARTIFICIAIS PARA ALIMENTOS

Os corantes utilizados em alimentos até 1980, no mundo totalizavam 50 substâncias naturais e 36 substâncias sintéticas orgânicas hidrossolúveis, já que os sintéticos lipossolúveis foram proibidos há muitos anos atrás (COULSON, 1980). Devido a essa diversidade de substâncias com poder corante, a lista dos permitidos em cada país varia substancialmente. Organizações internacionais tem sido criadas com o intuito de estabelecer especificações e critérios para a utilização desses aditivos em alimentos.

A comissão do Codex Alimentarius, criada em 1962, que é um organismo subsidiário da FAO (Food Administration of Organization) e da OMS (Organização Mundial da Saúde). Cento e trinta e sete países da ONU (Organização das Nações Unidas) pertenciam a esse comitê até o final de 1987 (VALIM, 1989).

Na Inglaterra a primeira legislação data de 1860, modificada em 1955 e dados posteriormente anexados em 1973. A Inglaterra permite 20 corantes artificiais, sendo 18 realmente utilizados e 6 com uso restrito a determinados alimentos (BERDICK, 1982). No Japão a legislação é de 1947 e sua lista conta com 11 corantes sintéticos, sendo que, dentre estes, 3 foram abandonados voluntariamente. Na Alemanha o controle é feito baseado em trabalhos realizados em 1957 pela Comissão Alemã de Corantes (BERDICK, 1982). Alguns países como a Noruega e Suécia proíbem o uso de corantes artificiais em alimentos.

No Brasil em 1961 foi promulgada pela primeira vez o decreto nº 50040, alterado em 1962, referente às normas reguladoras do emprego de corantes em alimentos. A legislação atual conta do decreto nº 55871 de 1965, modificado em 1987 através de portaria (BRASIL, 1965 e 1988). O Ministério da Saúde classifica os corantes da seguinte forma:

- C.I. CORANTE ORGÂNICO NATURAL: aquele obtido a partir de vegetal ou, eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado.

- C.II: CORANTE ORGÂNICO SINTÉTICO ARTIFICIAL: aquele obtido por síntese orgânica, mediante o emprego de processo tecnológico adequado e não encontrado em produtos naturais.

- C.III: CORANTE ORGÂNICO SINTÉTICO IDENTICO AO NATURAL: é o corante cuja estrutura química é semelhante à do princípio isolado do corante orgânico natural.

- C.IV: CORANTE INORGÂNICO (PIGMENTO): aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimentos (ABIA, 1978).

Os rótulos dos alimentos coloridos artificialmente devem conter os dizeres “COLORIDO ARITFICIALMENTE” e ter relacionado nos ingredientes o código C.II (BRASIL, 1965 e 1988).

CORANTES ARTIFICIAIS PERMITIDOS NO BRASIL

É permitido no Brasil o uso de apenas oito corantes artificiais sendo eles: amarantho, vermelho de eritrosina, vermelho 40, ponceau 4R, amarelo crepúsculo, amarelo tartrazina, azul de indigotina e azul brilhante.

O uso dos corantes artificiais no Brasil é bastante difundido entre as indústrias de alimentos (**Tabela 1**), no entanto, não existe nenhum fabricante nacional de corantes artificiais, sendo que os utilizados aqui são importados, principalmente dos Estados Unidos, Alemanha, Inglaterra, Holanda e Japão.

As recomendações, em relação à utilização de corantes sintéticos, estão vinculadas a definição da ingestão diária aceitável (IDA). A IDA é definida como a quantidade de corante, expressa com base no peso corpóreo, que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem oferecer risco à saúde. O valor da IDA só é atribuído às substâncias para as quais se possuem dados toxicológicos sobre a toxicidade a curto e longo prazo e/ou informações bioquímicas do composto. Todos os corantes

orgânicos sintéticos permitidos para alimentos no Brasil possuem seu valor de IDA estabelecido.

TABELA 1 - Aplicação de corantes na indústria de alimentos.

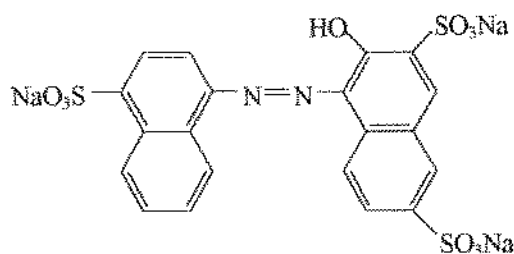
ALIMENTO		CORANTES	
		Natural	Artificial
Hídricos	bebidas		X
Açucarados	balas	X	X
	doces	X	X
	polpas	X	X
	frutas cristalizadas	X	
	confeitos		X
Farináceos	massas	X	
	tortas	X	X
Lácteos	leites saborizados	X	
	queijos	X	
	iogurtes	X	X
	sobremesas	X	X
Gordurosos	margarinas	X	
Salsas(desidratadas)		X	

fonte :SATO et al., 1992.

CORANTES AZO

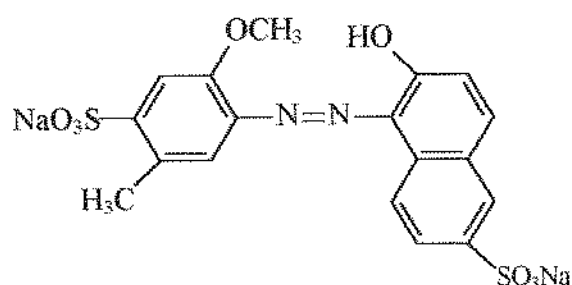
Esta classe compreende vários compostos que apresentam um anel naftaleno ligado a um segundo anel benzeno por uma ligação azo (N=N). Esses anéis podem conter um, dois ou três grupos sulfônicos (DRAKE, 1975). Esse grupo representa a classe de corantes sintéticos em alimentos mais importante e mais utilizada, cosméticos e medicamentos. Pertencem a essa classe os corantes:

AMARANTO (C.I.-color index-16.185)- é um corante vermelho, da classe monoazo, também conhecido por Bordeaux S, C.I. Food Red S, FD&C Red nº2 e C.I. Acid Red 27. É um sal trisódico do ácido 1-(4-sulfo-1-naftilazo)-2-naftol-3,6-disulfônico, com a seguinte estrutura (COULSON, 1980; PYOSA,1997):



Alguns estudos são contraditórios quanto à inocuidade deste corante, sendo, por medida de segurança, proibido nos Estados Unidos. No Canadá é permitido pois sua estrutura química 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 (BERDICK, 1980).

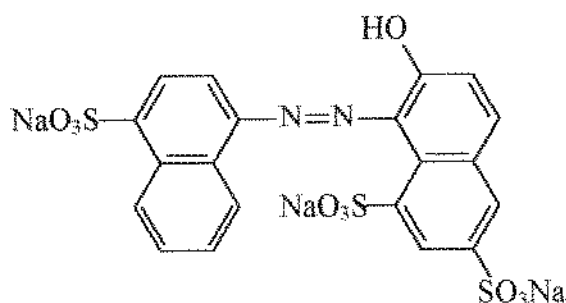
VERMELHO 40 (C.I-color index-16.035) é um corante vermelho amarelado, da classe monoazo, também conhecido como Allura Red AC, C.I. Food Red 17 e FD&C Red nº40. É um sal dissódico do ácido 5-(2-metoxi-5-metil-4-sulfofenilazo)-6-hidroxi-2-naftaleno sulfônico, com a seguinte estrutura (COULSON, 1980; PYOSA,1997):



A Inglaterra, Suíça, Suécia e países da CEE (Comunidade Econômica Européia) proibem seu uso. Estudos metabólicos mostraram que o vermelho 40 é pouco absorvido pelo organismo e em estudos de mutagenicidade não apresentou potencial carcinogênico,

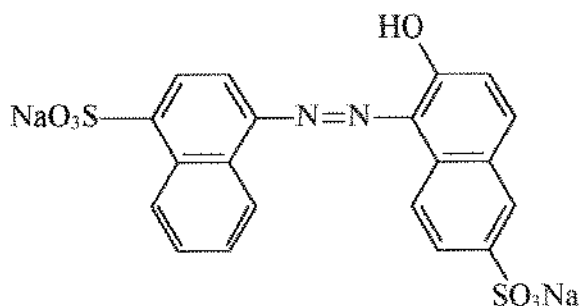
desta forma tendo seu uso liberado para alimentos no Canadá e Estados Unidos (IFT, 1986).

PONCEAU 4R (C.I.-color index-16.255) tem coloração vermelho vivo, também pertence à classe dos mono azo e apresenta os nomes de Cochineal Red A e New Coccine, C.I. Food Red 17 e C.I. Acid Red 18. Quimicamente é um sal trisódico do ácido 1-(4-sulfo-1-naftilazo)-2-naftol-6,8-disulfônico, apresentando a seguinte estrutura (COULSON, 1980; PYOSA,1997):



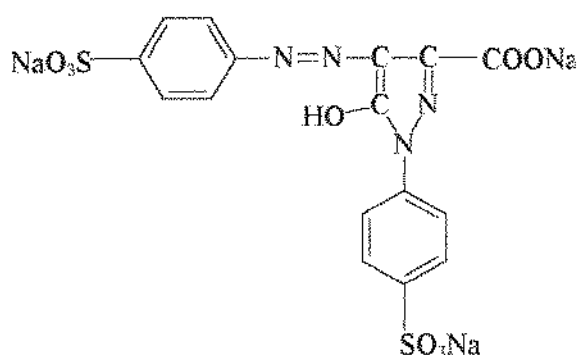
O Ponceau 4R não é permitido nos Estados Unidos; na Inglaterra seu uso é provisório e restrito; na Alemanha, nos países da CEE e no Japão seu uso é permitido, mas foi voluntariamente banido pelos industriais japoneses (BERDICK, 1982). Tal fato se deve aos poucos estudos relevantes realizados sobre sua toxicidade.

AMARELO CREPÚSCULO (C.I.-color index-15.985) apresenta coloração alaranjada, também chamado de C.I. Food Yellow 3, FD&C Yellow nº6 e Sunset Yellow FCF. É um sal dissódico do ácido 1-(4-sulfofenilazo)-2-naftol-6-sulfônico, que apresenta a seguinte estrutura (COULSON, 1980; PYOSA,1997):



Os Estados Unidos, Inglaterra Japão e países da CEE permitem seu emprego em alimentos; o Canadá permite em alguns produtos específicos e numa concentração máxima de 300 ppm (partes por milhão) (BERDICK, 1982).

TARTRAZINA (C.I.-color index-19.140) é um corante amarelo da classe azopirazóicos, também conhecido como C.I. Food Yellow 4 e FD&C Yellow nº5. Quimicamente é um sal trissódico do ácido 5-hidroxi-1-p-sulfofenil-4-(p-sulfofenilazo)-pirazol-3 carboxílico. Sua estrutura é apresentada abaixo (COULSON, 1980;PYOSA,1997):

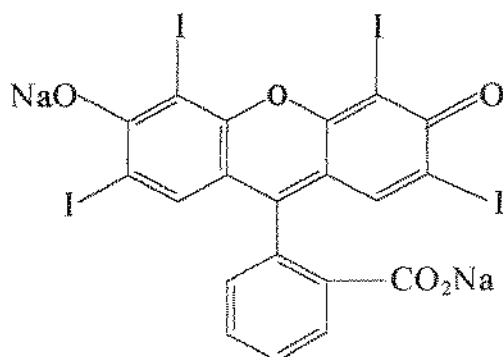


Dentre os corantes azo, a tartrazina tem despertado uma maior atenção dos toxicologistas e alergistas (CROCE, 1965), sendo apontada como a responsável por várias reações adversas, causando desde urticária até asma. Estima-se que uma em cada 10 mil pessoas apresentam reações a esse corante (BERDICK, 1982). Provavelmente, de

8 a 20% dos consumidores sensíveis à aspirina, são também sensíveis à tartrazina. Entretanto, é um dos corantes mais empregado em alimentos e permitido em muitos países, como Inglaterra, Canadá, Estados Unidos e outros (BERDICK, 1982).

CORANTES XANTENOS

A ERITROSINA (C.I.-color index-45.430) é o único representante dessa classe permitido no Brasil. É um corante de coloração róseo, também conhecido como C.I. Food Red 14 e FD&C Red nº3. Consiste, basicamente, de um sal dissódico (ou dipotássico) de 2', 4', 5', 7'-tetraiodofluoresceína, com a seguinte estrutura (COULSON, 1980; PYOSA,1997):

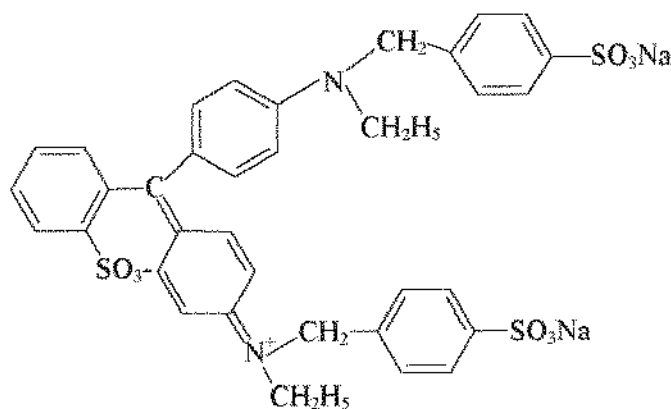


É também permitido nos Estados Unidos, países da CEE, Reino Unido e Canadá (BERDICK, 1982).

CORANTES TRIFENILMETANOS

Esse grupo apresenta estrutura básica de três radicais arila, em geral grupos fenílicos, ligados a um átomo de carbono central e apresentam, ainda, grupos sulfônicos que lhes conferem alta solubilidade em água. O único corante permitido pertencente a esse grupo é o azul brilhante.

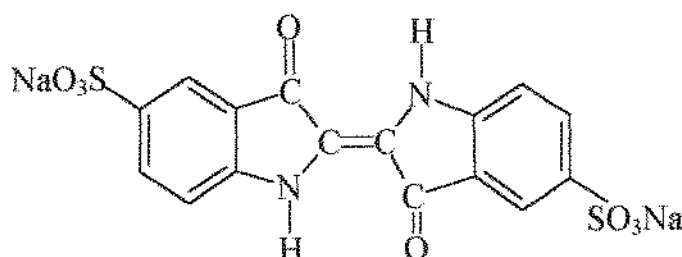
AZUL BRILANTE (C.I.-color index-42.090) coloração azul, da classe triarilmetano, também conhecido por C.I. Food Blue 2, FD&C Blue nº1 e Brilliant Blue FCF. Sua química é a de um sal dissódico do 4-[4-(N-etil-p-sulfobenzilamino)-fenil]-(2-sulfoniofenil)-metileno[-1-(N-etil-N-p-sulfobenzil)-delta-2,5-ciclohexadienimina], apresentando a estrutura abaixo (COULSON, 1980; PYOSA, 1997).



Seu uso é incondicional nos Estados Unidos, no Canadá seu limite máximo é de 100ppm; na Inglaterra pode ser utilizado apenas em alguns alimentos; no Brasil seu uso é restrito a refrigerantes (BERDICK, 1982).

CORANTES INDIGÓIDES

AZUL DE INDIGOTINA (C.I.-color index-73.015) é um corante azul, da classe indigóide, também conhecido como C.I. Food Blue 1, FD&C Blue 2 e indigo-carmin. Sua química é a de um sal dissódico do ácido indigotina-5',5'-dissulfônico, com a seguinte estrutura (COULSON, 1980; PYOSA,1997):



A CEE considera seu uso seguro, sendo também empregado no Japão, Estados Unidos e Inglaterra (BERDICK, 1982; VETORAZZI, 1981).

MÉTODOS PARA ANÁLISE DE CORANTES ARTIFICIAIS

Métodos Clássicos

Os métodos analíticos de identificação e quantificação de corantes artificiais, bem como micro constituintes da matriz complexa dos alimentos, compreende várias etapas. A análise se inicia com a extração do corante da matriz, seguida de uma etapa de limpeza para a retirada de possíveis interferentes (açúcar, ácidos, corantes naturais, etc.) e por fim a separação por técnicas cromatográficas, seguidas de identificação e quantificação.

A primeira técnica de separação de corantes sintéticos se baseia num trabalho de ARATA, empregando lã pura (BOLEY et al., 1980; CORRADI e MICHELI, 1979; LEHMANN et al., 1970; PEARSON, 1973). Este método ainda hoje é bastante

utilizado, os corantes são fixados na lã, em seguida são extraídos e identificados por cromatografia em papel. Corantes naturais não se ligam à lã ou então não são desorvidos, tornando essa técnica de extração também uma etapa de limpeza. BOLEY et al. (1980); LEHMANN et al. (1970), DOLINSKI e STEIN (1962); YANUKA et al. (1963) e outros apontam algumas desvantagens desse método, como: adsorção lenta e incompleta de alguns corantes; mudanças irreversíveis na estrutura de alguns corantes pelo uso de altas temperaturas e exposição a valores extremos de pH; e longos períodos necessários para se obter um extrato puro.

Alimentos insolúveis em água, ricos em lipídeos, contendo amido ou alto teor protéico dificultam o tingimento da lã, pois em meio ácido as proteínas formam coágulos que aprisionam os corantes artificiais dificultando a extração (CORRADI e MICHELLI, 1979; LEHMANN et al., 1970).

Um outro método baseia-se na extração dos corantes por solventes orgânicos como álcool iso-amilico, éter de petróleo, álcool benzílico, metil ciclohexanona e quinoleína (CHO et al., 1975; MOTTIER e POTERRAT, 1955). No entanto, o uso desses solventes como extratantes não apresentou resultados satisfatórios. A identificação dos corantes é feita por cromatografia de camada delgada, utilizando alumina como fase estacionária e comparando-se com padrões sob o mesmo tratamento. Esse método apresenta as vantagens da cromatografia em papel, pois trabalha com pequenas quantidades e facilidade para comparação com padrão, juntamente com as vantagens da cromatografia em camada delgada com alumina, que possui forte poder de separação das estruturas de interesse (MOTTIER e POTERRAT, 1955).

Resinas trocadoras de ânions também foram utilizadas na análise de corantes (BOLEY et al., 1980; GRAICHEN e MOLITOR, 1963; DOLINSKI e STEIN, 1962), entretanto, antes da introduzir a mistura de corantes na coluna é necessário separá-los dos co-extratantes. No caso da lã pura, ela por si só já é uma purificação bastante satisfatória na maioria dos casos, embora a técnica de limpeza utilizando coluna de poliamida parece ser superior, pois não causa degradação dos pigmentos (GILHOOLEY et al., 1972; LEHMANN et al., 1970). A purificação é feita através de sucessivas lavagens da coluna de poliamida com água e acetona para retirar açúcares, ácidos, flavorizantes e possíveis corantes naturais básicos. A desorção dos corantes sintéticos

pode ser feita com uma solução de hidróxido de amônio metanólico (TOLEDO e GUERCHON, 1990). A poliamina 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 proporcionam uma rápida limpeza e concentração dos corantes (LOVE, 1984; YOUNG, 1984; LAWRENCE et al., 1981; BOLEY et al., 1980), no entanto devido ao seu alto custo são pouco utilizados.

O uso de cromatografia de coluna com fase estacionária de sílica-gel e alumina, ajustada para diferentes pHs, permite a separação dos corantes por adsorção ou troca iônica, dependendo das condições escolhidas. O emprego de cromatografia por coluna é um método que possibilita a obtenção dos corantes de maneira quimicamente pura e isolados, podendo a seguir serem facilmente identificados. (SCLAR et al., 1990; YANUKA et al., 1963)

Uma outra maneira de analisar os corantes sintéticos sugere a não necessidade de separação dos mesmos para análise qualitativa e quantitativa. Uma vez extraída a mistura de corantes faz-se a leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de máxima absorção de cada constituinte da mistura, considerando a contribuição de cada corante na mistura para a absorvância final (TAKAHASHI et al., 1988; PALLOTI et al., 1977). A concentração de cada corante é obtida através de uma análise matemática binária, porém esse método necessita que os corantes apresentem no máximo 30% de sobreposição de seus espectros, para que não ocorra erros nas leituras das absorvâncias. (OHLWEILER, 1981).

Métodos, principalmente envolvendo cromatografia em papel (PEARSON, 1976; LEES, 1971; CHIANG, 1969; GRIFFITHS, 1966; YANUKA, 1963) e cromatografia em camada delgada (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) tem sido descritos. Métodos por cromatografia gasosa não são aplicáveis, devido a baixa volatilidade dos corantes sintéticos e à instabilidade às altas temperaturas empregadas.

Métodos por CLAE

Em separações muito difíceis, tanto para cromatografia em papel como para camada delgada (SINGH, 1982; MACRAE, 1981; PUTTERMANS et al., 1981), ou em estudos mais detalhados dos corantes (GOLDBER e CALVEY et al., 1982; CALVEY et al., 1981; COX e REED, 1981; BIBEAU e CLEYDESDALE, 1978), o uso da CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) tem demonstrado resultados bastante satisfatórios, graças ao seu poder de separação e sua 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 um tempo de análise muito curto, em comparação ao requerido pelas técnicas tradicionais (SINGH, 1982; MARMION, 1977), a sua aplicação na separação e identificação dos corantes artificiais tem aumentado nos últimos anos (LOVE, 1984; YOUNG, 1984; MACRAE, 1981; SINGH, 1982; PUTTERMANS et al., 1981).

As primeiras análises de corantes artificiais por CLAE foram realizadas utilizando colunas de sílica, entretanto, para 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 conseguidas com cromatografia líquido-líquido, utilizando colunas de troca-iônica (PASARELLI e JACOBS, 1975).

Outra alternativa é a utilização de fase-reversa C_{18} com gradiente de eluição e eluentes tamponados, que apresentam uma melhora significativa na seletividade, retenção e simetria dos picos (BOLEY et al., 1980). 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 ou pode reduzir a solubilidade do corante pela fase móvel (CIOLA, 1998; McKRONE e IVIE, 1980). A eluição por gradiente se faz necessária quando diferentes corantes apresentam tempos de retenção muito próximos ou muito diferentes (LANCASTER e LAWRENCE, 1991; LOVE, 1984; YOUNG, 1984; PUTTERMANS et al., 1981; LAWRENCE et al., 1981; BOLEY et al., 1980).

A utilização de par-iônico foi mais recentemente desenvolvida para a separação de compostos fortemente polares e tem se mostrado uma técnica bastante adequada para a determinação dos corantes sintéticos (LAWRENCE et al., 1981; BOLEY et al., 1980;

COULSON, 1980, , PASARELLI e JACOBS, 1975). Em particular para os corantes artificiais, o par-iônico, freqüentemente, utilizado é um detergente, como por exemplo o brometo de cetiltrimetilamônio (cetrimida) (KNOX E LAIRD, 1976), sendo também utilizado o fosfato de tetra-n-butilamônio (TBAP) (LANCASTER, 1982 e 1983). No entanto, essa técnica requer longos períodos de condicionamento das colunas.

Métodos combinados utilizando CLAE-EM (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrometro de massas), também já foram descritos, principalmente para o estudo de impurezas formadas durante a síntese dos corantes (YINON et al., 1989).

A CLAE é, atualmente, uma das principais técnicas para análise de corantes em alimentos, os limites de detecção obtidos com a técnica são satisfatórios para aqueles estabelecidos pela legislação. Entretanto, o sistema ideal para a separação de todos os corantes permitidos pela legislação brasileira numa única corrida ainda não foi desenvolvido, mas como a maioria dos alimentos industrializados apresentam no máximo uma mistura de até 3 corantes, os problemas quanto a separação são raríssimas vezes insolúveis.

VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

Os resultados gerados por um método analítico devem garantir, através de evidências, confiabilidade e qualidade (ARAUJO, 1995). Segundo WILLIAMS (1993), a garantia da qualidade analítica é expressa, por 5 fatores essenciais:

- controle de qualidade interno, (calibração de aparelhos e de padrões, treinamento dos analistas, uso de registros e de controle gráficos, expressão adequada dos resultados, etc.);
- certificação do laboratório em uma entidade certificadora oficial;
- participação em estudos interlaboratoriais;
- uso de materiais de referência;
- uso de métodos devidamente validados.

Vários procedimentos estatísticos são utilizados com a finalidade de desenvolver, avaliar e validar um método (WERNIMONT, 1985; STEINER, 1982; YODEN, 1982), entre eles merece destaque a exatidão, precisão, sensibilidade e rusticidade.

a) Exatidão

Indica o grau de concordância entre o resultado obtido e o valor de referência, ou valor real. O valor real é determinado através de métodos exatos de análise e de calibrações com padrões e/ou material de referência (BARROS NETO et al., 1995; WILRICH, 1993a). A recuperação do método, determinada pela adição de padrões à matriz, avalia a eficiência das etapas de limpeza e derivação (sem avaliar a extração), além de verificar a ocorrência de perdas durante os procedimentos estabelecidos pelo método.

b) Precisão

O desenvolvimento de um método analítico está sujeito a variações aleatórias, que podem ser estimadas pela precisão. Estas estimativas são expressas através da repetibilidade e da reprodutibilidade do método (CAULCUT e BODDY, 1983).

A repetibilidade indica o grau de concordância entre resultados sucessivos, obtidos a partir de um único método, com o mesmo material, sob as mesmas condições analíticas, em curtos intervalos de tempo. Quantitativamente, é expressa pelo valor abaixo do qual a diferença absoluta entre os resultados pode ser esperada como incerteza, com probabilidade especificada. Na ausência desta indicação a probabilidade é de 95 % (CAULCUT e BODDY, 1983).

A reprodutibilidade indica o grau de concordância entre resultados individuais obtidos a partir de um mesmo método, com o mesmo material, em diferentes laboratórios, com diferentes operadores, equipamentos e/ou intervalos de tempos. Quantitativamente, é expresso pelo valor abaixo do qual as diferenças absolutas entre dois resultados isolados podem ser esperados como incertezas, com 95 % de confiança (CAULCUT e BODDY, 1983).

c) Sensibilidade

Um grande número de parâmetros, que indicam a capacidade do instrumento em discriminar sinal e ruído (relação S/R), as propriedades físico-químicas do analito e a composição da matriz, afetam a sensibilidade de um método analítico específico. As inclinações das curvas de calibração são utilizadas para determinar o valor da sensibilidade. Os limites de detecção e de quantificação também são indicativos desta sensibilidade, entretanto, os valores determinados com base na calibração são válidos apenas para a série de medidas correspondentes. Estes limites devem ser determinados por experimentos intra e interlaboratoriais.(WILRICH, 1993b ; WILLARD et al., 1988).

O limite de detecção é definido como a concentração do analito que produz um sinal duas vezes maior que o desvio padrão do sinal fornecido pelo branco, indicando a menor concentração de um composto que pode ser detectado pelo método, dentro de um nível de confiança especificado (WILLARD et al., 1988;CAULCUT e BODDY, 1983).

d) Rusticidade

Embora um novo método possa funcionar perfeitamente no laboratório de origem os resultados podem se desviar do valor esperado, em extensões consideráveis, quando testados colaborativamente. Tais discrepâncias ocorrem mesmo quando os laboratórios participantes contam com analistas experientes e apresentam repetibilidade aceitável entre os experimentos. Várias condições podem influenciar, em maior ou menor escala, os resultados finais do teste analítico: concentração, qualidade e idade dos reagentes, taxas de aquecimento, equipamentos, umidade local, etc. (WERNIMONT, 1985; YOUNDEN, 1982). Alguns testes preliminares podem ser desenvolvidos, variando aqueles fatores que podem ser facilmente alterados de um laboratório para outro. Com o objetivo de evitar o erro sistemático, as variáveis críticas identificadas devem ser cuidadosamente controladas durante o desenvolvimento do método(ULBERTH, 1993).

No entanto, a literatura disponível não tem oferecido informações sobre os estudos da rusticidade dos métodos desenvolvidos para corantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- . ABIA - Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação - *Compendio da Legislação de Alimentos: Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos*. 5 rev. São Paulo: ABIA, v. 1A. (1990).
- . ARAUJO, Y - "Apoio estatístico para a qualidade analítica." In: *Conceito Amplo da Qualidade em Alimentos*. ILSI-ITAL, Campinas, 67 p, (1995).
- . BARROS NETO, B. ; SCARMINIO, I.S. ; ROY, E.B. - "Planejamento e Otimização de Experimentos", 2ª ed., Campinas SP, editora UNICAMP, (1996).
- . BERDICK, M. - Safety of Food Colors In: Hanthcock, J. N. ed. *Nutritional Toxicology*. New York, Academic Press, 1, 383-434, (1982).
- . BIBEAU, T. C.; CLYDESDALE, F.M. - "Termal Stability of Subsidiary Dyes Associated with FD and C Yellow nº 6". *Journal of Food Science*, 43, 521-534, (1978).
- . 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*, 105, 589-593, (1980).
- . BRANCA, P.; SPAGNOLINI, G.P. - "Identificazione e Dosaggio Spectrofometrico di Alcuni Coloranti di Sintesi in Prodotti Alimentari". Estratto Dalla Rivista *Industrie Delle Bevande*". Dicembre, 1980 - Chiriotti Editori, (1980).
- . BRASIL 1965. Leis e Decretos, Dec. Lei 55871 de 26/03/1965. D.O.U. 29/04/1965.
- . BRASIL 1988. Leis e Decretos, Resolução 04 de 24/11/1988. D.O.U. 19/12/1988.
- . CALVEY, R.J.; GOLDBERG, A. L.; MADIGAN, E. A. - "HPLC Determination of Intermediates / Side Reaction Products in FD and C Yellow nº 5". *Journal of the AOAC*, 64 (3), 665-669, (1981).
- . CAULCUTT, R.; BODDY, R. - *Statistic for anaytical chemists*. 1th. Ed., Chapman and Hall, Londres, 253 p, (1983).

- . CIOLA, R. - "Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho HPLC"
ed. Edgard Blücher, 1ª ed., São Paulo, SP, (1998).
- . CHIANG, H. C. - "Polyamide - Silica Gel Thin - Layer Chromatography of Red Food
Dyes". *Journal of Chromatography*, 40, 189-190, (1969).
- . CHIANG, H. C.; LIN, S. L. - "Polyamide Kieselguhr Thin - Layer Chromatography of
Yellow Food Dyes". *Journal of Chromatography*, 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*, 17 (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*, 93
(1), 243-247, (1974).
- . CLYDESDALE, F.M. "Color as a factor in food choice", *Critical Reviews in Food
Science and Nutrition*, 33, (1), 83-101, (1993).
- . CORRADI, C.; MICHELI, G. - "Método Rapido di Ricerca ed Identificazione dei
Coloranti Acidi Artificiali Idrosolubili Nei Prodotti Alimentari". *Boletino dei
Chimici dei Laboratori Provinciali*, 5 (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 AOAC*, 64 (2), 324-331, (1981).
- . CROCE, J. - "Muita cor e algum risco nas balas". *Consumidor S.A.* - Instituto
Brasileiro de Defesa do Consumidor, 2, 5-8, (1965).
- . DOLINSKY, M.; STEIN, C. - "Application of a Liquid Anion Exchange Resin to the
Separation of FD and C Colours from Foods". *Journal of the AOAC*, 45 (3),
767-769, (1962).
- . DRAKE, J.J.P. "Food Colours - Harmless Aesthetics or Epicurean Luxuries ?",
Toxicology, 5, 3-42, (1975).

- . GILHOOLEY, R. A.; HOODLESS, R.A.; PITMAN, K. G.; THONSON, J. -
 "Separation and Identification of Food Colours, IV. Estraction of Synthetic
 Water - Soluble Food Colours". *Journal of Chromatography*, 72, 325-331,
 (1972).
- . GOLDBER, A. L.; CALVEY, R.J. - "Automated HPLC Determination of
 Intermédiate and Side Reaction Products in FD C Red n ° 3". *Journal of the
 AOAC*, 65(1), 103-107, (1982).
- . GRAHAN, R. J. T.; NYA, A .E. - "The Partition Chromatography of Food Dyes on
 Polycarbonate - Coated Foils". *Journal of Chromatography*, 43, 547-559,
 (1969).
- . GRAICHEN, C.; MOLITOR, J. C. - "Determination of Certifiable FD&C Colors
 Additives in Food and Drugs". *Journal of the AOAC*, 46 (6), 1022-1029, (1963).
- . GRIFFITHS, M. H. E. - "Systematic Identification of Food Dyes Using Paper
 Chromatography Techniques". *Journal of Food Technology*, 1, 63-72, (1966).
- . 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*, 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, (1980).
- . 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).
- . KNOX, J. H. ; LAIRD, G. R. - "Soap Chromatography - A New HPLC Technique for
 Separotion of Ionizable Materials". *Journal of Chromatography*, 122, 17-34,
 (1976).
- . LANCASTER, F. E. ; LAWRENCE, J. F. - "Ion-Pair HPLC Separation and Detection
 of Subsidiary Dyes in Synthetic Food Colors", *Journal of the AOAC*, 65, (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 AOAC*, 66, (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*, 8, (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*, 210, 168-172 (1981).
- . 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 AOAC*, 53 (6), 1182-1189 (1970).
- . LEPRI, L.; DESIDERE, P. G.; COAS, V.) - "Separation and Identification of Water-Soluble Food Dyes by Ionexchange and Soap Thin-Layer Chromatography". *Journal of Chromatography*, 161, 279-286 (1978).
- . LOVE, J. L. - "A Simple Method to Identify Added Synthetic Colour in Foods". *New Zeland Journal of Science*, 27, 113-116 (1984).
- . MACRAE, R. - "Recent Applications of HPLC to Food Analysis". *Journal of Food Technology*, 16, 1-11 (1981).
- . MARMION, D. M. - "HPLC Determination of 4,4 (diazoamino) of Dibenzen Sulfonic Acid in FD and C Yellow n° 6". *Journal of the AOAC*, 60 (1), 168-172(1977).
- . McKONE, H. T. ; IVIE, K. - "An Introduction to HPLC: Separation of Some FD&C Dyes", *Journal of Chemical Education*, 57, (4), 321-322 (1980).
- . MOTTIER, M.; POTERRAT, M. - "De L'extraction des Colorants pour Denrées Alimentaires Avec la Quinoleína et de leur Identification par Chromatographie sur Plaque d'Alumine". *Analytica Chimica Acta*, 13, 46-56(1955).

- . OHLWEILER, O.A. - "Fundamentos da Análise Instrumental" Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro, RJ, 486p, (1991).
- . PALLOTTI, G. ; BENCIVENGA, B. ; MAURIZIO, G. ; GIABBAI, M. ; PALMIOLI, A. ; ROSATELLI, I. - "Método Spettrofotométrico por la Determinazione Simultanea di Coloranti Sinteci Idrosolubili Negli Alimenti e nelle Bevande", *Bolletino dei Chimici dell'Unione Italiana Dei Laboratori Provinciali*, 7, 217-230(1977).
- . PASARELLI, R. J.; JACOBS, E. S. - "High pressue liquid chromatography analysis of dyes and intermédiates". *Journal of Chromatography Science*, 13, 153-157(1975).
- . PEARSON, D. - "The identification of EEC Food Colours". *Journal Ass. Publ. Analysis*, 11, 127-134 (1973).
- . PEARSON, D. - "General Methods for Additives and Contaminants". In: "*The Chemical Analyses of Food*". 7th ed. Churchil Livingstone - Edimburgh, London, N. Y (1976).
- . PERRY, A. R.; WOOLEY, D. G. - "The Identification of Some Water-Soluble Food Colours by Thin-Layer Chromatography". *Journal Ass. Publ. Analysts*, 7, 94-98(1969).
- . PYOSA -COLORES PARA ALIMENTOS - Certigrama ^{MR} - catálogo de especificações de corantes artificias,(1997).
- . PUTTERMANS, M. L.; DRYON, L.; MASSART, D. L. - "Ion-Pair HPLC of Synthetic Water-Soluble Acid Dyes" *Journal of the AOAC*, 64, 1-8 (1981).
- . RIEDEL, G. - Controle Sanitário dos Alimentos, São Paulo, Loyola, 445 p, (1987).
- . SATO, G.S. ; CHABARIBERY, D. ; MAIA, M.L. ; CARVALHO, F.C. ; NETO, A.N.; MARQUES, S.A. "Tendências de mercado para corantes na indústria de alimentos", *Agricultura em São Paulo, SP*, 39, (supl. 1), 1-50(1992).
- . SCLAR, R.N. ; FREEMAN, K.A. "Chromatographic Procedures for the Separation of Water-soluble Acid Dyes Mixtures", *Journal Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73, (6), 829-837 (1990).
- . SINGH, M. - "Automation HPLC Determination of Uncobined Intermédiantes of in FD and C Red n° 40". *Journal of the AOAC*, 72 (6), 1342-1347 (1982).

- . STEINER, E. H. - "Planning and analysis of results of collaboratives test" In: *Statistical Manual of the AOAC*. 3 th ed. AOAC, Arlington, 88p (1982).
- . TAKAHASHI, M.Y. ; YABIKU, H.Y.; MARSIGLIA, D.A.P. "Determinação quantitativa de corantes artificiais em alimentos", *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 48, (1/2), 7-15(1988).
- . TOLEDO, M.C.F. ; GUERCHON, M.S. "Corantes artificiais em alimentos ",*Ciênci. Tecnol. Alimentos*, 10, (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 AOAC*. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Alemanha, Int. Dairy Federation, Belgica, 9302, 202-203 (1992).
- . VALIM, M. F. C. F. A. - "Avaliação do efeito de corantes orgânicos aintéticos artificiais na função respiratória mitocondreal" Dissertação de Meatrado em Ciências de Alimentos, FEA, UNICAMP, Campinas, (1989).
- . VETORAZZI, G. - "Toxicological profiles of food colorants" In: *Handbook of international food regulatory toxicology*. Lancaster, MTP Press, 2, 13-86, (1981).
- . WERMINONT, G.T. - "Use of statistics to develop and avaluate analytical methods". *AOAC*, Virginia, 183p (1985).
- . WILLARD, H.H.; MERRIT, Jr., L.L.; DEAN, J.A.; SEATTLE, Jr.,F.A. - "Instrumental Methods of Analysis". 7th ed. *Wadsworth publishing company*, USA, 895p, (1988).
- . WILLIAMS, A - "The evident (and urgent) need for analytical quality assurance. In: Analytical quality assurance and good laboratory practice in dairy laboratories". *International Seminar of AOAC*. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Alemanha, Int. Dairy Federation, Belgica, 9302, 13-19, (1992).
- . 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, Alemanha, 1992, Int. Dairy Federation, Belgica, 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 AOAC*. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Alemanha, 1992, Int. Dairy Federation, Belgica, 9302, 190-201, (1993b).
- . YANUKA, Y.; SHALON, Y.; WEISSENBERG, E.; NIR-GROSFELD, I. - "The Isolation and Separation of Dyes from Foodstuffs by Column Chromatography". *Analyst*, 88, 872-876 (1963).
- . YINON, J. ; JONES, T. L. ; BETOWSKI, L. D.) "Particle Beam Liquid Chromatography-Electron Impact Mass Spectrometry of Dyes", *Journal of Chromatography*, 482, 75-85 (1989).
- . YOUNDEN, W.J. - "Statistical techniques for collaboratives test" In: *Statistical Manual of the AOAC*. 3 th ed. AOAC, Arlington, 88p (1982).
- . YOUNG, M.L. - "Rapid Determination of Color Additives, Using the C₁₈ Cartridge", *Journal of the AOAC*, 67, (5), 1022-1024(1984).

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS E BEBIDAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

RESUMO

O uso de corantes artificiais pelas indústrias de alimentos ocorre pela alteração e/ou destruição da cor natural dos produtos durante o processamento e/ou estocagem e, principalmente, para aumentar a aceitabilidade do produto frente ao consumidor, além de apresentarem várias vantagens sobre os corantes naturais. Entretanto, a falta de metodologias analíticas apropriadas tem dificultado o controle dos níveis de corantes, especialmente, metodologias capazes de responder à demanda do número de análises dos vários corantes empregados e nos mais variados tipos de alimentos. Este trabalho propõe e valida uma metodologia para a determinação simultânea dos oito (8) corantes sintéticos (amarelo crepúsculo, tartrazina, amaranço, vermelho 40, ponceau 4R, eritrosina, azul brilhante e azul de indigotina) permitidos para alimentos no Brasil, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os corantes são extraídos com água morna (40 a 50°C), a solução é centrifugada e, após filtração em filtro fluopore FHLP 01300 de 0,5 µm, injetada no cromatógrafo. No processo cromatográfico, a utilização de coluna ODS-2 e as fases móveis H₂O/MeOH (70:30) com 0,08M de acetato de amônio para condicionamento da coluna e H₂O/MeOH (70:30) para a corrida, possibilitam a eluição dos corantes sintéticos em 20 minutos, sendo necessários 12,5 min. para o condicionamento da coluna antes de uma nova injeção. A detecção é feita na região do visível e a quantificação através de curvas de padronização externa. Os limites de detecção e recuperação determinados foram, respectivamente: 0,51 µg/mL e 96,3% para o azul de indigotina; 1,30 µg/mL e 98,2% para o azul brilhante; 1,02 µg/mL e 102% para o amaranço; 0,57 µg/mL e 96,8% para o ponceau 4R; 1,10 µg/mL e 100,3% para o vermelho 40; 0,51 µg/mL e 96% para a eritrosina; 0,70 µg/mL e 99,7% para a tartrazina; 1,83 µg/mL e 98,9% para o amarelo crepúsculo. Testes de repetibilidade

apresentaram coeficientes de variação inferiores a 3,3% para todos os corantes. A metodologia proposta, aqui validada, apresenta eficiência, versatilidade, rapidez e simplicidade.

SUMMARY

The application of synthetic dyes in food occur because of the alteration or destruction of the natural colour of the products during the processing or stockage and specially, to increase the acceptance of the product to the customer, besides showing several advantages to the natural colouring. Although, the lack of proper analytic has made difficult the control of colouring levels, specially, methodology, capable of responding to the demand of the analysed numbers of the several applied colouring and in the several kinds of food. This work proposed and validated a methodology to the simultaneous determination of eight synthetic colours (Sunset yellow, yellow nº 5, bordeaux S, red nº 40, red nº 17, red nº 3, brilliant blue and indigo carmin) allowed for food in Brazil, applying the technique of high performance liquid chromatography (HPLC). The colouring were taken with warm water (40 to 50° C), the solution was centrifuged and, after filtering in fluore filter FHLF 01300 of 0.5 µm, it was injected in the chromatography. In the chromatographic process, the use of the column ODS-2 and the mobile phase H₂O/MeOH (70:30) with 0.08M of ammonia acetate to the conditioning of the column H₂O/MeOH (70:30) to the run, allowed the elution of the synthetic dyes in twenty minutes, being necessary 12.5 min. to the conditioning of the column before another injection. The determined detection and recuperation limits were respectively : 0.51 µg/ml and 96.3% to the indigo carmin, 1.30 µg/ml and 98.2% to the brilliant blue, 1.02 µg/ml and 102% to the bordeaux S, 0.57 µg/ml and 96.8% to the red nº 17, 1.10 µg/ml and 100.3% to the red nº 40, 0.51 µg/ml and 96% to the red nº 3, 0.70 µg/ml and 99.7% to the yellow nº 5, 1.83 µg/ml and 98.9% to the sunset yellow. Repeated tests showed variation levels beyond 3.3% to all the colourings. The proposed methodology, shown here, presents efficiency, versatility, quickness and simplicity.

INTRODUÇÃO

Adicionar corantes aos alimentos para torná-los mais atrativos é uma prática de longa data. Muitas substâncias 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 (IFT, 1986).

Com a descoberta nos séculos XVIII e XIX dos corantes sintéticos e a constatação da influência da cor na aparência e, conseqüentemente, na aceitação do alimento pelo consumidor, o interesse pelo uso dos corantes artificiais aumentou enormemente. No entanto, alguns abusos foram cometidos com o emprego desses aditivos chegando a serem utilizados com a intenção de mascarar alimentos mau processados e até deteriorados, sendo alguns inclusive sendo coloridos com substâncias altamente tóxicas (IFT, 1980).

Muitos alimentos industrializados originalmente não apresentam cor e em outros a cor natural é alterada ou destruída durante o processamento e/ou estocagem, com isso o emprego de corantes para suplementar ou realçar a coloração perdida e, principalmente, para garantir a aceitação do produto frente ao consumidor é um recurso muito utilizado.

Por diversas razões é notório o aumento no uso de corantes sintéticos pelas indústrias alimentícias, principalmente numa produção em larga escala, garantindo a uniformidade dos alimentos, além do que, os corantes artificiais apresentarem um custo relativamente inferior aos corantes naturais, maior faixa de coloração e estabilidade e maior poder de tingimento, tudo isso aliado à pouca disponibilidade dos corantes naturais (SATO, 1992).

Os corantes utilizados em alimentos, até 1980, totalizavam 36 substâncias sintéticas orgânicas e 50 substâncias naturais (COULSON, 1980). Devido a essa

diversidade de substâncias com poder corante, a lista dos permitidos em cada país varia substancialmente. Em virtude da proliferação de compostos corantes sintéticos e de seu uso estendido aos alimentos, tornou-se necessário o controle de suas aplicações e desenvolveu-se maior preocupação com seus possíveis efeitos à saúde humana.

Existem diferentes opiniões sobre a inocuidade dos corantes artificiais, consequentemente, diversos países ou regiões permitem o uso de diferentes corantes artificiais.

Com o aumento da globalização e, consequentemente, aumento das importações/exportações, a utilização de métodos cada vez mais confiáveis, eficientes e rápidos para a detecção, identificação e quantificação dos corantes se faz mais necessário. Não basta, simplesmente, provar que um produto é colorido artificialmente, cada corante ou mistura desses devem ser detectadas e cada corante quantificado individualmente. 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.

Alguns métodos, utilizando diferentes técnicas analíticas, têm sido empregados na determinação de corantes sintéticos (WILLIAMS, 1969). As técnicas mais comumente empregadas utilizam os clássicos métodos cromatográficos, como a cromatografia em papel (PEARSON, 1976; CHO et al., 1975; LEES, 1971; GRIFFITHS, 1966; SRAMEK, 1964), camada delgada (RIBEIRO-CUNHA et al., 1996; TOLEDO e GUERCHON, 1990; LEPRI et al., 1978; CLERCQ e MASSART, 1974; GILHOOLEY et al., 1972; HOODLESS et al., 1971; GRAHAM e NYA, 1969; CHIANG e LIN, 1969; PERRY e WOOLEY, 1969) e coluna aberta (GRAICHEN e MOLITOR, 1963; YANUKA et al., 1963; DOLINSKY e STEIN, 1962). Porém, análises quantitativas utilizando essas técnicas são muito demoradas e produzem dados com baixa exatidão e precisão. A principal vantagem desses métodos clássicos é a simplicidade dos equipamentos utilizados. Métodos por cromatografia gasosa apresentam aplicação restrita na área dos corantes sintéticos, principalmente, devido ao alto peso molecular, não volatilidade e uma limitada estabilidade térmica a altas temperaturas apresentada pela maioria dos corantes sintéticos (TERRILL e JACOBS, 1970).

O desenvolvimento de novos equipamentos e recheios de colunas cromatográficas, tornando-as mais eficientes, e o interesse despertado pelas impurezas presentes nos corantes, vinculadas ou formadas durante a síntese, fizeram da CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) uma técnica atrativa e um importante instrumento no controle desses aditivos (GRATZFELD-HUSGEN e SCHUSTER, 1995; GREENWAY et al., 1992; WHITE e HARBIN, 1989; LANCASTER e LAWRENCE, 1983 e 1982; LAWRENCE et al., 1981; McKONE e IVIE, 1980; PUTTEMANS et al., 1981; BOLEY et al., 1980). Recentemente, a literatura vem apresentando avanços nos métodos de análise para os corantes artificiais através de técnicas promissoras, como a eletroforese capilar (HAWLETT PACKARD, 1995), no entanto, é uma técnica ainda muito recente e sofisticada para análise de rotina.

O novo enfoque dado ao desenvolvimento de metodologias analíticas vem buscando novos métodos que permitam a determinação simultânea de vários compostos, com rapidez, custos relativamente baixos e que garantam resultados de qualidade (AGOSTINI e GODOY, 1997). Neste sentido, a CLAE apresenta-se como uma das técnicas mais apropriadas, incluindo rapidez, precisão, exatidão e alta sensibilidade, mesmo para compostos presentes em quantidades muito baixas e em matrizes complexas, tais como os alimentos (MACRAE, 1990), além de permitir a análise simultânea de vários corantes.

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 Official Analytical Chemists) vem estimulando o controle de qualidade analítica, através de planejamentos e análises estatísticas variadas (ULBERTH, 1993; WILRICH, 1993; WERNIMONT, 1985). No Brasil, também, a validação dos métodos analíticos tem sido uma preocupação dos pesquisadores, mas pouco se tem feito em relação a validação de novos métodos para corantes artificiais.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e validação de uma metodologia, por CLAE, para a determinação simultânea dos oito corantes artificiais (amarelo crepúsculo, tartrazina, vermelho 40, ponceau 4R, eritrozina, amaranço, azul brilhante e azul de indigotina) permitidos para alimentos no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Foram analisados seis (6) diferentes produtos alimentícios que apresentavam declarado nas embalagens a presença de corantes artificiais na sua composição, sendo: pós para gelatina, preparados sólidos para refrescos, refrigerantes, bebidas isotônicas, balas e confeitos. As amostras foram adquiridas em supermercados da região de Campinas/SP. Para a determinação em cada produto, duas embalagens tiveram os conteúdos homogeneizados antes da retirada da amostra para análise. Foram realizadas, no mínimo, duplicatas para cada amostra, separando-as por cor/sabor e fabricante, totalizando 45 amostras analisadas.

REAGENTES

Os padrões de corantes artificiais foram adquiridos da ICI do Brasil S.A. O metanol grau cromatográfico (*ominsolv*) e o acetato de amônio grau analítico foram adquiridos da MERCK, Brasil. A água utilizada no preparo das amostras e das fases móveis foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram sempre filtradas em filtros fluopore FHLP 04500 de 0,5 μm de diâmetro de poro e degaseificados em banho ultra-sônico.

EQUIPAMENTOS

Após a extração as amostras foram centrifugadas em centrífuga marca Hitachi modelo Himac CR21.

Para análise em CLAE foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (HELWETT PACKARD) série 1050, com sistema de bombeamento isocrático e válvula injetora tipo *Rheodyne* e uma alça de amostragem de 20 μL de capacidade. Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna cromatográfica *Spherisorb* ODS-2, com partículas de 5 μm , com dimensões de 150 x 4,6 mm d.i. (SIGMA-ALDRICH, USA) protegida por

uma coluna de guarda *Micropore*, C_{18} , 10 μm , 30x 4,6 mm d.i. (VARIAN). Um detector de arranjo de diodos (DAD) da HP série 1050, acoplado a um *software HP Chemstation*, permitiu registrar o cromatograma em três diferentes comprimentos de ondas, durante uma mesma corrida, o que possibilitou a análise de todos os corantes de forma simultânea.

MÉTODOS

METODOLOGIA ANALÍTICA

Para a extração, em pós para gelatina e preparados sólidos para refresco, são tomadas entre 4 a 8g de amostra previamente homogeneizada. Para balas e confeitos são tomadas e pesadas de 5 a 8 unidades de cada cor/sabor. Refrigerantes e bebidas isotônicas foram, simplesmente, degaseificados e filtrados. Os corantes são extraídos com, aproximadamente, 20 a 25mL de água aquecida (40 a 50°C) e as soluções transferidas quantitativamente para balões volumétricos de 50 mL. Para os confeitos, em especial, os recheios sofriam uma reextração para garantir uma total retirada dos corantes. Após completado o volume com água, uma pequena quantidade (cerca de 10 mL) é tomada e levada à centrifugação por 10 minutos a 15.000 rpm. O sobrenadante é, então, adequadamente filtrado em membrana fluoropore, FHLP 01300 (MILLIPORE), com poros de 0,5 μm e injetado no cromatógrafo.

A coluna é condicionada pela passagem de uma solução de água/metanol (70:30) adicionada de 0.08M de acetato de amônio, com uma vazão de 0,5 mL/min, por um período inicial de 12,5 minutos. Após esse período, a mesma fase móvel, sem a presença do acetato de amônio, com vazão de 0,5 mL/min, separa os corantes através de eluição isocrática. Os oito corantes são separados em 20 minutos. A coluna é recondicionada, novamente, com a presença de acetato de amônio na fase móvel, por um período de 12,5 minutos. Os compostos são detectados pela absorção na região do visível. Utilizando o recurso oferecido pelo *software HP Chemstation* os cromatogramas são registrados simultaneamente em três diferentes comprimentos de onda, para melhor visualização e

quantificação, sendo : a 595nm para os corantes azuis, a 525nm para os vermelhos e para os amarelo a 450nm.

A identificação dos corantes foi feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com padrões analisados nas mesmas condições, por co-cromatografia e pelos espectros de absorção obtidos com a utilização do detector de arranjo de diodos. A quantificação dos corantes é feita por curvas de padronização externa, construída com 5 níveis de concentração, sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

O fluxograma da metodologia desenvolvida para a determinação simultânea dos corantes artificiais presentes em alimentos esta apresentado na **Figura 1**.

VALIDAÇÃO DO MÉTODO

LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção foram estimados com padrões, realizando-se sucessivas diluições e determinando a menor quantidade detectável, aproximadamente duas a três vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento. Concentrações próximas, maiores e menores, ao limite de detecção encontrado para cada corante utilizando-se padrões, foram adicionadas a balas, tomando-se o cuidado de se adicionar corantes que originalmente não estavam presentes nas amostras. Após a adição os corantes foram extraídos da matriz alimentícia, conforme procedimento descrito anteriormente, e determinado os limites de detecção. Os limites de quantificação foram considerados como sendo duas vezes o valor dos limites de detecção para cada corante (CAULCUTT e BODDY, 1983).

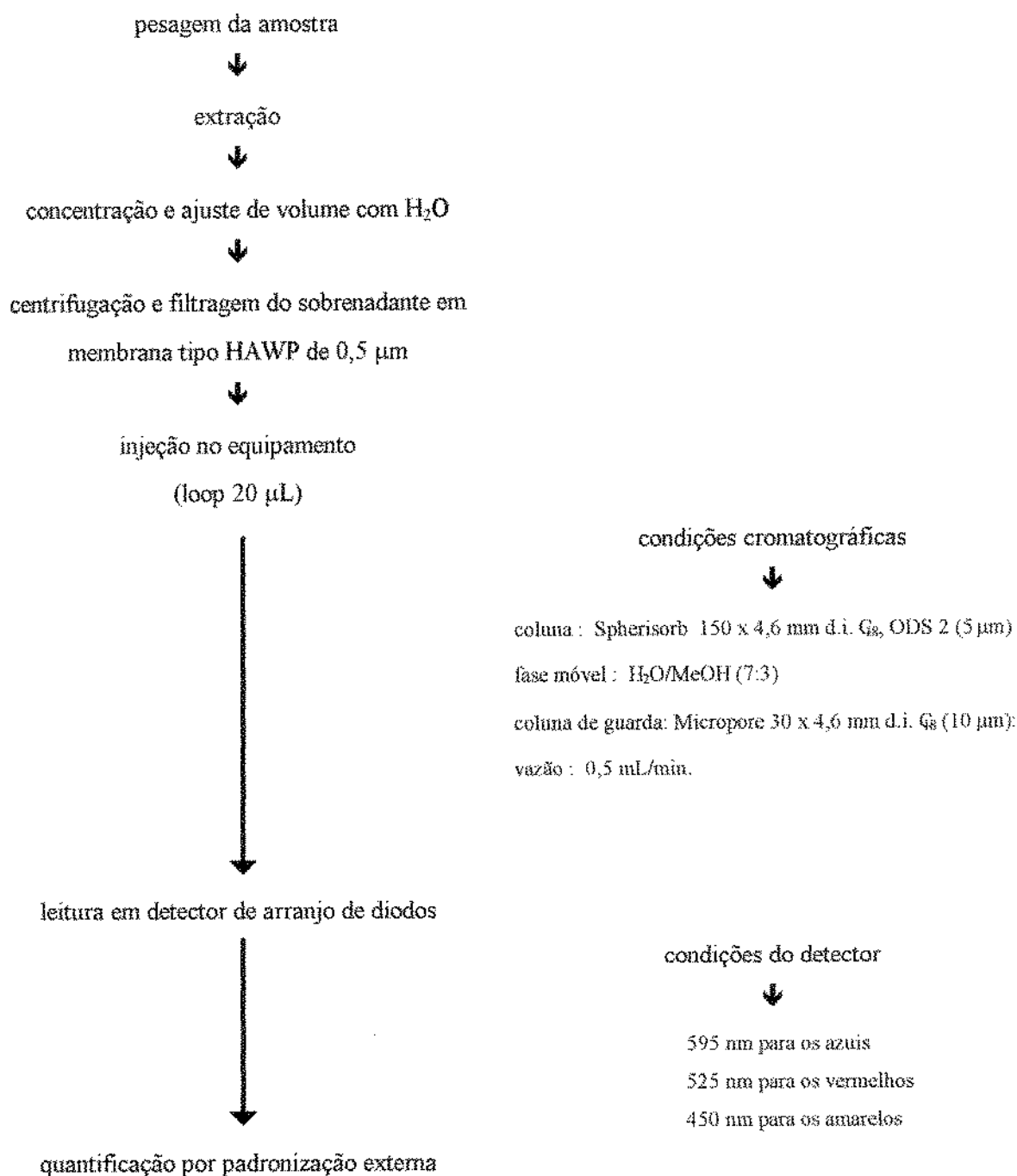


FIGURA 1 : Fluxograma da metodologia utilizada na determinação de corantes artificiais.

RECUPERAÇÃO DE PADRÕES

Foram realizados testes de recuperação de padrões, em duplicata, adicionados às balas, em dois diferentes níveis de concentração (**Tabela 10**).

REPETIBILIDADE

A repetibilidade foi avaliada através de determinações, em duplicatas, de corantes artificiais em soluções padrão e adicionadas às balas. A repetibilidade foi calculada segundo CAULCUTT e BODDY (1983) através da fórmula:

$$R= 2,92 (2DP)^{1/2}$$

onde R-repetibilidade, com significância de 90%
DP-estimativa de desvio padrão

RUSTICIDADE

O estudo foi realizado através de planejamento fatorial fracionado com 8 ensaios, para avaliar como 5 variáveis, consideradas críticas nas etapas que antecedem à cromatografia (**Tabela 1**), podem afetar as concentrações de corantes. O planejamento fatorial fracionado usado foi 2⁵⁻²(BARROS NETO, 1996) (**Tabela 2**).

Tabela 1 : Condições pré-estabelecidas (+) e alternativas (-) na determinação da rusticidade do método desenvolvido.

VARIÁEIS		(+)	(-)
A	peso da amostra	4 g	7 g
B	rotação da centrifuga	15.000	10.000
C	tempo de centrifugação	10 min	8 min
D	diâmetro do poro do filtro	0,5 µm	0,45 µm
E	periodo entre extração e injeção	0 hs	24 hs

Tabela 2 : Distribuição aleatória de 5 variáveis através de um planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} (PROC FACTEX, the SAS System)

ENSAIOS	VARIÁVEIS				
	A	B	C	D	E
1	-	-	-	-	+
2	+	-	-	+	-
3	-	+	-	+	-
4	+	+	-	-	+
5	-	-	+	+	+
6	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-
8	+	+	+	+	+

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ETAPAS ANALÍTICAS

Além da vantagem da utilização de sistema isocrático, a fase móvel água/metanol (70:30), fez com que os oito corantes artificiais permitidos pela legislação brasileira pudessem ser eluidos numa única corrida, em aproximadamente 20 minutos de corrida. O rápido condicionamento da coluna (12,5 minutos) com água/metanol (70:30) + 0.08 M acetato de amônio, antes de cada injeção, foi significativo, pois a presença do tampão melhorou a seletividade, retenção e simetria dos picos, com um efeito mais pronunciado sobre a tartrazina, o amaranço, o azul de indigotina, o ponceau 4R e o amarelo crepúsculo. Dados semelhantes foram obtidos por BOLEY et al. (1980), quando utilizaram fase móvel tamponada, além de um sistema de eluição por gradiente, para a separação dos corantes.

Em testes preliminares realizados, a utilização de par-iônico (cetrimida- brometo de cetiltrimetilamônio) na fase móvel necessitou de um período equivalente a dois dias para condicionar todo o sistema. Embora a técnica de par-iônico seja a mais citada para a análise de corantes artificiais (WHITE e HARBIN, 1989; LANCASTER e

LAWRENCE, 1983 e 1982; PUTTERMANS et al., 1982 a e b e 1981; LAWRENCE et al., 1981; BOLEY et al., 1980; McKONE e IVIE, 1980), o uso desses compostos apresenta sempre o inconveniente de longos períodos de condicionamento.

O uso do DAD acoplado ao *software HP ChemStation*, que permite o registro cromatográfico em vários comprimentos de onda simultaneamente, auxiliou enormemente nas análises, pois além de possibilitar os perfis dos espectros de absorção, para fins de identificação, permitiu, também, atingir limites de detecção mais baixos, pois cada corante pode ser quantificado no comprimento de onda mais próximo ao seu comprimento de onda de máxima absorção. Isto também pode ser alcançado mudando-se o comprimento de onda durante o processo cromatográfico (LAWRENCE et al. 1981). No entanto, devem existir condições favoráveis que possibilitem essa mudança, o que, por vezes, torna a etapa cromatográfica muito mais demorada. As **Figuras 2 a 4** apresentam os cromatogramas de separação dos corantes artificiais em solução padrão. Podemos observar os diferentes perfis cromatográficos registrados em diferentes comprimentos de onda. Também, pode-se visualizar os espectros de absorção de cada corante fornecidos pelo DAD.

Os cromatogramas referentes as amostras de pós para gelatina, refrigerantes, confeitos e balas, estão dispostos nas **Figuras 5 e 6** respectivamente. Pelo fato desses compostos absorverem na região do visível, praticamente, não há interferentes.

As curvas de padronização apresentaram boa linearidade, nas faixas de concentração pré-estabelecidas (**Anexos 1 a 4**).

As composições qualitativas e quantitativas dos corantes artificiais, presentes nas amostras aqui analisadas, são apresentadas nas **Tabelas 3 a 5**. A Legislação Brasileira permite um máximo de 10mg/100g ou 10mg/100mL de corantes artificiais no produto final a ser consumido e também no máximo mistura de até três diferentes corantes. Nos preparados sólidos para refresco todos os sabores do fabricante da marca A, estavam acima da legislação sendo que um deles apresentou, ainda, uma mistura de 4 corantes (**Tabela 3**). Todos os refrigerantes, confeitos, pós para gelatinas e bebidas isotônicas analisados atendiam aos valores estabelecidos pela legislação (**Tabelas 3, 4 e 5** respectivamente). Apenas uma amostra de confeito, cor/sabor marrom do fabricante B, apresentou 4 diferentes corantes. Para as balas, das 8 amostras analisadas, 4

apresentaram uma quantidade superior ao limite permitido pela legislação (**Tabela 5**). Em nenhuma das amostras se observou a presença de corantes não permitidos pela legislação brasileira.

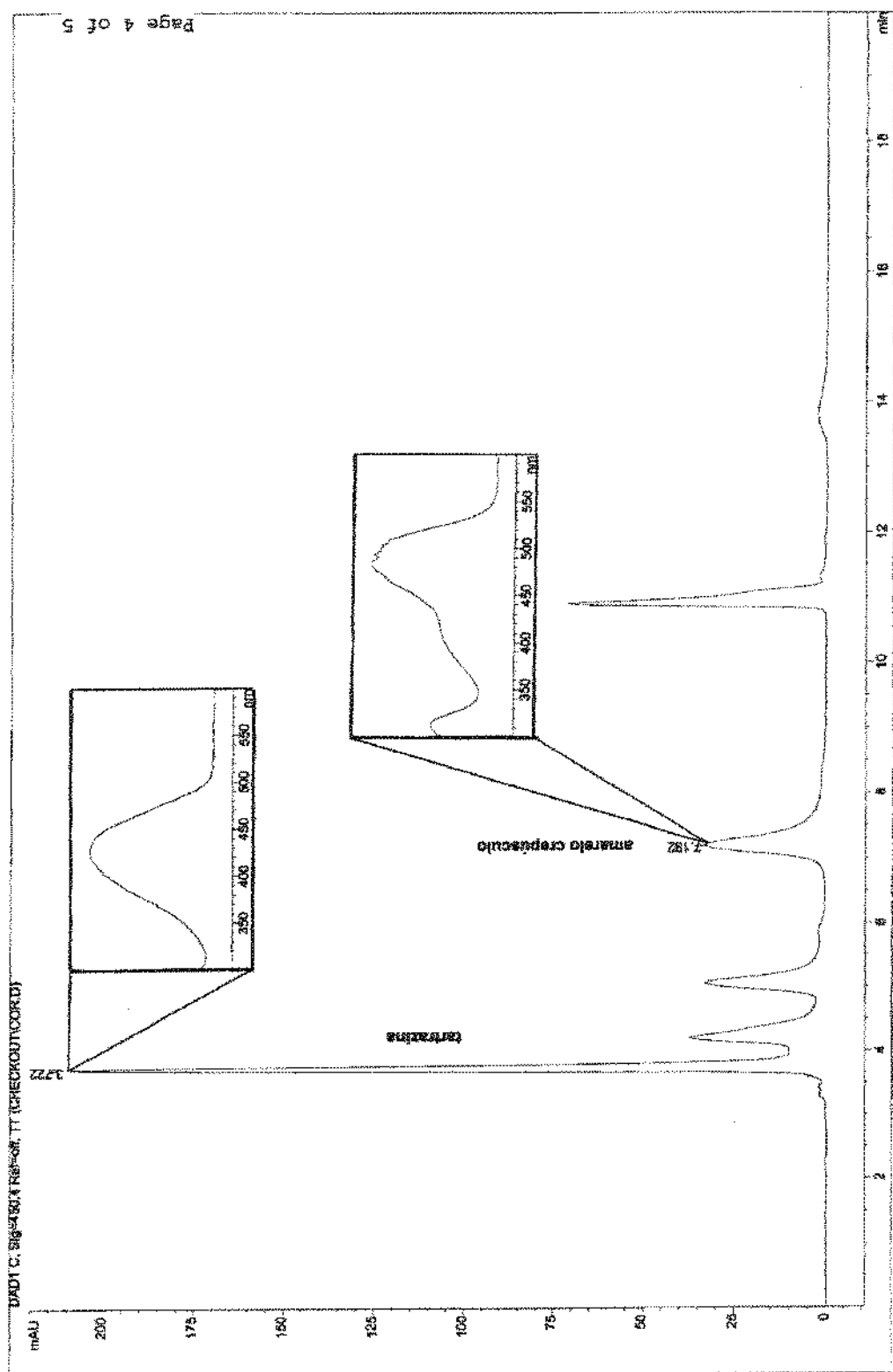


Figura 2: Perfil cromatográfico de padrões dos corantes artificiais. Condições cromatográficas descritas no texto, comprimento de onda do detector a 450 nm. Em destaque, os espectros de absorção dos corantes amarelos (tartrazina e amarelo crepúsculo)

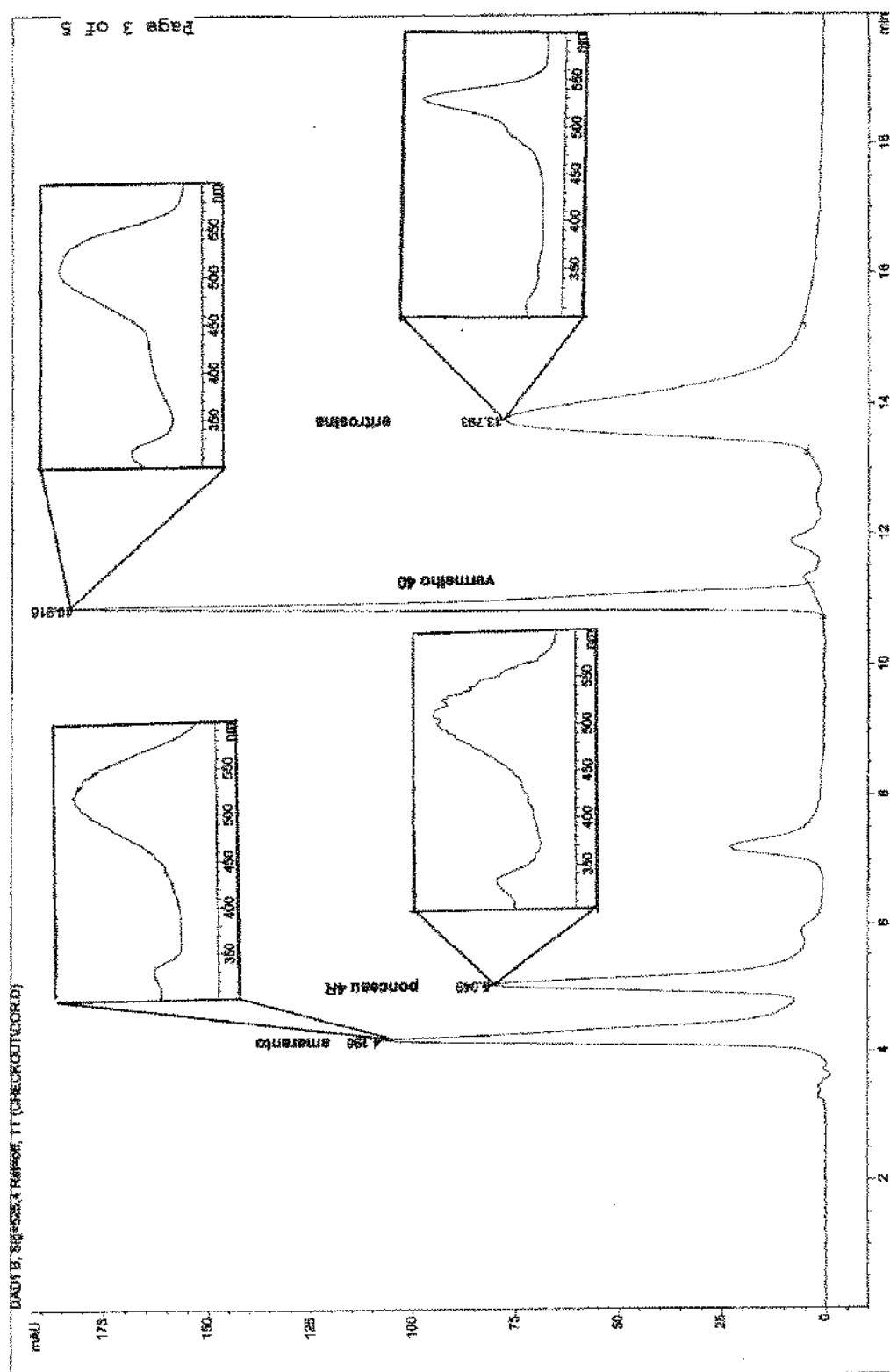


Figura 3: Perfil cromatográfico de padrões dos corantes artificiais. Condições cromatográficas descritas no texto, comprimento de onda do detector a 525 nm. Em destaque, os espectros de absorção dos corantes vermelhos (amarantho, ponceau 4R, vermelho 40 e eritrosina).

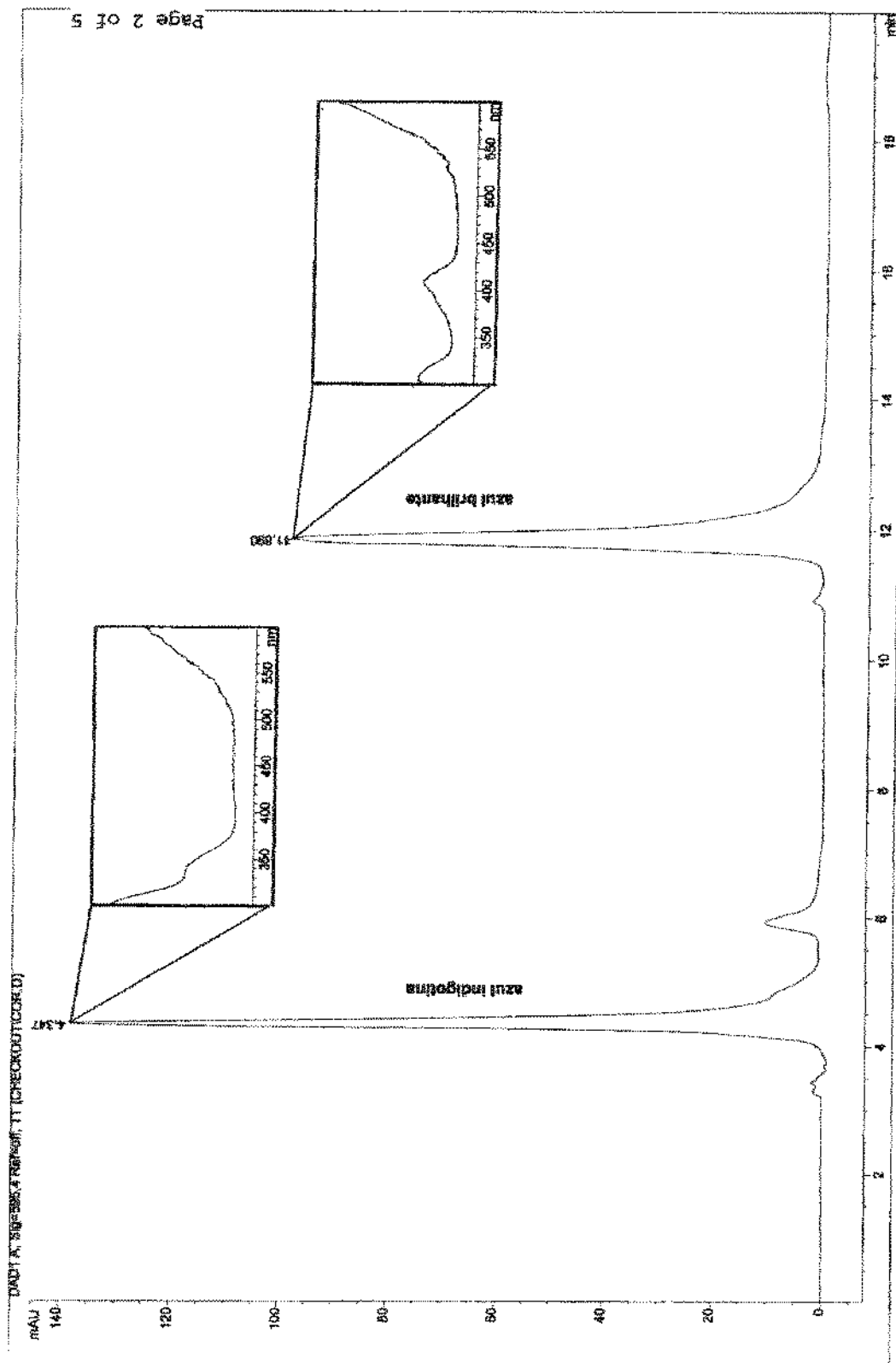


Figura 4: Perfil cromatográfico de padrões dos corantes artificiais. Condições cromatográficas descritas no texto, comprimento de onda do detector a 590 nm. Em destaque, os espectros de absorção dos corantes azuis (azul brilhante e azul indigotina).

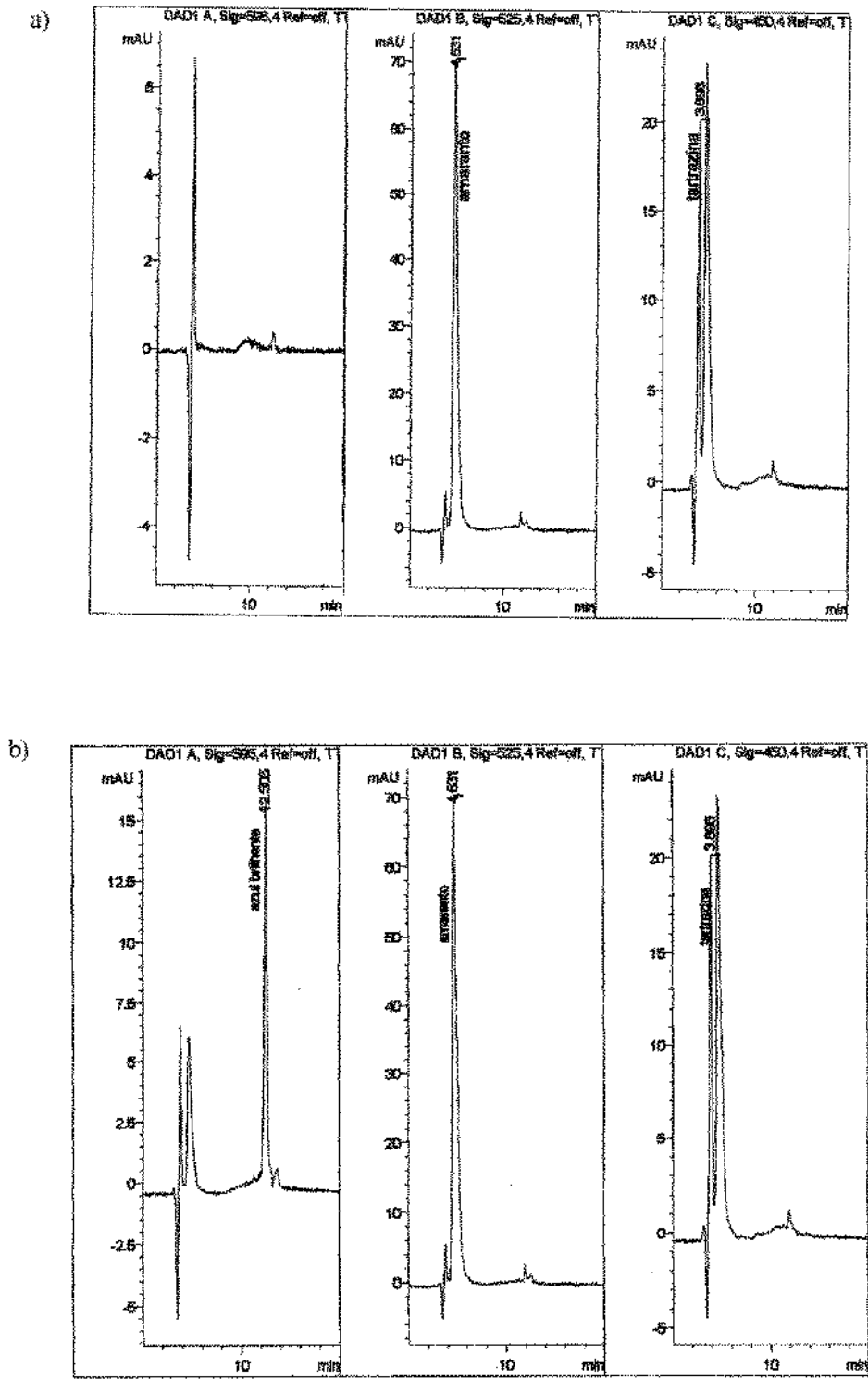


Figura 5 : Perfis cromatográficos nos três comprimentos de onda para: (a) gelatina comum cor/sabor framboesa; (b) refrigerante cor/sabor uva. Condições cromatográficas descritas no texto.

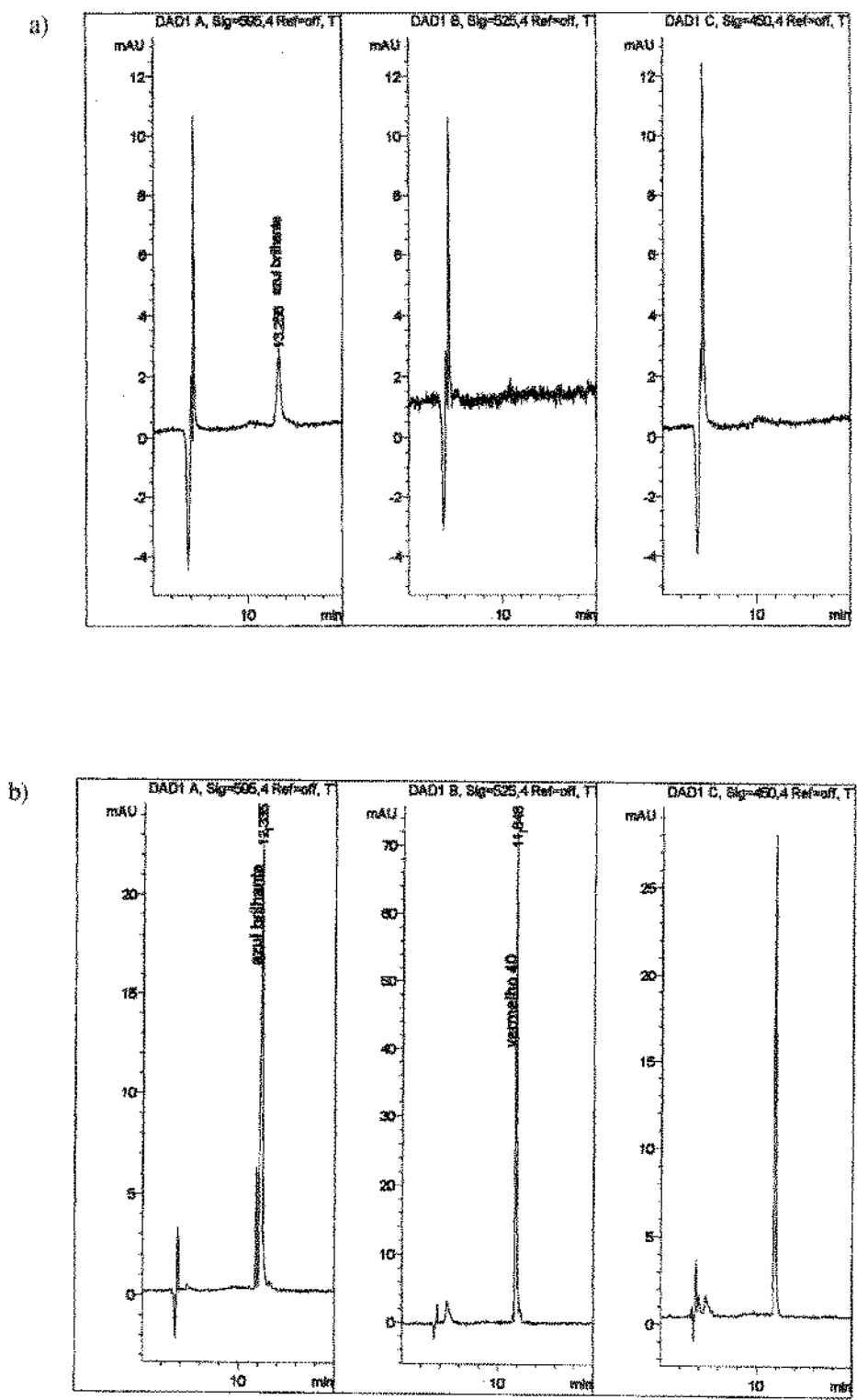


Figura 6: Perfis cromatográficos nos três comprimentos de onda de leitura para : (a) confeito de chocolate cor/sabor azul, (b) bala cor/sabor roxa. Condições cromatográficas descritas no texto.

Tabela 3: Composição qualitativa e quantitativa dos corantes artificiais *

PRODUTO	MARCA	COR/SABOR	CORANTE (mg/100g)				TOTAL
			tartrazina	amaranto	amarelo crep.	azul indigotina	
REFRESCO EM PÓ	A	laranja	11±2		4.8±0.6		16.2
		morango		2.5±0.6	16±3		18.3
		uva	11±1	34±6	0.1±0.1	9±1	54.3
	B	laranja	3.9±0.7		1.7±0.2		5.6
		morango		3±2	2.3±0.5		5.2
		maracujá	3.3±0.4		0.8±0.2		4.1
REFRIGERANTE	A	abacaxi	2±1		0.2±0.1		2.6
		uva	3±1	3.4±0.2		0.17±0.04	6.97
		uva	0.75±0.05	3.6±0.3		0.46±0.00	4.77
	B	uva	0.73±0.05	3.5±0.2		0.21±0.02	4.4
		laranja	0.46±0.03	0.05±0.00	2.8±0.2		3.34

*média e estimativa do desvio padrão de duas amostras em duplicata.
espaços em branco indicam corantes não detectados

Tabela 4: Composição qualitativa e quantitativa dos corantes artificiais *

PRODUTO	MARCA	COR/ SABOR	CORANTE (mg/100g)						TOTAL	
			tartrazina	amaranto	ponceau 4R	amarelo crep.	vermelho 40	azul indigot.		azul brilhante
CONFEITOS	A	azul							0.43±0.03	0.43
		amarelo	0.92±0.06							0.92
		vermelho		3.5±0.3	2.0±0.1		1.12±0.08			3.14
		verde	1.5±0.1						0.37±0.03	1.85
		laranja			traços	2.6±0.2				2.62
		marrom				2.8±0.2	0.79±0.06	0.29±0.02		3.82
	B	azul						0.32±0.02		0.32
		laranja				3.1±0.2				3.05
		vermelho		2.9±0.2	1.7±0.1					1.69
		amarelo	2.3±0.2							2.26
BEBIDAS ISOTÔNICAS	A	marrom		0.63±0.04	0.36±0.03	3.7±0.3		0.38±0.03		4.47
		uva		0.23±0.01		0.01±0.00			0.08±0.00	0.32
		tangerina		0.01±0.00		0.22±0.01			0.01±0.00	0.24
		maracujá								
	B	melancia					0.44±0.02			0.44
		tangerina				0.38±0.02	0.01±0.00			0.39

* média e estimativa de desvio padrão de duas amostras em duplicata.
espaços em branco indicam corantes não detectados

Tabela 5: Composição qualitativa e quantitativa dos corantes artificiais *

PRODUTO	MARCA	COR/SABOR	CORANTE (mg/100g)					azul indigotina	azul brilhante	TOTAL
			tartrazina	amaranto	amarelo crep.	Vermelho 40				
GELATINA	A	morango		4.2±0.2	3.4±0.2					7.6
		abacaxi	1.57±0.01		0.53±0.02					2.1
		cereja		10.6±0.2						10.6
		limão	1.61±0.03					0.35±0.01		1.96
		uva		3.2±0.4				0.64±0.08		3.84
	B	morango		3.7±0.3	2.74±0.00					6.44
		abacaxi	2.3±0.3		0.46±0.04					2.76
		cereja		6.6±0.4						6.6
		limão	1.56±0.05					0.6±0.01		2.16
		uva		3.1±0.1				0.49±0.05		3.59
BALAS	A	azul							0.84±0.00	0.84
		rosa				5.9±0.2				5.87
		amarelo	12.0±0.7							12.01
		laranja	0.37±0.00		11.16±0.62					11.53
		roxo				1.74±0.02			0.78±0.00	2.52
	B	vermelho/branco				2.59±0.03				2.59
		verde/amarelo	10.2±0.5			0.41±0.00			0.94±0.01	11.55
		vermelho/laranja	0.68±0.00			3.88±0.08				10.45

*média e estimativa do desvio padrão de duas amostras em duplicata.
espaços em branco indicam corantes não detectados

VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

Os limites de detecção encontrados para os corantes artificiais em solução padrão e nas balas foram os mesmos, e estão representados na **Tabela 9**. Os limites de quantificação foram considerados como sendo duas vezes o limite de detecção. Em nenhum trabalho revisado na literatura foi encontrado relato desses limites.

Tabela 9 : Limites de detecção e quantificação para os corantes artificiais, segundo as condições de trabalho deste estudo.

CORANTE	LIMITE DETECÇÃO	LIMITE QUANTIFICAÇÃO
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
AZUL DE INDIGOTINA	0.51	1.03
AZUL BRILHANTE	1.30	2.60
AMARANTO	1.02	2.04
PONCEAU 4R	0.57	1.13
VERMELHO 40	1.10	2.19
ERITROSINA	0.51	1.03
TARTRAZINA	0.70	1.41
AMARELO CREPÚSCULO	1.83	3.66

As taxas de recuperação, para os oito corantes analisados (**Tabela 10**), variaram entre 96-103%, nos dois níveis de enriquecimento em balas. 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 (1975) e GRAICHEN e MOLITA (1963), mas muito próximas às obtidas por ASHKENAZI et al. (1991), embora esses autores tenham utilizado a cromatografia de coluna clássica para a determinação dos corantes em alimentos.

Tabela 10 : Recuperação dos padrões adicionados em dois diferentes níveis de concentração em balas.

CORANTE	I	recuperação (%)	II	recuperação (%)
AZUL DE INDIGOTINA	3.44	96.2	5.16	96.4
AZUL BRILHANTE	2.93	98.0	4.39	98.4
AMARANTO	2.41	101.0	3.61	103.0
PONCEAU 4R	2.71	96.8	4.07	96.6
VERMELHO 40	2.52	102.0	3.78	100.3
ERITROSINA	2.81	96.0	4.21	96.0
TARTRAZINA	2.25	99.6	3.38	99.7
AMARELO CREPÚSCULO	1.84	99.0	2.76	98.8

I e II representam os dois diferentes níveis de concentração (mg/100mL) estudados
média de determinações em duplicata

A **Tabela 11** apresenta as faixas de repetibilidade esperadas entre duas determinações, em solução padrão e em balas, com 90% de confiança. Desta forma, espera-se que os valores fornecidos por determinações em duplicata, difiram, dentro dos limites fornecidos pela repetibilidade, com a confiança indicada.

Tabela 11 : Repetibilidade dos corantes em balas e em solução padrão, em dois diferentes níveis de concentração (mg/100mL)*

CORANTE	Concentração balas	Repetibilidade balas	Concentração padrão	Repetibilidade padrão
AZUL DE INDIGOTINA	0.57±0.00	0.00	3.20±0.08	1.17
AZUL BRILHANTE	1.14±0.01	0.41	3.22±0.016	1.65
AMARANTO	2.10±0.02	0.58	6.83±0.18	1.75
PONCEAU 4R	13.86±0.96	4.05	6.21±0.30	2.26
VERMELHO 40	5.87±0.17	1.70	4.07±0.20	1.85
ERITROSINA	1.96±0.02	0.58	5.25±0.22	1.94s
TARTRAZINA	8.14±0.33	2.37	9.52±0.38	2.55
AMARELO CREPÚSCULO	2.39±0.03	0.72	26.02±0.98	4.09s

Nível de significância 10%
* média e estimativa do desvio padrão de amostras em duplicata

A **Tabela 12** apresenta as concentrações dos corantes determinadas em balas, por combinações fatoriais das variáveis inerentes aos procedimentos pré-cromatográficos, na avaliação da rusticidade do método.

TABELA 12: Concentrações (mg/100g) dos corantes artificiais em bala, através de combinações fatoriais, para avaliação da rusticidade do método.

Combinação*	Tartrazina	Amaranto	Ponceau 4R	Amarelo	Vermelho 40	Eritrosina	Azul	Azul
				Crep.			Indigotina	Brilhante
1	9.02	6.94	6.01	27.12	3.83	5.41	3.14	3.15
2	10.00	7.06	5.61	27.27	4.49	5.20	3.36	3.40
3	9.48	6.78	6.31	26.57	4.22	5.64	2.27	3.37
4	9.15	6.57	6.21	26.86	4.00	5.47	3.13	3.22
5	9.37	6.72	6.43	24.72	4.07	5.03	3.10	2.86
6	9.47	6.61	6.72	25.17	3.88	5.16	3.22	3.28
7	10.20	6.84	6.20	24.84	4.12	4.99	3.15	3.26
8	9.43	7.08	6.14	25.61	3.93	5.08	3.24	3.24
média	9.52	6.82	6.21	26.02	4.07	5.25	3.20	3.22
dp	0.38	0.18	0.30	0.99	0.20	0.22	0.08	0.16
cv (%)	3.94	2.65	4.86	3.79	4.96	4.14	2.56	4.85s

*de acordo com a Tabela 2, cv : coeficiente de variação; dp: desvio padrão

Através da tabela podemos observar que a metodologia apresenta bons níveis de reprodução, apresentando valores de coeficiente de variação inferiores a 5%.

Já na Tabela 13 temos os valores obtidos por análise estatística para avaliar se ocorrem interações durante as etapas pré-cromatográficas que possam afetar as determinações dos corantes artificiais. Essa tabela indica se uma dada variável estudada pode interferir no resultado. Podemos observar que uma das variáveis estudadas influenciou na determinação docorantes amarelo crepúsculo.

TABELA 13: Estimativa do efeito das variáveis durante as determinações dos corantes artificiais em balas.

Corantes	Observação	Variáveis*				
		A	B	C	D	E
Tartrazina	estimativa do efeito	-0.00	0.10	0.20	0.10	-0.55
	significância (p > f)	0.99	0.78	0.58	0.77	0.22
Amaranto	estimativa do efeito	0.01	-0.02	-0.02	0.17	0.01
	significância(p > f)	0.98	0.94	0.92	0.51	0.96
Ponceau 4R	estimativa do efeito	-0.15	0.10	0.26	0.09	0.09
	significância(p > f)	0.75	0.82	0.58	0.85	0.84
Amarelo Crep.	estimativa do efeito	0.42	-0.10	-1.88*	0.04	0.11
	significância(p > f)	0.30	0.77	0.03	0.91	0.75
Vermelho 40	estimativa do efeito	0.2	0.00	-0.14	0.22	-0.22
	significância(p > f)	0.92	1.00	0.46	0.28	0.28
Eritrosina	estimativa do efeito	-0.04	0.10	-0.37	-0.02	0.00
	significância(p > f)	0.82	0.59	0.14	0.91	1.00
Azul Indigotina	estimativa do efeito	0.50	0.02	-0.08	0.11	-0.12
	significância(p > f)	0.37	0.76	0.23	0.13	0.11
Azul Brilhante	estimativa do efeito	0.12	0.10	-0.13	-0.01	-0.21
	significância(p > f)	0.26	0.32	0.24	0.93	0.12

*de acordo com a Tabela 1; p: probabilidade; f: valor teste-fs

CONCLUSÕES

A utilização de fase móvel H₂O/MeOH tamponada, para condicionamento da coluna durante 12,5 minutos entre as injeções, é fundamental, possibilitando a boa resolução dos corantes sem a utilização de pares-iônicos.

Os dados de recuperação e repetibilidade recomendam a aplicação da metodologia na determinação em alimentos. A análise de rusticidade do método mostra que a única variável, que influência na determinação do amarelo crepúsculo é a velocidade de rotação da centrifuga, sendo que as demais variáveis não apresentam qualquer efeito sobre a determinação dos corantes.

A nova metodologia mostrou resultados bastante satisfatórios, quando aplicada a todos os alimentos aqui estudados. No entanto, os dados obtidos apontam a necessidade de um maior rigor no controle desses aditivos.

Recomendamos a metodologia aqui apresentada para a determinação de corantes artificiais, por CLAE, por apresentar vantagens em relação aos métodos usuais, principalmente por: possibilitar a determinação simultânea dos oito corantes artificiais; simplicidade e versatilidade na etapa de extração; menores perdas na execução do método e rapidez.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- . AGOSTINI, T.A.; GODOY, H. T. - “Desenvolvimento de Metodologia para Determinação Simultânea, por CALE, das Vitaminas B₁, B₂, B₆, Ácido Nicotínico e Nicotidamida em Alimentos Enriquecidos”. Tese de doutorado apresentada à faculdade de Engenharia de Alimentos.(1997).
- . ASHKENAZI, P. ; YARNITZKY, C. CAIS, M. “Determination of synthetic food colours by means of a novel sample preparation system”, *Analytical Chimica Acta*, 248, 289-299, (1991).
- . BARROS NETO, B. ; SCARMINIO, I.S. ; ROY, E.B. - “Planejamento e Otimização de Experimentos”, 2ª ed., Campinas SP, editora UNICAMP, (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*, 105, 589-593, (1980).
- . CAULCUTT, R.; BODDY, R. - *Statistic for anaytical chemists*. 1th. Ed., Chapman and Hall, Londres, 253 p, (1983).
- . CHIANG, H. C.; LIN, S. L. - "Polyamide Kiselguhr Thin - Layer Chromatography of Yellow Food Dyes". *Journal of Chromatography*, 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*", 17 (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*", 93 (1), 243-247, (1974).
- . COULSON, J. - "Synthetic Organic Colours for Food ". In: *Developements in Food Colours - I*, Walford, J. (Ed) Appl. Sc. Publ. Ltd, London, (1980).
- . DOLINSKY, M.; STEIN, C. - "Application of a Liquid Anion Exchange Resin to the Separation of FD and C Colours from Foods". *Journal of the AOAC.*, 45 (3), 767-769, (1962).
- . GILHOOLEY, R. A.; HOODLESS, R.A.; PITMAN, K. G.; THONSON, J. - "Separation and Identification of Food Colourrs, IV. Estraction of Synthetic Water - Soluble Food Colours". *Journal of Chromatography*, 72, 325-331, (1972).
- . GRAHAN, R. J. T.; NYA, A .E. - "The Partition Chromatography of Food Dyes on Polycarbonate - Coated Foils". *Journal of Chromatography*, 43, 547-559, (1969).
- . GRAICHEN, C.; MOLITOR, J. C. - "Determination of Certifiable FD&C Colors Additives in Food and Drugs". *Journal of the AOAC*, 46 (6), 1022-1029, (1963).
- . GRAICHEN, C. - "Quantitative Determination of FD&C Colors in Foods", *Journal of the AOAC*, 58, (2), 278-282, (1975).

- . 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).
- . GREENWAY, G. M. ; KOMETA, N. ; MACRAE, R. - "The determination of food colours by HPLC with on-line dialysis for sample preparation", *Analytical Methods Section*, 43, 137-140, (1992).
- . GRIFFITHS, M. H. E. - "Systematic Identification of Food Dyes Using Paper Chromatography Techniques". *Journal of Food Technology*, 1, 63-72, (1966).
- . HAWLETT PACKARD - "Applications of the HP ^{3d} Capillary Electroforesis System" Publication number 12-5963-7140E, 1, 107p, (1995).
- . 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*, 54, 393-404, (1971).
- . IFT - "Food Colours". A Scientific Status Summary by the Institute of Food Technologists's Expert Panel of Food Safety and Nutrition and the Comite of Public Information, (1980).
- . IFT- "Food Colours". A Scientific Status Summary by the Institute of Food Technologists's Expert Panel of Food Safety and Nutrition and the Comite of Public Information, (1986).
- . LANCASTER, F. E. ; LAWRENCE, J. F. - "Ion-Pair HPLC Separation and Detection of Subsidiary Dyes in Synthetic Food Colors", *Journal of the AOAC*, 65, (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 AOAC*, 66, (6), 1424-1428 (1983).
- . LAWRENCE, J. F.; LANCASTER, F. E.; CONACHER, H. B.S. - "Separation and detection of synthetic food colours by ion-pair HPLC". *Journal of Chromatography*, 210, 168-172(1981).
- . LEES, R. - "Colour - Identification of Food Dyes". In: *Laboratory Handbook of Methods of Food Analysis*. 2nd Ed., Leonard Hill, London(1971).

- LEPRI, L.; DESIDERE, P. G.; COAS, V.) - "Separation and Identification of Water-Soluble Food Dyes by Ionexchange and Soap Thin-Layer Chromatography". *Journal of Chromatography*, 161, 279-286(1978).
- MACRAE, R. - "HPLC in food analysis" Academic Press, London, 2th, (1990).
- McKONE, H. T. ; IVIE, K. - "An Introduction to HPLC: Separation of Some FD&C Dyes", *Journal of Chemical Education*, 57, (4), 321-322 (1980).
- PEARSON, D. - "General Methods for Additives and Contaminants". In: *"The Chemical Analyses of Food"*. 7th ed. Churchill Livingstone - Edimburgh, London, N. Y (1976).
- PERRY, A. R.; WOOLEY, D. G. - "The Identification of Some Water-Soluble Food Colours by Thin-Layer Chromatography". *Journal Ass. Publ. Analysts*, 7, 94-98(1969).
- PUTTERMANS, M. L.; DRYON, L.; MASSART, D. L. - "Ion-Pair HPLC of Synthetic Water-Soluble Acid Dyes". *Journal of the AOAC*, 64, 1-8 (1981).
- PUTTERMANS, M. L.; DRYON, L.; MASSART, D. L. - "Isolation, identification, and Determination of Food Dyes Following Ion-Pair Extraction", *Journal Assoc. Off. Anal. Chem*, 65, (3), 737-744(1982).
- PUTTERMANS, M. L.; DRYON, L.; MASSART, D. L. - "Evaluation of Thin Layer, Paper, and, HPLC for identification of Dyes Extracted as Ion-Pairs with Tri-n-octylamine", *Journal AOAC*, 65, (3), 730-736 (1982).
- 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", *Ciênci. Tecnol. Alimentos*, 16, (1), 6-11 (1996).
- SATO, G.S. ; CHABARIBERY, D. ; MAIA, M.L. ; CARVALHO, F.C. ; NETO, A.N. ; MARQUES, S.A. "Tendências de mercado para corantes na indústria de alimentos", *Agricultura em São Paulo, SP*, 39, (supl. 1), 1-50(1992).
- SRAMEK, J. - "Paper chromatography of dyes - IV. Paper chromatography of water-soluble dyes", *Journal of Chromatography*, 15, 57-64(1964).

- . TERRIL, J. B. e JACOBS, E. S. - "Aplication of gas-liquid chromatography to the Analysis of antraquinone dyes and intermediates", *Journal chromatography Science*, 8, 604-607, (1970)
- . TOLEDO, M.C.F. ; GUERCHON, M.S. "Corantes artificiais em alimentos ", *Ciênci. Tecnol. Alimentos*, 10, (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 AOAC*. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Alemanha, Int. Dairy Federation, Belgica, 9302, 202-203 (1992)
- . WHITE, P. C. ; HARBIN A. - "HPLC of Acidic Dyes on a Dynamically Modyfied Polystyrene - Divinylbenzene Packing Material With Multi-wavelength Detection and Absorbance Ration Characteristion", *Analyst*, 114, 877-882 (1989).
- . WERMINONT, G.T. - "Use of statistics to develop and avaluate analytical methods". *AOAC*, Virginia, 183p (1985).
- . WILLIAMS, A - "The evident (and urgent) need for analytical quality assurance. In: Analytical quality assurance and good laboratory practice in dairy laboratories". *International Seminar of AOAC*. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Alemanha, Int. Dairy Federation, Belgica, 9302, 13-19, (1992)
- . 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, Alemanha, Int. Dairy Federation, Belgica, 9302, 61-79, (1992)
- . YANUKA, Y.; SHALON, Y.; WEISSENBERG, E.; NIR-GROSFELD, I. - "The Isolation and Separation of Dyes from Foodstuffs by Columm Chromatography". *Analyst*, 88, 872-876(1963).

TEORES DE CORANTES ARTIFICIAIS DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM PÓ PARA GELATINA

RESUMO

Dos métodos de determinação de corantes artificiais, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a grande maioria apresentam inconvenientes, principalmente, devido à utilização de gradiente de eluição e/ou par-iônico, o que resulta, normalmente, em longos períodos de condicionamento da coluna cromatográfica. Este trabalho utiliza um novo método por CLAE, proposto por PRADO e GODOY (1998), para a determinação qualitativa e quantitativa desses aditivos. A nova metodologia permite uma preparação simples da amostra e, no processo cromatográfico, a utilização de coluna de C_{18} e fases móveis composta de água/metanol tamponada com acetato de amônio para o condicionamento da coluna e água/metanol para a separação na coluna cromatográfica, possibilitaram a eluição dos corantes de forma isocrática. A detecção foi feita utilizando um detector de arranjo de diodos e com o auxílio do *software HP Chemistation* cada cromatograma pode ser monitorado em três diferentes comprimentos de onda simultaneamente, a 595 nm para os corantes azuis, 525 nm para os vermelhos e 450 nm para os amarelos. O método foi aplicado em 125 amostras de pós para gelatina comum e *diet*, de diversos sabores, de sete diferentes fabricantes em três diferentes lotes. Em todas as amostras encontrou-se um, ou mistura de no máximo três, dos seguintes corantes: amarantho, amarelo crepúsculo, tartrazina, azul de indigotina e ponceau 4R, este último encontrado apenas nas gelatinas *diet*. Em nenhuma das amostras foi encontrado corante artificial não permitido pela legislação brasileira e a quantidade utilizada não ultrapassou o determinado pela legislação brasileira. Através de análise de variância, observamos a mesma composição qualitativa para os mesmos sabores de diferentes fabricantes, o que não ocorre com a composição quantitativa, que variou muito de fabricante para fabricante. Poucas foram as diferenças significativas observadas

nos três lotes analisados para cada fabricante, o que demonstra o bom controle na utilização desses aditivos pela indústria de alimentos.

SUMMARY

Among the methods of determination of synthetic dyes, applying the high performance liquid chromatography (HPLC), the majority showed to be inconvenient, specially, due to the usage of gradient elution and ionic pair, which normally results in long periods of conditioning of the chromatographic column this work uses a new method by HPLC, proposed by PRADO and GODOY (1998), to the quantitative and qualitative determination of the additives. The new technology allows a simple preparation of the sample and, in the chromatographic process, the usage of the column of C₁₈ and mobile phases composed of water/methanol tamponed with ammonia acetate to the conditioning of the column and water/methanol to the separation of the chromatographic column, allowing the elution of the colours in isocratic way. The detection was done using a diode array detector and with the help of software HP chemstation each chromatogram can be monitored simultaneously in three different lengths of wave, 595 nm for the blue colourants, 525 nm for the red and 450 for the yellow. The method was applied in 125 samples of jelly regular and diet powder, of several flavours, of seven different manufacturers in three different shares. It was found in all the sample one, or the mixture of maximum three, of the following colorants : bordeaux S, sunset yellow, tartrazine, indigo carmin and ponceau Sr, this last one only found in diet jelly. It wasn't found in any of the same colouring which isn't allowed by the brazilian legislation and the quantity used didn't go over to the determination of the brazilian legislation. Through the analyses of the variation, we observe the same qualitative composition to the same flavours of different manufacturers, but the quantitative composition varied a lot from manufacturer to manufacturer.

There were few significant differences observed in the three shares analysed to each manufacturer, what demonstrates a good control in the usage of these additives by the food industry.

INTRODUÇÃO

O emprego de aditivos químicos em alimentos é motivo de muita polêmica que gera controvérsia envolvendo consumidores, indústria, pesquisadores e governo. Os corantes artificiais pertencem a uma dessas classes de aditivos alimentares e têm sido objeto de muitas críticas, já que seu emprego em alguns alimentos se justifica apenas por questões de hábitos alimentares.

A cor é associada a muitos aspectos de nossa vida, influenciando nossas decisões, incluindo as que envolvem os alimentos. A aparência, segurança, aceitabilidade e características sensoriais são todas afetadas pela cor. Embora esses efeitos sejam associações inerentes às características psicológicas, eles interferem na escolha dos produtos (CLYDESDALE, 1993).

Muitos alimentos industrializados originalmente não apresentam cor e em outros a cor natural é alterada ou destruída durante o processamento e/ou estocagem, com isso o uso de corantes para suplementar ou realçar a coloração perdida e, principalmente, para aumentar a aceitabilidade do produto frente ao consumidor é um recurso muito utilizado. A lógica de consumo desses produtos se dá pelos olhos, alimentos coloridos, vistosos, atraentes só podem ser deliciosos. Essa cor maravilhosa se deve ao uso de corantes, um aditivo não totalmente inofensivo.

Os corantes orgânicos sintéticos artificiais foram, progressivamente, substituindo os corantes naturais, devido à sua maior estabilidade, poder de coloração, maior faixa de coloração e preço, além de garantir a uniformidade dos alimentos produzidos em larga escala (SATO, 1992).

Com o aumento da globalização e consequentemente aumento das importações/exportações, a utilização de métodos mais confiáveis, eficientes e rápidos para a detecção, identificação e quantificação dos corantes se faz cada vez mais necessário. Com as restrições das legislações em relação às quantidades permitidas e as

tendências futuras de se aumentar essas restrições, o problema passou a ser além da identificação, a quantificação desses corantes em alimentos. O Brasil permite uma quantidade máxima de 10 mg/100g no produto final e uma mistura de no máximo três dos seguintes corantes artificiais: Tartrazina, Amarelo Crepúsculo, Amaranto, Ponceau 4R, vermelho 40, Eritrosina, Azul Indigotina e Azul Brilhante (ALMEIDA, 1987; AMARAL, 1984).

A determinação de corantes sintéticos em alimentos tem sido feita por métodos cromatográficos tradicionais e, mais recentemente, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (GRATZFELD-HUSGEN e SCHUSTER, 1995; GREENWAY et al., 1992; WHITE e HARBIN, 1989; LANCASTER e LAWRENCE, 1983 e 1982; LAWRENCE et al., 1981; McKONE e IVIE, 1980; BOLEY et al., 1980; PUTTEMANS et al., 1981). PRADO E GODOY (1998) desenvolveram e validaram uma metodologia, por CLAE, que, além das vantagens de eficiência na separação, rapidez e simplicidade, permite a separação e quantificação dos oito corantes permitidos em uma única corrida, utilizando sistema de eluição isocrático sem a adição de par-iônico à fase móvel.

Este trabalho teve como objetivo a determinação dos corantes em pós para gelatina utilizando a CLAE. A escolha desse alimento para as análises se deve ao fato de ser um produto ampla e habitualmente consumido, principalmente pela população infantil, e por ser um produto onde os corantes artificiais são tradicionalmente empregados em sua composição.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Foram analisados vários sabores de cinco e quatro diferentes marcas de pós para gelatina comum e *diet*, respectivamente. Para cada marca/sabor de gelatina comum, foram analisados três lotes diferentes, identificados pela data de fabricação apresentada na embalagem. As amostras de gelatina comum e *diet* foram preparadas homogeneizando todo o conteúdo de duas embalagens em moinho de facas, com peneira de 60 mash. As análises foram sempre realizadas em duplicata. Todos os produtos foram comprados em supermercados da região de Campinas, São Paulo e Limeira, totalizando 125 amostras.

REAGENTES

Os padrões de corantes artificiais foram adquiridos através da ICI do Brasil S.A. O metanol utilizado com grau cromatográfico (*ominsolv*), solução amoniacal e o acetato de amônio foram adquiridos da MERCK Brasil e cartuchos de sep-pak C₁₈. A água utilizada no preparo das fases móveis e das amostras foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram sempre filtradas em filtros FLOUPORE (MILLIPORE HAWP 0013) de 0,5 µm de diametro de poro e degaseificadas em banho ultra-sônico.

EQUIPAMENTO

Após a extração as amostras foram centrifugadas em centrífuga marca Hitachi modelo Himac CR21.

Para análise em CLAE foi utilizado cromatógrafo a líquido HP série 1050, com sistema de bombeamento isocrático e válvula injetora tipo *Rheodyne* e uma alça de amostragem de 20 µL de capacidade. Um detector de arranjo de diodos (DAD) HP série

1050, acoplado a um *software HP Chemstation*, que apresenta o recurso de visualização, em até cinco diferentes comprimentos de ondas em uma mesma corrida cromatográfica, possibilitou a análise de todos os corantes de forma simultânea. Para esse trabalho, utilizaram-se os mesmos comprimentos de onda propostos por PRADO e GODOY (1998), 595nm para os corantes azuis, 525nm para os vermelhos e 450nm para os amarelos. Foi utilizada como coluna analítica a *Spherisorb ODS-2* de 150x4,6mm d.i., 5 μ m (SIGMA-ALDRICH, USA), protegida por uma coluna de guarda *Micropore* 30x4,6 mm d.i., C₁₈, 10 μ m (VARIAN, USA).

MÉTODOS

Pesou-se entre 4 a 5g de amostra, previamente homogenizada, para a extração dos corantes. Devido à simplicidade da matriz as amostras foram simplesmente dissolvidas em água quente (40 a 50°C) e o volume ajustado com água em balão volumétrico de 50mL. Após o ajuste de volume, uma pequena fração (cerca de 10 mL) era coletada e centrifugada por 10 minutos a uma rotação de 15.000 rpm. O sobrenadante era filtrado em membrana fluoropore, HAWP 001300 (MILLIPORE), com poros de 0,5 μ m e depois injetado no cromatógrafo.

Foram realizados também testes com lâ segundo PEARSON ,(1976) e com cartuchos de sep-pak C₁₈ de acordo com CHIANG e LIN, (1969).

ETAPA CROMATOGRÁFICA

Antes da injeção da amostra , a coluna era condicionada, por um período inicial de 12,5 minutos, a uma vazão de 0,5 mL/min, pela passagem de uma solução de água/metanol (70:30) adicionada de 0,08M de acetato de amônio. Imediatamente, a fase móvel é trocada por uma nova fase móvel constituída apenas de água/metanol, nas mesmas proporções, mas sem a presença do tampão. Com esta fase móvel os corantes são separados através de um sistema de eluição isocrática, com uma vazão de 0,5

mL/min. O tempo necessário para a separação dos oito corantes foi de 20 minutos. A coluna foi condicionada, novamente, pela passagem da fase móvel tamponada por um período de 12,5 minutos antes de ser acionada uma nova corrida.

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO

Os compostos são detectados através do detector de arranjo de diodos (DAD) na região do visível. O recurso oferecido pelo *software* permitiu o registro gráfico de cada cromatograma nos três diferentes comprimentos de onda estabelecidos: 595 nm para os corantes azuis, para os vermelhos a 525 nm e os amarelos a 450 nm.

Os corantes foram identificados através da comparação dos tempos de retenção obtidos com soluções padrão analisadas nas mesmas condições e pelos espectros de absorção obtidos pelo DAD. A adição de padrões às amostras também foi usado como parâmetro de identificação (co-cromatografia). A quantificação foi realizada por padronização externa, construindo curvas com 5 níveis de concentração, sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A simplicidade das matrizes permitiu que as amostras fossem apenas dissolvidas em água quente, centrifugadas, filtradas e injetadas no cromatógrafo. Essa técnica simples de extração foi comparada com a técnica de extração através da lã pura (CORRADI e MICHELI, 1979; PEARSON, 1976; LEHMAN et al., 1970). O emprego de lã para extração resultou sempre em quantidades inferiores devido, principalmente, a não adsorção completa pela lã e pela dificuldade de se retirar quantitativamente os corantes impregnados na mesma. Este fato já havia sido observado por muitos pesquisadores (GILHOOLEY et al., 1972; LEHMAN, 1970; YANUKA, 1963, DOLINSKY e STEIN, 1962).

A utilização de coluna de poliamida para limpeza (GILHOOLEY et al., 1972; CHIANG e LIN, 1969), bem como a utilização de cartuchos de sep-pak C₁₈ (CHIANG e LIN, 1969), se mostraram desnecessários para a limpeza das matrizes estudadas, o que

representou uma sensível economia na realização do método de análise, devido ao alto custo desses materiais, além de diminuir as perdas em decorrência do maior manuseio da amostra. A etapa de centrifugação é suficiente para facilitar no processo de filtração subsequente.

A utilização de sistema isocrático com fase móvel tamponada, apresentou grande vantagem, principalmente pela não utilização do par-iônico e pelo pequeno tempo de condicionamento necessário para o sistema cromatográfico, apenas 12,5 minutos. O uso de uma fase móvel tamponada no condicionamento da coluna foi significativo, pois a presença do tampão aumentou a resolução entre os corantes tartrazina, amaranço, azul de indigotina, ponceau 4R e amarelo crepúsculo.

Tais dados coincidem com os encontrados em sistemas isocráticos, mudando-se o comprimento de onda ou a fase móvel dos sistemas para a obtenção de misturas de padrões de corantes artificiais (PUTTERMANS et al., 1981). 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 móvel (BOILEY et al., 1980). Esses dados confirmaram a eficiência de eluentes tamponados na separação dos corantes artificiais (LAWRENCE et al., 1981; BOILEY et al., 1980).

Em testes preliminares, a utilização de brometo de cetiltrimetilamônio (cetrimida) necessitou de um período equivalente a dois dias para condicionar todo o sistema (PRADO e GODOY, 1998). Embora a técnica de par-iônico seja a mais recomendada para a análise de corantes artificiais (LAWRENCE et al., 1981; YANUKA, 1963), o uso desses compostos apresenta sempre o inconveniente de longos períodos de condicionamento.

As composições qualitativa e quantitativa dos corantes artificiais presentes nas amostras são apresentadas nas **Tabelas 1 e 2**. Dos oito corantes permitidos pela legislação brasileira, cujas estruturas são apresentadas na **Figura 1**, foram encontrados nas amostras analisadas apenas: a tartrazina, o amarelo crepúsculo, o amaranço, o azul de indigotina e o ponceau 4R. O amaranço foi o corante artificial quantitativamente mais utilizado pelos fabricantes de gelatina (**Figura 2**), e ainda esteve presente em um maior número de amostras analisadas. O ponceau 4R foi encontrado em apenas duas marcas de

gelatina *diet* que, coincidentemente, só fabricam alimentos *diet*. Nas outras marcas de gelatina *diet*, que também fabricam o pó para gelatina comum, a composição nos dois tipos de produtos foi a mesma para os diferente sabores.

TABELA 1 : Teores de corantes artificiais (mg/100mL) em pó para gelatina comum*.

SABOR	CORANTE (mg/100mL)	MARCA				
		A	B	C	D	E
MORANGO	tartrazina					0.8±0.1
	amaranto	4.2±0.2a	3.7±0.3b	1.62±0.02c	1.40±0.06c	4.14±0.07a
	amarelo crep.	3.4±0.2a	2.7±0.0b	3.5±0.5a	2.25±0.04b	1.6±0.2c
	total	7.6	6.4	5.12	3.65	6.57
ABACAXI	tartrazina	1.57±0.01a	2.3±0.3b	3.3±0.1c	2.9±0.2c	0.8±0.2d
	amaranto	0.53±0.02a	0.46±0.04a	3.3±0.5b	0.20±0.04c	0.12±0.06c
	total	2.1	2.76	6.6	3.1	0.92
CEREJA	amaranto	10.6±0.3a	6.6±0.5b		4.79±0.01c	3.0±0.2d
LIMÃO	tartrazina	1.61±0.04a	1.56±0.05a	2.05±0.00b	1.97±0.02b	
	indigotina	0.35±0.00a	0.60±0.02b	0.67±0.03b	0.20±0.01c	
	total	1.96	2.1	2.72	2.17	
UVA	amaranto	3.2±0.4a	3.10±0.01a	3.46±0.07a	2.49±0.07b	
	indigotina	0.64±0.08a	0.49±0.05b	0.46±0.09b	0.22±0.03c	
	total	3.84	3.59	3.92	2.71	
FRAMBOESA	tartrazina					0.9±0.2
	amaranto	3.0±0.2a			2.48±0.03b	4.1±0.2b
	amarelo crep	1.03±0.01a			1.5±0.1b	
	total.	4.03			3.98	5.0
TANGERINA	tartrazina	0.50±0.02a			0.17±0.00b	
	amaranto	1.1±0.2a			0.5±0.3b	
	total.	1.60			0.67	
PESSÊGO	tartrazina	0.43±0.07a				1.05±0.09b
	amaranto	0.55±0.02a				0.8±0.4a
	total.	0.98				1.85
TUTTI-FRUTTI	amaranto	1.31±0.07a				4.2±0.3b
	tartrazina	1.08±0.02a				2.93±0.01b
	amaranto	2.13±0.05a				0.85±0.07b
	total	4.52				7.98

*os resultados apresentados são médias e estimativa do desvio padrão de duas amostras analisadas em duplicata
letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ao nível de 5% de significância
espaços em branco indicam corantes não encontrados

TABELA 2 : Teores de corantes artificiais (mg/100mL) em pó para gelatina *diet**.

SABOR	CORANTE (mg/100mL)	MARCA			
		A	D	F	G
MORANGO	amaranto amarelo crep total	5.66±0.08a 4.16±0.09a 9.82	2.0±0.9b 0.77±0.05b 2.77		3.72±0.0c 3.72
ABACAXI	tartrazina		2.13±0.04a	1.92±0.08a	2.0±0.2a
CEREJA	amaranto ponceau 4R total	10.7±0.4a 10.7	4.13±1.3b 4.13	2.36±0.01c 6.8±1.1a 9.16	4.6±0.7b 5.6±0.7a 10.2
LIMÃO	tatrazina indigotina total	1 1.82±0.02a 0.54±0.06a 2.36		3.8±0.1b 1.1±0.3b 4.9	
FRAMBOESA	amaranto amarelo crep total	4.2±0.4a 5.8±0.1a 10.0		3.2±1.2a 6.5±1.9a 9.7	4.34±0.02a 4.34

*os resultados apresentados são médias e estimativa de desvio padrão de duas amostras analisadas em duplicata
letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ao nível de 5% de significância
espaços em branco indicam corantes não encontrados

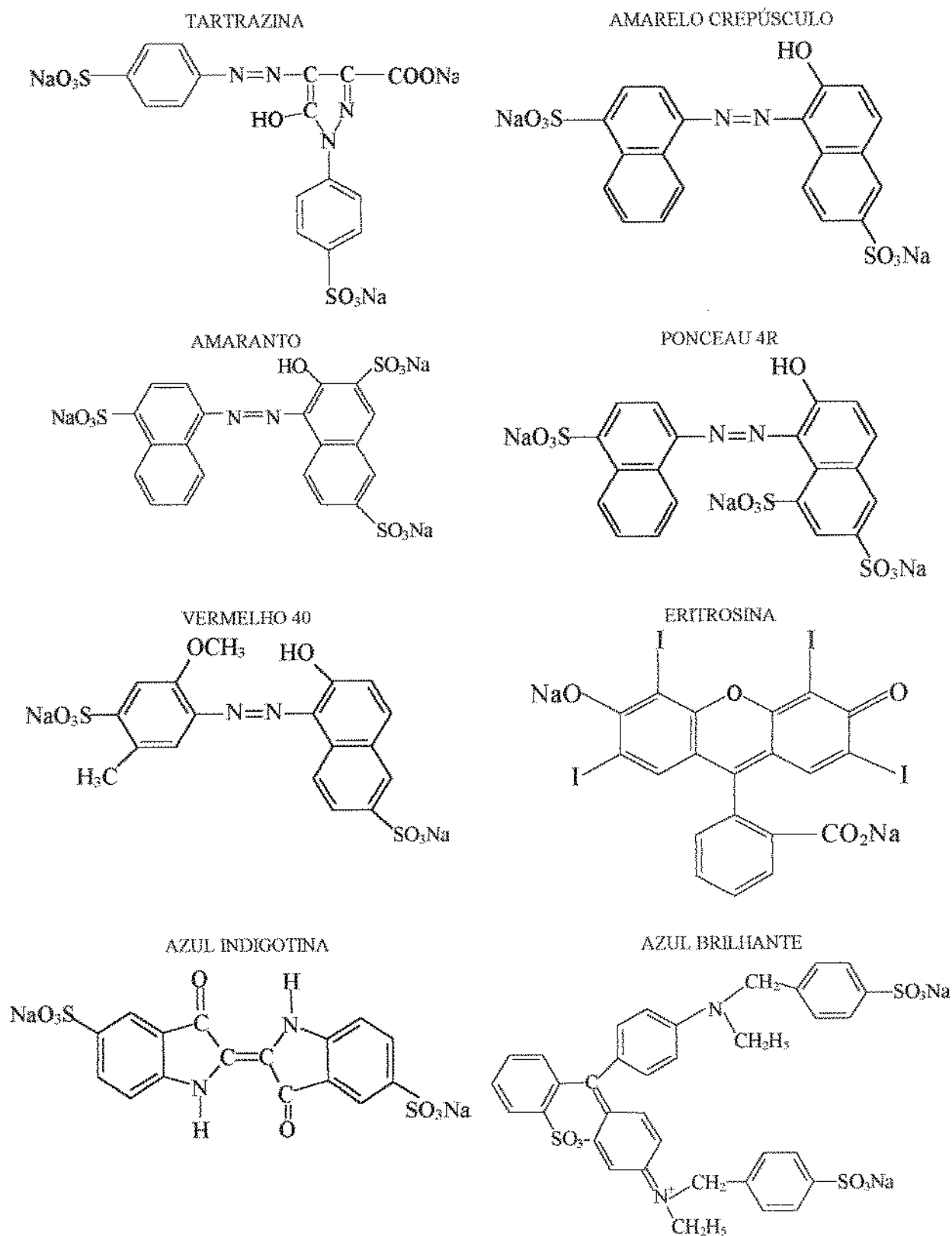
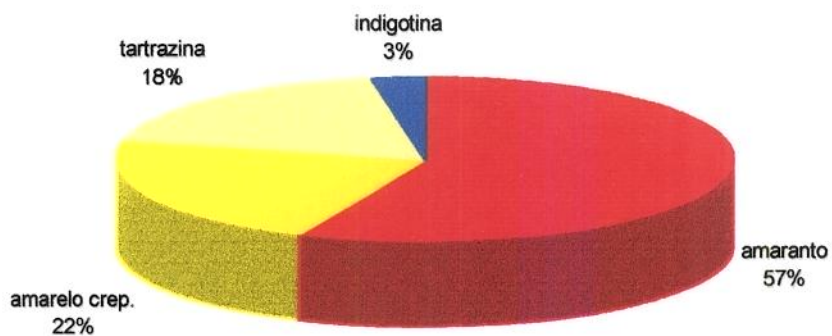
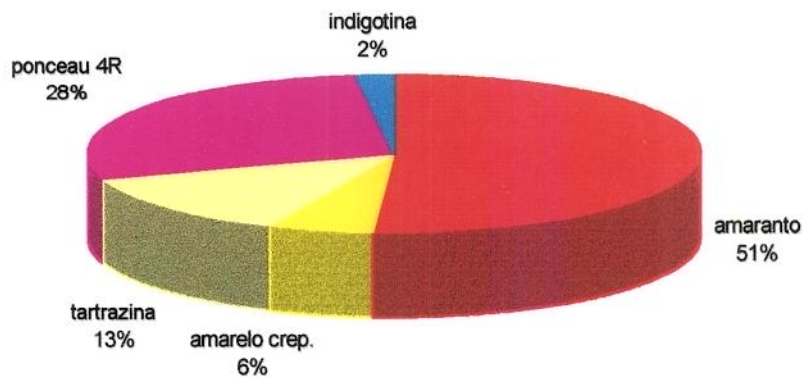


Figura 1: Estrutura química dos corantes artificiais permitidos no Brasil

gelatina**gelatina diet**

As análises estatísticas foram realizadas nas amostras de gelatina com a intenção de se verificar diferenças significativas na composição quantitativa de corantes para um mesmo sabor entre as diferentes marcas, **Tabelas 3 e 4**. Na maioria das amostras analisadas, ocorreu diferença significativa, nível de 5% de significância, nas quantidades de corantes artificiais utilizadas nos mesmos sabores de diferentes marcas, chegando em algumas situações a se utilizar uma quantidade seis vezes maior de um determinado corante. Já no caso das gelatinas *diet*, praticamente, não houve diferença significativa dos corantes utilizados entre os diferentes fabricantes.

Três diferentes lotes, de três diferentes fabricantes, de pó para gelatina comum foram analisados. Na **Tabela 3 e 4**, estão apresentadas as concentrações para cada lote das diferentes marcas, divididos por sabores. Pelo resultado da análise de variância temos que, a maioria dos fabricantes manteve um bom controle na utilização desses aditivos.

A **Figura 3** mostram os cromatogramas de duas amostras de gelatina, uma normal e outra *diet*, nos três comprimentos de onda.

TABELA 3: Comparação entre lotes dos teores de corantes artificiais (mg/100mL) em pó para gelatina*.

SABOR	CORANTE	MARCA	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3
MORANGO	tartrazina	E	0.8±0.1a	0.75±0.02a	0.89±0.00a
	amarelo crepúsculo	A	3.4±0.2a	3.39±0.07a	3.71±0.01a
		B	2.7±0.0a	3.1±0.2b	3.0±0.2b
		C	3.5±0.5a	3.25±0.08a	3.2±0.2a
		D	2.25±0.04a	3.3±0.3b	3.25±0.00b
		E	1.6±0.2a	2.18±0.03b	1.80±0.04a
	amaranto	A	4.2±0.2a	4.2±0.3a	3.83±0.04a
		B	3.7±0.3a	4.3±0.1b	4.14±0.04b
		C	1.62±0.02a	1.4±0.2b	1.4±0.1b
		D	1.40±0.06a	1.69±0.02b	1.70±0.1b
		E	4.14±0.07a	4.3±0.4a	4.3±0.2a
ABACAXI	tartrazina	A	1.57±0.02a	1.5±0.1a	1.4±0.1a
		B	2.3±0.3a	2.2±0.4a	2.23±0.09a
		C	3.3±0.5a	3.5±0.5a	3.2±0.1a
		D	2.9±0.3a	2.6±0.1a	2.7±0.3a
		E	0.8±0.2a	0.89±0.01a	0.7±0.2a
	amarelo crepúsculo	A	0.53±0.03a	0.59±0.02a	0.45±0.01a
		B	0.46±0.05a	0.40±0.05a	0.41±0.07a
		C	0.3±0.1a	0.10±0.05b	0.21±0.03c
		D	0.20±0.05a	0.19±0.05a	0.23±0.00a
		E	0.12±0.08a	0.11±0.07a	0.07±0.00a
LIMÃO	tartrazina	A	1.61±0.04a	1.63±0.01a	1.58±0.07a
		B	1.56±0.05a	1.61±0.02a	1.65±0.00a
		C	2.05±0.00a	1.6±0.1b	2.13±0.07a
		D	1.97±0.02a	1.7±0.1a	1.53±0.03b
	azul de indigotina	A	0.35±0.00a	0.41±0.02a	0.72±0.03b
		B	0.60±0.02a	0.55±0.03a	1.05±0.02b
		C	0.67±0.03a	0.5±0.2a	0.21±0.03b
		D	0.20±0.01a	0.23±0.02a	0.60±0.00b
CEREJA	amaranto	A	10.6±0.3a	10.4±0.7a	9.9±0.3a
		B	6.6±0.5a	6.8±0.2a	6.84±0.07a
		D	4.79±0.01a	5.1±0.2a	6.2±0.4b
		E	3.0±0.2a	1.7±0.3b	2.8±0.2a

*os resultados são médias e estimativa de desvio padrão de duas amostras analisadas em duplicata
letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa, nível de 5% de significância

TABELA 4: Comparação entre lotes dos teores de corantes artificiais (mg/100mL) em pó para gelatina*.

SABOR	CORANTE	MARCA	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3
PÊSSEGO	tartrazina	A E	0.43±0.09a 1.05±0.09a	0.39±0.04a 1.1±0.2a	0.38±0.06a 2.28±0.01b
	amarelo crepúsculo	A E	0.55±0.02a 0.8±0.4a	0.39±0.04b 0.07±0.00a	0.38±0.06b 0.12±0.00a
UVA	amaranto	A B C D	3.2±0.4a 3.10±0.02a 3.46±0.07a 2.49±0.07a	2.4±0.4b 2.19±0.07b 3.5±0.7a 3.4±0.2b	2.14±0.05b 3.79±0.01c 3.0±0.1b 2.4±0.2a
	azul de indigotina	A B C D	0.64±0.08a 0.49±0.03a 0.46±0.09a 0.22±0.04a	0.46±0.04b 0.54±0.07a 0.17±0.03b 0.27±0.02a	0.71±0.07a 0.72±0.02b 0.22±0.00b 0.21±0.02a
TUTTI-FRUTTI	tartrazina	A E	1.08±0.02a 2.93±0.01a	1.07±0.06a 3.17±0.09a	0.8±0.3b 3.2±0.3a
	amarelo crepúsculo	A E	2.13±0.05a 0.85±0.07a	2.20±0.04a 0.9±0.1a	1.9±0.7a 0.79±0.02a
	amaranto	A E	1.31±0.07a 4.2±0.3a	1.4±0.2a 4.9±0.3a	0.9±0.2b 4.7±0.7a
FRAMBOESA	tartrazina	E	0.9±0.2a	0.84±0.04a	0.41±0.02b
	amarelo crepúsculo	A D	1.03±0.01a 1.5±0.2a	1.4±0.4b 1.6±0.2a	1.46±0.02b 1.4±0.3a
	amaranto	A D E	3.0±0.2a 2.48±0.04a 3.19±0.03	3.15±0.08a 3.40±0.03b 3.19±0.03	2.85±0.01a 2.73±0.03c 3.3±0.2
TANGERINA	tartrazina	A D	0.50±0.02a 0.14±0.00a	0.47±0.06a 0.17±0.04a	0.42±0.07a 0.18±0.03a
	amarelo crepúsculo	A D	1.1±0.2a 0.5±0.3a	1.27±0.07b 0.43±0.01a	1.31±0.01b 0.4±0.1a

*os resultados são médias e estimativa de desvio padrão de duas amostras analisadas em duplicata
letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa, nível de 5% de significância

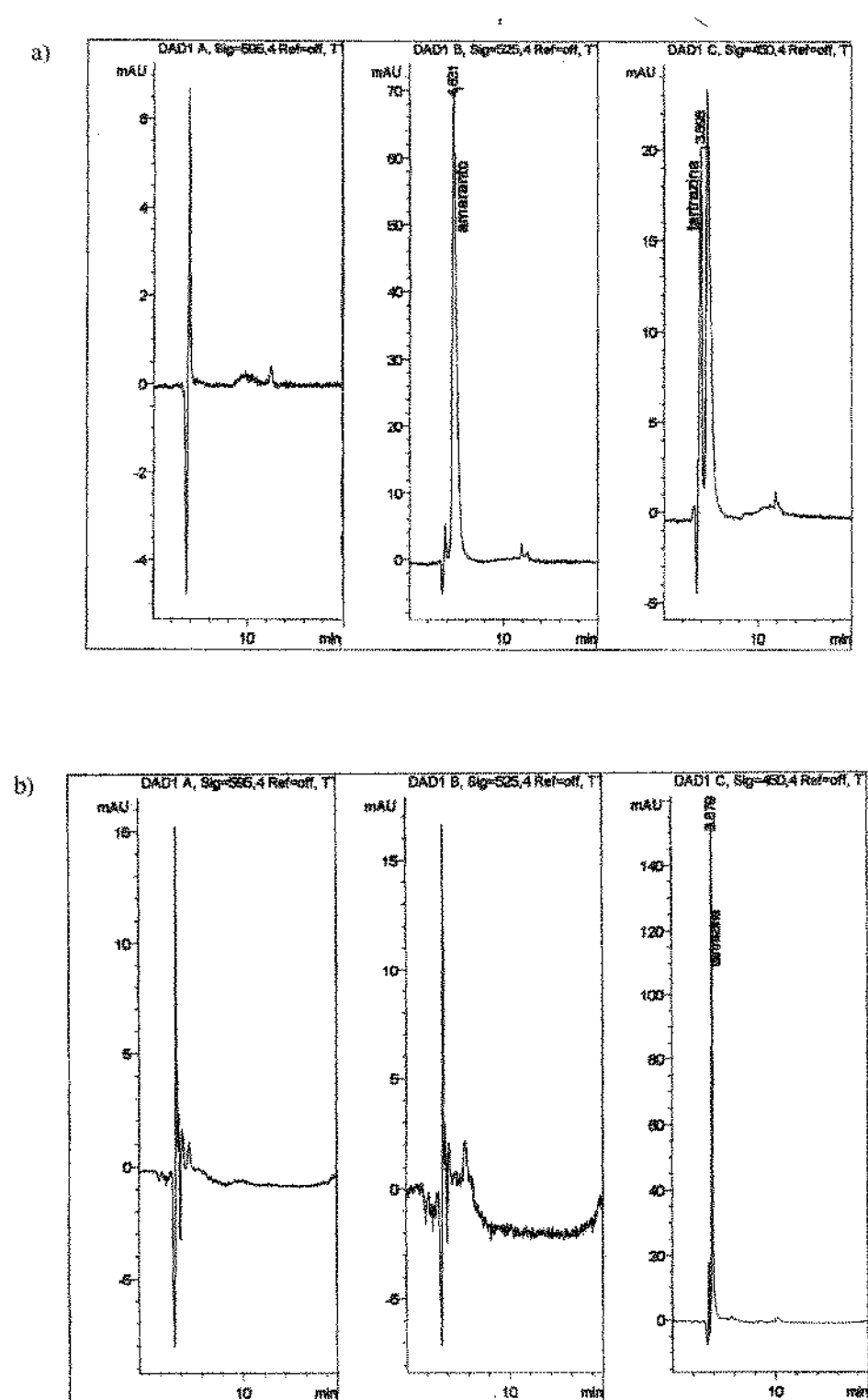


Figura 3 : Perfis cromatográficos nos três comprimentos de onda de leitura para : (a) gelatina comum cor/sabor framboesa; (b) gelatina *diet* cor/sabor abacaxi. Condições cromatográficas descritas no texto.

CONCLUSÕES

Na maioria das amostras de gelatina analisadas o limite estabelecido pela legislação brasileira (10mg/100mL ou 10mg/100g) foi ultrapassado. Somente em duas amostras de gelatina sabor cereja, fabricante A, foram encontrados níveis um pouco superiores. Também não foram encontrados misturas de mais de três corantes e corantes não permitidos.

O amarantho foi o corante quantitativamente mais encontrado e estando presente em um maior número de amostras. O ponceau 4R foi encontrado apenas nas amostras *diet*.

Comparando-se os teores de corantes entre as gelatinas comum e *diet*, observou-se uma tendência do uso em quantidades maiores em produtos *diet*.

A composição qualitativa e quantitativa encontrada nos diferentes lotes para cada fabricante mostrou o bom controle na utilização dos corantes sintéticos.

Em vista dos resultados obtidos, a metodologia aqui aplicada mostrou-se bastante satisfatória, demonstrando um bom potencial para a sua aplicação em outros tipos de produtos alimentícios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F. L. - "Política de vigilância sanitária em alimentos" I Simpósio sobre Aditivos para Alimentos - ITAL, Campinas, SP, setembro (1987).
- AMARAL, E. C. C. - "Aspectos atuais da legislação sobre aditivos alimentares em âmbito internacional" Anais do seminário Latino Americano sobre Toxicologia de Alimentos, Ed. UNICAMP, Campinas, SP, agosto, (1984).
- 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*, 105, 589-593, (1980).
- CHIANG, H. C.; LIN, S. L. - "Polyamide Kieselguhr Thin - Layer Chromatography of Yellow Food Dyes". *Journal of Chromatography*, 44 (1), 203-204, (1969).

- . CLYDESDALE, F.M. "Color as a factor in food choice", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, (1), 83-101, (1993).
- . CORRADI, C.; MICHELI, G. - "Metodo Rapido di Ricerca ed Identificazione dei Coloranti Acidi Artificiali Idrosolubili Nei Prodotti Alimentari". *Boletino dei Chimici dei Laboratori Provinciali*, 5, (1), 188-200, (1979).
- . DOLINSKY, M.; STEIN, C. - "Application of a Liquid Anion Exchange Resin to the Separation of FD and C Colours from Foods". *Journal of the AOAC.*, 45 (3), 767-769, (1962).
- . GILHOOLEY, R. A.; HOODLESS, R.A.; PITMAN, K. G.; THONSON, J. - "Separation and Identification of Food Colours, IV. Estraction of Synthetic Water - Soluble Food Colours". *Journal of Chromatography*, 72, 325-331, (1972).
- . 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).
- . GREENWAY, G. M. ; KOMETA, N. ; MACRAE, R. - "The determination of food colours by HPLC with on-line dialysis for sample preparation", *Analytical Methods Section*, 43, 137-140, (1992).
- . LANCASTER, F. E. ; LAWRENCE, J. F. - "Ion-Pair HPLC Separation and Detection of Subsidiary Dyes in Synthetic Food Colors", *Journal of the AOAC*, 65, (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 AOAC*, 66, (6), 1424-1428 (1983).
- . LAWRENCE, J. F.; LANCASTER, F. E.; CONACHER, H. B.S. - "Separation and detection of synthetic food colours by ion-pair HPLC". *Journal of Chromatography*, 210, 168-172(1981).
- . 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 AOAC.*, 53 (6), 1182-1189(1970).

- . McKONE, H. T. ; IVIE, K. - "An Introduction to HPLC: Separation of Some FD&C Dyes", *Journal of Chemical Education*, 57, (4), 321-322 (1980).
- . PEARSON, D. - "General Methods for Additives and Contaminants". In: "*The Chemical Analyses of Food*". 7th ed. Churchill Livingstone - Edimburgh, London, N. Y (1976).
- . PRADO , M. A.; GODOY, H. T. - "Metodologia para determinação de corantes artificiais em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência" Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos, FEA, UNICAMP, Campinas, (ver capítulo 2), (1998).
- . PUTTERMANS, M. L.; DRYON, L.; MASSART, D. L. - "Ion-Pair HPLC of Synthetic Water-Soluble Acid Dyes". *Journal of the AOAC*, 64, 1-8 (1981).
- . SATO, G.S. ; CHABARIBERY, D. ; MAIA, M.L. ; CARVALHO, F.C. ; NETO, A.N. ; MARQUES, S.A. "Tendências de mercado para corantes na indústria de alimentos", *Agricultura em São Paulo, SP*, 39, (supl. 1), 1-50(1992).
- . WHITE, P. C. ; HARBIN A. - "HPLC of Acidic Dyes on a Dynamically Modified Polystyrene - Divinylbenzene Packing Material With Multi-wavelength Detection and Absorbance Ration Characteristion", *Analyst*, 114, 877-882 (1989).
- . YANUKA, Y.; SHALON, Y.; WEISSENBERG, E.; NIR-GROSFELD, I. - "The Isolation and Separation of Dyes from Foodstuffs by Column Chromatography". *Analyst*, 88, 872-876(1963).

TEORES DE CORANTES ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

RESUMO

A cor está associada com muitos aspectos da nossa vida e influência muitas de nossas decisões no dia-a-dia, incluindo aquelas que envolvem alimentos. A aparência, segurança, características sensoriais e aceitabilidade do alimento são todas afetadas pela cor. Corantes alimentares, tanto os de origem sintética como os naturais, são muito utilizados em alimentos processados e bebidas. Eles servem para suplementar ou atribuir uma cor que é destruída durante o processamento e estocagem, e aumentar significamente a aparência e aceitabilidade de alimentos originalmente sem cor, como é o caso das bebidas carbonatadas balas e confeitos em geral. Com a finalidade de ganhar cada vez mais um mercado competitivo, as indústrias de alimentos lançam mão de novos produtos a cada dia. É o caso de cereais matinais com sabores de frutas e coloridos artificialmente, com a finalidade de estimular ainda mais o consumo destes, principalmente, pelo público infantil. A Legislação Brasileira permite a utilização de no máximo uma mistura de três corantes artificiais e uma quantidade de até 10mg/100g ou 10mg/100mL no produto final a ser consumido. Fica claro que, além da identificação, é necessário a quantificação desses aditivo nos alimentos. Neste trabalho utilizou-se uma nova metodologia desenvolvida por PRADO e GODOY (1998), empregando a CLAE. A utilização de coluna ODS-2 e fase móvel tamponada para condicionamento da coluna e H₂O/MeOH para a corrida, aliada a utilização de detector de arranjo de diodos (DAD) com leitura simultânea em três diferentes comprimentos de onda, possibilita a eluição dos corantes em 20 minutos, sendo necessários 12.5 min. para o condicionamento da coluna. O método foi aplicado em diferentes tipos de alimentos, como cereais matinais coloridos, refrigerantes, bebidas isotônicas, preparados sólidos para refresco, sucos concentrados artificiais, sucos naturais, confeitos de chocolate, gomas de mascar e balas. Em cereais matinais coloridos artificialmente em apenas duas cores/sabores não ultrapassaram o

limite permitido. Nas porções recomendadas para consumo pelos fabricantes em todas as amostras analisadas, os limites ultrapassaram os permitidos pela legislação brasileira. Das cinco variedades de bebidas não alcoólicas, apenas os preparados sólidos para refresco apresentaram problemas, em duas das quatro marcas analisadas, onde o limite máximo estabelecido foi ultrapassado. Os resultados dos teores de corantes nos três tipos de confeitos indicam que esse tipo de produto necessita de uma melhor fiscalização por parte do governo, uma vez que ele é destinado principalmente, para o público infantil. Em várias marcas analisadas os limites máximos estabelecido por lei foram ultrapassados, tanto quantitativamente quanto nas mistura de mais de três corantes.

SUMMARY

The colour is associated with many aspects of our lives and influences our daily decisions ,including those which involves food. The appearence, security, sensorial characteristics and acceptance of the food are affected by the colour. Food colouring, as well as the ones of sintetic origin as the natural, are very much used in food and beverage processing. They are used to add or to attribute a colour that is destroyed during the processing or stockage, and to increase significantly the appearance and acceptance of food originally without colour, as in the case of carbonated drinks, candies and sweet in general. With the purpose of getting even more the competitive market, the food industry register new products every day. It is the case of morning cereal with flavour of fruit and artificially coloured, with the purpose of stimulating even more its consume , specially, by the youth. The brazilin legislation allows the use of maximum the mixture of three artificial colouring and amount of to 10mg/100ml to the final product to be consumed. It is clear that, besides the identification, it is necessary the quantity of these additives in the food. In this work it was used a new methodology developed by PRADO and GODOY (1998), using HPLC. The use of the column ODS-2 and mobile fase tamponed to the conditioning of the column H₂O/MeOH to the race, associated to the usage of a diode array dectetor (DAD) with the simultaneous reading in three different lengh of wave, allows the eluition of the colouring in twenty minutes, being necessary 12.5 min. to the conditioning of the column. the method was applied in different types of food, such as coloured morning

cereals, soft drinks, isotonic drinks, solid preparation to refreshments, concentrated, artificial juice, natural juice, chocolate candies chewing gums and toffee. In artificially coloured morning cereals with only two colours don't surpass the allowed limit. In the recommended portions for consume by the manufacturers in all the samples analysed, the limit surpass the ones allowed by the Brazilian of the five varieties of non alcoholic drinks, only the solid preparation for refreshments showed problems, in two of four analysed brands, where the maximum established limit was surpassed. The results of the colouring wording in the three types of candies indicated that this kind of product needs a better fiscalization on the part of the government, as it is mainly indicated for children. In several analysed brands the maximum limits established by law were surpassed, as in the quantity as in the mixture of more than three colours.

INTRODUÇÃO

Enquanto a maioria das empresas do setor de alimentação sofre com a crise econômica, as indústrias de balas, bombons, drops e gomas de mascar nem chegaram a sentir os efeitos da crise. Ao contrário, fabricar e vender guloseimas tem engordado, ano após ano, o faturamento de mais de 100 empresas do ramo.

Com produtos baratos, como as balas avulsas que podem custar apenas alguns centavos, os fabricantes de guloseimas colocam em prática o velho ditado popular, reunindo milhões de tostão em tostão. Também no varejo, trata-se de uma linha lucrativa e indispensável para os mais de 400 mil revendedores espalhados por todo o país. O consumo de guloseimas, praticamente, não pesa no bolso, e uma bala muitas vezes substitui a moeda do troco. A característica *preço*, aliada à farta rede de vendas, garante o sucesso do setor. Uma vez que o setor é extremamente competitivo, oferecendo 220 marcas diferentes para uma linha, que não ultrapassa a 40 tipos de produtos, as empresas lançam mão de diversos artifícios para conquistar o mercado, desde altos investimentos em propaganda, até tornar as guloseimas as mais atrativas possível, o que justifica a grande utilização de corantes artificiais para tal finalidade (GUIA OESP, 1991). O mesmo vem ocorrendo com outros produtos, como as bebidas não alcoólicas e cereais matinais coloridos. Infelizmente, o consumidor por si só não é capaz de controlar a própria

exposição aos corantes, e conseqüentemente não pode avaliar se o benefício recebido justifica o risco a que está exposto (YANUKA et al,1963).

A regulamentação dos corantes e a necessidade de controle de qualidade do governo sobre as empresas tem forçado o desenvolvimento de novas técnicas analíticas capazes de responder não só a demanda do número de análises, mas de forma rápida e, principalmente, confiável. Com essa finalidade é que atualmente vários métodos envolvendo a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) estão sendo usados para determinar qualitativamente e quantitativamente esse tipo de aditivo (LANCASTER e LAWRENCE, 1991; LAWRENCE e LANCASTER, 1981; BOLEY et al., 1980; McKONE e IVIE, 1980; McKONE e NELSON, 1980).

O presente trabalho teve como objetivo a determinação simultânea dos corantes permitidos no Brasil em vários tipos de alimentos, através de uma metodologia utilizando a CLAE (PRADO e GODOY, 1998). A escolha de doces, bebidas não alcoólicas e cereais matinais coloridos para as análises deve-se, principalmente, ao fato de serem produtos amplamente consumidos, especialmente pela população infantil, e por apresentarem corantes artificiais em sua composição.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Foram analisados alguns tipos de guloseimas de vários sabores, sendo: balas duras e mastigáveis; gomas de mascar e doces de chocolate coloridos artificialmente. Amostras de quatro variedades de bebidas não alcoólicas de vários sabores, também foram tomadas : refrigerantes, preparado sólido para refresco, bebidas isotônicas, suco concentrado artificial e suco natural de frutas (acerola, cupuaçu, taperebá). E mais três marcas diferentes de cereais matinais, que contêm em seu interior vários sabores. Para todas as amostras foram analisados 2 lotes diferentes, identificados pela data de fabricação. As amostras foram preparadas separando - se por cores/sabores. As análises foram sempre realizadas em duplicata. Antes da tomada da amostra analítica, os

alimentos foram homogeneizando em multiprocessador de alimentos. Todos os produtos foram comprados em supermercados da região de Campinas, SP.

REAGENTES

Os padrões de corantes artificiais foram adquiridos da ICI do Brasil S.A.. O metanol utilizado com grau cromatográfico (*ominsolv*) e o acetato de amônio foram adquiridos da MERCK Brasil. A água utilizada no preparo das fases móveis e das amostras foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram sempre filtradas em filtros FLOUPORE (MILLIPORE HAWP 0013) de 0,5 μm de diâmetro de poro, e degaseificados em banho ultra-sônico.

EQUIPAMENTO

Para análise foi utilizado cromatógrafo a líquido HP série 1050, com sistema de bombeamento isocrático; válvula injetora tipo “Rheodyne”, com alça de amostragem de 20 μL e detector de arranjo de diodos (DAD) HP série 1050, acoplado a um software HP Chemstation, que apresenta o recurso de visualização de até cinco comprimentos de ondas diferentes numa mesma corrida. Foram utilizados os comprimentos de onda de 595 nm para os azuis, 525 nm para os vermelhos e 450 nm para os amarelos.

Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna Spherisorb ODS-2 de 150 mm x 4,6 mm d. i., C_{18} de 5 μm , protegida por uma coluna de guarda Micropore 30mm x 4,6 mm d.i. C_{18} , de 10 μm .

MÉTODOS

MÉTODOS ANALÍTICOS

Pesou - se entre 4 a 9 g de balas, gomas e confeitos de chocolate coloridos (em geral eram tomadas algumas unidades de cada amostra), para a extração dos corantes. As amostras foram simplesmente dissolvidas em água quente (40 a 50° C), e o volume ajustado para 50 mL. Em especial, os confeitos de chocolate e gomas foram lavados várias vezes com água, para garantir completa extração.

Para os cereais matinais coloridos pesou-se entre 3 a 5 g de amostra, previamente homogeneizada. As análises foram realizadas separando-se as amostras por cores/sabores e na porção recomendada para consumo pelo fabricante (30 g). Solução amoniacal 10 % em etanol mostrou-se mais eficiente que a água para a extração dos corantes em cereais matinais coloridos. Lavagens sucessivas foram realizadas até completa retirada dos corantes. As alíquotas retiradas eram unidas e concentradas em roto evaporador (70° C) até um volume final de 50 mL. As amostras tiveram seus volumes ajustados com água, obtida do sistema de filtração Milli Q. O volume final das amostras de porção recomendada, tiveram seus volumes finais ajustados para 250 mL, por se tratar de uma quantidade inicial 10 vezes maior que a normalmente utilizada.

Pesou-se entre 4 a 5 g de amostra dos preparados sólidos para refresco, previamente homogeneizadas. Devido à simplicidade da matriz, não foi necessário nenhuma preparação da amostra para a análise. As amostras foram simplesmente dissolvidas em água e o volume ajustado para 50 mL. Para as amostras de suco concentrado artificial, foram tomadas alíquotas de 2,0 mL e dissolvidas em água. As dissoluções seguiram a recomendação do fabricante (1:130).

Os refrigerantes, as bebidas isotônicas e os sucos naturais de frutas, receberam apenas um tratamento de degaseificação em sistema de ultra-som.

Em todas as amostras, após o ajuste de volume, era coletada uma fração, e centrifugada a uma rotação de 15.000 rpm por 10 min..

Após a centrifugação o sobrenadante (cerca de 10 mL) era filtrado em membrana tipo HAWP de 0,5 μm (MILLIPORE), com poros de 0,5 μm , e injetado no cromatógrafo.

Todas as amostras foram analisadas em duplicata, exceto a porção recomendada de cereais matinais coloridos que foi realizada em quadriplicata, coletando-se a amostragem aleatoriamente do pacote.

CROMATOGRAFIA

Para análise em CLAE foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (HELWETT PACKARD) série 1050, com sistema de bombeamento isocrático e válvula injetora tipo *Rheodyne* e uma alça de amostragem de 20 μL de capacidade. Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna cromatográfica *Spherisorb* ODS-2, com partículas de 5 μm , com dimensões de 150 x 4,6 mm d.i. (SIGMA-ALDRICH, USA) protegida por uma coluna de guarda *Micropore*, C_{18} , 10 μm , 30x 4,6 mm d.i. (VARIAN). Um detector de arranjo de diodos (DAD) da HP série 1050, acoplado a um *software HP Chemstation*, permitiu registrar o cromatograma em três diferentes comprimentos de ondas, durante uma mesma corrida, o que possibilitou a análise de todos os corantes de forma simultânea.

Os corantes foram separados através de um sistema de eluição isocrático. A coluna era condicionada pela passagem de uma solução de água/metanol 70:30 + 0.08 M de acetato de amônio por 12.5 minutos, e após esse período era acionada a corrida com mudança de fase móvel para água/metanol 70:30. Em ambos os casos a vazão era de 0,5 mL/min. O tempo de corrida para a separação dos corantes era de 20 minutos (PRADO e GODOY, 1998).

O fluxograma da metodologia desenvolvida está apresentado na **Figura 1**.

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO

Os picos foram detectados através do detector de arranjo de diodo (DAD). Os corantes foram divididos em três grupos : os azuis foram detectados a 595 nm, os vermelhos a 525 nm e os amarelos a 450 nm.

Os corantes foram identificados pelos tempos de retenção em comparação com os tempos de retenção dos padrões analisados nas mesmas condições e pelos espectros de absorção obtidos pelo DAD (**Anexo 5**). A adição de padrões nas amostras também foi usada como parâmetro de identificação (co-cromatografia). A quantificação foi realizada por padronização externa. Foram construídas curvas de padronização para cada corante artificial, com 5 níveis de concentração, sendo cada ponto média de duas injeções (**Anexos 1 a 4**).

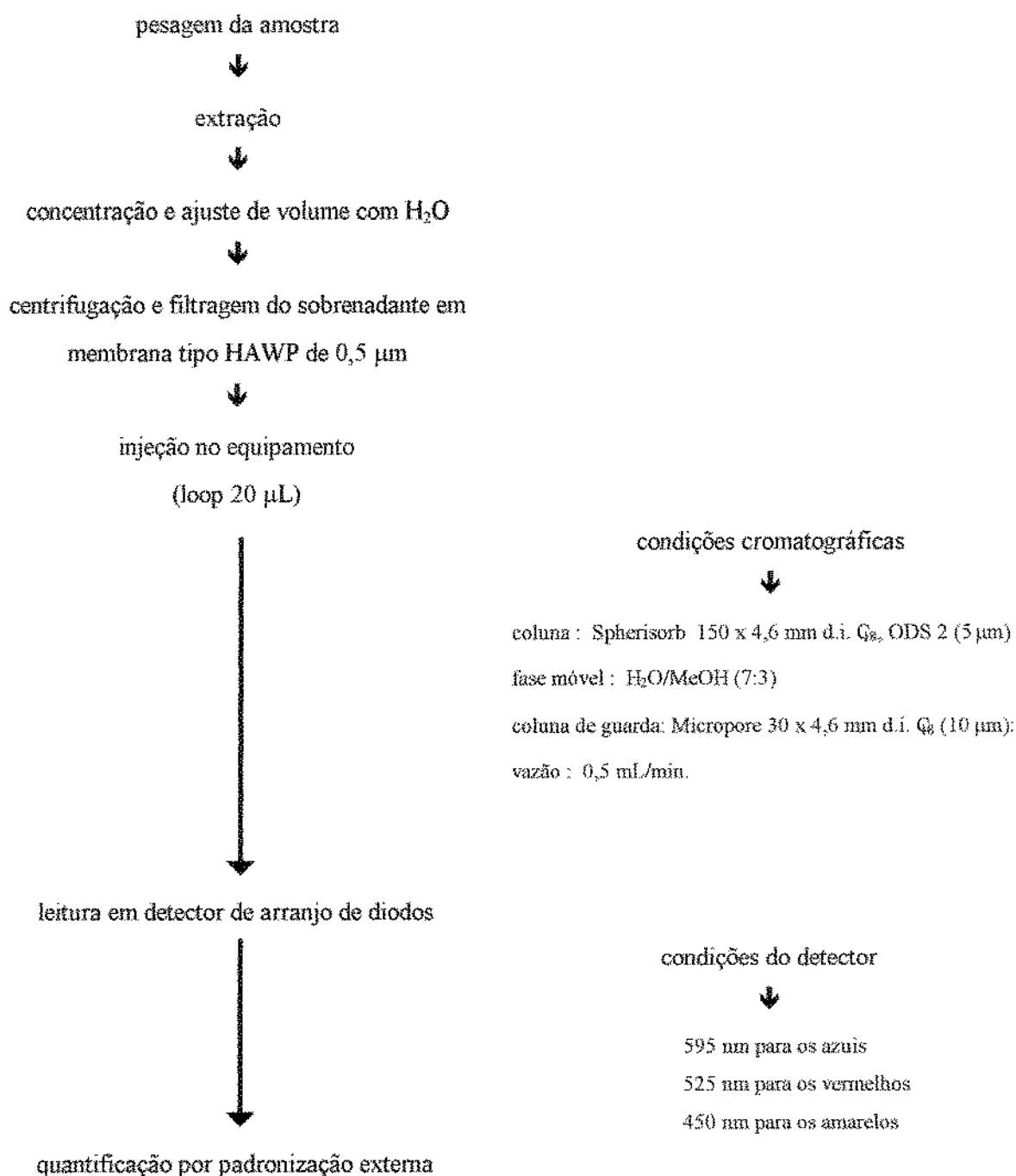


FIGURA 1 : Fluxograma da metodologia utilizada na determinação de corantes artificiais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As composições qualitativas e quantitativas dos corantes artificiais presentes nas amostras são apresentadas nas **Tabelas 1 a 9**.

Os valores obtidos de corantes artificiais nos confeitos de chocolate (**Tabela 1**), em apenas duas amostras, cor/sabor vermelho marcas A e D, foram encontrados limites superiores aos permitidos pela legislação brasileira, e em duas amostras cor/sabor marrom das Marcas B e D, foi encontrado mistura de 4 corantes, excedendo assim o permitido. Embora a marca D seja um produto importado, para sua comercialização no país, deve seguir as normas vigentes.

Nas gomas de mascar (**Tabela 2**) apenas a marca C não apresentou irregularidades. Todos os sabores das marcas E, F e G apresentaram índices bem superiores aos permitidos (2 a 5 vezes mais). Tais dados só vem a confirmar o observado quando comparados visualmente a coloração de produtos similares nacionais e importados, principalmente da Argentina e Estados Unidos. Em geral os produtos importados (marcas E e G) apresentam uma coloração mais intensa. Esta, talvez, fosse a justificativa de quatro corantes em todas da marca G. No entanto, as gomas da marca F são produto nacional. Um outro produto nacional, cor/sabor limão marca A, apresentou um teor 15 vezes maior que o permitido. Ainda em relação às gomas de mascar, em duas amostras da marca D a extração não foi completa, mesmo após várias tentativas com outros solventes e combinações de solventes para a extração, talvez pelo tipo de goma utilizada que mantém o corante retido em sua estrutura, no entanto, consideramos que o mesmo ocorre durante o consumo.

TABELA 1 : Teores de Corantes Artificiais (mg/100mL) em confeitos de chocolate coloridos*

MARCA	COR/ SABOR	CORANTES						(mg/100g)			TOTAL
		tartrazina	amarelo crepúsculo	amaranto	ponceau 4R	vermelho 40	eritrosina	azul indigotina	azul brilhante		
A	azul								0.87±0.00		0.87
	amarelo	1.84±0.02									1.84
	vermelho			7.0±0.3	4.03±0.08	2.24±0.03					13.27
	verde	2.95±0.04							0.75±0.00		3.70
	rosa						1.64±0.01				1.64
	laranja		5.2±0.1		traços						5.24
B	marrom		5.5±0.2			1.57±0.01		0.58±0.00			7.64
	azul							0.64±0.00			0.64
	laranja		6.1±0.2								6.11
	vermelho			5.9±0.2	3.37±0.06						9.23
	amarelo	4.5±0.1									4.52
	marrom		7.5±0.3	1.26±0.01	0.72±0.00			0.77±0.00			10.21
C	azul								1.29±0.01		1.29
	amarelo	2.80±0.04	traços								2.80
	verde	1.68±0.01							0.54±0.00		2.22
	rosa						traços				
	vermelho			1.25±0.05	1.80±0.02						3.05
	laranja		4.6±0.1								4.59
D	roxo		traços	1.25±0.01				0.30±0.00			1.55
	marrom	2.25±0.03			0.87±0.00			0.30±0.00			3.42
	verde	3.54±0.06							1.10±0.00		4.64
	azul							1.82±0.01	2.81±0.03		4.63
	marrom	3.65±0.07	2.15±0.02			2.02±0.02		1.82±0.02			9.64
	amarelo	7.2±0.3									7.19
E	vermelho	2.84±0.04	12.3±0.8			0.57±0.00					15.67
	rosa					traços	traços	traços			
	verde	6.1±0.2							traços		6.07
	amarelo	6.0±0.2	traços								5.97
	laranja	1.58±0.01	2.96±0.05								4.54
	marrom	2.48±0.03				1.64±0.01			traços		4.12
	azul							0.45±0.00		0.45	

*média e estimativas do desvio padrão das amostras analisadas em duplicata

espaços em branco indicam corantes não encontrados

TABELA 2 : Teores de Corantes Artificiais (mg/100mL) em gomas de mascar*

MARCA	COR/ SABOR	CORANTES						TOTAL
		tartrazina	amarelo crepúsculo	amarelo	vermelho 40	eritrosina	azul indigotina	azul brilhante
A	laranja		27±1		0.22±0.01			27.32
	limão	155±7						154.77
	maçã	0.26±0.01			13±1			12.99
	melancia	4.9±0.3			0.41±0.02			5.34
B	verde	6.5±0.3			0.17±0.01		2.04±0.06	8.70
	laranja		12.8±0.6					12.82
	amarelo	7.6±0.4						7.56
	vermelho				24±1			23.45
	rosa				7.3±0.4			7.26
C	tutti frutti				0.97±0.05	2.6±0.1		3.57
	hortelã	3.6±0.2			0.38±0.02		1.04±0.05	5.05
	uva			2.00±0.1	0.53±0.03		0.74±0.04	3.27
	morango				2.4±0.1			2.41
	uva				2.5±0.1		0.37±0.02	2.83
D	cereja				50±3			50.25
	tutti frutti				0.45±0.02	1.95±0.09		2.40
	canela		34±2		39±2			72.95
E	pink	7.5±0.4	3.7±0.2		33±2			44.07
	verde	36±2			0.41±0.02		14.2±0.7	50.12
F	amarelo	21±1						21.37
	laranja	55±3				13.9±0.7		69.01
	rosa	1.19±0.06			0.48±0.02	26±1		27.78
	roxo			29±1	1.28±0.06	3.1±0.2		32.80
	bordo				36±2			36.16
G	azul/amarelo	10±2	1.09±0.00		0.52±0.06			25.59
	laranja/amarelo	10.1±0.9	8.9±0.4		3.44±0.01		0.43±0.03	22.84
	vermelho/laranja	6.96±0.01	9.43±0.00		31.6±0.2		0.49±0.00	48.49

*média e estimativas do desvio padrão das amostras analisadas em duplicata
espaços em branco indicam corantes não encontrados

TABELA 3 : Teores de corantes artificiais (mg/100mL) em balas duras*

MARCA	COR/ SABOR	CORANTES (mg/100g)						TOTAL
		tartrazina	amarelo crepúsculo	amaranto	vermelho 40	azul indigotina	azul brilhante	
A	azul						0.84±0.00	0.84
	rosa				5.9±0.2			5.87
	amarelo	12.0±0.7						12.01
	laranja	0.37±0.00	11.2±0.6					11.53
	roxo				1.74±0.02		0.78±0.00	2.52
B	vermelho/branco				2.59±0.03			2.59
	verde/amarelo	10.2±0.5			0.41±0.00		0.94±0.01	11.55
	vermelho/laranja	0.68±0.00	5.9±0.2		3.88±0.08			10.45
C	morango		2.55±0.03		4.4±0.9		0.41±0.00	7.33
D	laranja		14±1		0.49±0.00			16.62
	verde	15±1					0.90±0.01	15.80
	branco	traços						
	vermelho				8.6±0.4			8.62
	amarelo	5.6±0.2			0.23±0.00			5.82
E	verde/amarelo	5.7±0.2					0.74±0.00	6.43
	vermelho/branco				4.8±0.1			4.79
	vermelho/laranja		8.7±0.4		6.9±0.2			15.56
F	verde/amarelo	6.7±0.2			0.60±0.00			7.25
	laranja/amarelo	4.9±0.1	12.4±0.8					17.27
	rosa/amarelo	4.6±0.1			3.67±0.07			8.31
G	azul/rosa	traços			1.89±0.02		2.30±0.03	4.19
	rosa/amarelo	8.8±0.4			7.1±0.3			15.92
	laranja/verde	1.20±0.01	7.3±0.3		0.35±0.00		0.45±0.03	9.27
	verde/amarelo	6.9±0.2					0.43±0.00	7.39
H	laranja	9.00±0.4	16±1		0.17±0.00			25.17
	amarelo	16±1			0.18±0.00			15.87
	verde	3.17±0.05					0.52±0.00	3.69
	vermelho				11.0±0.6			11.03
I	cereja			4.8±0.1	0.34±0.00			5.16
	menta	1.09±0.01					0.99±0.00	2.08
J	cereja			3.33±0.06				3.33
	limão	28±4						28.26
K	vermelho			9.0±0.4				9.01
	laranja		11.5±0.7	traços				11.51
	amarelo	3.57±0.06						3.57
	verde	5.5±0.2					traços	5.54
L	verde	3.22±0.05				0.57±0.00		3.79
	vermelho	1.18±0.01		2.08±0.02				3.26
	amarelo	8.3±0.4						8.33

*média e estimativas do desvio padrão das amostras analisadas em duplicata
espaços em branco indicam corantes não encontrados

TABELA 4 : Teores de Corantes Artificiais (mg/100mL) em balas mastigáveis*

MARCA	COR/ SABOR	CORANTES					(mg/100g)			TOTAL
		tartrazina	amarelo crepúsculo	amaranto	ponceau 4R	eritrosina	azul indigotina	azul brilhante		
A	morango			0.67±0.00					0.67	
	laranja		1.64±0.01						1.64	
	hortelã									
B	morango			2.79±0.04					2.79	
	tutti frutti			2.08±0.02					2.08	
	abacaxi	12.8±0.8		traços					12.84	
C	vermelho				14±1				13.86	
	laranja	9.1±0.4		traços		1.96±0.02			11.05	
	rosa	0.29±0.00				1.65±0.01			1.94	
	amarelo	13.2±0.9		traços					13.22	
	azul	traços						1.14±0.01	1.14	
	verde	8.1±0.3						0.90±0.01	9.04	
	roxo					traços		0.35±0.00	0.35	
	branco									
D	vermelho		2.39±0.03	2.10±0.02					4.49	
	laranja		7.4±0.3						7.38	
	rosa									
	azul						0.24±0.00		0.24	
	verde	0.68±0.00						traços	0.68	
	amarelo	1.26±0.01							1.26	
	branco									

*média e estimativas do desvio padrão das amostras analisadas em duplicata
espaços em branco indicam corantes não encontrados

TABELA 5: Teores dos corantes artificiais encontrados em cereais matinais *

MARCA	COR/ SABOR	tartrazina	amarelo crepusculo	ponceau 4R	CORANTES (mg/100g)			azul indigotina	azul brilhante	TOTAL
A	verde		0,37 ± 0,07		0,23 ± 0,05			2,59 ± 0,9	3,2	
	laranja		46 ± 1		1,6± 0,5				47,7	
	vermelha		5,2 ± 0,4		8,8 ± 0,5				14,0	
	amarela		2,7 ± 0,8		0,55 ± 0,03				3,25	
	roxa				14,4 ± 0,1			2,49 ± 0,06	16,89	
	porção **		12 ± 2		3,8 ± 0,6	0,09 ± 0,09		0,57 ± 0,09	15,96	
B	verde	31 ± 2	traços		traços			0,93 ± 0,2	31,97	
	laranja	1,1 ± 0,2	136 ± 15		136 ± 15				139,5	
	vermelha	0,6 ± 0,2	2,5 ± 0,3		2,5 ± 0,3			0,43 ± 0,06	55,89	
	amarela	78 ± 1	2,29 ± 0,05		2,29 ± 0,05	0,2 ± 0,2			80,57	
	roxa	1,1 ± 0,2						9,8 ± 0,2	37,4	
	porção **	26 ± 3	29, ± 8		29, ± 8			1,4 ± 0,2	74,9	
C	verde	45 ± 2	3,79 ± 0,1	0,95±0,00			6,8±0,4		56,40	
	laranja	1,2 ± 0,4	123 ± 4						124,34	
	vermelho		7,6±0,2	30±1					37,46	
	amarelo	69,6±0,3	4,4±0,2						74,06	
	porção**	23±2	33±7	5,8±0,6			0,5±0,1		62,17	

* média e estimativa dos desvios padrões de dois lotes em duplicata
** porção recomendada pelo fabricante (30 g), analisadas em, quadruplicada
espaços em branco indicam corantes não encontrados

TABELA 6 : Teores de corantes artificiais (mg/100mL) em refrigerante*

MARCA	COR/ SABOR	CORANTES (mg/100mL)					TOTAL
		tartrazina	amarelo crepúsculo	amaranto	azul indigotina	azul brilhante	
A	laranja		0.60±0.03	0.01±0.00			0.61
	uva	0.03±0.00		0.27±0.01		0.03±0.00	0.33
B	laranja		0.38±0.01				0.38
C	laranja	0.46±0.03	2.83±0.2	0.05±0.01			3.34
	uva	0.75±0.02		3.56±0.5	0.46±0.01		4.77
D	laranja		2.9±0.3				2.88

*média e estimativas do desvio padrão das amostras analisadas em duplicata
espaços em branco indicam corantes não encontrados

TABELA 7 : Teores de corantes artificiais (mg/100mL) em suco concentrado artificial diluído segundo recomendação do fabricante*

MARCA	SABOR/ COR	CORANTES (mg/100mL)				TOTAL
		tartrazina	amaranto	amarelo crep.	Azul brilhante	
A	LARANJA	0.27 ± 0.03		0.38 ± 0.06		0.65
	UVA		1.67 ± 0.08	1.13 ± 0.02	0.27 ± 0.00	3.07
	TANGERINA		0.09 ± 0.01	0.74 ± 0.01		0.83

*média e estimativas do desvio padrão das amostras analisadas em duplicata
espaços em branco indicam corantes não encontrados

TABELA 8 : Teores de corantes artificiais (mg/100mL) em preparados sólidos para refresco em pó*

MARCA	COR/ SABOR	CORANTES (mg/100mL)				TOTAL
		tartrazina	amarelo crepúsculo	amaranto	azul indigotina	
A	laranja	11±2	4.8±0.6			16.2
	morango		16±3	2.5±0.6		18.3
	uva	11 ±1	0.1±0.1	34±6	9±1	55.2
B	laranja	3.9±0.7	1.7±0.2			5.6
	morango		2.3±0.5	3±2		5.2
	maracujá	3.3±0.4	0.8±0.2			4.1
	abacaxi	2±1	0.2±0.1			2.6
	uva	3±1		3.4±0.2	0.17±0.04	6.97
C	laranja	11±1	3.1±0.3			14.7
	limão	2.7±0.4				2.7
	morango		7±3	5 ±1		12.0
	maracujá	15±1	6.4±0.5			21.4
	abacaxi	2.3±0.4	0.18±0.07			2.48
D	laranja	3.9±0.9	1.6±0.2			5.5
	maracujá	3±1	0.78±0.08			4.08
	abacaxi	2±1	0.21±0.02			2.01

*média e estimativas do desvio padrão das amostras analisadas em duplicata
espaços em branco indicam corantes não encontrados

TABELA 9 : Teores de corantes artificiais (mg/100mL) em bebidas isotônicas*

MARCA	COR/ SABOR	CORANTES (mg/100mL)				TOTAL
		amarelo crepúsculo	amaranto	vermelho 40	azul brilhante	
A	uva	0.01±0.00	0.23±0.01		0.08±0.00	0.32
	tangerina	0.22±0.01	0.01±0.00		0.01±0.00	0.24
	maracujá					
B	melancia			0.44±0.02		0.44
	tangerina	0.38±0.02		0.01±0.00		0.39
C	uva					
	tangerina					
D	acerola					
	laranja					
E	pêssego					
	tangerina	0.33±0.02				0.33
	uva	0.02±0.00		0.14±0.01	0.05±0.00	0.21

*média e estimativas do desvio padrão das amostras analisadas em duplicata
espaços em branco indicam corantes não encontrados

As balas foram divididas em duas categorias, duras e mastigáveis. Nas amostras de balas duras apenas uma marca (E) não apresentou índices acima do permitido, as demais marcas todas apresentaram pelo menos um sabor/cor acima da legislação (**Tabela 3**). Somente uma amostra da marca G apresentou mistura de 4 corantes. O mesmo não foi observado com as balas mastigáveis, apenas 20 % das balas, analisadas continham concentração de corantes acima do limite (**Tabela 4**).

O corante amarantho foi o único não encontrado nas amostras de cereais matinais coloridos (**Tabela 5**). As três marcas analisadas estão fora do permitido, sendo que na porção média recomendada pelos fabricantes o teor de corantes chegou a sete vezes mais do que é permitido. A amostra C, além de apresentar altas concentrações de corantes artificiais, declarava na sua embalagem apenas a presença de corante natural, no entanto, nenhum corante natural estava presente.

Os valores obtidos de corantes artificiais para amostras de refrigerante e suco concentrado artificial, **Tabela 6 e 7**, respectivamente, estavam dentro das normas previstas pela legislação brasileira. Nos preparados sólidos para refresco (**Tabela 8**) os índices foram superiores aos permitidos, sendo que na marca A todos os sabores analisados estavam acima, em especial o sabor uva que apresentou 5 vezes mais corante que o permitido.

Nas amostras de bebidas isotônicas (**Tabela 9**), nenhuma apresentou problemas de excesso de corantes em suas composições. As amostras C e D indicavam o uso somente de corantes naturais em sua composição e realmente, não continham corantes artificiais. Observou-se que, durante a filtração dessas amostras os filtros de 0,5µm de diâmetro de poro, apresentaram-se intensamente coloridos, possivelmente por reterem os corantes naturais. O mesmo aconteceu com os sucos naturais de frutas. Em nenhuma das amostras analisadas de bebidas, que declaravam a presença de corante natural, observou-se a presença de corante sintéticos. Um fato interessante é que a amostra E (bebida isotônica), indicava em um de seus sabores (pêssego) o uso de corante artificial, no entanto, após a filtração, os filtros se apresentaram coloridos e o filtrado límpido, indicando talvez a presença de corante natural.

Nenhum corante não permitido pela legislação brasileira foi encontrado nas amostras analisadas. Entretanto o azul brilhante, que no Brasil só é permitido para emprego em refrigerantes, foi encontrado em várias amostras de balas, cereais matinais coloridos, gomas de mascar e confeitos de chocolate coloridos. No geral, a tartrazina e o amarelo crepúsculo foram os corantes, quantitativamente, mais utilizados pelas indústrias nas amostras aqui analisadas (**Anexos 6 a 10**).

Os cromatogramas referentes às amostras estão mostrados nas **Figuras 2 a 6**.

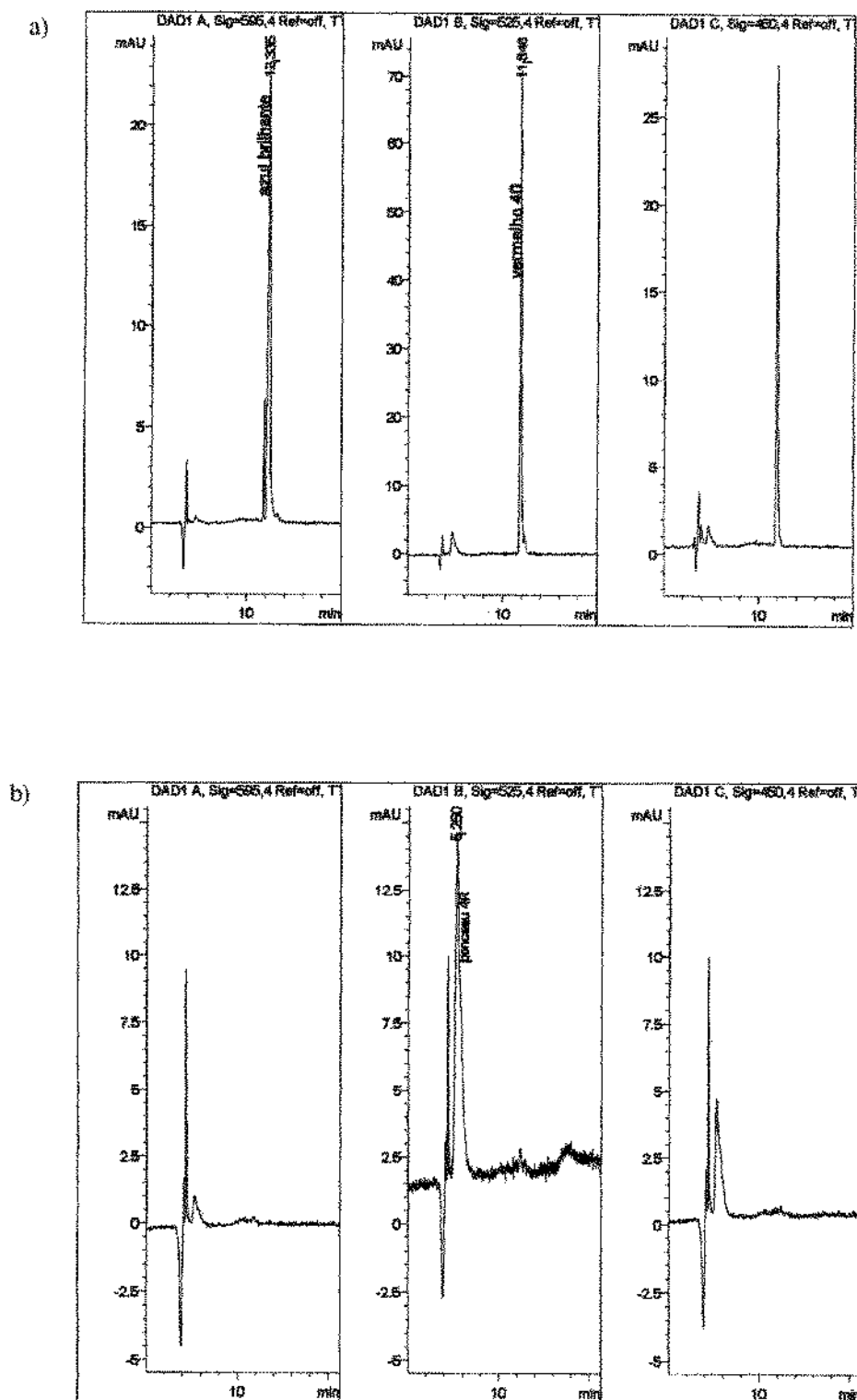


Figura 2: Perfis cromatográficos nos três comprimentos de onda de leitura para: (a) bala dura cor/sabor roxa; (b) bala mastigável cor/sabor vermelha. Condições cromatográficas descritas no texto.

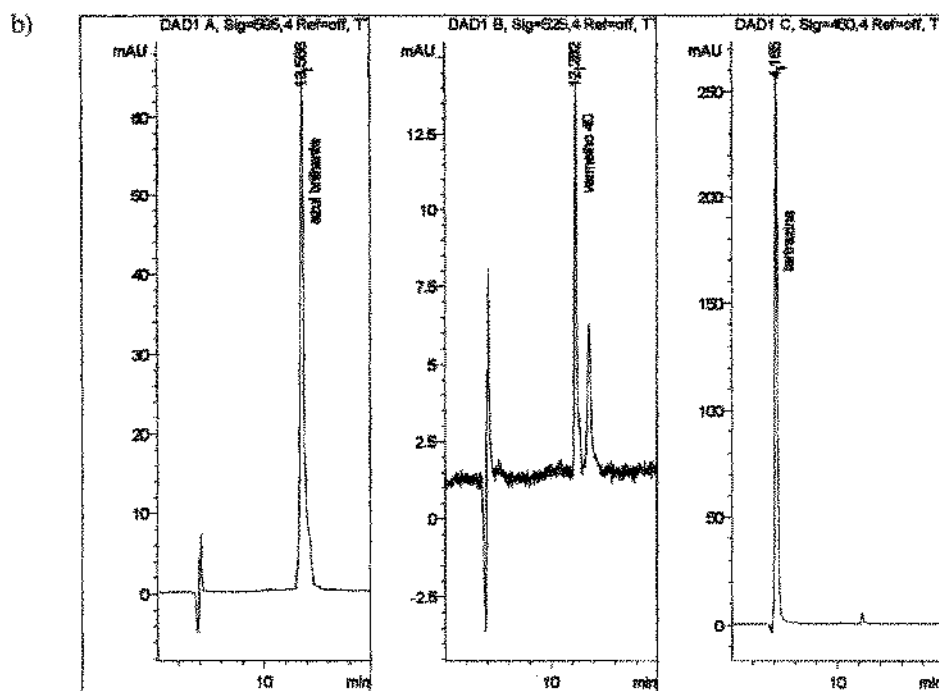
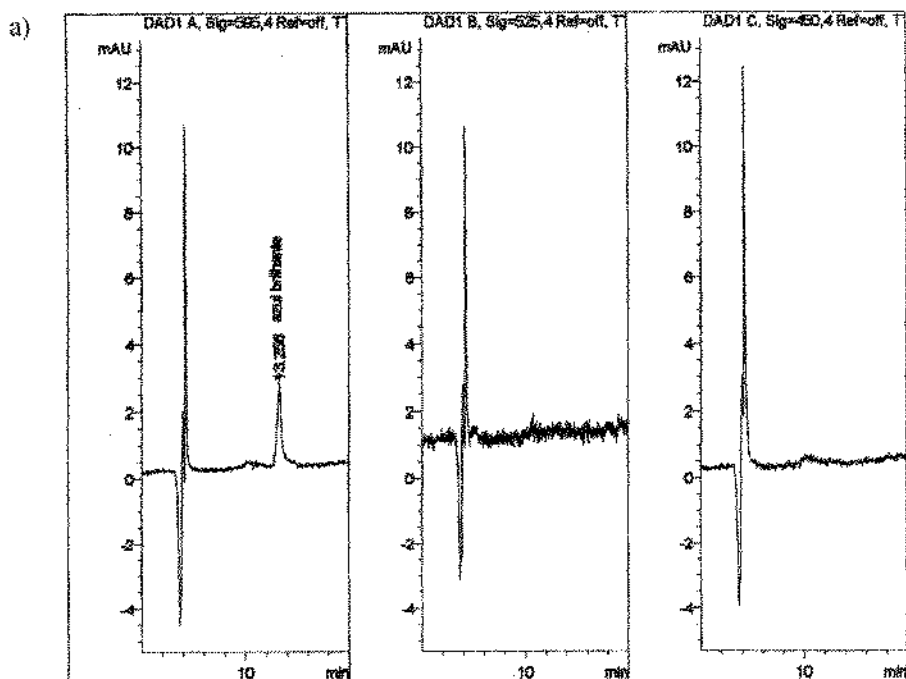


Figura 3 : Perfis cromatográficos nos três comprimentos de onda de leitura para:: (a) confeito de chocolate cor/sabor azul; (b) goma de mascar cor/sabor verde. Condições cromatográficas descritas no texto.

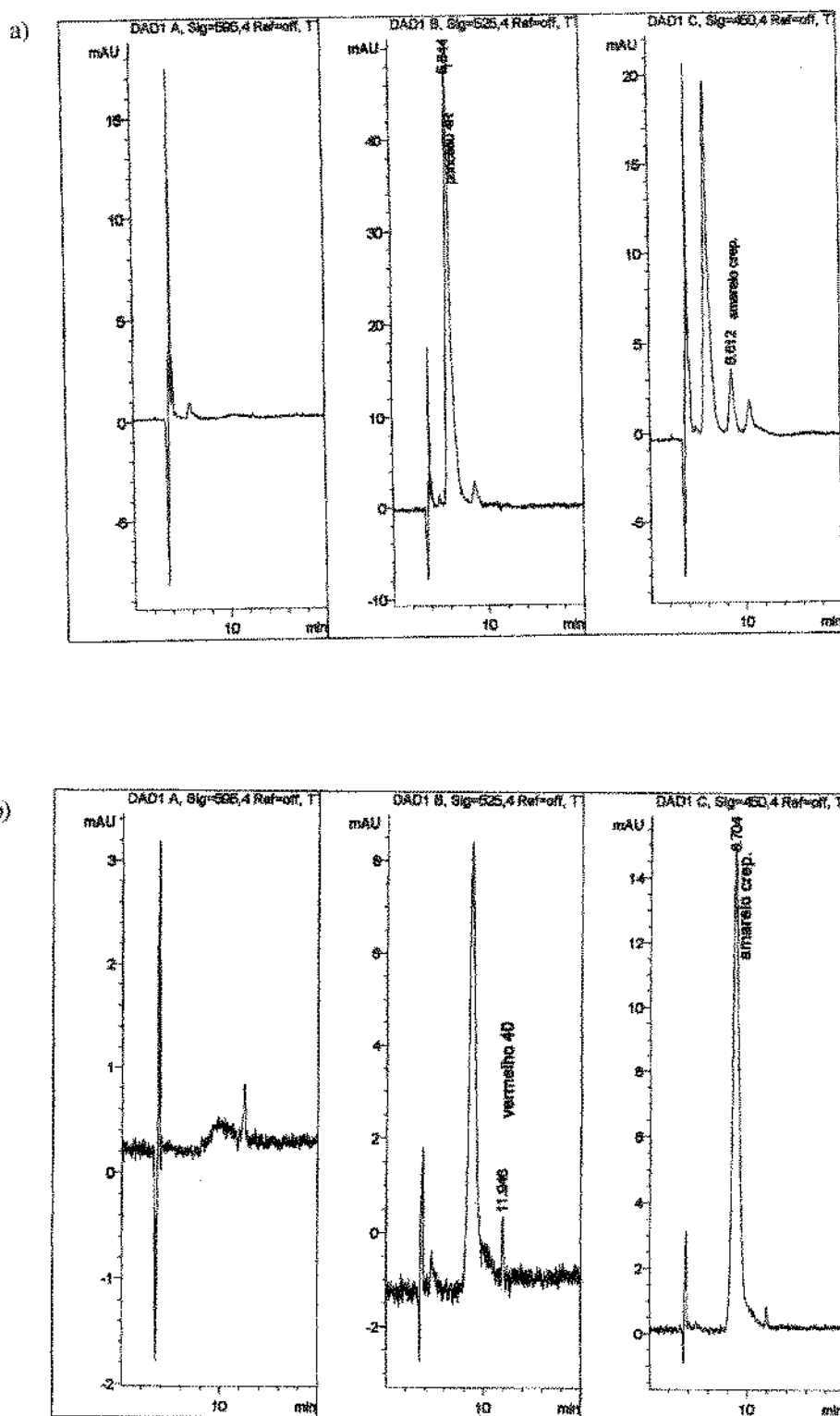


Figura 4 : Perfis cromatográficos nos três comprimentos de onda de leitura para:: (a) cereal matinal colorido cor/sabor vermelho; (b) bebida isotônica cor/sabor tangerina. Condições cromatográficas descritas no texto.

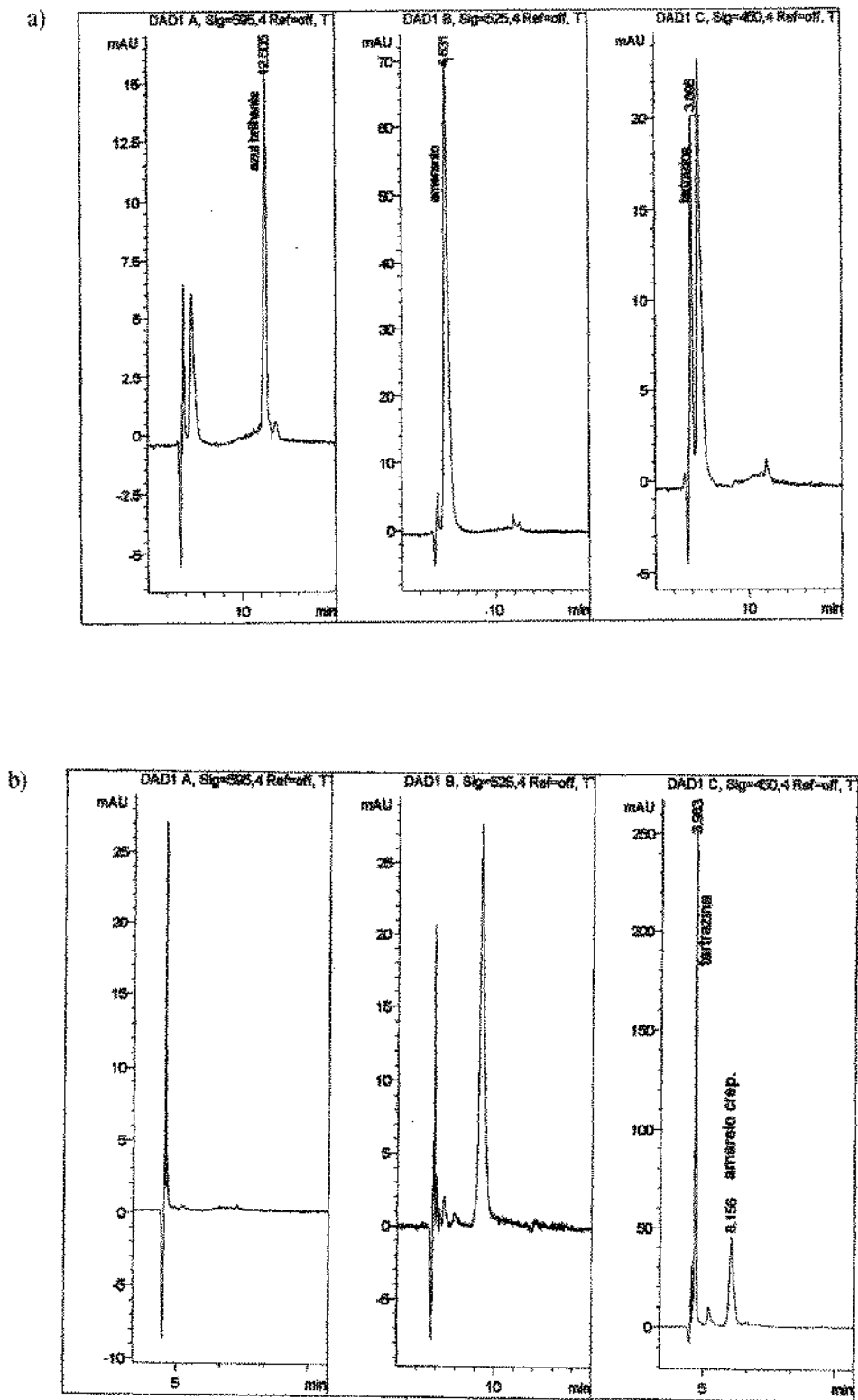


Figura 5 : Perfis cromatográficos nos três comprimentos de onda de leitura para:: (a) refrigerante cor/sabor uva; (b) preparado sólido para refresco cor/sabor laranja. Condições cromatográficas descritas no texto.

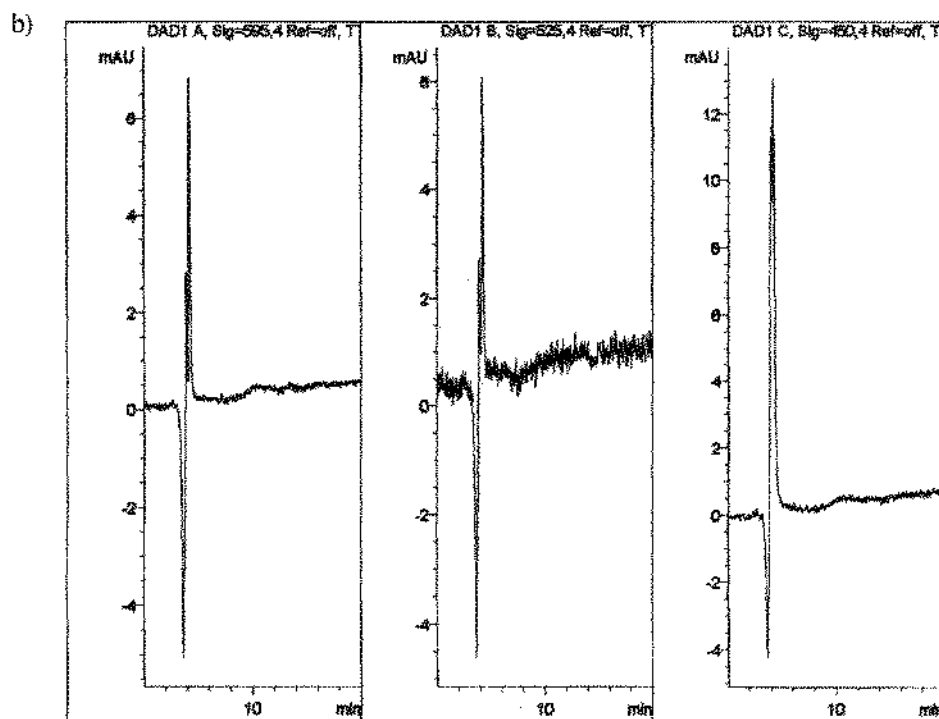
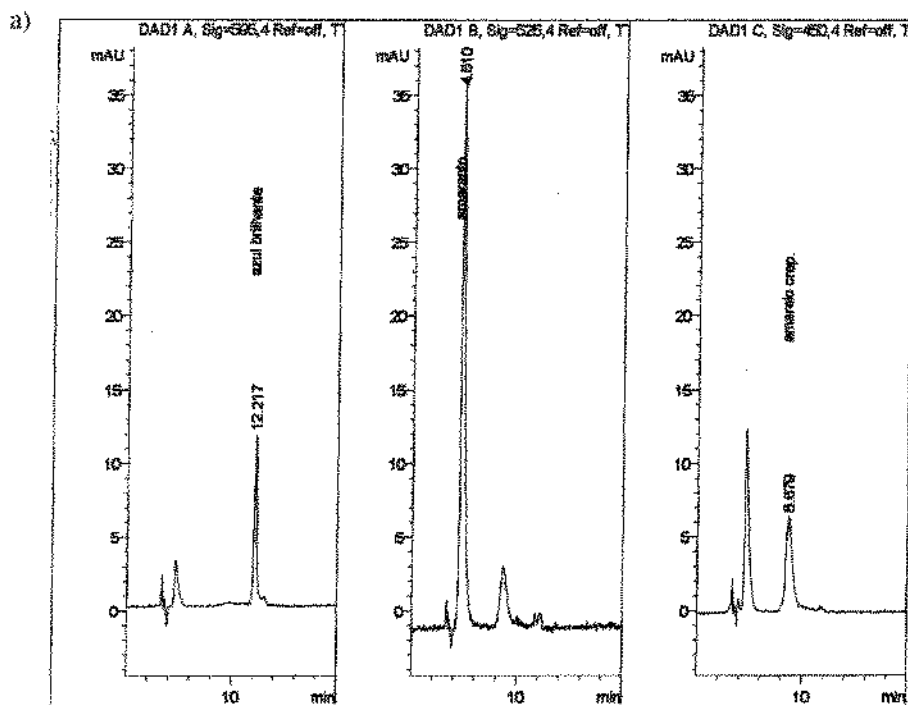


Figura 6 : Perfis cromatográficos nos três comprimentos de onda de leitura para: (a) suco concentrado artificial cor/sabor uva; (b) suco natural cor/sabor acerola. Condições cromatográficas descritas no texto.

CONCLUSÃO

A metodologia se mostrou bastante eficaz para a quantificação dos oito corantes artificiais permitidos no Brasil, nas amostras analisadas.

Os resultados apontam a não existência de um bom controle no uso dos corantes artificiais pelas empresas alimentícias nacionais, já que muitos dos produtos aqui analisados apresentavam teores elevados e mesmo misturas de mais de três corantes. Os produtos importados deveriam atender as especificações da nossa legislação para serem comercializados em nosso país.

Embora não se tenha encontrado corantes não permitidos, as quantidades e misturas, muitas vezes, ultrapassaram os limites determinados.

O azul brilhante, permitido somente em refrigerantes, foi encontrado em outros produtos.

Corantes naturais presentes nas amostras ficaram retidos no filtro de 0,5 μm de poro, o que não ocorre com os corantes sintéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- . 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*, 105, 589-593, (1980).
- . GUIA OESP - Para a indústria de alimentação, painel do setor, pag. 25, (1991),.
- . LANCASTER, F. E. ; LAWRENCE, J. F. - "Determination of total non-sulphonated
aromatic amines in tartrazine, sunset yellow FCF and allura red by reduction and
derivatization followed by HPLC", *Food Additives and Contaminants*, 8, (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*, 210, 168-172(1981).
- . McKONE, H. T. ; IVIE, K. - "An Introduction to HPLC: Separation of Some FD&C Dyes", *Journal of Chemical Education*, 57, (4), 321-322 (1980).
- . McKONE, H. T. ; NELSON, G. J. - "Separation AND Identification of Some FD&C Dyes by TLC", *Journal of Chemical Education*, 57, (4), 722 (1980).
- . PRADO , M. A.; GODOY, H. T. - "Metodologia para determinação de corantes artificiais em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência" Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos, FEA, UNICAMP, Campinas, (ver capítulo 2), (1998).
- . YANUKA, Y.; SHALON, Y.; WEISSENBERG, E.; NIR-GROSFELD, I. - "The Isolation and Separation of Dyes from Foodstuffs by Column Chromatography". *Analyst*, 88, 872-876(1963).

CONCLUSÕES

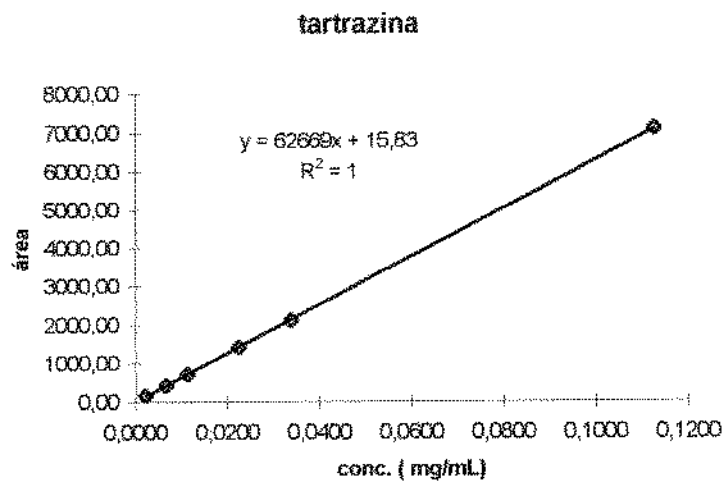
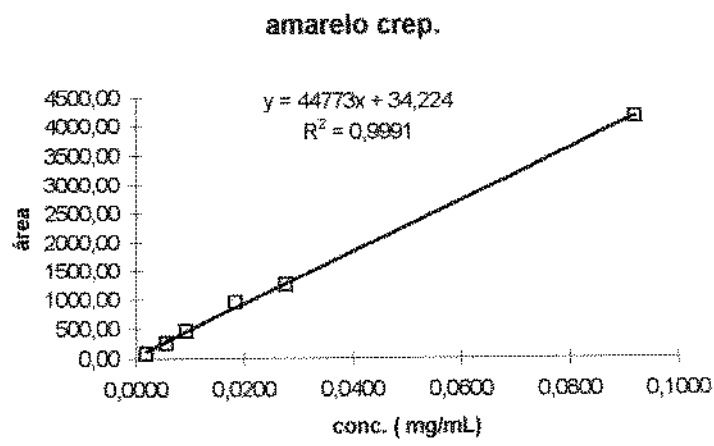
1. A metodologia proposta permite uma preparação simples da amostra e no processo cromatográfico, a utilização de coluna de ODS-2; as fases móveis, H₂O/MeOH tamponada para condicionamento da coluna seguida de H₂O/MeOH para a cromatografia; e a utilização de detector de arranjo de diodos (DAD), possibilitou a identificação e quantificação dos corantes artificiais em uma única injeção.
2. Pequenas modificações em relação ao solvente de extração, como a adição de sal de amônio, podem melhorar a performance desta etapa, dependendo da matriz a ser analisada.
3. Os limites de detecção encontrados para os corantes azul indigotina, azul brilhante, amaranço, ponceau 4R, vermelho 40, eritrosina, tartrazina e amarelo crepúsculo foram 0.51 µg/mL; 1.30 µg/mL; 1.02 µg/mL; 0.57 µg/mL; 1.10 µg/mL; 0.51 µg/mL; 0.70 µg/mL; 1.83 µg/mL, respectivamente. Os dados de recuperação foram acima de 95% e os de repetibilidade obtiveram índices de coeficiente de variação abaixo de 10%, e portanto foram considerados satisfatórios.
4. Embora a metodologia não seja destinada a detectar a presença específica de corantes naturais, pudemos observar que, quando estes estão presentes nas amostras, podem ser visualizados pela coloração dos filtros de amostra que impedem completamente sua passagem.
5. O método apresentou grande rusticidade entre os tratamentos promovidos durante as determinações dos oito corantes.
6. Recomendamos a metodologia por CLAE aqui apresentada e validada na determinação dos corantes artificiais, com grandes vantagens em relação aos métodos

usuais, principalmente pelos fatores a seguir: determinação simultânea dos oito corantes artificiais sem a necessidade de troca de comprimento de onda durante a corrida cromatográfica; simplicidade no preparo das amostras resultando em maior rapidez; a não utilização de pares iônicos na fase móvel e a utilização de reagentes com menores níveis de toxidez e de menor custo;

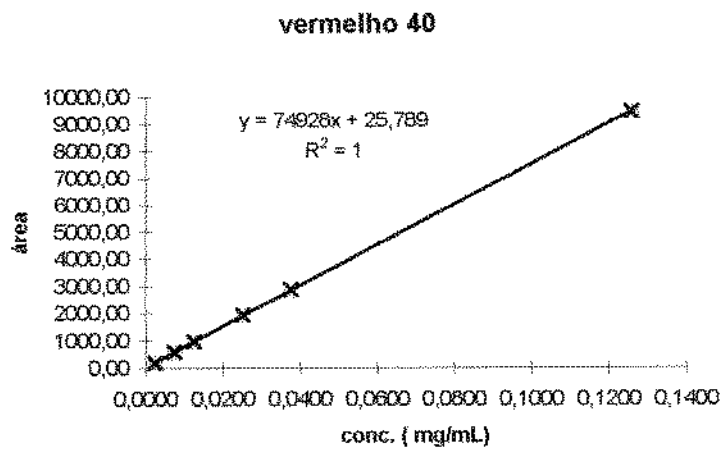
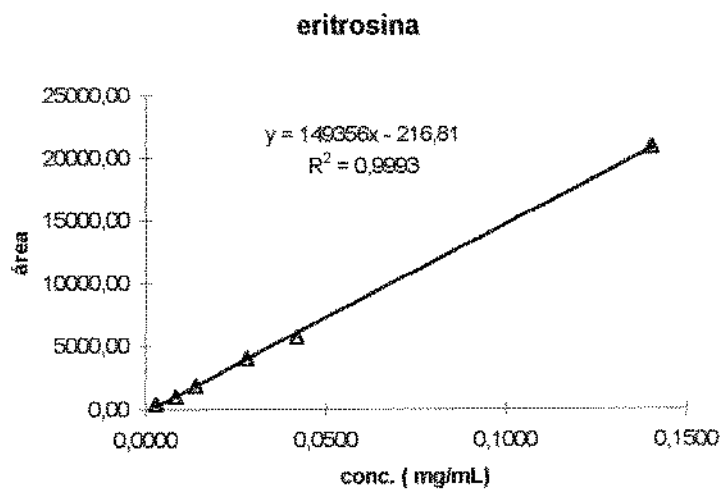
7. Os resultados apontam para a necessidade de um melhor controle das indústrias de alimentos para esse tipo de aditivo.

SUGESTÕES

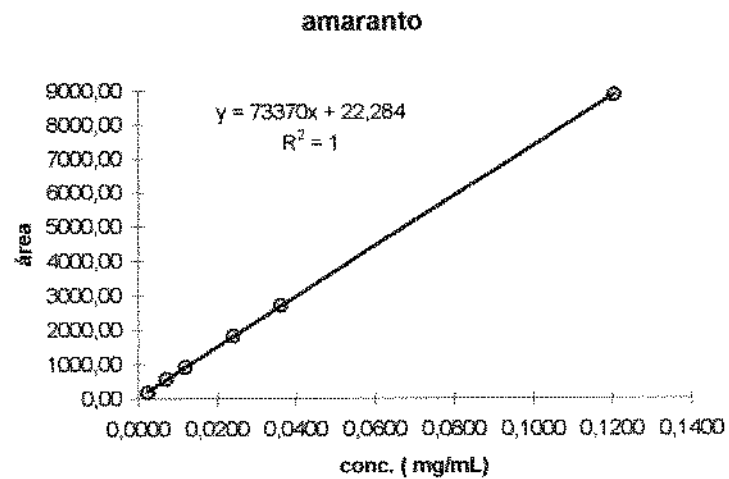
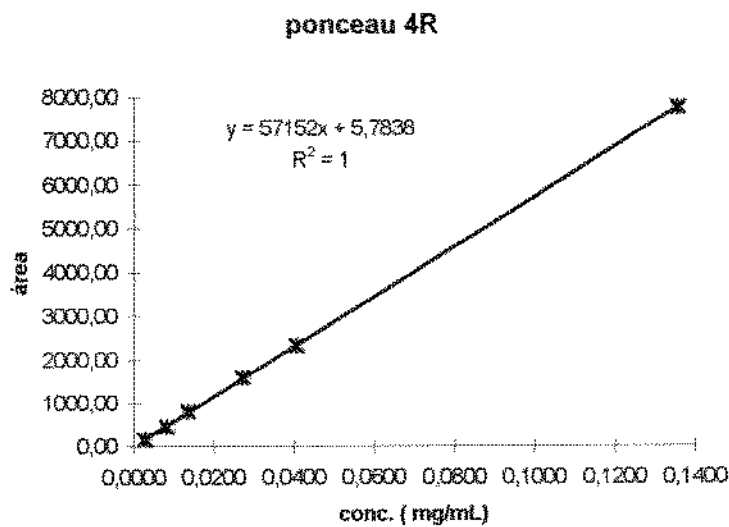
1. Extensão da metodologia para produtos farmacêuticos onde são utilizados os corantes artificiais, com o intuito de manter um bom controle desses produtos, também.
2. Estender a metodologia para determinação simultânea de corantes naturais e artificiais presentes em alimentos.
3. Fazer uma comparação de dados obtidos através das metodologias tradicionais e da nova metodologia aqui proposta.



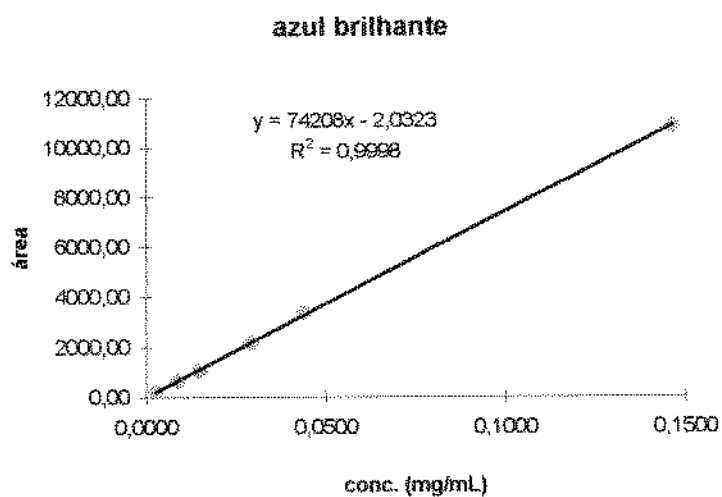
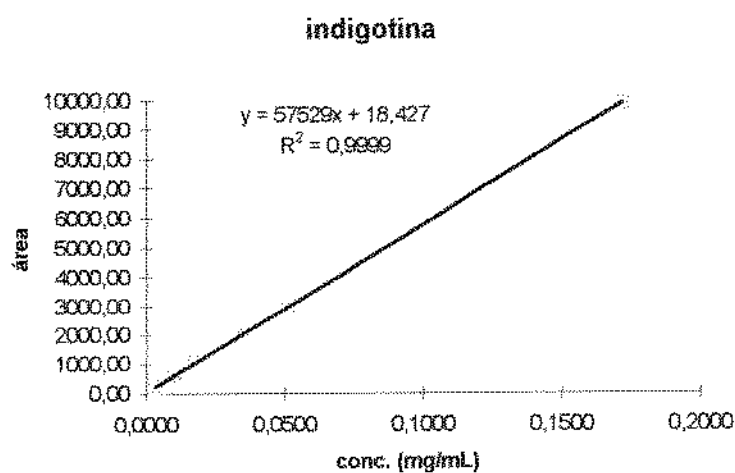
Anexo I: Curvas de padronização externa do amarelo crepúsculo e tartrazina.



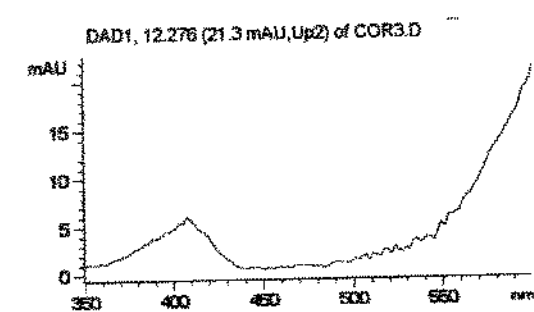
Anexo 2: Curvas de padronização externa da eritrosina e vermelho 40.



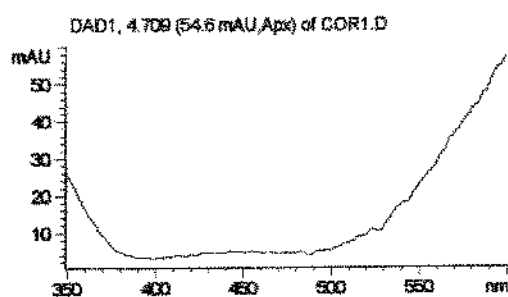
Anexo 3: Curvas de padronização externa do ponceau 4R e amaranto.



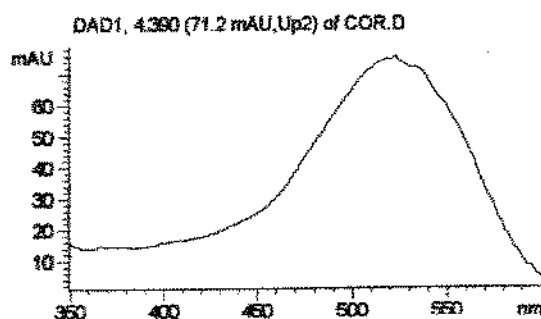
Anexo 4: Curvas de padronização externa do azul de indigotina e azul brilhante



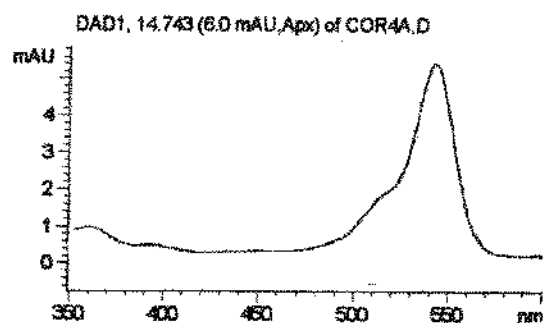
AZUL BRILHANTE



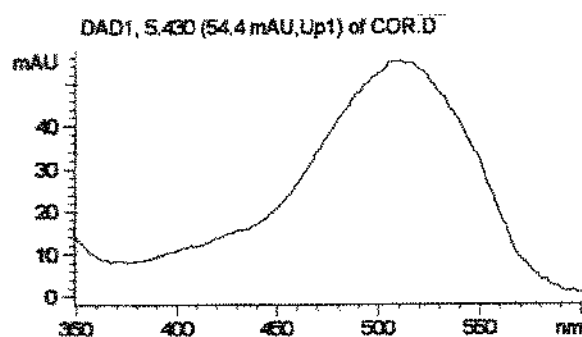
AZUL INDIGOTINA



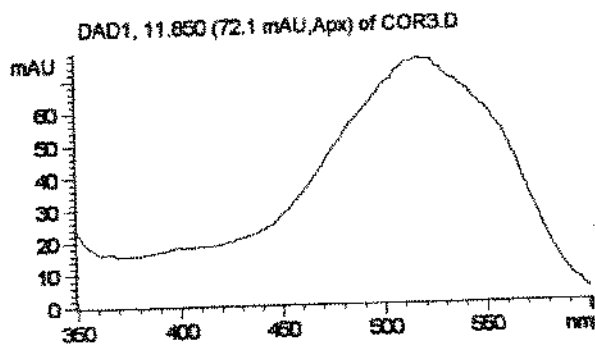
AMARANTO



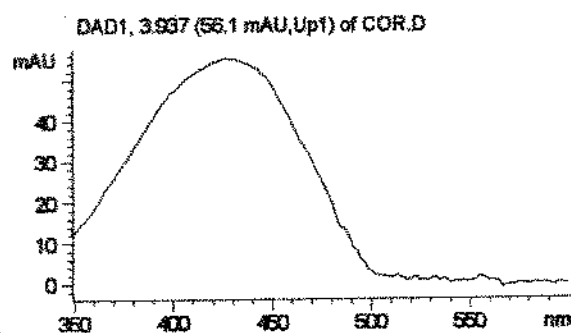
ERITROSINA



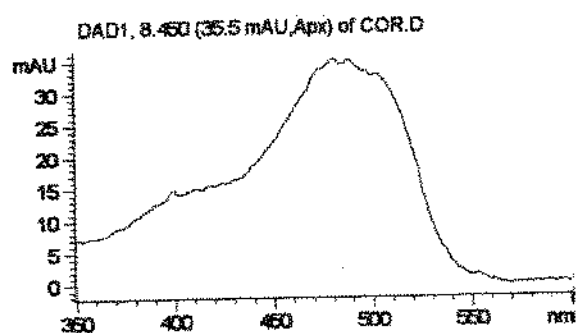
PONCEAU 4R



VERMELHO 40

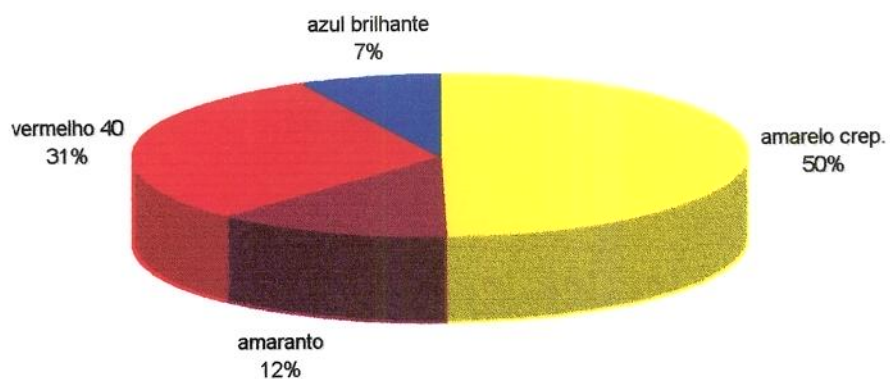
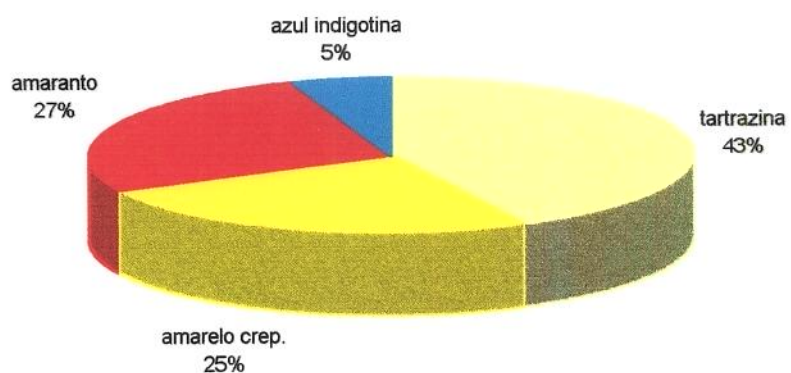


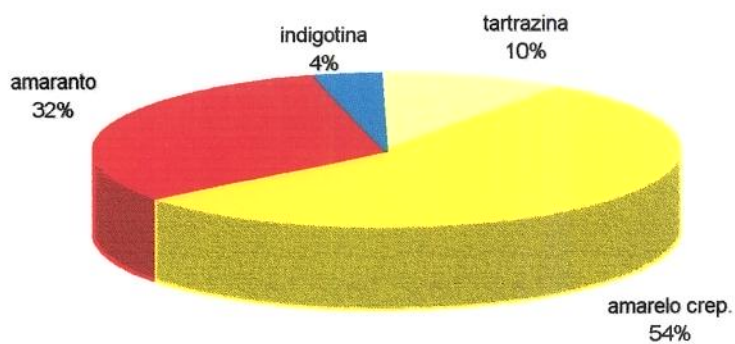
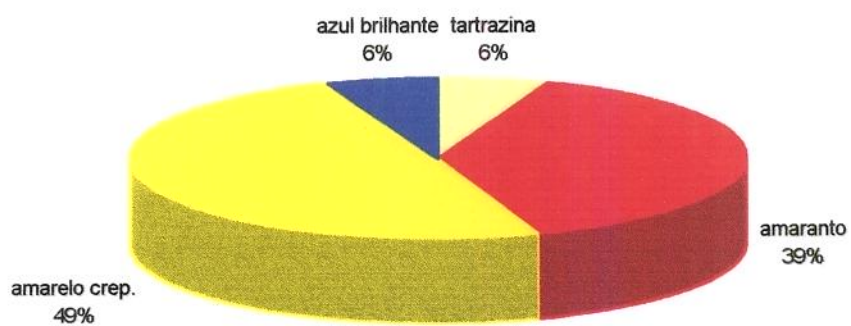
TARTRAZINA



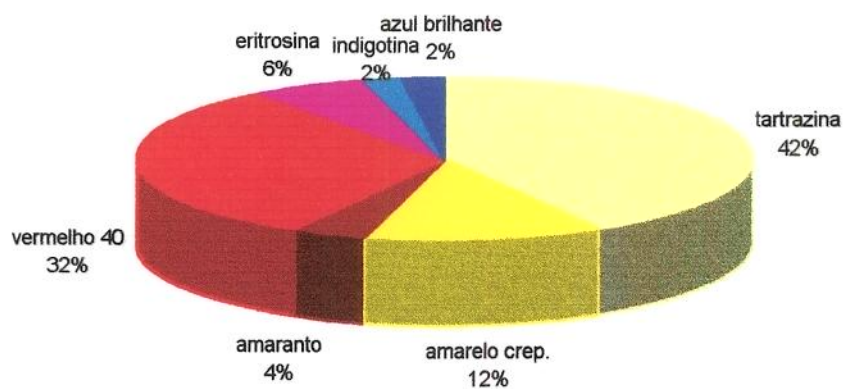
AMARELO CREPÚSCULO

Anexo 5: Espectro de absorção dos corantes artificiais presentes nas amostras

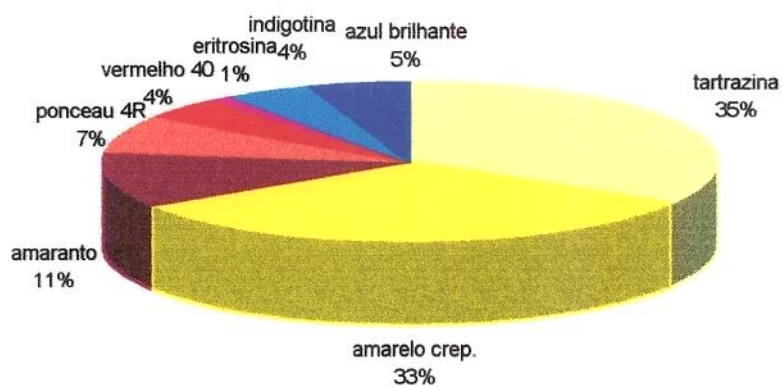
bebidas isotonicas**preparado solido para refresco**

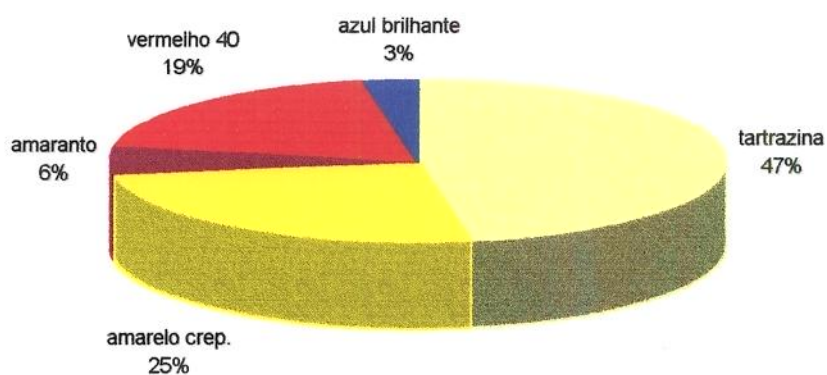
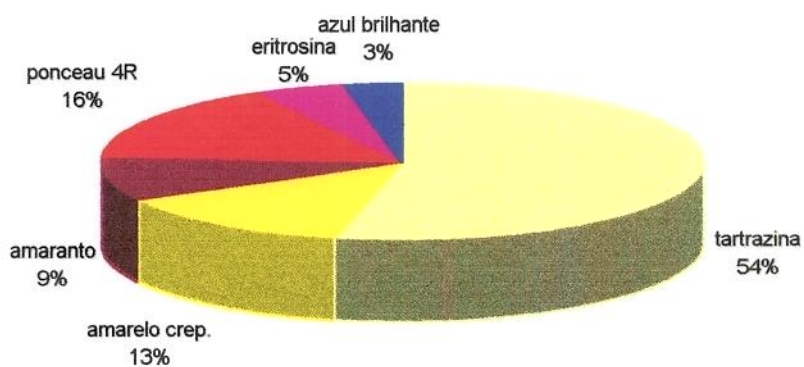
refrigerantes**suco concentrado artificial**

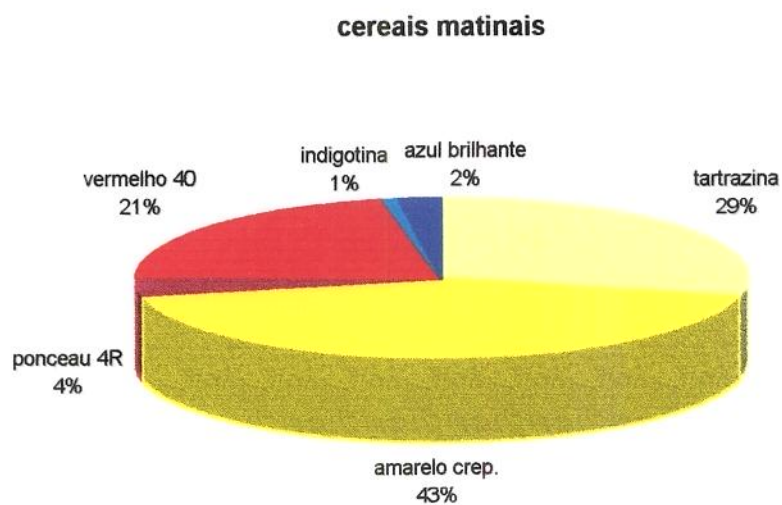
gomas de mascar



confeitos



balas duras**balas mastigáveis**



Anexo 10: Proporções usadas dos corantes artificiais nos produtos analisados