

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA

Departamento de Ciência de Alimentos - DCA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS
ANALÍTICAS PARA AVALIAÇÃO DE IDENTIDADE
E DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS
EM PREPARADOS SÓLIDOS PARA REFRESCOS E
REFRIGERANTES**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Luiz Wanderley Bratfisch Pace, aprovada pela Comissão Julgadora em 23 de novembro de 2000.

Campinas, 23 de novembro de 2000

Heloisa M. Cecchi
Profa. Dra. Heloisa Máscia Cecchi
Presidente da Banca

Luiz Wanderley Bratfisch Pace

Farmacêutico

Profa. Dra. Heloisa Máscia Cecchi

Orientadora

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

Campinas - SP
2000



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

200101950

UNIDADE	30
N.º CHAMADA:	T/Unicomp
	P114d
V.	Ex.
TOMBO BC	43693
PROC.	16-392/01
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00
DATA	09/02/01
N.º CPD	

CM-00154397-9

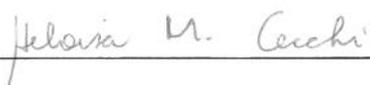
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

P114d Pace, Luiz Wanderley Bratfisch
Desenvolvimento de metodologias analíticas para avaliação da identidade e determinação de corantes artificiais em preparados sólidos para refresco e refrigerantes / Luiz Wanderley Bratfisch. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Heloisa Máscia Cecchi
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Corantes. 2.Cromatografia líquida de alta eficiência.
3.Espectroscopia infravermelho. 4.Refrigerantes. I.Cecchi, Heloisa Máscia. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

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 obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.



Profa. Dra. Heloisa Máscia Cecchi

FEA / UNICAMP

Presidente



Profa. Dra. Helena Teixeira de Godoy

FEA / UNICAMP

Membro



Prof. Dr. Paulo Roberto Nogueira Carvalho

ITAL

Membro

Profa. Dra. Adilma R. P. Scamparini

FEA / UNICAMP

Membro

Dedico este trabalho a meus pais,

Luiz e Almery,

pelo amor, carinho e apoio.

“Quem não muda, fica estagnado.

E não basta fazer bem;

é preciso fazer cada vez melhor”.

Amyr Klink

AGRADECIMENTOS

A Profa. Heloisa Máscia Cecchi, pela orientação, amizade e compreensão.

A Profa. Gláucia M. Pastore, pelo incentivo desde o curso de graduação em Biologia.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições e sugestões apresentadas para a redação final desta tese.

A Buckman Laboratórios Ltda, pelo uso dos laboratórios e equipamentos analíticos para a realização deste trabalho e a Buckman Laboratórios Intl., em especial ao pessoal do KRC (Knowledge Resource Center) pelo apoio no levantamento bibliográfico.

A Carmen Gomez Teixeira A. Rodrigues pelo apoio e incentivo, a Ione A. Pires da Costa e Maria A. Ferreira pela colaboração nas traduções e sugestões.

A todas as pessoas do Laboratório de Análise de Alimentos, do Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pelo apoio e amizade.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente durante a elaboração deste trabalho.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL...
SEÇÃO CIRCULANTE

CONTEÚDO

RESUMO	1
SUMMARY	3
INTRODUÇÃO	5
CAPÍTULO 1	
PRINCIPAIS CORANTES ARTIFICIAIS UTILIZADOS EM PREPARADOS SÓLIDOS PARA REFRESCO E REFRIGERANTES (REVISÃO)	7
1.1 INTRODUÇÃO	9
1.2 HISTÓRICO	10
1.3 CLASSIFICAÇÃO	12
1.4 PRINCIPAIS CORANTES ARTIFICIAIS UTILIZADOS EM ALIMENTOS NO BRASIL	15
1.5 CONTROLE DE QUALIDADE DOS CORANTES PARA ALIMENTOS	25
1.6 NECESSIDADES DE PESQUISAS FUTURAS	26
1.7 TABELAS	27
1.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
1.9 ANEXO	35

CAPÍTULO 2

MÉTODOS ANALÍTICOS RELEVANTES PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS POR ESPECTROFOTOMETRIA VISÍVEL E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (REVISÃO)	37
2.1 INTRODUÇÃO	39
2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS	41
2.2.1 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	41
2.2.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	46
2.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA IDENTIDADE DE PREPARADOS SÓLIDOS PARA REFRESCO POR ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO	55
3.1 RESUMO	57
3.2 SUMMARY	58
3.3 INTRODUÇÃO	59
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	60
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.6 CONCLUSÕES	78

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
3.8 SUGESTÕES	80

CAPÍTULO 4

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS EM PREPARADOS SÓLIDOS PARA REFRESCO E REFRIGERANTES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	81
4.1 RESUMO	83
4.2 SUMMARY	84
4.3 INTRODUÇÃO	85
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	87
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
4.6 CONCLUSÕES	110
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
4.8. SUGESTÕES	114

CAPÍTULO 5

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS EM PREPARADOS SÓLIDOS PARA REFRESCO E REFRIGERANTES POR ESPECTROFOTOMETRIA NO VISÍVEL	115
5.1 RESUMO	117

5.2 SUMMARY	118
5.3 INTRODUÇÃO	119
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	122
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	126
5.6 CONCLUSÕES	153
5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
5.8. SUGESTÕES	159

CAPÍTULO 6

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS EM PREPARADOS SÓLIDOS PARA REFRESCO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA	161
6.1 RESUMO	163
6.2 SUMMARY	164
6.3 INTRODUÇÃO	165
6.4 MATERIAL E MÉTODOS	166
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	171
6.6 CONCLUSÕES	177
6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	178

CAPÍTULO 7

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS EM PREPARADOS SÓLIDOS PARA REFRESCO E REFRIGERANTES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO E VISÍVEL	181
7.1 RESUMO	183
7.2 SUMMARY	184
7.3 INTRODUÇÃO	185
7.4 MATERIAL E MÉTODOS	190
7.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	198
7.6 CONCLUSÕES	215
7.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	216
CONCLUSÕES GERAIS	217

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 3

- Figura 1:** Fluxograma da metodologia utilizada na obtenção de espectros no infravermelho para determinação da identidade de preparados sólidos para refresco **63**
- Figura 2:** Espectro no infravermelho da sacarose obtido por reflectância interna difusa **71**
- Figura 3:** Espectro no infravermelho do preparado sólido para refresco (tradicional) obtido por reflectância interna difusa **71**
- Figura 4:** Espectro no infravermelho do preparado sólido para refresco (diet) obtido por reflectância interna difusa **73**
- Figura 5:** Espectros no infravermelho dos preparados sólidos para refresco (tradicional com e sem adição de polpa de fruta) obtido por reflectância interna difusa **73**
- Figura 6:** Espectros no infravermelho dos preparados sólidos para refresco (tradicional e diet) obtidos por reflectância interna difusa **75**

CAPÍTULO 4

- Figura 1:** Cromatograma dos padrões de corantes artificiais , cromatografia líquida de alta eficiência, detecção: 510nm. **93**
- Figura 2:** Cromatograma dos padrões de corantes artificiais , cromatografia líquida de alta eficiência, detecção: 400nm. **94**

Figura 3: Cromatograma de amostra de refresco sabor laranja, cromatografia líquida de alta eficiência, detecção: 510nm.	95
Figura 4: Cromatograma de amostra de refresco sabor uva, cromatografia líquida de alta eficiência, detecção: 510nm.	96
Figura 5: Curva de calibração para determinação de corantes artificiais por CLAE, detecção: 400nm.	97
Figura 6: Curva de calibração para determinação de corantes artificiais por CLAE, detecção: 510nm.	99
Figura 7: Identificação dos corantes através da variação da área x variação do comprimento de onda em cromatografia líquida de alta eficiência	109

CAPÍTULO 5

Figura 1: Valores de turbidez (NTU) de amostras de preparados sólidos para refresco pronto para consumo	127
Figura 2: Espectros dos padrões de corantes artificiais na região do visível em absorvância	129
Figura 3: Espectros dos padrões de corantes artificiais na região do visível em segunda derivada	131
Figura 4: Espectro na região do visível em segunda derivada da amostra de refrigerante (sabor laranja)	133
Figura 5: Espectro na região do visível em segunda derivada da amostra de refrigerante (sabor uva)	134

Figura 6: Curva de calibração para determinação de corantes artificiais por espectrofotometria na região do visível (segunda derivada). Corantes: amarelo de tartrazina, amarelo crepúsculo, amaranto, vermelho 40, azul de indigotina. **135**

Figura 7: Curva de calibração de corante artificial por espectrofotometria na região do visível (segunda-derivada). Corante: azul brilhante. **137**

Figura 8: Espectros na região do visível em 2° derivada das amostras de refrigerante e refresco (sabor uva) com e sem adição de solução de hidróxido de sódio-50%. **151**

CAPÍTULO 7

Figura 1: Espectro do filme de poliestireno na região do infravermelho mediano em transmitância **201**

Figura 2: Espectro do filtro de óxido de holmio em absorvância na região do ultravioleta e visível **204**

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Características espectrofotométricas dos principais corantes artificiais	27
Tabela 2: Estabilidade em diferentes valores de pH dos principais corantes artificiais	28
Tabela 3: Estabilidade em diferentes meios dos principais corantes artificiais	29

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Comparação no FT-IR entre os preparados sólidos para refresco tradicional	67
Tabela 2: Comparação no FT-IR entre os preparados para refresco light	68
Tabela 3: Comparação no FT-IR entre os preparados sólidos para refresco tradicional com e sem adição de polpa de fruta	70
Tabela 4: Estudo de repetibilidade (desvio-padrão e variância) baseado em 5 repetições de cada amostra (FT-IR)	77

CAPÍTULO 4

Tabela 1: Avaliação da composição da fase móvel para determinação de corantes por cromatografia líquida de alta eficiência	92
---	-----------

Tabela 2: Corantes artificiais presentes em preparados sólidos para refresco e respectivas concentrações	101
	102
Tabela 3: Corantes artificiais presentes em refrigerantes e respectivas concentrações	103
Tabela 4a: Determinação da % de recuperação de corantes artificiais em preparados sólidos para refresco determinado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	105
Tabela 4b: Determinação da % de recuperação de corantes artificiais em refrigerantes determinado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	106
Tabela 5: Desvio-padrão e coeficientes de variação médios de cada corante artificial presente nas amostras de preparados sólidos para refresco obtidos na determinação por CLAE	107
Tabela 6: Limite de detecção e limite de determinação dos corantes artificiais por CLAE	108

CAPÍTULO 5

Tabela 1: Turbidez da solução de preparados sólidos para refresco pronto para o consumo determinada através de turbidímetro antes e após filtração	126
Tabela 2a: Corantes artificiais presentes em preparados sólidos para refresco e respectivas concentrações determinada através de espectrofotometria na região do visível (absorvância)	139
	140
	141

Tabela 3a: Corantes artificiais presentes em refrigerantes e respectivas concentrações determinadas através de espectrofotometria na região do visível (absorvância)	
Tabela 2b: Corantes artificiais presentes em preparados sólidos para refresco e respectivas concentrações determinada através de espectrofotometria na região do visível (segunda derivada)	142 143
Tabela 3b: Corantes artificiais presentes em refrigerantes e respectivas concentrações determinadas através de espectrofotometria na região do visível (segunda derivada)	144
Tabela 4a: Determinação da % de recuperação de corantes artificiais determinado através de espectrofotometria na região do visível (absorvância)	144
Tabela 4b: Determinação da % de recuperação de corantes artificiais determinado através de espectrofotometria na região do visível (segunda derivada)	145
Tabela 5a: Desvio-padrão e coeficientes de variação médio de cada corante artificial presente nas amostras de preparados sólidos para refresco obtidos na determinação por espectrofotometria na região do visível (absorvância)	146
Tabela 5b: Desvio-padrão e coeficientes de variação médio de cada corante artificial presente nas amostras de preparados sólidos para refresco obtidos na determinação por espectrofotometria na região do visível (segunda derivada)	147

Tabela 6: Limites de detecção e quantificação de corantes artificiais por método espectrofotométrico na região do visível (Absorvância) **148**

Tabela 7: Valores de absortividade dos corantes em tampão acetato 0,02% (pH=4,8) **149**

CAPÍTULO 6

Tabela 1: Concentração média (mg/100g) de amarelo de tartrazina em amostras de preparados sólidos para refresco **172**

Tabela 2: Concentração média (mg/100g) de amarelo crepúsculo em amostras de preparados sólidos para refresco **173**

Tabela 3: Concentração média (mg/100g) de vermelho 40 em amostras de preparados sólidos para refresco **173**

Tabela 4: Concentração média (mg/100g) de azul de indigotina em amostras de preparados sólidos para refresco **174**

Tabela 5: Concentração média (mg/100g) de amaranto em amostras de preparados sólidos para refresco **174**

Tabela 6: Teste Q aplicado aos valores médios de concentração de cada corante artificial presente em amostras de preparados sólidos para refresco **175**

Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) aplicado aos resultados médios de concentração de cada corante artificial presente em amostras de preparados sólidos para refresco, comparando três métodos analíticos **176**

CAPÍTULO 7

Tabela 1: Verificação da calibração da balança analítica	198
Tabela 2: Desvio obtido na calibração da pipeta Eppendorf	199
Tabela 3: Comparação das bandas características do filme de poliestireno com os valores pré-estabelecidos	200
Tabela 4: Verificação da absorvância do espectrofotômetro UV-Visível, na região do ultravioleta utilizando solução de dicromato de potássio	202
Tabela 5: Comprimentos de onda máximo do filtro de óxido de holmio	203
Tabela 6: Transmitância de cada filtro em comprimento de onda específico obtido na região do visível	205
Tabela 7: Valores de turbidez obtidos na calibração do turbidímetro	206
Tabela 8: Valores da relação (área/concentração) dos corantes artificiais para alimentos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	207
Tabela 9: Calibração do comprimento de onda do detector UV-Visível do cromatógrafo líquido	208
Tabela 10: Calibração do fluxo da bomba isocrática do cromatógrafo líquido	208

Tabela 11: Simulação do cálculo de % de variação aplicado a uma curva de calibração de corantes artificiais por CLAE	209
Tabela 12: Avaliação da composição da fase móvel para determinação de corantes por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna RP-18, fase reversa e fluxo de 1,0 mL/minuto	211
Tabela 13: Turbidez da solução de preparados sólidos para refresco pronto para o consumo através de turbidímetro, antes e após centrifugação e filtração	213

ÍNDICE DE ANEXOS

CAPÍTULO 1

Anexo 1: Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 16 – Bebidas – Subcategoria 16.2.2. – Bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas -	35
---	-----------

ANEXOS - PLANILHA DE CÁLCULO **223**

Anexo A: Azul brilhante	225
Anexo B: Azul de indigotina/vermelho 40	226
Anexo C: Azul de indigotina/amaranto	227
Anexo D: Amaranto/amarelo de tartrazina	228
Anexo E: Amarelo crepúsculo/amarelo de tartrazina	229

RESUMO

Com a globalização a cada dia surgem novas marcas e fornecedores de produtos alimentícios, bem como o grande apelo pelos produtos “diet ou light”, levaram o desenvolvimento de refresco em pó e refrigerantes contendo edulcorantes. A base do refresco em pó tradicional é a sacarose (açúcar cristal) e do “light” é a maltodextrina. Outra novidade nos preparados sólidos para refresco é adição de polpa de fruta e vitamina.

Os métodos utilizados no presente trabalho, foram baseados em espectrometria no infravermelho para verificação de identidade dos preparados sólidos para refresco e em cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria na região do visível para a quantificação dos corantes presentes em preparados para refresco em pó e refrigerantes; sendo baseados na publicação do FDA (Chemistry Review Branch, maio 1993) que menciona que o método analítico não deve ser tão sofisticado ou complicado que possa ser executado somente em laboratórios com equipamentos altamente especializados ou por pessoal especialmente treinados.

Os corantes avaliados foram amarelo de tartrazina (E 102), amarelo crepúsculo (E 110), amaranto (E 123), azul de indigotina (E 132), azul brilhante (E 133) e vermelho 40.

Foram analisadas diferentes marcas, sabores e tipos (tradicional com e sem polpa de fruta e light) de preparados sólidos artificiais para refresco, sendo utilizado um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Perkin Elmer, com acessório de reflectância interna difusa para obtenção dos espectros das amostras. As determinações foram baseadas no trabalho de Wilson, R. H. e

colaboradores (1992) para a determinação do conteúdo de frutas em geléias. Os espectros das amostras convertidos em Kubelka-Munk foram comparados entre si através de sobreposição, software compare e observação de bandas espectrais. Os espectros obtidos por reflectância difusa forneceram informações para as determinações qualitativas permitindo a identificação do refresco tradicional com ou sem polpa de fruta e o “light”, de maneira simples e rápida, confirmando a potencialidade desta técnica analítica aplicada à análise de alimentos.

As determinações quantitativas dos corantes por CLAE foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido com bomba simples (sistema de eluição isocrática), coluna C-18 (fase reversa), detector UV-Visível em 510nm e tampão acetato de amônio (0,05M):Metanol (80:20) como fase móvel, com fluxo de 1,0mL/minuto. Para o método alternativo foi utilizado um espectrofotômetro UV-Visível, Lâmbda 20, Perkin Elmer visando a determinação qualitativa e quantitativa dos corantes. Utilizando curvas de calibração foi possível determinar a concentração dos corantes por espectrofotometria na região do visível, através dos espectros da segunda derivada e cálculos matemáticos foi calculado a concentração dos corantes através da espectrofotometria na região do visível, sendo os resultados comparados com os obtidos através de CLAE utilizando padronização externa. Para o amarelo crepúsculo, a porcentagem de recuperação foi de 98,8% (CLAE) e 98,3% (espectrofotometria); desvio-padrão 0,076 (CLAE) e 0,012 (espectrofotometria). O método por CLAE otimizado, utilizando um único comprimento de onda (510nm), permitiu a determinação dos corantes presentes nas amostras analisadas em única corrida cromatográfica e o método alternativo por espectrofotometria, utilizando o espectro da segunda derivada, possibilitou a identificação e quantificação dos corantes com maior rapidez, simplicidade e redução do custo analítico.

SUMMARY

With the globalization, each day we have new brands and suppliers of nutritive products, and the great plea for the light products led to the development of drink powder and soft drinks containing edulcorater. The base of the traditional drink powder is saccharose (crystal sugar) and the base of the light is the malto-dextrin. The new drink powder could have a fruit pulp and vitamin.

The methods used in this work were based on infrared spectrometry to verify the identity of the solid powder for soft drinks and on high performance liquid chromatography and spectrophotometry in the visible region for the quantification of present dyes in material for drink powder; being based on the FDA publication (Chemistry Review Branch, May 1993) which mention that the analytical method must not be so sophisticated or complex that can be executed only in laboratories with high specialized equipment or by highly special trained people.

The pigments considered were: tartrazin yellow (E 102), sunset yellow (E 110), yellow (E 123), indigotin blue (E 132), brilliant blue (E 133) and red 40.

Different brands, flavours and kinds (traditional, with and without fruit pulp and light) of solid powder for soft drinks were analyzed, being used a Fourier trasnsformed infrared spectrophotometer, Perkin Elmer, with diffuse internal reflecting accessory to obtain the sample spectrum. The determinations were based on Wilson, R. H. and collaborators (1992) for the determination of fruit content in jelly. The sample spectrum converted in Kubelka-Munk were compared among them through overlapping, software compare and observe of spectral stripes. The specters obtained by diffuse reflectance provide information for the

qualitative determinations allowing the identification of the traditional drink powder with or without fruit pulp and the light one, in a simple and fast manner, confirming the potentiality of this analytical technic applied to the food analysis.

The quantitative determinations of the food dyes by HPLC, were done using a liquid chromatographer with isochratic pump, column C-18 (reverse phase), UV-Visible detector in 510nm and Ammonium acetate buffer (0,05M):Methanol: (80:20) as mobile phase, with flux of 1,0 mL/minute. For the alternative method it was used a Visible-UV spectrophotometer, Lambda 20, Perkin Elmer aiming the qualitative and quantitative determination of the dyes. Using calibration curves it was possible to determine the dyes concentrations by spectrophotometry in the visible region, through the second derivative spectrum and mathematical calculations the food dye concentration was calculated through spectrophotometer in the visible region, being the results compared with the obtained through HPLC using external standards. For the sunset yellow, the recovering percentage was 98.8% (HPLC) and 98.3% (spectrophotometry); standard-deviation 0.076 (HPLC) and 0.012. The optimized HPLC method, using a unique wavelenght (510 nm), provide the pigment determination present in the analyzed samples in just one chromatographic run and the alternative method by spectrophotometry, using the second derivative spectrum, allowed the identification and quantification of the food dyes faster, with more simplicity and analytical cost reduction.

INTRODUÇÃO

As regulamentações para aditivos em alimentos exigem métodos analíticos sensíveis e exatos para a realização de determinações qualitativas e quantitativas, visando verificar a presença, concentração de aditivos e adulteração em alimentos.

Frente a isto, é necessário o desenvolvimento e otimização de métodos analíticos a serem utilizados nos laboratórios de pesquisa, desenvolvimento, controle da qualidade ou processo e fiscalização.

Ao desenvolvermos uma metodologia analítica devemos levar em consideração vários fatores, entre os quais podemos citar: sensibilidade, linearidade, incerteza, exatidão, repetibilidade, reprodutibilidade, operacionalidade, rapidez e custo os quais estão relacionados a qualidade.

Os métodos analíticos devem também levar em consideração os aspectos de segurança (cuidados durante a rotina analítica, manuseio de reagentes) e meio ambiente (evitar o uso de reagentes que poluam o meio ambiente; se necessário prever tratamento para o resíduos a serem descartados).

A cada dia é mais frequente o número de indústrias e instituições seguindo normas de gestão de qualidade (ISO 9000, GMP, GLP) e de gestão ambiental (ISO 14001). Dentro deste contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos devem atender estas normas.

As indústrias e os laboratórios buscam a certificação por estas normas, visando garantir a qualidade de seus produtos e serviços; reduzir os custos e contribuir para o crescimento sustentável em relação aos

aspectos ambientais.

A necessidade do controle da qualidade dos produtos e das quantidades dos aditivos permissíveis em alimentos, garantindo a saúde dos consumidores, inseridos no contexto atual justificam o objetivo deste trabalho de avaliar e otimizar metodologias analíticas visando aplicar a espectrometria no infravermelho para determinação de identidade de preparados sólidos para refresco e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrofotometria na região do visível para a determinação qualitativa e quantitativa de corantes presentes em amostras de refresco em pó e refrigerantes.

Os resultados da concentração dos corantes presentes nas amostras obtidos por CLAE foram comparados com os resultados obtidos pelos métodos espectrofotométricos utilizando técnicas estatísticas com o objetivo de validar a metodologia alternativa desenvolvida.

Visando a obtenção de resultados confiáveis os equipamentos usados nas determinações também passaram por um processo de calibração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

FERREIRA, M.S.. & SIDARAVICUS, R.. **Aplicação tecnológica de aditivos e nutrientes em alimentos**. São Paulo. p.14-21. 1984.

REID, T.F.. Food additives. **Food processing industry**. 39 (469): 71,73, 75 & 77. 1970.

GAVA, A.J.. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. 4.ed.. Livraria Nobel S/A. 1982.

NBR ISO 9002 – Dez,1994.

CAPÍTULO 1

PRINCIPAIS CORANTES ARTIFICIAIS UTILIZADOS EM PREPARADOS SÓLIDOS PARA REFRESCO E REFRIGERANTES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUÇÃO

Frequentemente a cor é a primeira qualidade sensorial pela qual um alimento é avaliado. Nosso sentido é treinado para aceitar alimentos de uma determinada coloração e rejeitar qualquer desvio de nossas expectativas, ou seja, o consumidor associa cada alimento com uma determinada cor, portanto é desejável psicologicamente que o alimento processado tenha a cor que lembre o produto natural (Francis, 1970). A qualidade de um alimento e sabor estão associados com coloração (Ghorpade et al, 1995).

Os pigmentos naturais associados com os alimentos frescos, especialmente frutas e vegetais, são vivos e brilhantes. Entretanto, estes pigmentos estão sujeitos a condições físicas e químicas adversas durante o processamento podendo haver degradação parcial, causando alteração da coloração dos alimentos. Nos países desenvolvidos, mais de 75% dos alimentos é processado de alguma maneira antes de chegar ao consumidor. As indústrias alimentícias devem adicionar corantes caso a aparência aceita não for restabelecida (Ghorpade et al., 1995).

Os corantes são utilizados em alimentos principalmente pelas seguintes razões:

- Restabelecer a aparência original do alimento quando a cor natural foi destruída por aquecimento e armazenamento;
- Proporcionar homogeneidade de coloração devido a variação natural na intensidade da cor;
- Intensificar a coloração natural que ocorre nos alimentos para

atender as expectativas dos consumidores; como por exemplo iogurtes de frutas, refrescos e refrigerantes;

- Aumentar a atratividade;
- Auxiliar na identidade ou característica pela qual alguns alimentos são reconhecidos;
- Indicador visual da qualidade do alimento.

Os corantes sintéticos e naturais tem um importante papel na aparência dos alimentos processados, bem como na industrialização, armazenamento e controle de qualidade. São ingredientes importantes em muitos alimentos como confeitos, sobremesas, sorvetes e bebidas, uma vez que muitos destes são naturalmente incolores (Ghorpade et al., 1995).

1.2 HISTÓRICO

Os corantes tem sido utilizados para tornar os alimentos mais atrativos há vários séculos. As especiarias e condimentos tiveram papel importante como agentes corantes nas antigas civilizações da Índia e China. O vinho foi colorido pela primeira vez aproximadamente em 400 D.C. Os corantes derivados de minerais, plantas e animais contribuíram para o desenvolvimento das primeiras civilizações (Tannahill, 1973).

A descoberta do primeiro corante sintético em 1856 é dada a Willian Henry Perkins. Após esta data surgiram novos e diferentes corantes sintéticos. Estes corantes comparados com os extratos naturais de animais, vegetais e minerais, apresentam características tintoriais e

estabilidade superiores. Estes corantes estavam rapidamente disponíveis em várias formas, sendo imediatamente utilizados na Europa. Nos Estados Unidos, a primeira autorização para uso de corantes artificiais foi para manteiga em 1886 e a segunda foi em 1896 em queijo. Entretanto, após 1900, 80 diferentes corantes alimentícios foram utilizados em uma grande variedade de produtos incluindo catchup, gelatina, manteiga, queijo, sorvete, bala e vinho (Ghorpade et al., 1995).

Foi criado três categorias de corantes sintéticos (Federal Food, Drug and Cosmetic Act, 1906):

- FD&C (Food, Drug and Cosmetic): certificados para uso em alimentos, medicamentos e cosméticos;
- D&C (Drug and Cosmetic): corantes e pigmentos considerados seguros para medicamentos e cosméticos quando em contato com membranas mucosas ou quando ingeridos;
- D&C externo (Drug & Cosmetic): devido a sua toxicidade oral, não são certificados para uso em produtos de ingestão intencional, mas são considerados seguros para uso em produtos a serem aplicados externamente.

Para a aprovação de um novo corante o FDA (Food and Drug Administration), requer os resultados dos seguintes estudos toxicológicos (U.S. FDA, 1982):

- Estudo subcrônico, com duração de 90 dias, em espécies não roedores, geralmente cães;
- Toxicidade aguda em ratos;

- Estudo crônico, com no mínimo duas espécies animais, como por exemplo, ratos e camundongos (um com exposição intra uterina), por 24 - 30 meses;

- Estudo teratogênico;

- Estudo de reprodução de multigerações usando camundongos;

- Teste de mutagenicidade.

O desenvolvimento e uso de corantes alimentícios nos países europeus foi diferente dos Estados Unidos. Por exemplo, no Reino Unido não foi estabelecido qualquer legislação para corantes alimentícios até meados de 1950 (Haveland-Smith e Combes, 1980). Alguns países permitem o uso de alguns corantes, enquanto que outros proíbe o uso de todos os corantes sintéticos para uso em alimentos. Muitos dos corantes aprovados para uso em alimentos pelo FDA são usados na Europa. Para o benefício dos leitores, quando aplicável, o “Color Index Number” são fornecidos para os corantes sintéticos aprovados para o uso tanto na Europa com os Estados Unidos.

1.3 CLASSIFICAÇÃO

Os corantes permitidos para uso em alimentos podem ser amplamente classificados em duas categorias: corantes sujeitos a certificação e isentos de certificação. Um esquema para a classificação dos corantes para uso em alimentos é apresentado na figura 1.



Figura 1: Classificação dos corantes para uso em alimentos (Ghorphade et al., 1995).

A classificação dos corantes sintéticos para uso em alimentos são da EEC, FD&C e CI Food Colour Numbers of the Colour Index) (Coulson, 1980).

1.3.1 Corantes Azo

Os corantes “azo” compreendem o maior grupo de corantes

certificados, caracterizado por apresentar um ou mais ligações “azo” (- N=N -), monoazo, diazo, triazo, tetrazo ou poliazo; associados com um ou mais grupos aromáticos (Coulson, 1980).

Os corantes “azo” são facilmente reduzidos por íons metálicos ou agentes redutores fortes como o dióxido de enxofre, estando sujeitos ao esmaecimento com o tempo. Também são suscetíveis a oxidação por luz ultravioleta. Os corantes certificados pertencentes às outras classes são mais resistentes a redução química. Entretanto, FD&C Blue N° 2 e FD&C Red N° 3 são facilmente oxidados pela luz ultravioleta e esmaecem rapidamente (Newsome, 1990).

Os corantes azo contendo o grupo pirazolona (azo pyrazol) não é um azo verdadeiro, mas um tautômero ceto-hidrazina (Ghorpade et al., 1995).

1.3.2 Corantes triarilmetanos

Os corantes triarilmetanos apresentam coloração brilhantes e grande capacidade tintorial. O cromóforo consiste de um carbono central ligado à três anéis aromáticos geralmente com hidroxila, amino ou amino substituintes na posição *p* (*para*) que funcionam como auxocromos (Coulson, 1980).

1.3.3 Corantes xantênicos

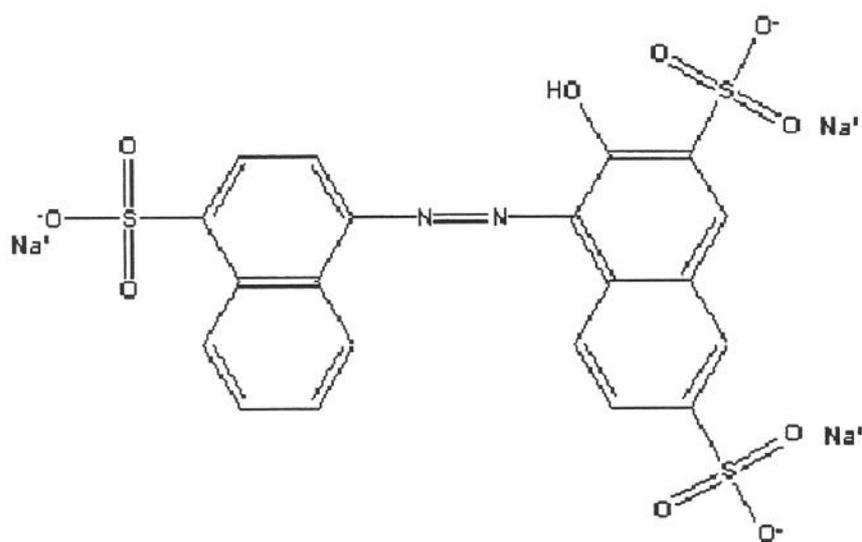
Possuem o xanteno como cromóforo com grupos amino ou hidroxílico na posição *m* (*meta*) com a respectiva ponte de oxigênio. A eritrosina é o único corante xantênico permitido para uso em alimentos e apresenta fluorescência (Coulson, 1980).

1.3.4 Corantes indigos

O grupo indigóide é baseado no indigo natural sendo que a cor é resultante da ressonância hídrida da estrutura ou estrutura tetrapolar (Coulson, 1980).

1.4 PRINCIPAIS CORANTES ARTIFICIAIS UTILIZADOS EM ALIMENTOS NO BRASIL

1.4.1 FD&C Red N° 2

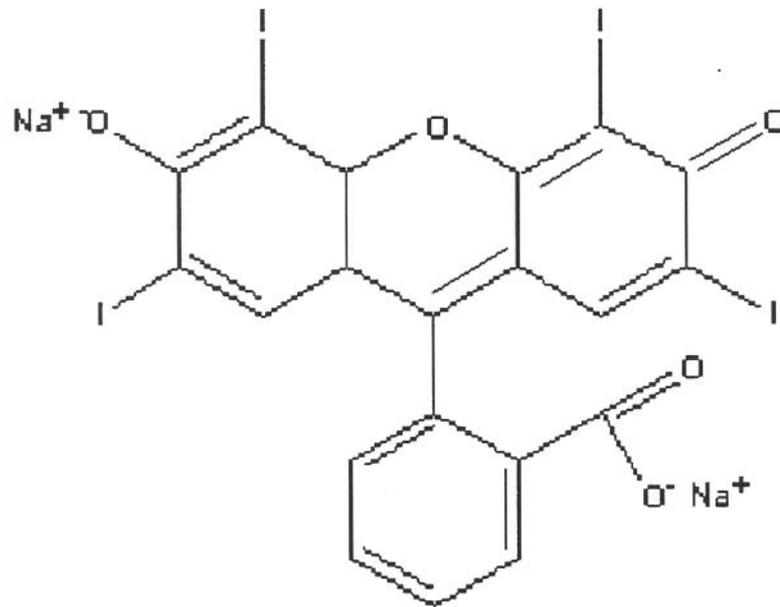


FD&C Red N° 2 (amaranto, Color Index N° 16185) pertence ao grupo monoazo dos corantes sintéticos.

Corante em pó de coloração marrom-avermelhada. Apresenta absorção máxima em água a 522,5nm. A solubilidade em água é de 7,20 g/100mL H₂O, apresentando em solução aquosa coloração vermelho viva. Pouco solúvel em álcool. Ocorre perda da coloração na presença de bissulfito. O ácido clorídrico não altera a intensidade da coloração, enquanto que o hidróxido de sódio aumenta sua intensidade (Merck Index, 1989).

Os primeiros estudos fisiológicos com amarantho fornecido acima de 5% do total da dieta não causou alterações patológicas, mutagenicidade ou aumento na incidência de tumor em ratos (Cook et al., 1940; Willheim e Ivy, 1953; Mannel et al., 1958). Estudos de 7 anos de duração, realizados pelo FDA, também não apresentaram alterações patológicas em cães quando o corante foi adicionado em níveis de 2% (U.S. FDA, 1974). Vários estudos similares realizados em camundongos, ratos, coelhos, gatos e cães, não apresentaram significativos efeitos teratogênicos e reprodutivos (WHO, 1975). Dois estudos relataram efeitos carcinogênicos e embriotóxico em ratos alimentados com 0,8 - 1,6% de amarantho na dieta (Baigusheva, 1968; Andrianova, 1970). Em 1971, o FDA iniciou estudos próprios para confirmar a embriotoxicidade do amarantho em ratos. O estudo indicou estatisticamente um aumento significativo na variedade e quantidade de neoplasma malignos em ratas.

1.4.2 FD&C Red N° 3



FD&C Red N° 3 (eritrosina, Color Index N° 45430) pertence ao grupo xantênico dos corantes sintéticos.

Corante em pó de coloração marrom. Apresenta absorção máxima em água a 525nm e a 531nm em álcool 95%. Solúvel em água apresentando coloração vermelho cereja. Solúvel em álcool, apresentando coloração vermelho com leve fluorescência em álcool à 95%. A adição de ácido clorídrico em soluções aquosas do corante produz um precipitado marrom amarelado, enquanto que o hidróxido de sódio produz um precipitado vermelho na presença de excesso de reagente (Merck Index, 1989).

Nos Estados Unidos, o FD&C N° 3 foi aprovado para uso em alimentos desde 1907. Com exceção dos estudos realizados pelo

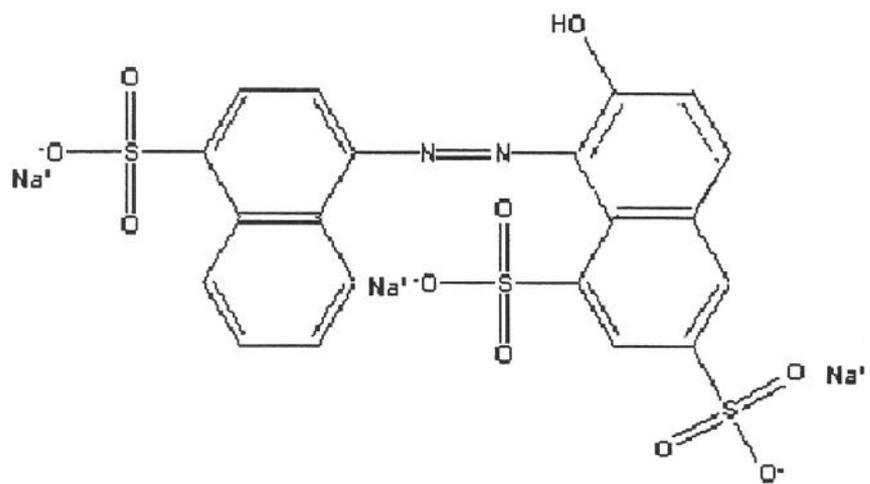
“International Research and Development Corporation (IRDC), a maioria dos estudos crônicos e subcrônicos realizados em ratos, camundongos e cães indicaram que a eritrosina não é carcinogênica. Um estudo realizado pelo IRDC (1982), solicitado pelo FDA, indicou efeitos adversos no útero e desenvolvimento de tumores na tireóide em ratos alimentados com dietas contendo 4% de eritrosina. Entretanto, não foi observado efeitos adversos com níveis de 0,1; 0,5; e 1% de corante na dieta.

Estudos subcrônicos indicaram que a eritrosina inibe a conversão de tiroxina em triiodotironina, resultando em aumento da secreção de tirotropina pela glândula pituitária; resultando em aumento da estimulação da tireóide e formação de tumor. Não foi evidenciado a formação de tumor em ratos machos na faixa de 0,5% (302 mg/Kg de peso corporal/dia). Entretanto, estudos em seres humanos não foram eficientes para identificar qualquer efeito adverso devido a ingestão do corante. (Anderson et al., 1964; Bora et al., 1969).

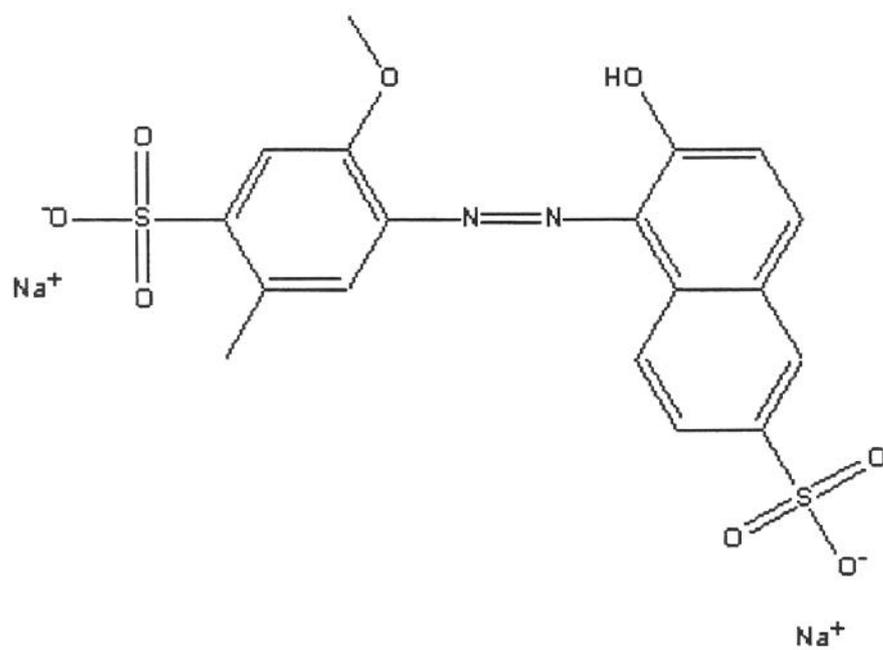
A eritrosina foi implicada na modificação de processo comportamental (neurotoxicidade). Muitos pesquisadores estudaram o efeito deste corante na liberação de neurotransmissor e transferência de ferro pelas células das membranas; entretanto, não houveram evidências conclusivas que pudessem relacionar o corante e os possíveis efeitos comportamentais adversos (Swanson e Logan, 1980; Augustine e Levitan, 1983; Sibergeld et al., 1983; Vorhees et al., 1983; Kantor et al., 1984).

1.4.3 FD&C Red Nº 4

PONCEAU 4R (Color Index Nº 16255) pertence ao grupo monoazo dos corantes sintéticos.



1.4.4 FD&C Red N° 40



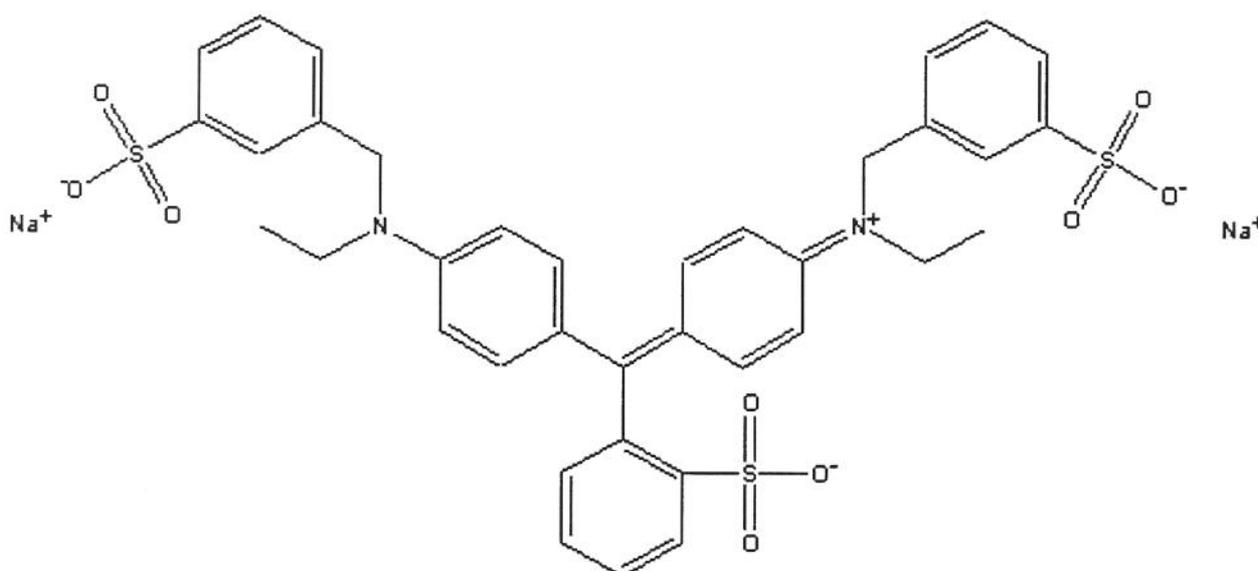
FD&C Red N° 40 (vermelho 40, Color Index N° 16035) pertence ao

grupo monoazo dos corantes sintéticos.

Corante em pó de coloração vermelho escura. A solubilidade em água a 25°C é de 22,5% e em álcool à 50% é de 1,3% (Merck Index, 1989).

Nos Estados Unidos, o FD&C N° 40 foi aprovado para uso em alimentos em 1971. Órgãos canadenses concluíram que o relatório submetido pelo produtores para suportar a segurança do produto foram inadequadas (IFT, 1986). Estudos posteriores indicaram que o corante é seguro para uso em alimentos, tendo seu uso aprovado no Canadá, entretanto seu uso não é permitido em vários países.

1.4.5 FD&C Blue N° 1



FD&C Blue N° 1 (azul brilhante, Color Index N° 42090) pertence ao grupo trifenilmetano dos corantes sintéticos.

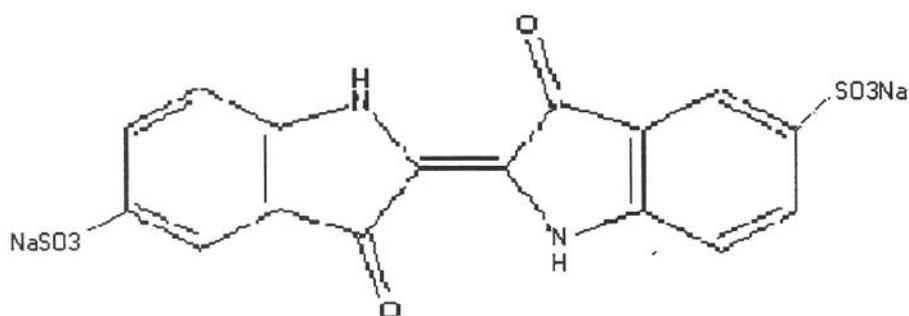
Corante em pó ou granulos de coloração violeta avermelhada com brilho metálico. Apresenta absorção máxima em água a 630nm. Solúvel

em água e etanol e insolúvel em óleos vegetais (Merck Index, 1989).

Nos Estados Unidos, o FD&C Blue N° 1 foi aprovado para uso em alimentos em 1929. Após ter sido testado para toxicidade crônica e passado pelos estudos de teratologia e reprodução, foi incluído na lista permanente de corantes para uso em alimentos nos Estados Unidos.

Estudos recentes tem mostrado que os efeitos do FD&C Blue N°1 são dependentes da concentração. Estudo com grupo de camundongo, 60 de cada sexo, foram alimentados com níveis do corante a 0,5; 1,5 e 5%. O tempo máximo de exposição foi 104 semanas para ambos os sexos, e o nível para que não fosse observado os efeitos (perda de peso e redução do tempo de vida foi estimado em 0,5% do corante sobre a dieta (Borzelleca et al., 1990).

1.4.6 FD&C Blue N° 2

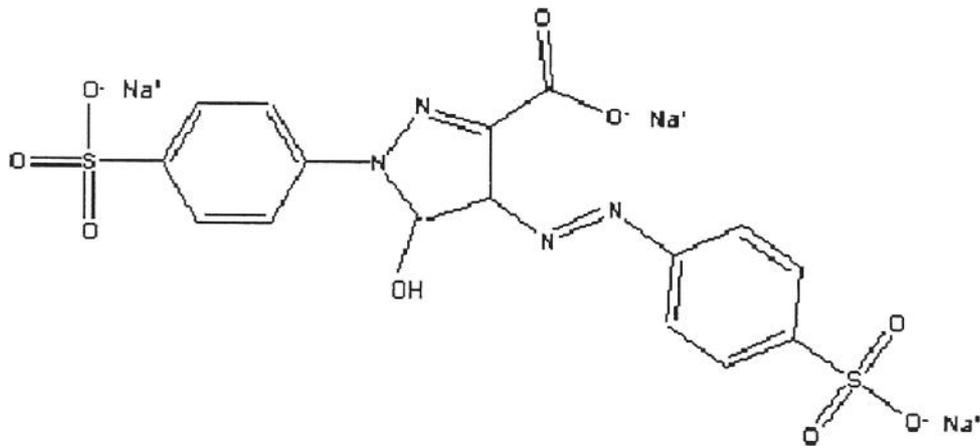


FD&C Blue N° 2 (indigotina, Color Index N° 73015) pertence ao grupo indigóide dos corantes sintéticos.

Corante em pó de coloração azul escura; sensível a luz e aos agentes oxidantes. A coloração é destruída na presença de ácido nítrico. Um grama dissolve e aproximadamente 100 mL de água a 25°C, levemente solúvel em álcool e praticamente insolúvel na maioria dos outros solventes orgânicos (Merck Index, 1989).

Nos Estados Unidos, o FD&C N° 3 foi aprovado para uso em alimentos em 1906.

1.4.7 FD&C Yellow N° 5



FD&C Yellow N° 5 (tartrazina, Color Index N° 19140) pertence ao grupo monoazo dos corantes sintéticos, possuindo um anel pirazólico em

sua estrutura.

Corante em pó de coloração amarelo alaranjado. Totalmente solúvel em água, não apresentando alteração da coloração na presença de ácido clorídrico, porém sofre alteração para avermelhada na presença de hidróxido de sódio. (Merck Index, 1989).

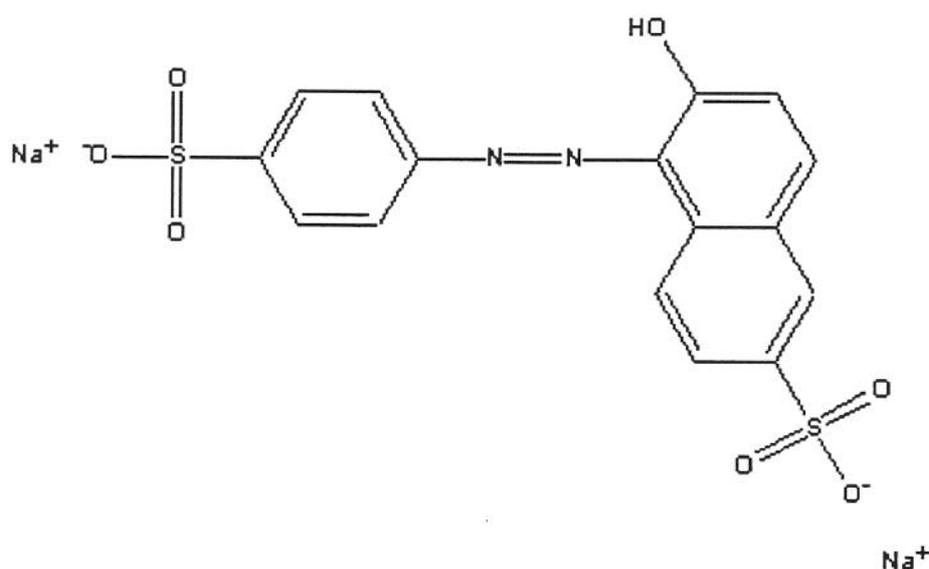
FD&C Yellown N° 5 é conhecido por causar reações alérgicas em poucos indivíduos sensíveis (Kevansky e Kingsley, 1964; Chafee e Settipane, 1967; Mitchell, 1971; Lockey, 1972). Também foi relacionado com a indução de asma (Chafee e Settipane, 1967). O corantes “azo” tem sido relacionados em reações alimentares envolvendo mecanismos imunológicos como urticária (Chaffe e Settipane, 1967; Weber et al., 1979). Foi notado reações não imunológicas como broncoespasmo em indivíduos asmáticos intolerantes a aspirina e com urticária crônica (Gerber et al., 1979). Em indivíduos sensíveis os sintomas incluem asma e rinite, sendo que aparecem com maior frequência em indivíduos que sofrem de asma alérgica e intolerantes à aspirina que o público em geral (Miller, 1982).

Estudos com a população nos Estados Unidos, indicaram que de aproximadamente um milhão de indivíduos sensíveis à aspirina, 15% são sensíveis a tartrazina (Chafee e Settipane, 1974; Settipane et al., 1974).

Estudos sugeriram que as reações à tartrazina representam uma idiossincrasia individual e que a propensão para reagir à tartrazina e outros corantes naturais e artificiais são provavelmente determinados geneticamente (Loblay e Swain, 1985). Existe suspeita que as impurezas presentes no corante estejam envolvidas nos mecanismos de reações adversas. A tartrazina não apresenta ser mutagênica (Brown e Dietrich, 1983). Após uma extensa revisão de todas evidências científicas dos testes

realizados para a aprovação da tartrazina para uso em alimentos, o FDA concluiu que o corante não é carcinogênico nem genotóxico. Aprovado para uso em alimentos nos Estados Unidos desde 1916, a tartrazina é usada em 60 países no mundo. O FDA requer a declaração deste corante na embalagem (Fed. Regist., 1979 e 1985).

1.4.8 FD&C Yellow N° 6



FD&C Yellow N° 6 (amarelo crepúsculo, Color Index N° 15985) pertence ao grupo monoazo dos corantes sintéticos.

Corante em cristais de coloração vermelho alaranjado. Apresenta absorção máxima em solução de acetato de amônio 0,02N a 480nm. Solúvel em água e levemente solúvel em etanol. (Merck Index, 1989).

O FD&C N°6 é similar ao amaranto e tartrazina, e também causa reações alérgicas e induz urticária em indivíduos sensíveis. Em um estudo realizado com ratos, foi observado lesões renais proliferativas em ratos

fêmeas quando o corante foi adicionado à 5% na dieta. Como a alta concentração poderia resultar numa média de consumo diário de 3926 mg/Kg/dia, enquanto que o consumo em seres humanos deste corante é aproximadamente 0,15 mg/Kg/dia (Newsome, 1990). O FDA submeteu o relatório ao “National Toxicology Program” (NTP) para revisão. Um estudo anterior realizado pelo NTP com ratos que receberam uma concentração menor de corante em suas dietas (1,25 e 2,5%) por um período de 24 meses não apresentaram efeitos nocivos relacionados ao consumo do corante (NTP, 1985). Após revisão do relatório fornecido pelo FDA, o comitê do NTP, concluiu que o FD&C N° 6 não é carcinogênico.

1.5 CONTROLE DE QUALIDADE DOS CORANTES PARA ALIMENTOS:

O controle de qualidade na fabricação de corantes é imprescindível, sendo que as matérias-primas utilizadas, o processo de fabricação e o produto final devem ser rigorosamente controlados. O controle de qualidade utilizando métodos analíticos clássicos, baseados na gravimetria e titrimetria, ainda são utilizados, mas foram suplementados por técnicas mais sofisticadas e bem estabelecidas como espectrometria no ultravioleta, visível e infravermelho, ressonância magnética nuclear, fluorescência de raio X, espectrofotometria de absorção atômica (Coulson, 1980).

O uso de técnicas de separação, incluindo cromatografia gasosa, cromatografia em papel, coluna aberta, em camada delgada e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são importantes para a identificação e quantificação utilizando padrões, visto a natureza complexa dos produtos e a necessidade de especificar níveis muito baixo de impurezas.

1.6 NECESSIDADES DE PESQUISAS FUTURAS

Nenhum corante é completamente adequado para uso em toda a grande variedade de aplicações em alimentos e nas diversas condições de processamento utilizadas. Então, a pesquisa necessita continuar para o desenvolvimento de novos e melhores corantes naturais e sintéticos. Neste aspecto, corantes poliméricos não absorvíveis, não metabolizados são considerados promissores (Nooman e Meggos, 1980; Newsome, 1990). Estes corantes podem ser produzidos pela fixação do cromóforo em polímero com peso molecular elevado o suficiente para prevenir a migração através da mucosa do trato gastrointestinal. A não absorção, estabilidade, capacidade tintorial e as aplicações potenciais dos corantes poliméricos tem recebido considerável atenção durante a última década (Santhanakrishnan, 1981; Newsome, 1990). Os estudos de longa duração para avaliação toxicológica destes corantes tem apresentado resultados satisfatórios.

1.7 TABELAS

Tabela 1: Características espectrofotométricas dos principais corantes artificiais em solução aquosa, permitidos no Brasil (Normas Analíticas IAL, 1976):

Corante	Nº de código (Color Index)	E ^{1%} _{1cm} no máximo (visível)	Absorção visível (máximo)	Absorção ultravioleta (máximo)		
Tartrazina	19140	536,6	426	257	-	-
Amarelo crepúsculo	15985	564,1	481	310	228	-
Azul brilhante	42090	1840,0	630	308	-	-
Azul indigotina	73015	449,3	610	287	250	-
Amaranto	16185	436,0	519	330	250	-
Eritrosina	45430	1130,0	524	310	260	-
Ponceau 4R	16255	442,5	507	332	245	220
Vermelho 40	16035	477,9	505	315	283	230

Tabela 2: Estabilidade em diferentes valores de pH dos principais corantes artificiais permitidos no Brasil (Handbook of US Colorants):

Corante	Nº no EEC	pH = 3	pH = 5	pH= 7	pH = 8
Tartrazina	E102	SA	SA	SA	SA
Amarelo crepúsculo	E110	SA	SA	SA	SA
Azul brilhante	E280	LA	MLA	MLA	MLA
Azul indigotina	E132	AA	AA	CA	AC
Amaranto	E123	-	-	-	-
Eritrosina	E127	I	I	SA	SA
Ponceau 4R	E124	-	-	-	-
Vermelho 40		SA	SA	SA	SA

I = insolúvel; SA= sem alteração significativa; LA= leve alteração (esmaecimento após 1 semana); MLA= alteração muito leve (esmaecimento após 1 semana); AA= apreciável alteração (esmaecimento após 1 semana); CA= considerável alteração (esmaecimento após 1 semana); AC= alteração completa (esmaecimento completo); - : dado não disponível.

Tabela 3: Estabilidade em diferentes meios dos principais corantes artificiais permitidos no Brasil (Handbook of US Colorants):

Corante	10% ácido cítrico	10% de ácido fumárico	10% de sacarose
Tartrazina	SA	SA	SA
Amarelo crepúsculo	SA	SA	SA
Azul brilhante	SA	SA	SA
Azul indigotina	AC	CA	LA
Amaranto	-	-	-
Eritrosina	I	I	SA
Ponceau 4R	-	-	-
Vermelho 40	SA	SA	SA

I = insolúvel; SA= sem alteração significativa; LA= leve alteração (esmaecimento após 1 semana); MLA= alteração muito leve (esmaecimento após 1 semana); AA= apreciável alteração (esmaecimento após 1 semana); CA= considerável alteração (esmaecimento após 1 semana); AC= alteração completa (esmaecimento completo); -: dado não disponível.

1.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, C. J., KEIDING, N. R., BRINK NIELSON, A. False elevation of serum protein-bound iodine caused by red colored drugs or food. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 16, p. 249 – 259, 1964.
- ANDRIANOVA, M. M. Carcinogenous properties of food pigments: maranth, SX Purple and 4R Purple. **Vop. Pitan.**, v. 29, p. 61 – 65, 1970.
- AUGUSTINE, G. J., LEVITAN, H. Neurotransmitter release from a vertebrate neuromuscular synapse affected by a food dye. **Science**, v. 207, p. 1489 – 1490, 1980.
- AUGUSTINE, G. J., LEVITAN, H. Neurotransmitter release and nerve terminal morphology at the frog neuromuscular junction affected by the dye erythrosine. **Br. J. Physiol.**, v. 334, p. 47 - 63, 1983.
- BORA, S. S., RADICHEVICH, I., WERNER, S. C. Artifactual elevation of PBI from iodinated dyes used to stain medical capsules pink. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 29, p. 1269 – 1271, 1969.
- BORZELLECA, J. F., DEPUKAR, K., HALLAGAN, J. B. Lifetime toxicity/carcinogenicity studies of brilliant blue in rats and mice. **Food Chem. Toxicol.**, v. 28, p. 221 – 234, 1990.
- BROWN, J. P., DIETRICH, P. S. Mutagenicity of selected sulfonated azo dyes in the salmonella microsome assay. Use of aerobic and anaerobic activation procedures. **Mutation Res.**, v. 116, p. 304 – 315, 1983.
- CHAFEE, F. H., SETTIPANE, G. A. Asthma caused by FD&C approved dyes. **J. Allergy**, v. 40, p. 65 – 72, 1967.

- CHAFEE, F. H., SETTIPANE, G. A. Asthma caused by FD&C approved dyes. **J. Allergy**, v. 40, p. 65 – 72, 1967.
- COOK, H. W., HEWETT, C. L., KENNAWAY, E. L., KENNAWAY, N. M. Effects produced in the liver of mice by zao naphthalenes and related compounds. **Am. J. Cancer**, v. 40, p. 62 – 77, 1940.
- COULSON, J. Synthetic organic colours for food. **In: Developments in food colours**, Walford, J. (Ed) Appl. Sc. Publ. Ltd, London, 1980.
- GERBER, J. G., PAYNE, N. A., OLEZ, M. S., OATES, J. A. Tartrazine and the prostaglandin system. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 63, p. 289 – 294, 1979.
- GHORPADE, V. M., DESHPANDE, S. S., SALUNKHE, D. K. Food colors. **In: Food additive toxicology**, Maga, J. A, Tu, A. T. (Eds.) Marcel Dekker, Inc., New York, 1995.
- IFT. **Food colors**. A scientific status summary by the Institute of Food Technologists Expert Panel on Food Safety and Nutrition. Institute of Food Technology, Chicago, 1986.
- IRDC. **Long-term dietary toxicity / carcinogenicity study in rats. Final reports**. International Research and Development Corporation. Ottawa, Canadá, 1982.
- KANTOR, M. A., TROUT, J. R., LaCHANCE, P. A. Food dyes produce minimal effects on locomotor activity and vitamin B-6 levels in post-weanling rats. **J. Nutr.** v. 114, p. 1402 – 1412, 1984.
- KEVANSKY, H., KINGSLEY, H. J., Fixed drug eruption caused by dyes. **S. Afr. Med.**, v.88, p. 216, 1964.

- LOBLAY, R. H., SWAIN, A. R. Adverse reactions to tartrazine. **Food Technology**, v. 37, p. 508 – 510, 1985.
- LOCKEY, S. D. Sensitizing properties of food additives and commercial products. **Ann. Allergy**, v. 30, p. 638 – 641, 1972.
- MANNELL, W. A. Further investigations on production of liver tumors in rats by Ponceau 3R. **Food Cosmet. Toxicol.**, v. 2, p. 169 – 174, 1964.
- MANNELL, W. A., GRICE, H. C., LU, F. C., ALLAMARK, M. G. Chronic toxicity studies on food colors. Observations on the toxicity of tartrazine, amaranth and sunset yellow in rats. **J. Pharmacol.**, v. 10, p. 625 – 634, 1958.
- MILLER, K. Sensitivity to tartrazine. **Br. Med. Journal**, V. 285, P. 1597 – 1598, 1982.
- MITCHELL, J. C. The skin and chemical additives in foods. **Arch. Dermatol.**, v. 104, p. 329 – 330, 1971.
- NEWSOME, R. L. Natural and synthetic coloring agents. **In: Food additives**, A. L. Branen, P. M. Davidson, S. Salminen (Eds) Marcel Dekker, New York, 1990.
- NOONAN, J. E., MEGGOS, H. Synthetic food colors. **In: Handbook of food additives**, v. 2, 2. ed., T. E. Furia (Ed) CRC Press, Florida, 1989.
- SANTHANAKRISHNAN, T. S. Food colors and their future. **Ind. Food Packer**, v. 35, p. 19 – 22, 1981.
- SETTIPANE, G. A., CHAFEE, F. H., KLEIN, D. E. Aspirin intolerance. A prospective study in an atopic and normal population. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 53, p. 200 – 204, 1974.

- SILBERGELD, E. K., LAFFERMAN, J. A., FINKEL, T. Neurochemical approaches to toxicity testing artificial food dyes. **NATO Conf. Ser.**, 1, 5^A, 1983.
- SWANSON, J. M., KINSBOURNE, M. Food dyes impair performance of hyperactive children on a laboratory learning test. **Science**, v. 207, p. 1485 – 1487, 1980.
- SWANSON, J. M., LOGAN, W. R. Effects of food dyes on neurotransmitter accumulation in rat brain homogenate and on the behavior of hyperactive children. **Methods Predict. Toxic.**, v. 182, p. 4, 1980.
- TANNAHILL, R. Food in history. **Stein and Day**, New York, 1973.
- TAYLOR, A. J. Natural colors in food. **In: Developments in food color – 2**, J. Walford (ed.), Elsevier, London, 1984.
- U.S. FDA. Termination of provisional listing and certification of FD&C Red No. 2. **Fed. Reg.**, v. 41, n. 28, p. 5823 – 5825, 1974.
- U.S. FDA. FD&C Red No. 2. Denial of petition for permanent listing; final decision. **Fed. Reg.**, v. 25, Jan, p 6252, 1980.
- VORHEES, C. V., BUTCHER, R. E., BRUNNER, R. L., WOOTEN, V., SOBOTKA, T. J. A developmental toxicity and psychotoxicity evaluation of FD&C Red dye No. 3 (erythrosine) in rats. **Arch. Toxicol.** v. 53, p. 253 – 264, 1983.
- WEBER, R. W., HOFFMAN, M., RAINE, D. A., NELSON, H. S. Incidence of bronchoconstriction due to aspirin, azo dyes, noazo dyes and preservatives in a population of perennial asthmatics. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 64, p. 32 – 37, 1979.

WHO. Toxicological evaluation of some colors, enzymes, flavor enhancers, thickening agents and certain other food additives. **Food additive series**, n. 6, World Health Organization, Geneva, 1975.

WILLHEIM, R. IVY, A. C. A preliminary study concerning the possibility of dietary carcinogenesis. **Gastroenterology**. v. 23, p. 1 – 19, 1953

1.9 ANEXO

RESOLUÇÃO Nº. 389 DE 5 DE AGOSTO DE 1999.

REGULAMENTO TÉCNICO QUE APROVA O USO DE ADITIVOS ALIMENTARES ESTABELECIDO SUAS FUNÇÕES E SEUS LIMITES MÁXIMOS PARA A CATEGORIA DE ALIMENTOS
16 - BEBIDAS - SUBCATEGORIA 16.2.2. - BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS GASEIFICADAS E NÃO GASEIFICADAS

ATRIBUIÇÃO DE ADITIVOS CATEGORIA 16 - BEBIDAS

Número INS	FUNÇÃO/Nome	Limite máximo g/100g
16.2.2. BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS GASEIFICADAS E NÃO GASEIFICADAS		
16.2.2.1. PRONTAS PARA O CONSUMO		
	CORANTE	
100i	Cúrcuma, curcumina	0,015 (como Curcumina)
101i	Riboflavina	<i>quantum satis</i>
101ii	Riboflavina 5'-fosfato de sódio	<i>quantum satis</i>
102	Tartrazina	0,01
110	Amarelo crepúsculo	0,01
120	Carmim/cochonilha/ácido carmínico	0,01
122	Azorrubina	0,01
123	Amaranto, Bordeaux S	0,005
124	Ponceau 4R	0,005
127	Eritrosina	0,001
129	Vermelho 40	0,01
131	Azul patente V	0,005
132	Indigotina	0,01
133	Azul brilhante FCF	0,01
140i	Clorofila	<i>quantum satis</i>
140ii	Clorofilina	<i>quantum satis</i>
141i	Clorofila cúprica	<i>quantum satis</i>
141ii	Clorofilina cúprica	<i>quantum satis</i>
143	Verde rápido FCF	0,005
150 ^a	Caramelo I – simples	<i>quantum satis</i>
150b	Caramelo II - processo sulfito cáustico	<i>quantum satis</i>
150c	Caramelo III - processo amônia	<i>quantum satis</i>

150d	Caramelo IV - processo sulfito-amônia	<i>quantum satis</i>
153	Carvão vegetal - fontes vegetais	<i>quantum satis</i>
160ai	Caroteno: beta - caroteno sintético	<i>quantum satis</i>
160aii	Carotenos naturais (alfa, beta e gama)	<i>quantum satis</i>
160b	Urucum/bixina/norbixina	0,005 (como Bixina)
160c	Páprica/capsorubina/capsantina	<i>quantum satis</i>
160d	Licopeno	0,01
160e	Beta-Apo-8'carotenal	0,01
160f	Éster etílico ou metílico do ácido beta-apo-8'carotenóico	0,01
162	Vermelho de beterraba, betanina	<i>quantum satis</i>
163i	Antocianinas	<i>quantum satis</i>
171	Dióxido de titânio	<i>quantum satis</i>
16.2.2.2. PREPARADOS LÍQUIDOS PARA BEBIDAS GASEIFICADAS E NÃO GASEIFICADAS		
Admitem-se as mesmas funções que para 16.2.2.1 e os aditivos para cada função em quantidades tais que o produto pronto para o consumo contenha no máximo os limites estabelecidos para a categoria 16.2.2.1.		
16.2.2.3. POS PARA O PREPARO DE BEBIDAS GASEIFICADAS E NÃO GASEIFICADAS		
Admitem-se as mesmas funções que para 16.2.2.1 exceto conservadores, e os aditivos para cada função em quantidades tais que o produto pronto para o consumo contenha no máximo os limites estabelecidos para a categoria 16.2.2.1. Admite-se também o uso de antiuementantes/antiaglutinantes, como se indica a seguir:		
	ANTIUMENTANTE/ANTIAGLUTINANTE	
Todos os autorizados como BPF		<i>quantum satis</i>
341iii	Fosfato tricálcico, fosfato tribásico de cálcio, ortofosfato tricálcico	1,0

(1) Bebida gaseificada

(2) Bebida não gaseificada

CAPÍTULO 2

**MÉTODOS ANALÍTICOS RELEVANTES
PARA A DETERMINAÇÃO DE
CORANTES ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS
POR ESPECTROFOTOMETRIA VISÍVEL E
CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA**

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

2.1. INTRODUÇÃO

A adição de produtos químicos aos alimentos não é um processo moderno de sua conservação. O homem pré-histórico, com a descoberta do fogo, criou o processo de defumação, usado até hoje na preservação de certos alimentos. Depois, ele aprendeu a utilizar sal na conservação de carnes, condimentos para melhorar a palatabilidade de certos alimentos e a realizar fermentações de produtos vegetais e animais (Gava, 1982).

Hoje em dia, graças aos grandes avanços da indústria química, a indústria alimentícia tem-se beneficiado de novas substâncias que são adicionadas ao alimento para conservar, melhorar a cor, o aroma, a textura, e, inclusive, torná-lo mais nutritivo (Gava, 1982).

As três características principais dos alimentos são a cor, o sabor e a textura, sendo que a cor é considerado o atributo sensorial mais marcante. A cor é capaz de estimular o consumo dos alimentos, sendo portanto, um parâmetro importante no controle da qualidade nas indústrias de alimentos (Guimarães, 1998).

Dentre os aditivos utilizados em alimentos, os corantes são os que apresentam as maiores controvérsias. A indústria de alimentos utiliza corantes artificiais ou sintéticos na maioria dos produtos, sendo a uniformidade na coloração, bom poder tintorial, variedade de cores e grande disponibilidade no mercado as principais vantagens em relação aos corantes naturais. Porém existem desvantagens que os corantes naturais não apresentam, como por exemplo reações alérgicas, tipo asma, rinite e urticária (Guimarães, 1998).

Frente a isto é de grande importância que os corantes artificiais

presentes nos alimentos obedeçam a legislação no que diz respeito ao tipo, concentração máxima permitida e combinações.

Para que este controle possa ser realizado é necessário métodos analíticos para a identificação e quantificação de corantes em alimentos, nos laboratórios de controle da qualidade, desenvolvimento e fiscalização.

Baseado nas características cromóforas dos corantes artificiais, os métodos espectrofotométricos podem ser usados para análises qualitativas e quantitativas. Porém, dependendo da mistura de corantes presentes em uma amostra, pode ocorrer sobreposições espectrais fazendo com que a medida direta da absorvância não permita determinar a concentração de cada um (Berzas-Nevado et al., 1995).

Os métodos cromatográficos tem sido utilizados para a análise de corantes em alimentos, sendo que estas técnicas são adequadas principalmente quando as amostras possuem muitos corantes e são considerados métodos padrões. Entretanto, levando em consideração outros fatores como rapidez, simplicidade e custo, as análises espectrofotométricas utilizando cálculos matemáticos, espectros das derivadas e análise de multicomponentes são consideradas uma boa maneira para determinar a concentração de corantes presentes em alimentos (Berzas-Nevado et al., 1995).

2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.2.1 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Kwisatkowsha-Puchniarz et al. (1997) desenvolveram um método para a identificação de corantes sintéticos em produtos farmacêuticos utilizando espectrofotometria. O método foi baseado nas características de absorvância máxima e cálculos de absortividade na região do ultravioleta e visível sem isolamento prévio dos corantes e apresentou vantagens em relação a identificação utilizando a cromatografia em camada delgada. Outro trabalho semelhante foi desenvolvido por Nevado et al. (1997) utilizando espectrofotometria para a determinação da mistura de três corantes alimentícios; eritrosina (E-127), amaranço (E-123) e tartrazina (E-102). A curvas de calibração foram linear até 14mg/L para a eritrosina e 28mg/L para tartrazina e amaranço. Os limites de detecção obtidos foram 0,052; 0,934 e 0,123mg/L para a eritrosina, tartrazina e amaranço, respectivamente. Os métodos foram baseados principalmente na aplicação direta da espectrofotometria.

Berzas-Nevado et al. (1993) desenvolveram um método para a determinação de amarelo de quinolina e tartrazina por espectrofotometria usando o espectro da primeira derivada em amostras de refrigerantes. As amostras foram diluídas em tampão acetato 0,5M (pH=4,9). As soluções foram filtradas (0,45 μ m) e os espectros da primeira derivada obtidos. Os resultados de quatro amostras analisadas foram considerados compatíveis com os obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, usando fase reversa. Em 1994, os mesmos autores desenvolveram um método para a

determinação de corantes em misturas binárias por espectrofotometria utilizando o espectro da primeira derivada. Os espectros em absorvância dos corantes (Ponceau 4R, Carmoisina ou Amaranço) dissolvidos em solução tampão de ácido acético 0,1M / acetato de sódio pH de 4,8, foram obtidos a 600nm/min., usando água como branco. As curvas de calibração foram lineares e os limites de determinação foram 1 e 90µg/L para o Ponceau 4R e Carmoisina, respectivamente. Os valores de recuperação foram 100,51% para o Ponceau 4R e 98,63% para a Carmoisina. O método foi aplicado para bebidas e sobremesas de gelatina de morango.

Outro método foi desenvolvido por Berzas-Nevado, para a determinação simultânea de amaranço, Ponceau 4R e ácido carmínico (E-123, E-124 e E-120, respectivamente) sem prévia separação. As curvas de calibração foram linear até 32mg/L para o amaranço e Ponceau 4R e 64 mg/L para o ácido carmínico. Os melhores comprimentos de onda estabelecidos para a determinação dos corantes foram 373nm para o ácido carmínico, 549,7nm para o amaranço e 561,5nm para o Ponceau 4R. Os resultados obtidos foram comparados com o obtidos usando cromatografia líquida de alta eficiência, sendo concluído que o método é adequado para a determinação dos três corantes misturados em produtos como sobremesas de gelatina e bebidas com sabor de morango. Estes métodos foram baseados principalmente na utilização da primeira e segunda derivada da espectrofotometria.

Lopez-De-Alba et al. (1996) desenvolveram um método analítico para a determinação de mistura binárias de corantes, utilizando um algoritmo matemático simples, sendo utilizado quatro equações obtidas da regressão linear das curvas de calibração: duas calibrações para cada componente em dois comprimentos de onda distintos. Os corantes avaliados foram tartrazina, amarelo crepúsculo, amaranço, eritrosina e vermelho de Allura,

sendo os resultados comparados com métodos espectrofotométricos utilizando derivada, indicando boa performance. O método desenvolvido foi aplicado na determinação de dois corantes em amostras de “Kool-Aid” com sabores artificiais de morango, cereja e abacaxi.

Um trabalho semelhante foi realizado por Ni & Gong (1997) que desenvolveram um método para a determinação simultânea de mistura de corantes alimentícios por espectrofotometria. Mistura de tartrazina, amarelo crepúsculo, ponceau 4R, amaranto e azul brilhante foram analisadas simultaneamente sem prévia separação química. Os dados obtidos foram processados por métodos quimiométricos, com mínimo quadrado clássico (CLS), regressão de componente principal (PCR), mínimos quadrados parciais (PLS) e fator de transformação iterativo (ITTFA), utilizando os espectros em absorvância normal, primeira e segunda derivadas. Foram avaliados dezesseis misturas de corantes com cinco combinações, sendo que o método por ITTFA apresentou melhor precisão que CLS, PCR e PLS e as calibrações baseadas nos dados de primeira derivadas proporcionou alguma vantagem para os quatro métodos quimiométricos, sendo o método considerado satisfatório para a determinação de corantes em muitos produtos alimentícios.

Capitan-Vallvey et al. (1998) desenvolveram um procedimento analítico para a determinação de corantes artificiais em alimentos por espectrofotometria de fase sólida utilizando calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS). Amostras de bebidas não alcoólicas foram filtradas e produtos sólidos e semi-sólidos (balas, gelatinas e aditivos) foram dissolvidos em água em ultrassom e as soluções filtradas. As amostras preparadas contendo 5 – 80µg de corantes alimentícios foram misturadas com HCl 0,5M, diluídas com água e equilibradas com Sephadex DEAE A-25 (pérolas em gel). As pérolas foram coletadas por

filtração, empacotadas em células de quartzo de 1mm e as células centrifugadas. As células foram utilizadas para a obtenção do espectro (400 – 800nm) em espectrofotômetro. Os dados, consistindo de leituras em intervalo de 0,2nm, resultando em 1987 pontos experimentais por espectro, foram submetidos a tratamento por PLS para a quantificação de tartrazina, ponceau 4R e amarelo crepúsculo nas amostras, sendo o desvio-padrão de 0,5 – 10,8%.

Berzas-Nevado et al. (1999) desenvolveram um método analítico para a determinação espectrofotométrica simultânea de tartrazina, azul patente V e carmina indigo por mínimos quadrados parciais (PLS) e regressão do componente principal (PCR). Soluções aquosas dos corantes foram misturas com tampão acetato 0,1M (pH=4,8) e diluído com água resultando em soluções contendo 0,8 – 20mg/L de tartrazina, 0,4 – 6 mg/L de azul patente V e 0,8 – 17,6mg/L de carmina indigo. Os espectros de absorção das soluções foram obtidos na região de 315 – 710nm e foram utilizados com base de dados para a aplicação dos métodos quimiométricos. Os modelos de calibração foram avaliados por validação interna (verificação da concentração das próprias soluções dos corantes utilizadas no teste), validação cruzada (através de parâmetros estatísticos que mostram a eficiência do modelo de calibração) e por validação externa de 19 misturas diferentes do três corantes. A recuperação foi de 93,5 – 102,1%, sendo que os dois métodos quimiométricos deram resultantes semelhantes podendo ser aplicados para a determinação de corantes em preparações alimentícias.

Os mesmos autores descreveram quatro métodos espectrofotométricos para a determinação simultânea de três corantes para alimentos. Dois métodos foram baseados em técnicas de derivadas; sendo, primeira derivada e relação de espectros da derivada e os outros

dois baseados em técnicas de calibração multivariada; mínimos quadrados parciais e regressão do componentes principal. Todos os métodos foram realizados sem etapa de separação e utilizando dados espectrais de 315 – 710nm. Os métodos foram validados pela análise de misturas sintéticas contendo 2,4 – 17,6mg/L tartrazina, 1,6 – 5,6mg/L de azul patente V e 3,2 – 17,5mg/L de carmina indigo. Os métodos foram aplicados na determinação de corantes para confeitaria, cerejas em caldas e gelatina sabor limão. Os métodos espectrofotométricos desenvolvidos neste trabalho podem ser recomendados devido a sua simplicidade e os resultados satisfatórios obtidos na análise de misturas sintéticas e produtos alimentícios comerciais. Foram obtidos bons resultados para os corantes analisados, sendo a precisão dos métodos checas com nível de confiança de 95%.

Berzas-Nevado et al. (1999) descreveram um método para a determinação simultânea de amaranço, ponceau 4R, vermelho alura e vermelho 2G por espectrofotometria usando técnicas quimiométricas (PLS e PCR). As amostras foram solubilizadas em uma mistura de etanol (25%) e tampão de ácido acético 1M/ acetato de sódio com pH de 4,5. O método proposto após otimização dos parâmetros quimiométricos foi validado com amostras sintéticas e aplicados a bebidas.

Programas computacionais podem ser utilizados para a determinação de corantes artificiais sem separação prévia como apresentado por Garcia Penalver et al. (1999) que avaliaram três métodos espectrofotométricos para a quantificação simultânea da mistura de tartrazina (E-102) e amarelo crepúsculo (E-110) em amostra de corantes alimentícios disponíveis no mercado espanhol, sendo comparado a performance de três programas computacionais para a determinação de multicomponentes (Varian ADLNEW52, MULT v3.0 Quimio e Varian Cary

Multicomponent Analysis). O programa MULT v3.0 Químio apresentou os melhores resultados, bem como pode ser aplicado para a determinação de um único corante.

2.2.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Bonato et al. (1992) avaliaram corantes artificiais para alimentos utilizados no Brasil através de um método simples e barato usando extração com clorofórmio / n-butanol e cetrimida como par-iônico. Após extração, os corantes foram separados por cromatografia em camada delgada (sílica gel G). Quando somente um corante foi observado através de cromatografia em camada delgada, a quantificação foi realizada através da espectrofotometria no visível. Nos casos de dois corantes, os mesmos foram separados previamente através da cromatografia em camada delgada e eluídos com cetrimida 0,1M e posterior quantificação por espectrofotometria.

Buyukpamukcu & Saldamli (1995) descreveram um método para determinação de corantes sintéticos em alimentos solúveis em água por cromatografia em camada delgada e espectrofotometria. Vários corantes sintéticos (eritrosina, ponceau 4R, amarelo crepúsculo, verde rápido, azul brilhante, tartrazina, amaranto, indigotina e azul patente) foram dissolvidos em solução de etanol à 70% (v/v) e aplicados sobre placas para cromatografia em camada delgada de sílica gel. A melhor fase móvel para separação dos corantes constituiu de isopropanol: amônia: água (10:1:1, v/v). Após o desenvolvimento cromatográfico, as manchas dos corantes foram removidas da placa cromatográfica e submetidas a eluição com

etanol à 70% e centrifugadas. Os extratos foram diluídos para um volume conhecido e quantificados através de métodos espectrofotométricos. A aplicabilidade do método testada em confeitos, mostrando ser rápido e preciso para a determinação de corantes sintéticos para uso em alimentos, especialmente para alimentos solúveis em água e refrescos.

Ribeiro-Cunha et al. (1996) desenvolveram um método qualitativo para a diferenciação de corantes de cor amarela e vermelha com estrutura semelhante em alimentos. Os corantes vermelho 40 e amarelo crepúsculo são permitidos para uso em alimentos no Brasil, mas o vermelho rápido E e o laranja GGN, que apresentam estruturas semelhantes, não são permitidos para uso. Alguns métodos qualitativos fáceis foram desenvolvidos para diferenciar o vermelho rápido E do vermelho 40 e o laranja GGN do amarelo crepúsculo. O vermelho 40 pode ser diferenciado do vermelho rápido E através de cromatografia em camada delgada utilizando sílica gel ou poliamida 6DF, por eletroforese em gel de poliacrilamida e por complexação com contra-íon, enquanto que o amarelo crepúsculo pode ser diferenciado do laranja GGN somente através da cromatografia em camada delgada usando fase reversa de sílica gel após impregnação com octanol. Os métodos apresentados são de baixo custo e relativamente simples quando comparado com cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Pelo levantamento bibliográfico realizado, os métodos analíticos para a determinação de corantes desenvolvidos recentemente são baseados principalmente na cromatografia líquida de alta eficiência, dos quais destacamos os trabalhos desenvolvidos por Naga & Koike (1990) que consistiu na separação de corantes alimentícios por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna Inertsil ODS-2 (25 cm x 4,6 mm) e metanol 30 - 80% contendo 1 - 100mM de metilguanidina como

fase móvel. O fluxo da fase móvel foi de 0,9mL/min e a detecção em 470, 540 ou 600nm. O tempo para a separação dos corantes foi de aproximadamente 15 minutos, sendo observado que na ausência da metilguanidina na fase móvel nenhum corante foi eluído em 30 minutos.

Greenway et al. (1992) desenvolveram um método analítico para a determinação de corantes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com diálise “on line” para a preparação das amostras. As amostras foram extraídas com tampão de acetato de amônio 0,04M de pH 7 (tampão A) e os extratos foram submetidos à diálise usando um sistema automático para tratamento da amostra). Uma alíquota do dialisado foi submetida a análise por CLAE, utilizando coluna cromatográfica Spherisorb S5 ODS 2 (15cm x 4,6mm e partículas com 5µm) e fase móvel composta de tampão A: metanol : água (2:1:2), fluxo de 1mL/min e detecção a 475 nm. A curva de calibração foi linear até 150mg/L para o amaranço, marrom FK e ponceau 4R e 200mg/L para o amarelo crepúsculo; os correspondentes limites de detecção foram 0,64; 1,58; 0,50 e 0,50mg/L. O método foi aplicado para a determinação de corantes artificiais em balas, geléias, gomas de frutas e refrescos.

O método para a determinação de amarelo crepúsculo e ponceau 4R em balas por cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvido por Zghal et al (1995), consistiu na solubilização das amostras em fase móvel e posterior centrifugação. O sobrenadante foi removido e o resíduo sólido foi submetido a uma nova extração com fase móvel. Os dois sobrenadantes foram misturados e avolumados com fase móvel. A determinação dos dois corantes foi realizada utilizando coluna Hypersil H125 ODS C18 (250mm x 4,6mm) e fase móvel constituída de metanol / tampão fosfato 75mM (pH=6,7) na proporção de 1:3. Foi utilizado fluxo de 1mL/min e detecção a 500nm.

Berzas-Nevado et al. (1997) desenvolveram um método analítico para determinação de seis corantes para alimentos: amarelo crepúsculo (E-110), ácido carmínico (E-120), carmoisina (E-122), amaranto (E-125), ponceau 4R (E-124) e eritrosina (E-127). Os corantes foram separados utilizando coluna Nova-Pack C18 (150mm x 3,9mm) e sistema gradiente para a eluição. As fase móveis foram compostas por metanol/tampão fosfato pH=7 (1:4) e contendo 5mM de brometo de tetrabutíamônio, denominado de solvente A e metanol/tampão fosfato pH=7 (4:1) e contendo 5mM de brometo de tetrabutíamônio, denominado de solvente B. O detector foi acertado em 520nm. As curvas de calibração foram baseadas na área do pico, sendo lineares na faixa de 8 – 40mg/L do E-120 e 2 – 10 mg/L para os outros corantes testados.

Rizova & Stafilov (1995) desenvolveram um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação de 12 corantes sintéticos (amaranto, vermelho allura, negro brilhante BN, azul brilhante E, carmoisina, eritrosina, indigotina, azul patente V, ponceau 4R, amarelo de quinolina, amarelo crepúsculo, tartrazina), usando Amerlite XAD-2 como fase estacionária. Para a eluição foi utilizado vários álcoois acidificados (isopropanol, n-propanol, n-butanol), sendo obtido recuperação de 81,5 – 100,2%. A faixa do limite de detecção foi 4 – 10ng. O método foi testado em bebidas carbonatadas, balas, gomas,etc.

Um método utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com interação iônica foi desenvolvido por Angelino et al. (1998) para a determinação de corantes usando fase reversa. Os parâmetros definidos para os corantes amaranto, tartrazina, amarelo crepúsculo e coccolina por CLAE foram coluna Bondapack ODS (300mm x 3,9mm de diâmetro interno), a 25 graus Celsius, fase móvel composta de fosfato de octilamônio 5mM em água:acetoneitrila (65:25) pH=6, fluxo de 1

mL/minuto e detector de arranjo de diodos (160 – 600 nm) ou coluna Spherisorb ODS-2 (250mm x 4,6mm de diâmetro interno), a 25 graus Celsius com fase móvel composta de fosfato de octilamônio 5mM em água:acetonitrila (66:24) pH=6 e detecção nas mesmas condições citadas anteriormente.

Existem vários métodos desenvolvidos para a separação cromatográfica de corantes sintéticos sendo que muitos são fundamentados na cromatografia em papel, em cromatografia de camada delgada, em cromatografia de par iônico, utilizando as condições de fase reversa, sendo realizados estudos dos fatores que afetam a retenção

As condições de fase móvel mais utilizadas são baseadas em solução tampão, entretanto o principal problema na determinação de corantes sintéticos em alimentos, muitas vezes, não é o processo de separação, mas como são isolados quantitativamente das matrizes, principalmente das mais complexas.

Os métodos tradicionais, como a adsorção em lã ou poliamida, tende a não ser quantitativo e podem conduzir a degradação do corante. Um meio de minimizar os efeitos da extração, tanto do alimento, como do extrato aquoso, podendo oferecer vantagens frente a situações normalmente encontradas é a diálise, sendo que esta técnica pode ser usada como um meio de preparação das amostras, permitindo a determinação de corantes sintéticos em alimentos ricos em açúcares, sendo a amostra submetida a extração, centrifugação ou filtração e posterior diálise.

Em relação a detecção e quantificação dos corantes por CLAE o método mais utilizado é através da detecção na região do visível com comprimento de onda variável utilizando várias corridas cromatográficas e

uma para cada comprimento dependendo do corante presente na amostra, ou utilizando um único comprimento de onda otimizado para os corantes presentes ou através de arranjo de diodos.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) pode apresentar algumas dificuldades para ser desenvolvida, estando sujeita à muitas variáveis a serem consideradas. Colunas diferentes podem produzir tempo de retenção diferente para o mesmo composto; fazendo que com a instalação de uma nova coluna os parâmetros sejam estabelecidos para a mesma. O método também precisa ser revisado com o tempo de uso da coluna cromatográfica.

2.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELINO, S., FELL, A. F., GENNARO, M. C. Development of system suitability tests for ion-interaction chromatography of colorants on reversed-phase packing materials. *Journal Chromatography*, v.797, n. 1-2, p. 65-74, 1998.
- BERZAS-NEVADO, J., RODRIGUES FLORES, J., VILLASENOR LLERENA, M. J., RODRIGUEZ FARINAS, N. Rapid spectrophotometric method to resolve ternary mixtures of tartrazine, quinoline yellow and patent blue V in commercial products. *Journal Analytical Chemistry*, v.365, n. 4, p. 383-388, 1999.
- BERZAS-NEVADO, J., GUIBERTEAU-CABANILLAS, C., CONTENTO-SALCEDO, A. M., MARTIN-VILLAMUELAS, R. Spectrophotometric simultaneous determination of Amaranth, Ponceau 4R, Allura red and Red 2G by partial least-squares and principal component regression multivariate calibration. *Analytical Letter*, v.32, n. 9, p. 1879-1898, 1999.
- BERZAS-NEVADO, J., GUIBERTEAU-CABANILLAS, C., CONTENTO-SALCEDO, A. M. A reverse phase HPLC method to determine six food dyes using buffered mobile phase. *Analytical Letter*, v.31, n. 14, p. 2513-2535, 1998.
- BERZAS-NEVADO, J., GUIBERTEAU-CABANILLAS, C., CONTENTO-SALCEDO, A. M., FLORES, J. R., LLERENA, M. J. V. Rapid spectrophotometric method for determining erythrosine, amaranth and tartrazine in ternary mixtures. *Analytical Letter*, v.30, n. 14, p. 2565-2578, 1997.

- BERZAS-NEVADO, J., GUIBERTEAU-CABANILLAS, C., CONTENTO-SALCEDO, A. M. Simultaneous spectrophotometric determination of three food dyes using the first derivative of ratio spectra. *Talanta*, v.42, n. 12, p. 2043-2051, 1995.
- BERZAS-NEVADO, J., GUIBERTEAU-CABANILLAS, C., CONTENTO-SALCEDO, A.M. Determination of colourants in binary mixture by derivative spectrometry using zero-crossing and ratio spectra. *Analysis*, v.22, n. 1, p. 5-13, 1994.
- BONATO, P. S., BRAGA, G. L., SILVA, H. C., DEL LAMA, M. P. F. M., CARLUCCI, N. T. Evaluation of artificial food dyes used in Brazil. *Revista Farmácia Bioquímica Universidade de São Paulo*. v. 28, n. 1, p. 30-42, 1992.
- BUYUKPAMUKCU, E., SALDAMLI, I. Determination of synthetic food colorants in water-soluble food by TLC and UV-vis spectrophotometer. *Current Status Future Trends Analytical Food Chemistry*. v. 2, p. 291-294, 1995.
- CAPITAN-VALLVEY, L. F., FERNANDEZ, M. D., DE ORBE, I., AVIDAD, R. Simultaneous determination of colorants tartrazine, ponceau 4R and sunset yellow FCF in foodstuffs by solid-phase spectrophotometry using partial least-squares multivariate calibration. *Talanta*. v. 47, n. 4, p. 861-868, 1998.
- GARCIA PENALVER, L., SIMAL LOZANO, J., LOPEZ HERNANDEZ, J. A comparison of three spectrophotometric methods for simultaneous quantification of mixtures of E102 and E110 food additives. *Spectroscopy European*. v. 11, n. 1, p. 8-12, 1999.
- GREENWAY, G. M., KOMETA, N., MACRAE, R. Determination of food

- colours by HPLC with online dialysis for sample preparation. **Food Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 137-140, 1992.
- GUIMARÃES, I. S. S. Corantes naturais: os sucedâneos dos artificiais, 1998.
- KWIATKOSKA-PURCHNIARZ, B., PODOLSKA, M., BIALECKA, W., TUSZUNSKA, E. Identification of synthetic dyes in pharmaceutical by spectroscopic method. **Acta Polish Pharmaceutical**, v. 54, n.3, p. 171-178, 1997.
- LOPEZ-DE-ALBA, P. L., LOPEZ-MARTINEZ, L., WROBEL-KACZMARCZYK, K., WROBEL-ZASADA, K., AMADOR-HERNANDEZ, J. New spectrophotometric method for binary mixtures. **Bol. Soc. Chil. Quim.** v.41, n. 2, p.111-119, 1996.
- NI, Y., GONG, X. Simultaneous spectrophotometric determination of food colorants. **Analytical Chemical Acta**, v. 354, n. 1-3, p. 163-171, 1997.
- RIBEIRO-CUNHA, M. R., CARODOSO, M. G., NELSON, D. L., JOKL, L. Qualitative methods for differentiating structurally similar red and yellow colors in food. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.15, n. 1, p. 6-11, 1996.
- RIZOVA, V., STAFILOV, T. HPTLC method of identification and determination of some synthetic food colorings. **Analytical Letter**, v. 28, n. 7, p. 1305-1316, 1995.
- ZGHAL, H., GUEITIN, C., HALOUI, E., CZCHOK, M. Determination of sunset yellow FCF and ponceau 4R in sweets by high performance liquid chromatography. **Science Aliments**, v. 15, n. 5, p. 491-496, 1995.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA IDENTIDADE DE PREPARADOS SÓLIDOS PARA REFRESCO POR ESPECTROMETRIA NO INFRAVEMELHO

3.1 RESUMO

Com a globalização a cada dia surgem novas marcas e fornecedores de produtos alimentícios, bem como o grande apelo pelos produtos “light”, levaram o desenvolvimento de refresco em pó e refrigerantes contendo edulcorantes. A base do refresco em pó tradicional é a sacarose (açúcar cristal) e do “light” é a malto-dextrina; os produtos tradicionais podem conter polpa de fruta.

O método desenvolvido neste trabalho foi baseado na técnica de espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier, utilizando acessório de reflectância interna difusa (DRIFT) para a verificação da identidade de preparados sólidos para refresco. Os espectros das amostras foram comparados entre si e com padrão de sacarose através de software Compare e Spectrum, da Perkin Elmer, sendo obtidos os valores de correlação.

O método analítico desenvolvido permitiu a separação dos preparados em três grupos: tradicional (base sacarose); tradicional com polpa de fruta e light (base maltodextrina). Os testes de repetibilidade apresentaram coeficiente de variação inferior a 0,1% para as amostras avaliadas. A metodologia proposta apresenta boa eficiência, sendo de execução simples e rápida e demonstra a aplicabilidade desta técnica analítica para verificação de adulteração em preparados sólidos para refresco.

3.2 SUMMARY

With the globalization, each day we have new brands and suppliers of nutritive products, and the great plea for the light products led to the development of drink powder and soft drinks containing edulcorater. The base of the traditional drink powder is saccharose (crystal sugar) and the base of the light is the maltodextrin; the traditional products can contain fruit pulp.

The method developed in this work was based on the infrared spectrophotometry technic with Fourier transformed, using diffuse internal reflecting accessory to verify the identity of solid powder. The samples spectrum were compared among them, and with saccharose standard through software Compare and Spectrum, from Perkin Elmer, being obtained the correlation values.

The analytical method developed allowed to separate the material in three groups: traditional (based on saccharose), traditional with fruit pulp and light one (based on maltodextrin). The repetition tests showed standard deviation less then 0,1% for the analyzed samples. The proposed methodology shows efficiency, being the execution simple and fast, and demonstrates the applicability of this analytical technic to verify the adulteration in solid powder.

3.3 INTRODUÇÃO

Os consumidores e a globalização estão fazendo que aumente a demanda por alimentos considerados seguros e de alta qualidade. Muitos dos aspectos de segurança e qualidade são regulamentados e as exigências para os rótulos existem para proteger os consumidores. É necessário métodos analíticos que detectem adulteração e possam ser utilizados no controle da qualidade e fiscalização destes produtos. Entre os vários desenvolvimentos da espectrometria, talvez o mais importante para as indústrias de alimentos é a espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), na região do médio, sendo um grande potencial para análises qualitativa e quantitativas de alimentos (WILSON, 1990).

A espectrometria no infravermelho por reflectância difusa é considerada uma técnica qualitativa a semi quantitativa, porém pode ser usada como técnica quantitativa dependendo da amostra e a matriz de diluição.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método analítico para a verificação da identidade de preparados sólidos para fresco (tradicional, com polpa de furta e light) através espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier, utilizando acessório de reflectância interna difusa (DRIFT), apresentando vantagens em relação a facilidade e rapidez na preparação das amostras.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 MATERIAL

Foram analisadas vinte (20) amostras de diferentes preparados sólidos para refresco que apresentavam descrito na embalagem a presença de açúcar (sacarose), adição de polpa de fruta e light (malto-dextrina). As amostras foram adquiridas em supermercados da região de Campinas/SP. Cada amostra foi composta pela mistura de duas embalagens do produto de mesmo lote e homogeneizadas para a retirada da amostra para análise. A determinação foi realizada em triplicata para cada amostra.

3.4.2 REAGENTES

A sacarose utilizada como padrão e o cloreto de sódio (NaCl) utilizado para a obtenção da correção de fundo (background) foram adquiridos da Merck do Brasil. A sacarose e o cloreto de sódio foram triturados em almofariz e passados através de peneira de 100 mesh.

Para a calibração do espectrofotômetro foi utilizado filme de polistireno da Perkin Elmer (PT n° 186-2082).

3.4.3 EQUIPAMENTOS

Para a obtenção dos espectros das amostras na região do infravermelho médio foi utilizado um espectrofotômetro com transformada

de Fourier da Perkin Elmer, modelo 1620 e acessório para reflectância interna difusa da Perkin Elmer. A comparação entre os espectros foi realizada através dos “software Spectrum” da Perkin Elmer, sendo obtido os valores de correlação.

3.4.4 MÉTODOS

Cada amostra foi composta de duas embalagens de mesmo lote de preparado sólido para refresco, sendo que as mesmas foram trituradas em almofariz após a mistura e passadas por peneira de 100 mesh.

Para a correção de fundo (background) foi utilizado cloreto de sódio p.a. seco em estufa a 105°C durante 4 horas. O cloreto de sódio foi resfriado até a temperatura ambiente em dessecador, triturado em almofariz de porcelana e passado através de peneira de 100 mesh.

Para obtenção dos espectros na região do infravermelho foram acumulados 100 corridas (scan) na faixa de 4000 - 625cm⁻¹ e resolução de 4cm⁻¹; ambiente com temperatura controlada entre 20° - 25°C e umidade de 45 - 50%. Os espectros obtidos por reflectância difusa foram convertidos em unidade de Kubelka-Munk (KM) pelo software utilizado. O espectro de reflectância convertido em unidade de Kubelka-Munk (KM) apresenta linearidade com a concentração e o espectro em absorvância não obedece a lei de Beer. A equação de Kubelka-Munk (KM) descreve alterações na intensidade espectral com a concentração para amostras pulverizadas com profundidade infinitiva. Amostras com profundidade infinitiva são aquelas em que um aumento na profundidade não altera significativamente o espectro.

A comparação entre os espectros das amostras e padrão de sacarose e a determinação da correlação foi realizada utilizando software Spectrum da Perkin Elmer.

O fluxograma da metodologia analítica desenvolvida para a obtenção de espectros no infravermelho médio através de reflectância interna difusa a ser utilizado na determinação da identidade de preparados sólidos para refresco está apresentada na Figura 1.

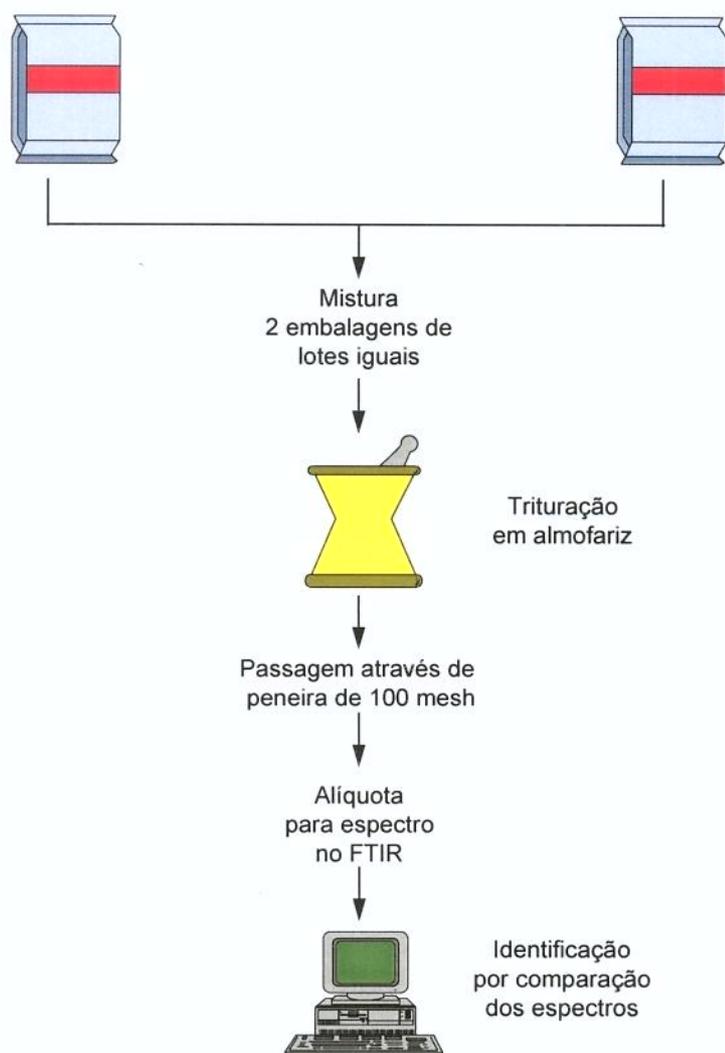


Figura 1: Fluxograma da metodologia utilizada na obtenção de espectros no infravermelho para determinação da identidade de preparados sólidos para refresco.

Os estudos de repetibilidade foram realizados baseado na repetição de 5 determinações de uma amostra de cada tipo de preparado sólido para refresco (tradicional, tradicional com polpa de fruta e light), sendo utilizando o software Spectrum da Perkin Elmer para a obtenção da correlação de comparação entre os espectros.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido as amostras serem sólidas o preparo foi de simples execução, permitindo que as mesmas fossem trituradas em almofariz e passadas através de peneira de 100 mesh, visando a homogeneidade do material reduzindo o efeito de espalhamento e reflectância especular durante a etapa espectrofotométrica, uma vez que os mesmos são afetados pelo tamanho e distribuição do tamanho das partículas. A interferência mais significativa na medida de reflectância difusa é a distorção do espectro devido a reflectância especular (Brimmer & Griffiths, 1986).

O uso do acessório de reflectância interna difusa (DRIFT) simplificou a preparação das amostras de preparados sólidos para refresco na obtenção dos espectros no infravermelho.

Os espectros em reflectância obtidos na região do infravermelho utilizando o DRIFT foram convertidos em unidade de Kubelka-Munk (KM), que apresenta linearidade com a concentração.

As comparações qualitativas entre as amostras de preparados sólidos para refrescos, visando a diferenciação dos produtos tradicionais com e sem polpa de fruta e light são apresentados nas tabelas 1 a 3.

Tabela 1: Comparação entre os preparados sólidos para refrescos tradicional - Produto comparado: R (sabor morango).

MARCA	SABOR	CORRELAÇÃO
R	morango	1,0000
R	uva	0,9953
R	limão	0,9923
F	abacaxi	0,9902
F	limão	0,9820
F	morango	0,9803
F	uva	0,9799
S	uva	0,9648
S	morango	0,9574
T	limão	0,9350
T	uva	0,9332
T	maracujá	0,9312
T	abacaxi	0,9299
padrão	sacarose	0,9274

O espectro da amostra de preparado sólido para refresco tradicional sabor morango da marca R foi comparado com espectros de amostras do produto de mesma marca e marcas diferentes com sabores iguais e diferentes. As correlações permitiram o agrupamento das amostras por marca, indicando a identidade das mesmas.

A comparação dos espectros dos preparados sólidos com a sacarose, base deste tipo de produto, apresentou correlação superior à 0,90.

Tabela 2: Comparação entre os preparados para refrescos light-
Produto comparado: C (sabor abacaxi):

MARCA	SABOR	CORRELAÇÃO
C	abacaxi	1,0000
C	maçã-verde	0,9362
C	limão	0,9282
C	tangerina	0,9226
C	p. rosada	0,9187
T(a)	maracujá	0,4489
T(a)	uva	0,4211
F	laranja	0,4160
S(b)	morango	0,2921
padrão	sacarose	0,2133

(a) contém edulcorantes, mas não há declaração de light na embalagem. (b) produto tradicional, incluído para comparação.

O espectro da amostra de preparado sólido para refresco “diet” sabor abacaxi da marca C foi comparado com espectros de amostras do produto de mesma marca e sabores diferentes, com produtos “diet” e “light” de outras marcas e sabores e com produtos tradicionais (base sacarose) . As correlações permitiram o agrupamento das amostras por marca:

- Marca C – produto “diet”: base maltodextrina + edulcorante (aspartame), conforme descrição na embalagem (correlação entre 0,90 - 1,00);

- Marcas T e F – produto “light”: base sacarose + edulcorantes (aspartame + acesulfame K) , conforme descrição na embalagem (correlação entre 0,40 - 0,45);

- Marca S (produto tradicional): base sacarose, conforme descrição na embalagem (correlação entre 0,20 - 0,30).

A comparação do espectro da amostra do preparado sólido para refresco da marca S com a sacarose, base deste tipo de produto, apresentou correlação próxima, indicando a identidade do produto.

Tabela 3: Comparação entre os preparados sólidos para refrescos tradicional com e sem adição de polpa de fruta - Produto comparado: S (sabor morango com polpa de fruta):

MARCA	SABOR	CORRELAÇÃO
S	morango	1,0000
T	maracujá	0,9326
T*	maracujá	0,9115
S*	morango	0,9033
padrão	sacarose	0,9064

* produto sem adição de polpa de fruta declarado na embalagem

O espectro da amostra de preparado sólido para refresco da marca S, sabor morango com polpa de fruta foi comparado com espectros de amostras do produto de mesma marca sem adição de polpa de fruta e com produto de marca diferente com e sem adição de polpa de fruta indicado na embalagem. As correlações permitiram o agrupamento das amostras analisadas com polpa de fruta (correlação entre 0,93 - 1,00) e sem adição de polpa de fruta (correlação entre 0,90 - 0,92).

A comparação dos espectros das amostras dos preparados sólidos analisados, com a sacarose permitiram comprovar a identidade da base dos produtos (correlação superior à 0,90).

Os espectros no infravermelho estão apresentados na figura 2 (sacarose), figura 3 (produto tradicional), figura 4 (produto diet), figura 5 (produto tradicional com e sem adição de polpa de fruta) e figura 6 (tradicional e diet).

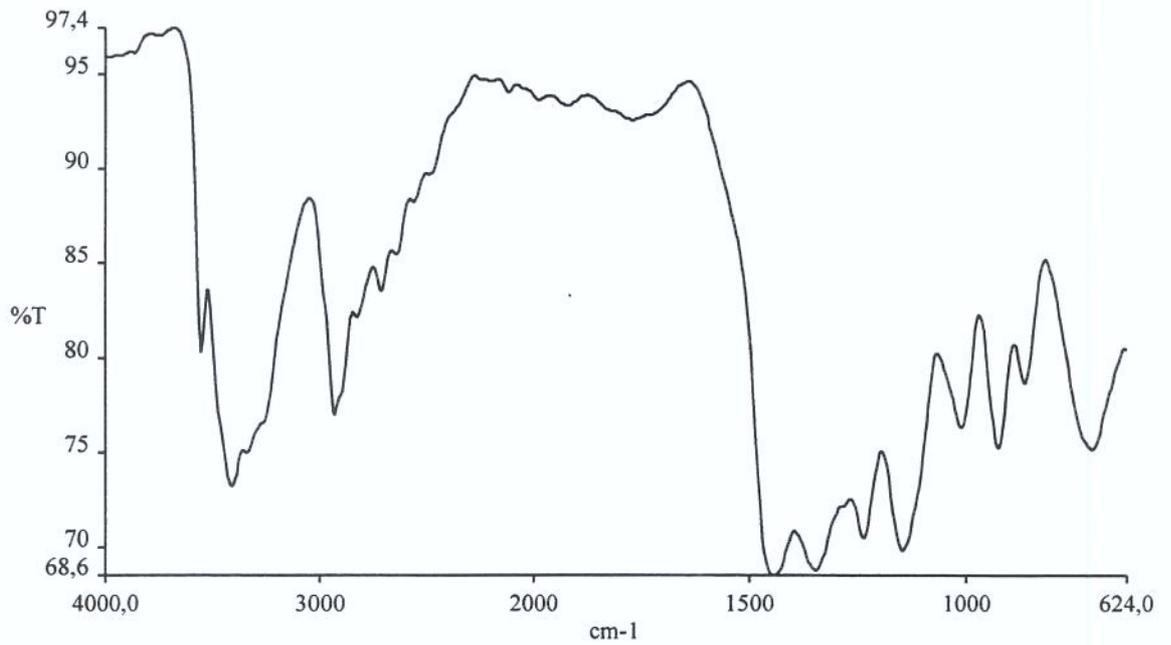


Figura 2: Espectro no infravermelho da sacarose (Padrão) obtido por reflectância interna difusa (4000 - 625cm⁻¹, resolução: 4cm⁻¹)

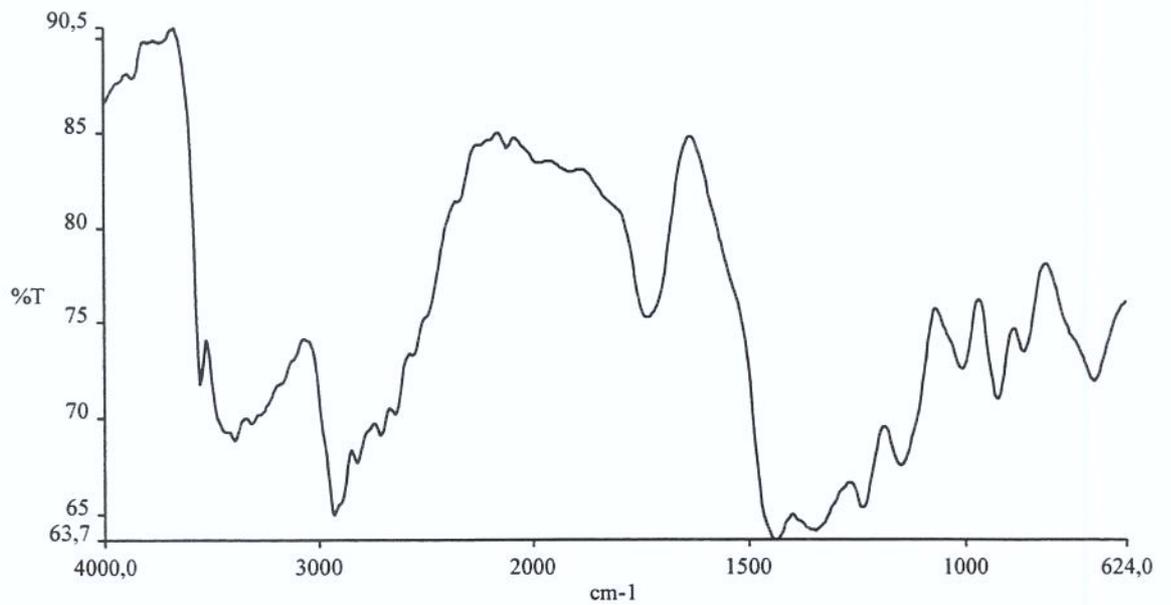


Figura 3: Espectro no infravermelho do preparado sólido para refresco (tradicional) obtido por reflectância interna difusa difusa (4000 - 625cm⁻¹, resolução: 4cm⁻¹):

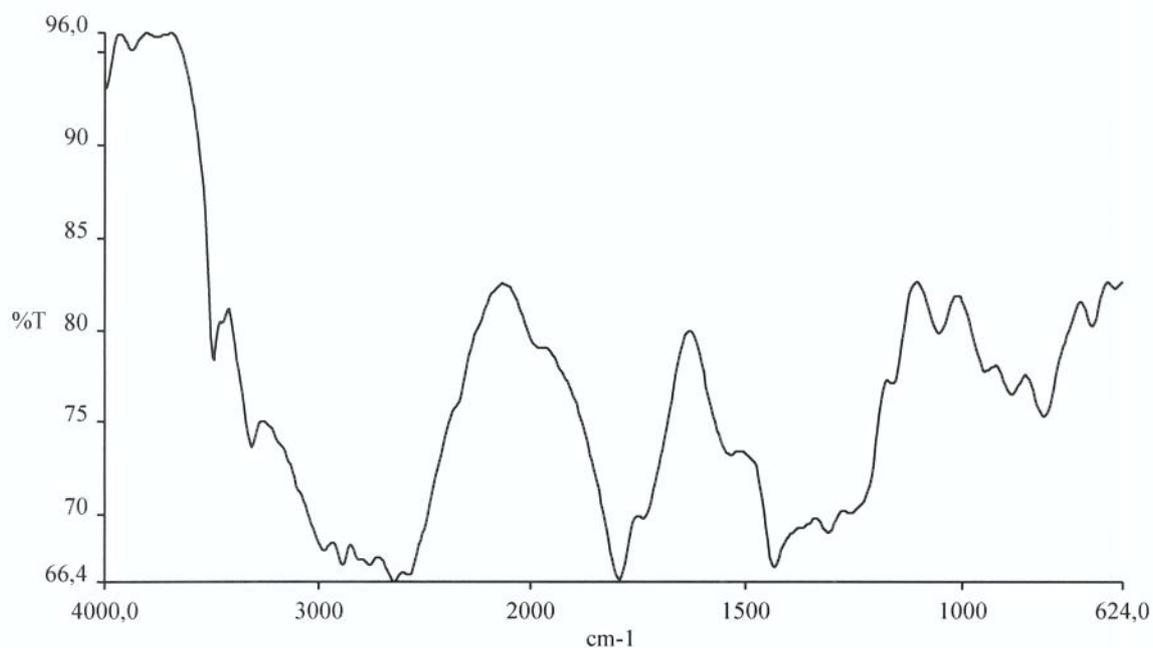


Figura 4: Espectro no infravermelho do preparado sólido para refresco (diet) obtido por reflectância interna difusa (4000 - 625cm⁻¹, resolução: 4cm⁻¹).

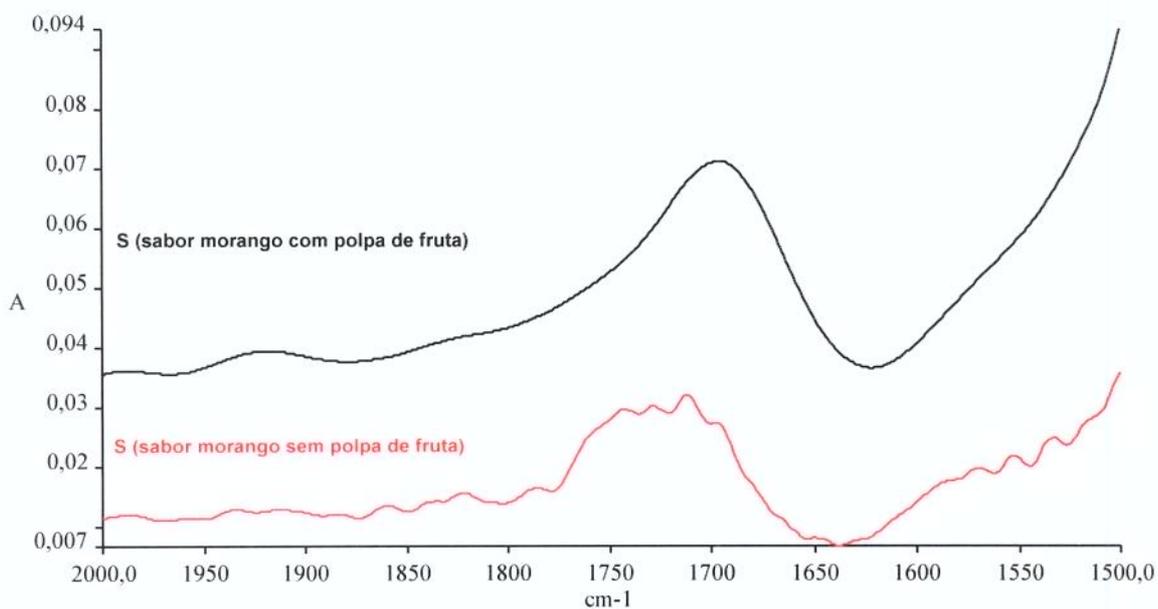


Figura 5: Espectros no infravermelho dos preparados sólidos para refresco (tradicional com e sem adição de polpa de fruta) obtido por reflectância interna difusa (2000 - 1500cm⁻¹, resolução: 4cm⁻¹).

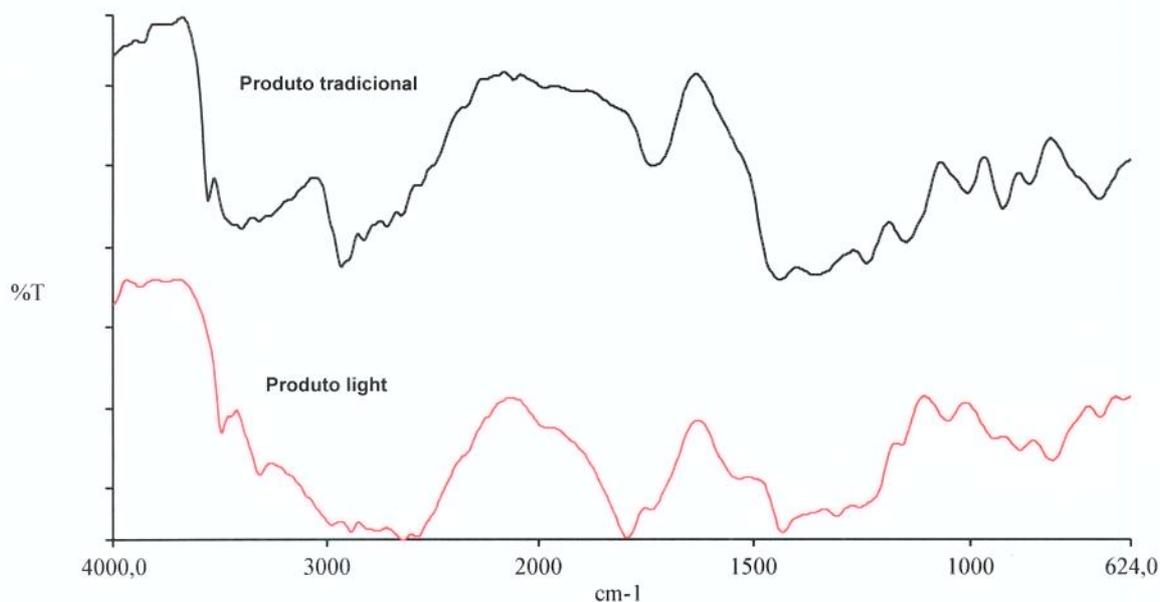


Figura 6: Espectros no infravermelho do preparados sólidos para refresco (tradicional e diet), reflectância interna difusa (4000 - 625cm⁻¹, resolução: 4cm⁻¹).

A banda característica utilizada para a identificação dos preparados sólidos para refresco diet foi em 1785cm⁻¹; enquanto que a adição de polpa de fruta pode ser avaliada pela alteração na intensidade da frequência a 1725cm⁻¹ (Wilson, 1993).

Os resultados de desvio-padrão e coeficiente de variação foram obtidos a partir dos valores de correlação das amostras analisadas, e estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Estudo de repetibilidade (desvio-padrão e variância), baseado em 5 repetições de cada amostra:

AMOSTRA	DESVIO-PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
sacarose (padrão)	0,0058	<0,01
tradicional	0,0259	0,07
tradicional com polpa	0,0177	0,03
light	0,0076	0,01

Os valores de desvio-padrão e coeficiente de variação inferior a 2% foram indicaram boa repetibilidade do método analítico.

3.6 CONCLUSÕES

Os resultados indicam que há um bom potencial para o uso da espectrometria no infravermelho com uso de reflectância difusa para auxiliar na identidade de produtos alimentícios como os preparados sólidos para refresco.

Os resultados dos espectros obtidos foram comparados com as declarações na embalagens, sendo verificado a presença de sacarose nos produtos light o que os difere dos diet (sem sacarose).

Não foi detectada discrepâncias em relação ao declarado na embalagem dos produtos analisados considerando o aspecto produto tradicional (sacarose) com e sem adição de polpa e light (sacarose + edulcorantes ou maltodextrina + edulcorantes).

No caso da identificação da adição de polpa aos preparados sólidos para refresco tradicionais, os valores de correlação obtidos para os produtos com e sem adição de polpa foram muito próximos para uma identificação mais conclusiva, provavelmente devido a pequena concentração de polpa adicionada aos produtos frente aos outros componentes presentes.

O uso do DRIFT indica uma potencialidade para determinações semi-quantitativas, que poderá ser utilizada para a determinação do teor de polpa de fruta adicionada aos produtos.

O método desenvolvido apresenta boa repetibilidade (inferior a 2%), sendo de execução simples e rápida o que permite o uso no controle da qualidade e na verificação de adulteração destes produtos.

3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELTON, P.S. & WILSON, R.H. Infrared sampling methods. **In *Perspectives in modern chemical spectroscopy***. Ed. D.L.Andres. Springer-Verlag, Berlin. 1990.
- BRIMMER, P.J. & GRIFFITHS, P. Effect of absorbing matrices on diffuse reflectance infrared spectra. **Analytical chemistry** (58), 2179 - 2184, 1986.
- HUGLES, E.B. & MAUNSELL, A.E. The analysis of fruit and fruit products. **The analyst** (59), 231. 1934.
- MANDELIS, A. & GROSSMAN, J.P. Perturbation theoretical approach to generalized Kubelka-Munk problem in nonhomogeneous optical media. **Applied spectroscopy** (46), 737-745, 1992.
- REINECKE, D., JANSEN, A., FISTER, F., SCHERNAU, U. Quantitative determination of organic compounds by diffuse reflectance fourier transform infrared spectrometry. **Analytical chemistry** (60), 1221-1224, 1988.
- WILSON, R.H., SLACK, P.T., APPLETON, G.P., SUN, L., BELTON, P.S. Determination of the fruit content of jam using fourier transform infrared spectroscopy. **Food chemistry** (47), 303-308, 1993.
- WILSON, R.H. Fourier transform infrared spectroscopy for food analysis. **Trends in analytical chemistry**. 9 (47), 127-131, 1990.

3.8. SUGESTÕES

Os resultados indicam que há um bom potencial para a aplicação da espectrometria no infravermelho (FT-IR) com uso do acessório de reflectância interna difusa (DRIFT) para análise das bases e aditivos utilizados em preparados sólidos para refresco.

O DRIFT pode permitir determinações para o controle da qualidade dos aditivos (corantes, acidulantes, etc), bem como determinações semi-quantitativas e quantitativas da concentração de polpa adicionada aos produtos alimentícios, como em preparados sólidos para refresco.

CAPÍTULO 4

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE
CORANTES ARTIFICIAIS EM PREPARADOS
SÓLIDOS PARA REFRESCO POR
CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA**

4.1 RESUMO

Com a globalização a cada dia surgem novas marcas e fornecedores de produtos alimentícios, como por exemplo preparados sólidos para refresco.

Os preparados sólidos para refresco são compostos principalmente de açúcar cristal e/ou edulcorantes, acidulantes, estabilizantes e corantes artificiais. Devido aos problemas que o excesso de alguns aditivos podem causar à saúde dos consumidores, principalmente os corantes artificiais, é necessário métodos analíticos para a determinação destes compostos para fins de desenvolvimento de novos produtos, controle da qualidade e fiscalização.

O método desenvolvido neste trabalho foi baseado na cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de corantes artificiais (amarelo de tartrazina, amarelo crepúsculo, amaranço, vermelho 40, azul de indigotina e azul brilhante) em preparados sólidos para refresco e refrigerantes, utilizando sistema isocrático, sendo a fase móvel composta de tampão acetato 0,05M:metanol (80:20). A detecção e quantificação foi realizado num único comprimento de onda na região do visível (510nm), permitindo a determinação dos corantes presentes nas amostras analisadas em apenas uma corrida cromatográfica.

O limite de detecção variou entre 0,12 e 0,53mg/L (vermelho 40 e amarelo de tartrazina, respectivamente), os coeficientes de variação foram inferiores a 7,5% para as amostras analisadas e a % de recuperação média ficou entre 95,5 e 112,0%. A metodologia proposta apresenta eficiência, sendo de execução simples e rápida.

4.2 SUMMARY

With the globalization, each day we have new brands and suppliers of nutritive products, such as solid powder and soft drinks.

The solid powder are composed mainly by crystal sugar and/or edulcorater, acidifying, stabilizing and artificial pigment. Due to problems related to the excess of some additives can cause to the consumer health, mainly the artificial food color, it is necessary analytical methods to determine these compounds in order to develop new products, quality control and fiscalization.

The method developed in this work was based on the high performance liquid chromatography to determine the artificial dyes (tartrazine yellow, sunset yellow, amaranth, red 40, indigotine brilliant blue) in the solid powder, using the isocratic system, using acetate buffer 0.05M:methanol (80:20) as mobile phase. The detection and quantification using a unique wavelength of the visible region (510nm), allowing the dye determination present in the analyzed samples in just one chromatographic run.

The detection limit was between 0.12 and 0.53mg/L (red 40 and tartrazine, respectively), the coefficient of variation was less than 7.5% for the analyzed samples and the recovery average was between 97.7 and 105.0% . The proposed methodology shows efficiency, being the execution simple and fast.

4.3 INTRODUÇÃO

Os consumidores e a globalização estão fazendo que aumente a demanda por alimentos considerados seguros e de alta qualidade. Muitos dos aspectos de segurança e qualidade são regulamentados e as exigências para os rótulos existem para proteger os consumidores.

Os corantes sintéticos, principalmente os corantes azo, são utilizados em grande variedade de produtos alimentícios durante muitos anos. A cor é um atributo importante de qualidade e muitos produtos processados são coloridos devido a destruição da sua cor natural durante o processamento ou para colorir produtos que são incolores, como por exemplo os refrigerantes e refrescos (Greenway et al, 1992).

Portanto, é necessário o desenvolvimento métodos analíticos para a determinar a presença e concentração dos corantes permitidos por lei, confirmar a ausência dos não declarados (Greenway et al, 1992) e avaliar a estabilidade durante o processamento e estocagem (Daman et al., 1989).

Existem vários métodos para separação cromatográfica de corantes sintéticos (citado por Saag, 1988), baseados em troca de íon e mais comumente na cromatografia de par-iônico utilizando fase reversa. Estudos detalhados sobre os fatores que afetam a retenção nestas condições foram publicados (citado por Damant, 1990). A fase móvel mais simples está baseada nos tampões de acetato de amônio.

Dentre os vários desenvolvimentos analíticos, a cromatografia líquida de alta eficiência é de grande aplicação em análise de alimentos.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método analítico para a determinação de corantes artificiais em preparados sólidos para fresco e refrigerantes através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando sistema isocrático para a separação e detecção em um único comprimento de onda.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 MATERIAL

Foram analisadas trinta (30) amostras de preparados sólidos para refresco de diferentes marcas e sabores e 6 (seis) amostras de refrigerantes sabor laranja e uva de marcas diferentes. Todas as amostras foram adquiridas em supermercados da região de Campinas/SP. Cada amostra foi composta pela mistura de duas embalagens do produto de mesmo lote e homogeneizadas para a retirada da amostra para análise. A determinação foi realizada em duplicata sendo que cada replicata é a média de 3 injeções cromatográficas.

4.4.2 REAGENTES

O reagente acetato de amônio grau analítico, utilizado com tampão e o metanol grau cromatográfico foram adquiridos da Merck. Os padrões dos corantes sintéticos (amarelo de tartazina, amarelo crepúsculo, amaranço, vermelho 40, azul de indigotina e azul brilhante) foram fornecidos pela Hilton Davis. A água utilizada no preparo da fase móvel foi purificada no sistema Nanopure e a fase móvel foi filtrada em filtros de 0,5 μ m de diâmetro de poro e degaseificada em banho ultrassônico.

4.4.3 EQUIPAMENTOS

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Milton Roy, composto de sistema isocrático e válvula injetora tipo Rheodyne com capacidade de injeção de 20 ml. A coluna cromatográfica utilizada foi RP-18 Sigma Aldrich Spherisorb Octadecil (250mm x 4,6mm e partículas com 5 μ m de diâmetro). A detecção e quantificação foi realizada utilizando um detector UV-Visível variável à 510nm, possibilitando a determinação de todos os corantes em uma única corrida cromatográfica.

4.4.5 METODOLOGIA ANALÍTICA

O procedimento cromatográfico por CLAE, proposto neste trabalho foi baseado principalmente na metodologia de Prado & Godoy (1998) e Berzas-Nevedo et al. (1997 e 1998).

Cada amostra foi composta de duas embalagens de mesmo lote do produto a ser analisado, sendo que as amostras de preparado sólido para refresco foram trituradas em almofariz para homogeneização e utilizado de 0,5 a 5 g que foram solubilizadas em fase móvel e avolumado para 50mL. Os refrigerantes foram desgaseificados e diluídos na proporção de 1:1 em fase móvel.

Todas as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 μ m de poro (Millex) e injetadas no cromatógrafo.

Foram testadas diferentes combinações de metanol e tampão acetato de amônio visando a melhor separação dos corantes presentes nas amostras analisadas, sendo que a fase móvel utilizada para a continuidade do trabalho foi tampão acetato de amônio 0,05M: metanol (80:20), sendo o tempo de corrida cromatográfica de 20 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto. Foi reduzido a concentração de acetato de amônio na fase móvel para uma separação mais rápida do azul brilhante.

Os corantes foram detectados por absorção na região do visível, sendo realizado as determinações em diferentes comprimentos de onda. O comprimento de onda selecionado para a continuidade do trabalho foi 510nm.

A identificação foi realizada por comparação dos tempos de retenção obtidos com padrões injetados nas mesmas condições das amostras, verificação da alteração das áreas relativa ao corante x comprimento de onda e por co-cromatografia. A quantificação foi realizada através de curvas de calibração externa, construídas com 5 concentrações diferentes de cada padrão. As amostras e padrões foram analisados em duplicata e as injeções realizadas em triplicata.

Os limites de detecção foram obtidos através de diluições sucessivas dos padrões, sendo calculado como sendo correspondente à concentração que produziu um valor do sinal medido três vezes maior que o nível de ruído médio medido com a solução sacarose (Leite, 1998). Os limites de quantificação foram calculados como sendo duas vezes o valor dos limites de detecção para cada corante.

O melhor fator de recuperação é o obtido através da diferença entre o produto matriz sem o analito de interesse com o produto matriz com o

analito. Caso isto não seja viável, o padrão deverá ser adicionado sobre a matriz já contendo o analito (Leite, 1998). Os testes do fator de recuperação de padrões foram realizados em duplicata, adicionando os padrões em 3 das amostras analisadas de sabor limão, morango, uva, sendo que a amostra era isenta dos corantes adicionados.

O valor adicionado não deve ser superior ao dobro da resposta do sinal da matriz; sendo utilizado duas concentrações equivalente a metade e o dobro do sinal correspondente à média de cada corante determinado nas amostras.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia analítica desenvolvida, utilizando sistema isocrático permite a determinação de corantes sem a necessidade de aguardar a reestabilização da coluna, reduzindo o tempo da análise. É necessário utilizar em média 10 a 20 vezes o volume da coluna, de fase móvel, para o perfeito acondicionamento da coluna (Chrom Book - Merck, 1998).

A fase móvel utilizada composta de tampão acetato de amônio 0,05M:metanol (80:20) permitiu a separação dos corantes: amarelo de tartrazina, amarelo crepúsculo, amaranço, vermelho 40, azul de indigotina e azul brilhante; presentes nas amostras analisadas em no máximo 20 minutos. Os estudos realizados para a seleção da fase móvel indicaram que o aumento na concentração do tampão de acetato de amônio para 0,10M faz com que ocorra aumento significativo do tempo de retenção de alguns corantes, principalmente o vermelho 40, enquanto que a sua redução para 0,01M não permite boa separação de alguns corantes, principalmente amaranço e azul de indigotina (Tabela I).

Tabela I: Avaliação da composição da fase móvel para determinação de corantes por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna RP-18, Sigma Aldrich Spherisorb Octadecil (250mm x 4,6mm e partículas com 5 μ m de diâmetro) e fluxo de 1,0mL/minuto.

Tampão acetato	Metanol	Acetato de Amônio	Resultado (separação cromatográfica)
80	20	-	não há separação dos corantes
80	20	0,01M	separação incompleta dos corantes
80	20	0,05M	separação completa
80	20	0,10M	separação completa, porém aumenta em muito o tempo de retenção de alguns corantes
Água	Metanol	Acetato de Amônio	Tempo de retenção (Vermelho 40)
80	20	0,01M	<10 minutos
80	20	0,05M	10 minutos
80	20	0,10M	>30 minutos

O uso de um único comprimento de onda na região do visível em 510nm, permitiu a identificação e quantificação de todos os corantes presentes nas amostras em uma única injeção cromatográfica.

Os cromatogramas dos padrões em diferentes comprimentos de onda estão apresentados nas figuras 1 e 2 e os referentes as amostras de preparados sólidos para refresco nas figuras 3 e 4.

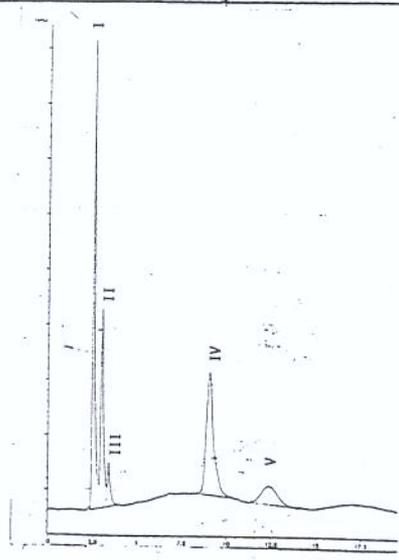
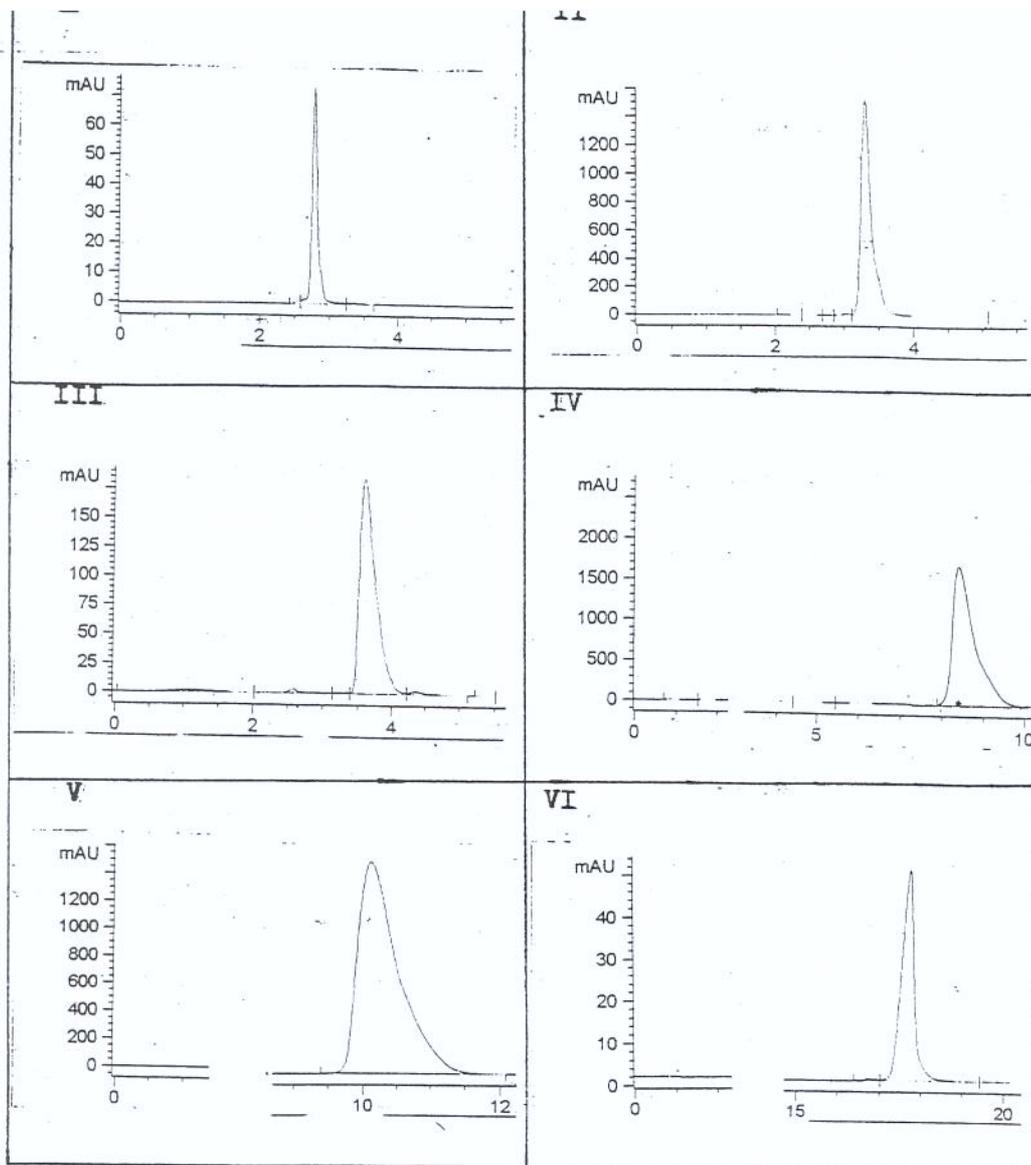


Figura 1: Cromatograma dos padrões de corantes artificiais e mistura de corantes. Condições cromatográficas: Coluna RP-18, 250mm x 4,6mm, partículas de 5 μ m. Fase móvel: tampão acetato de amônio 0,05M:metanol (80:20), fluxo 1,0mL/min, volume injetado: 20 μ l. Detecção: 510nm. Padrões: (I) tartrazina; (II) amaranço; (III) azul de indigotina; (IV) amarelo crepúsculo (V) vermelho 40; VI (azul brilhante).

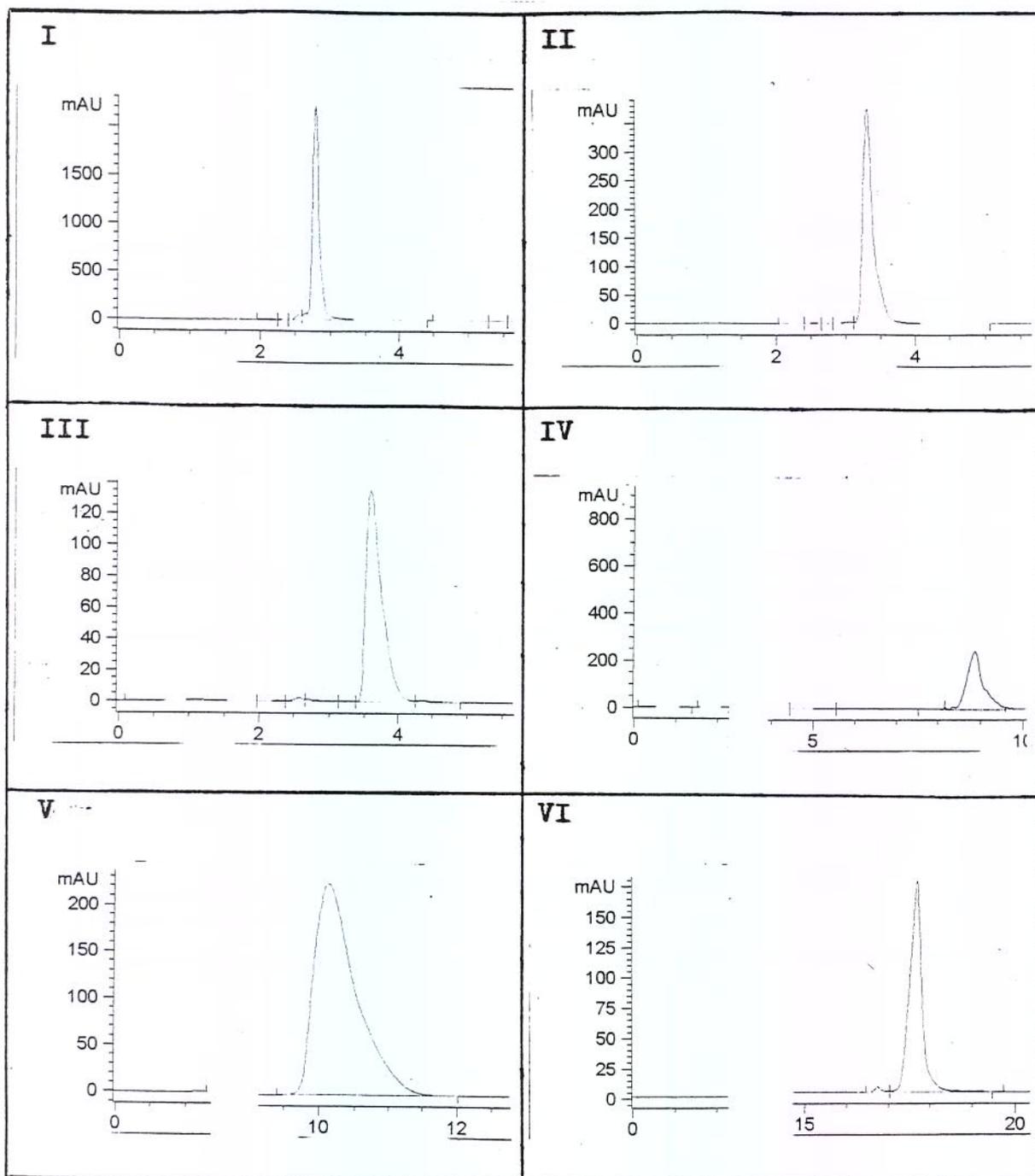


Figura 2: Cromatograma dos padrões de corantes artificiais. Condições cromatográficas: Coluna RP-18, 250mm x 4,6mm, partículas de 5 μ m. Fase móvel: tampão acetato de amônio 0,05M:metanol (80:20), fluxo 1,0mL/min, volume injetado: 20 μ l. Detecção: 400 nm. Padrões: (I) tartrazina; (II) amarantho; (III) azul de indigotina; (IV) amarelo crepúsculo (V) vermelho 40; VI (azul brilhante).

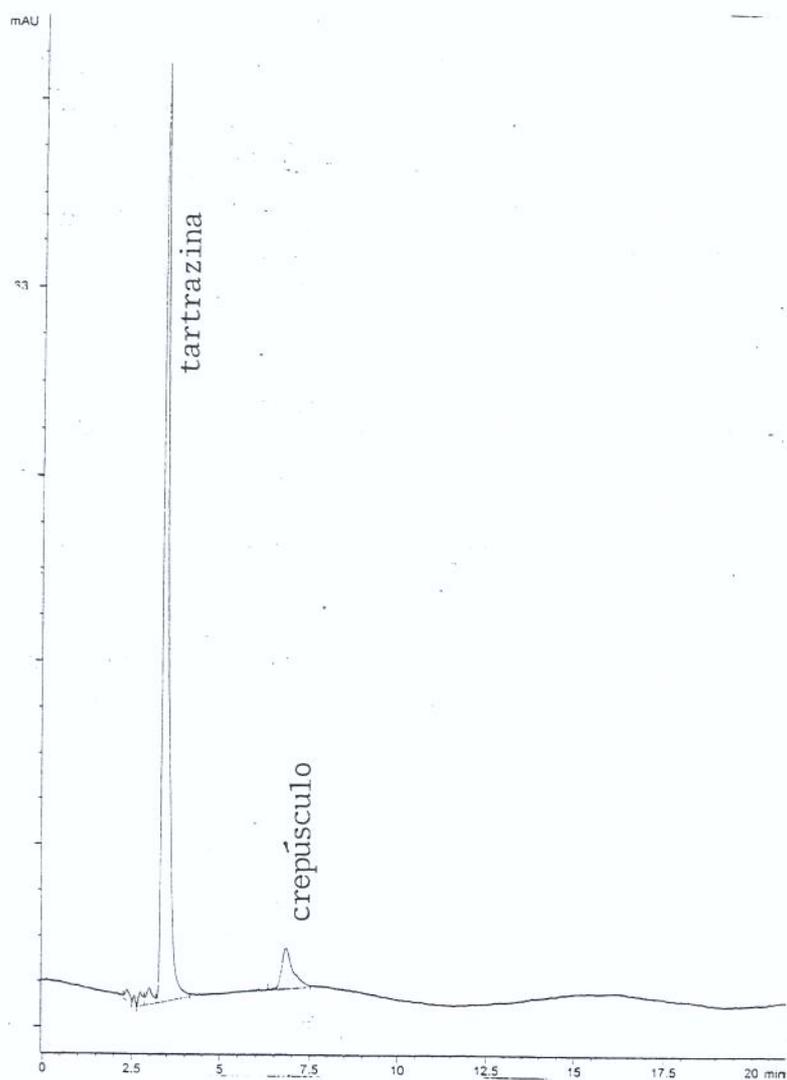


Figura 3: Cromatograma de amostra de refresco (sabor laranja). Condições cromatográficas: Coluna RP-18, 250mm x 4,6mm, partículas de 5 μ m. Fase móvel: tampão acetato de amônio 0,05M:metanol (80:20), fluxo 1,0mL/min, volume injetado: 20 μ l. Detecção: 510nm. Corantes: amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo.

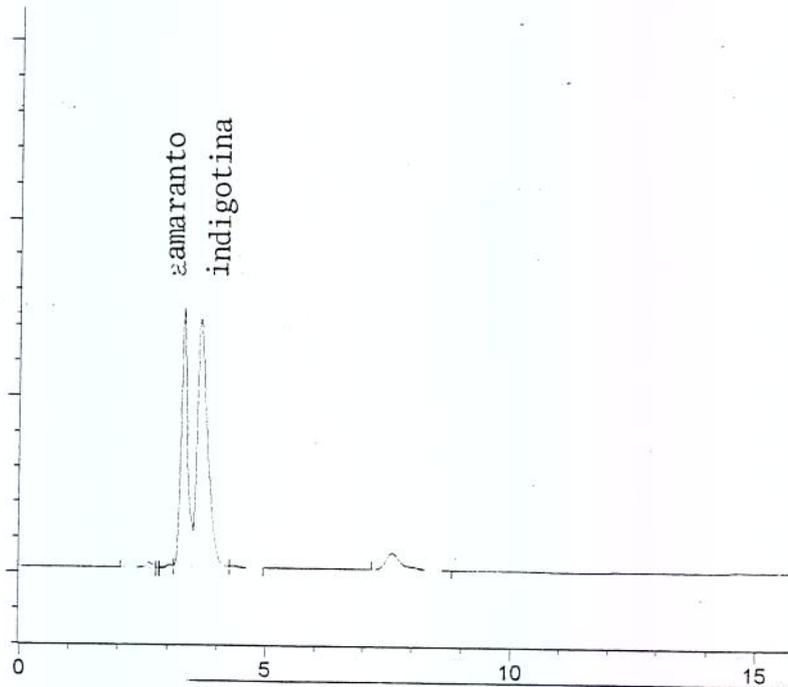


Figura 4: Cromatograma de amostra de refresco (sabor uva). Condições cromatográficas: Coluna RP-18, 250mm x 4,6mm, partículas de 5 μ m. Fase móvel: tampão acetato de amônio 0,05M:metanol (80:20), fluxo 1,0mL/min, volume injetado: 20 μ l. Detecção: 510nm. Corantes: amaranto e azul de indigotina.

As curvas de calibração estão apresentadas nas figuras 5 e 6, e apresentaram boa linearidade nas concentrações pré-estabelecidas, sendo a regressão linear (método dos mínimos quadrados) a forma utilizada para estimar a melhor reta que passa pelos pontos obtidos experimentalmente (Leite, 1998).

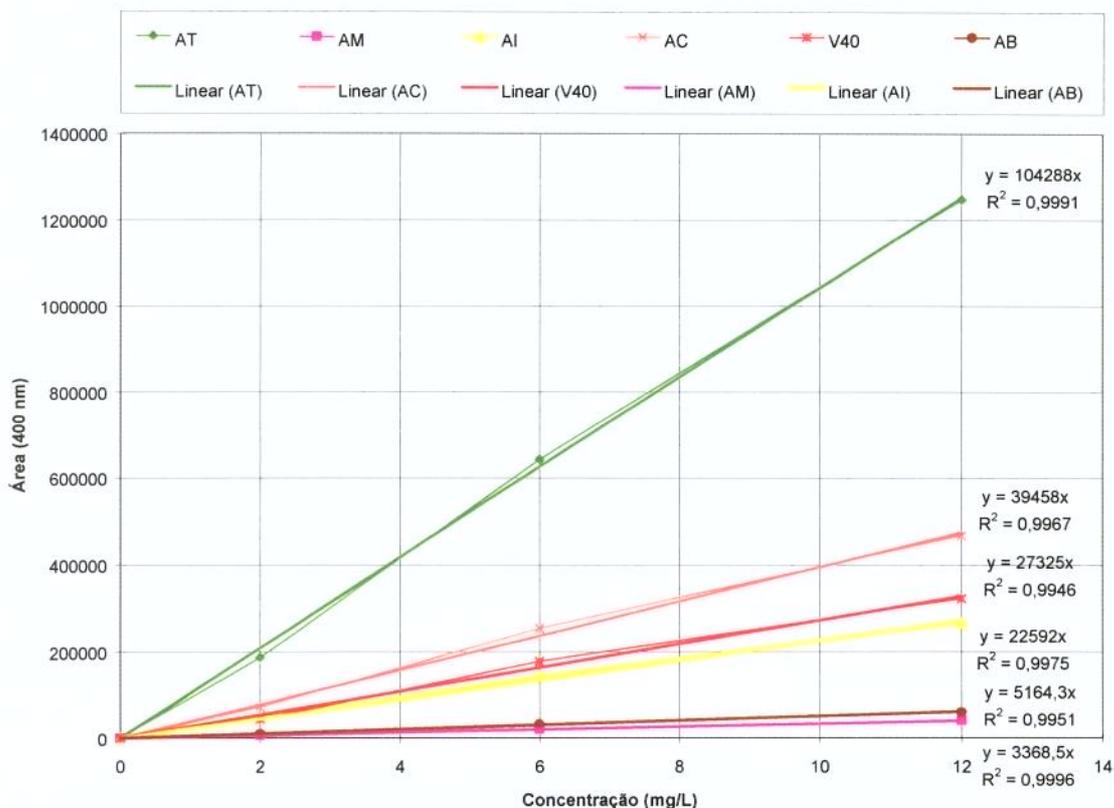


Figura 5: Curva de calibração para determinação de corantes artificiais por cromatografia líquida de alta eficiência. Condições cromatográficas: Coluna RP-18, 250mm x 4,6mm, partículas de 5µm. Fase móvel: tampão acetato de amônio 0,05M:metanol (80:20), fluxo 1,0mL/min, volume injetado: 20µl. Detecção: 400nm. Corantes: amarelo de tartrazina, amarelo crepúsculo, amaranto, vermelho 40, azul de indigotina e azul brilhante.

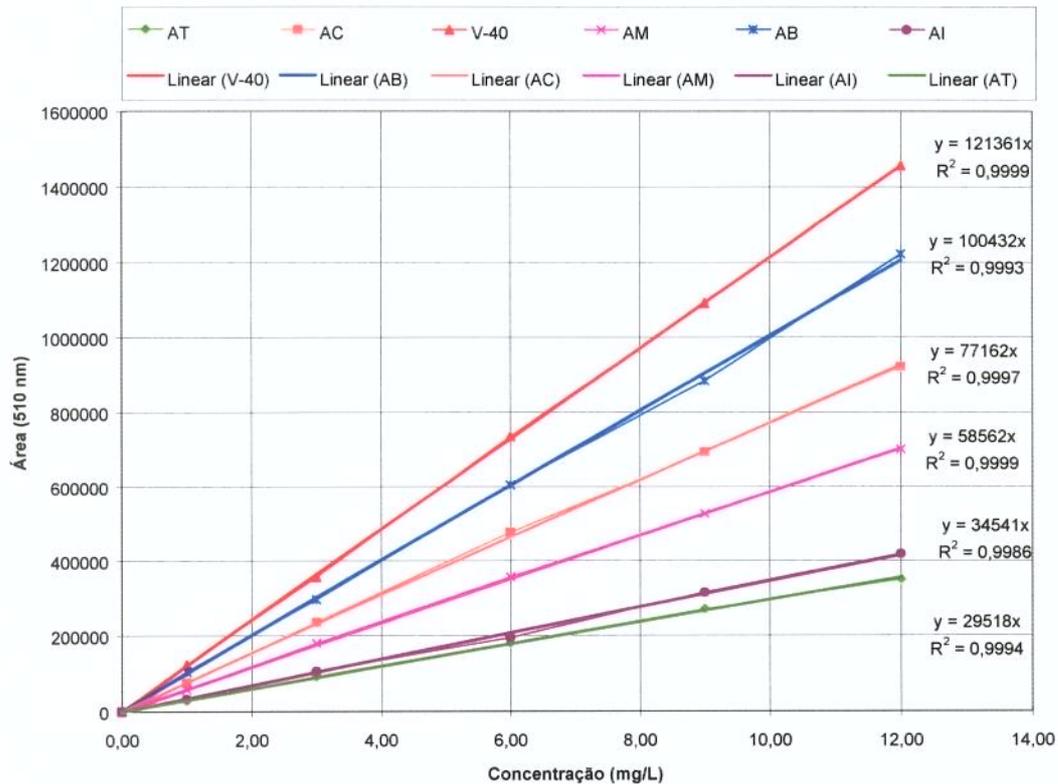


Figura 6: Curva de calibração para determinação de corantes artificiais por cromatografia líquida de alta eficiência. Condições cromatográficas: Coluna RP-18, 250mm x 4,6mm, partículas de 5 μ m. Fase móvel: tampão acetato de amônio 0,05M:metanol (80:20), fluxo 1,0mL/min, volume injetado: 20 μ l. Detecção: 510nm. Corantes: amarelo de tartrazina, amarelo crepúsculo, amaranto, vermelho 40, azul de indigotina e azul brilhante.

Os corantes e suas respectivas quantidades presentes nas amostras analisadas estão apresentadas na tabela II (preparados sólidos para refresco) e tabela III (refrigerantes).

Tabela II: Corantes artificiais presentes em preparados sólidos para refresco e respectivas concentrações

SABOR	MARCA	CORANTE (mg/100g)						Total
		tartrazina	crepúsculo	amaranto	vermelho 40	indigotina		
Laranja	A		5,0 ± 0,2					5,0
	B	1,23±0,05	1,37±0,08					2,60
	C	0,89±0,04	1,29±0,06					2,18
	D	1,89±0,08	0,98±0,05					2,87
	E	0,27±0,04	0,91±0,05					1,18
	F	1,76±0,05	0,66±0,03					2,42
	K	1,25±0,05	1,41±0,04					2,66
Mamão-laranja	B	1,95±0,06		0,74±0,03				2,69
Uva	B				3,16±0,04	0,89±0,06		4,05
	E			3,92±0,04		0,78±0,08		4,70
	F				2,98±0,05	0,84±0,03		3,82
	G				3,34±0,03	1,08±0,04		4,42
	H				6,0±0,1	1,56±0,04		7,6
	I			2,58±0,04		1,06±0,04		3,64
	K				4,01±0,05	1,34±0,03		5,35

Tabela II: Continuação: Corantes artificiais presentes em preparados sólidos para refresco e respectivas concentrações

SABOR	MARCA	CORANTE (mg/100g)						Total
		tartrazina	crepúsculo	amaranto	vermelho 40	indigotina		
Maracujá-mamão	D	2,02±0,05	0,63±0,04					2,65
	F	0,28±0,07	0,02±0,01					0,30
	G	0,47±0,05	0,10±0,05					0,57
	J	0,29±0,04	0,11±0,03					0,40
Limão	H	0,56±0,02						0,56
Lima-limão	J	0,91±0,03	0,12±0,02					1,03
Guaraná	A	1,52±0,04		0,69±0,03		0,37±0,04		2,58
	B		0,49±0,04	0,85±0,03				1,34
	D		1,90±0,08	3,54±0,01				5,44
Morango	E			1,72±0,03				1,72
	F			1,31±0,05				1,31
	H			5,95±0,06				5,97
Tangerina	J		1,95±0,04	0,09±0,00				2,04
Maçã-verde	J			0,05±0,00		0,07±0,00		0,12

Tabela III: Corantes artificiais presentes em refrigerantes e respectivas concentrações:

SABOR	MARCA	CORANTE (mg/100g)						Total
		tartrazina	crepúsculo	amaranto	vermelho 40	indigotina	azul brilhante	
Laranja	A	3,8±0,3						3,8
	B	2,5±0,2						2,5
	C	5,1±0,4						5,1
	D	3,6±0,3						3,6
	E	4,1±0,3						4,1
Uva	A	0,28±0,07		4,2±0,1			3,82±0,06	8,3

A Legislação Brasileira permite a presença de no máximo três corantes artificiais por produto e o limite máximo de 10mg/100g ou 10mg/100mL no produto para seu consumo. Não foi detectado nas amostras analisadas a presença de corantes acima da concentração permissível e em quantidade superior a três tipos.

Os fatores de recuperação para os corantes analisados estão apresentados na tabela IV e os desvios-padrão e coeficientes de variação médio de cada corante estão apresentados na tabela V.

Os limites de detecção e de determinação por cromatografia líquida de alta eficiência obtidos seguindo as condições descritas neste trabalho estão apresentados na tabela VI.

A identificação dos picos foram realizadas pelo tempo de retenção, co-cromatografia e variação da área de cada pico x comprimento de onda do detector (figura 7).

Tabela IVa: Determinação da % de recuperação de corantes artificiais determinado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

Adição	Recuperação					
	tartrazina	crepúsculo	amaranto	vermelho 40	indigotina	a.brilhante
I	95,5%	98,9%	96,3%	99,5%	98,0%	
II	99,8%	98,5%	99,0%	97,3%	112,0%	
Média	97,7%	98,7%	97,7%	98,4%	105,0%	
D.padrão	0,03	0,00	0,02	0,02	0,10	
C. variação (%)	0,09	0,00	0,04	0,02	0,98	

Tabela IVb: Determinação da % de recuperação de corantes artificiais determinado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

Adição	Recuperação					
	tartrazina	crepúsculo	amaranto	vermelho 40	indigotina	a.brilhante
I		97,0%				105,0%
II		102,4%				98,5%
Média		99,7%				101,8%
D.padrão		0,04				0,05
C. variação (%)		0,15				0,21

Tabela V: Desvios-padrão e coeficientes de variação médios de cada corante artificial presente nas amostras de preparados sólidos para refresco analisadas obtidos na determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (n= número de amostras).

Corante	Desvio-padrão	Coeficiente de variação (%)
Amaranto (n= 11)	0,03	2,48
Amarelo crepúsculo (n= 17)	0,05	7,31
Amarelo de tartrazina (n= 15)	0,05	6,47
Azul de indigotina (n= 9)	0,04	5,15
Vermelho 40 (n= 5)	0,05	1,33

Tabela VI: Limite de detecção e limite de determinação dos corantes artificiais.

Corante	Limite de detecção (mg/L)	Limite de determinação (mg/L)
Amaranto	0,18	0,36
Amarelo crepúsculo	0,21	0,42
Amarelo de tartrazina	0,53	1,06
Azul de indigotina	0,45	0,90
Azul brilhante	0,11	0,24
Vermelho 40	0,12	0,24

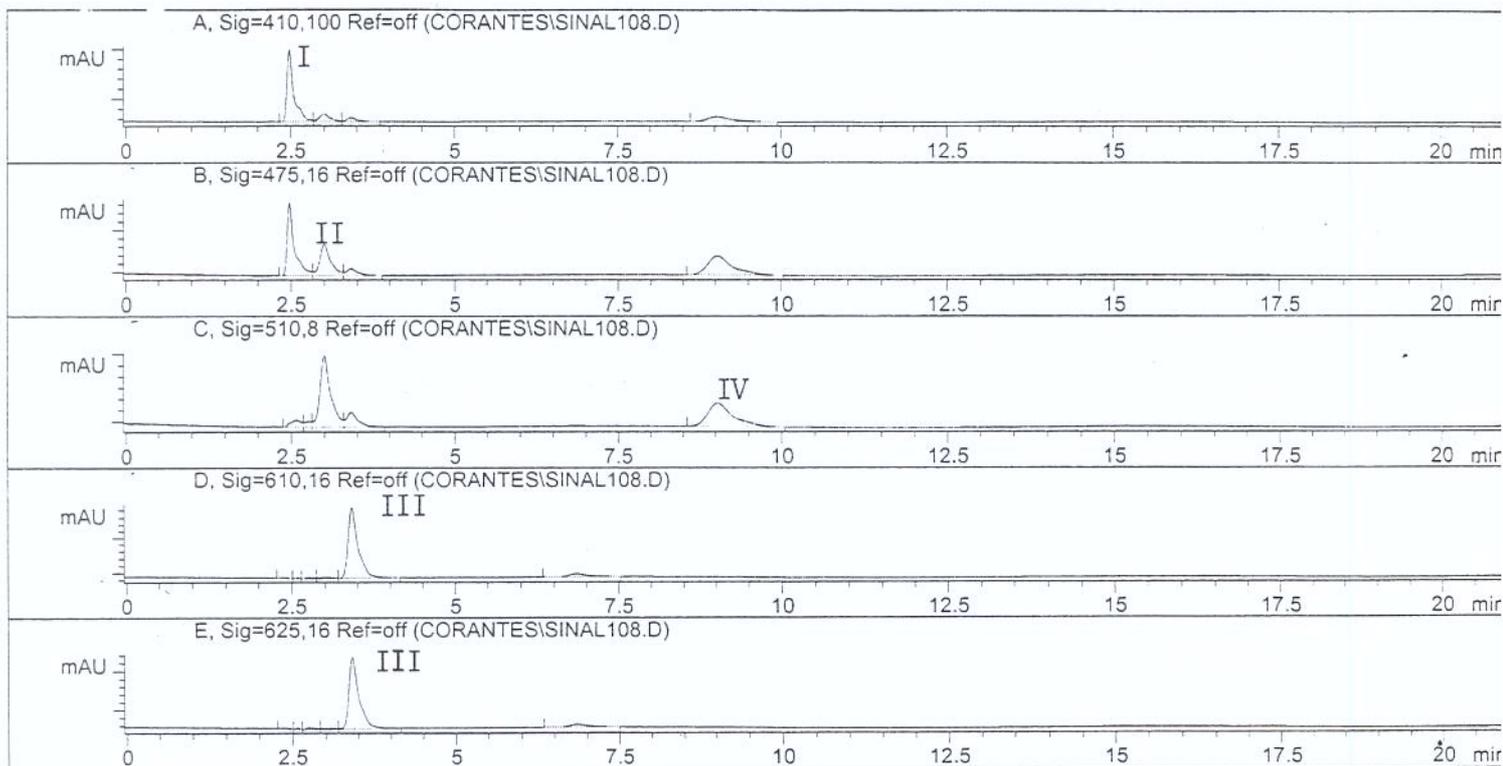


Figura 7: Identificação dos corantes através da variação da área x variação do comprimento em cromatografia líquida de alta eficiência: (I)tartrazina, (II) amaranço, (III) azul de indigotina e (IV) amarelo crepúsculo.

4.6. CONCLUSÕES

A fase móvel utilizada tampão acetato de amônio 0,05M:metanol (80:20), permitiu a separação de todos os corantes presentes nas amostras de preparados sólidos para refrescos e refrigerantes, utilizando sistema isocrático. Para que diminuir o tempo de retenção do azul brilhante foi reduzido a concentração de acetato de amônio na fase móvel. O tempo de corrida cromatográfica foi de 20 minutos, não sendo necessário tempo adicional para reestabilização da coluna. O condicionamento da coluna é fator significativo na repetibilidade analítica.

A eluição isocrática permite uma maior velocidade analítica, devido não ser necessário aguardar a reestabilização da coluna cromatográfica e o investimento para aquisição do equipamento (cromatógrafo) é menor, devido o custo da bomba simples (sistema isocrático) ser inferior ao sistema de bombas para gradiente.

O uso da fase móvel para dissolução das amostras, reduziu significativamente interferências devido ao solvente no início dos cromatogramas.

O comprimento de onda utilizado de 510nm, permitiu a identificação e quantificação dos corantes artificiais presentes utilizando uma única corrida cromatográfica.

Os limites de detecção encontrados para os corantes estudados foram adequados para a faixa de concentração dos mesmos presente nas amostras. Os valores de recuperação foram bons (97,7 - 105,0%), indicando não haver perda dos compostos durante a preparação das amostras e separação cromatográfica, e o coeficiente de variação obtido para todos os corantes artificiais analisados foi inferior à 7,5%..

A metodologia analítica por CLAE proposta neste estudo pode ser empregada para determinação de corantes em vários tipos de preparados sólidos para refresco e refrigerantes. A preparação da amostra é simples, consistindo em pesagem, diluição da amostra e filtração para os preparados sólidos para refresco e degaseificação e diluição para os refrigerantes.

Sendo este trabalho desenvolvido utilizando vidrarias certificadas, equipamentos calibrados e baseados nos resultados de %de recuperação e coeficiente de variação, podemos concluir que o método analítico desenvolvido é adequado, identificando e quantificando os corantes artificiais de maneira simples e rápida permitindo sua aplicação no controle da qualidade, desenvolvimento e fiscalização dos preparados sólidos para refresco e refrigerantes.

4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELINO, S., FELL, A. F., GENNARO, M. C. Development of system suitability tests for ion-interaction chromatography of colorants on reversed-phase packing materials. *Journal Chromatography*, v.797, n. 1-2, p. 65-74, 1998.
- BERZAS-NEVADO, J., GUIBERTEAU-CABANILLAS, C., CONTENTO-SALCEDO, A. M. A reverse phase HPLC method to determine six food dyes using buffered mobile phase. *Analytical Letter*, v.31, n. 14, p. 2513-2535, 1998.
- BONATO, P. S., BRAGA, G. L., SILVA, H. C., DEL LAMA, M. P. F. M., CARLUCCI, N. T. Evaluation of artificial food dyes used in Brazil. *Revista Farmácia Bioquímica Universidade de São Paulo*. v. 28, n. 1, p. 30-42, 1992.
- BUYUKPAMUKCU, E., SALDAMLI, I. Determination of synthetic food colorants in water-soluble food by TLC and UV-vis spectrophotometer. *Current Status Future Trends Analytical Food Chemistry*. v. 2, p. 291-294, 1995.
- GREENWAY, G. M., KOMETA, N., MACRAE, R. Determination of food colours by HPLC with online dialysis for sample preparation. *Food Chemistry*. v. 43, n. 2, p. 137-140, 1992.
- LAWRENCE, J. F., LANCASTER, F. E., CONACHER, H. B. S. Separation and detection of synthetic food colours by ion-pair HPLC. *Journal of Chromatography*. v. 210, p. 168 - 172, 1981.

- 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, 1998.
- RIBEIRO-CUNHA, M. R., CARODOSO, M. G., NELSON, D. L., JOKL, L. Qualitative methods for differentiating structurally similar red and yellow colors in food. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.15, n. 1, p. 6-11, 1996.
- RIZOVA, V., STAFILOV, T. HPTLC method of identification and determination of some synthetic food colorings. **Analytical Letter**, v. 28, n. 7, p. 1305–1316, 1995.
- ZGHAL, H., GUEITIN, C., HALOUI, E., CZCHOK, M. Determination of sunset yellow FCF and ponceau 4R in sweets by high performance liquid chromatography. **Science Aliments**, v. 15, n. 5, p. 491-496, 1995.

4.8 SUGESTÕES

O uso do detector em diferentes comprimentos de onda na região do ultravioleta (280; 254; 220 e 210nm), indicaram a potencialidade do uso das condições cromatográficas desenvolvida neste trabalho, para a determinação simultânea de outros aditivos, como por exemplo ácido cítrico ou ácido fumárico e aspartame, presentes nos preparados sólidos para refresco e refrigerantes, alterando apenas o comprimento de onda de 510 para 220 nm.

Caso ocorra variação no tempo de retenção dos corantes, podemos utilizar um padrão interno para cálculo do tempo de retenção relativo.

Dependendo da mistura de corantes presentes nas amostras a serem analisadas, pode ser reduzido a concentração de acetato de amônio na solução tampão, visando a redução do tempo de retenção, principalmente do vermelho 40 e azul brilhante.

CAPÍTULO 5

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE
CORANTES ARTIFICIAIS EM PREPARADOS
SÓLIDOS PARA REFRESCO E
REFRIGERANTES POR
ESPECTROFOTOMETRIA NO VISÍVEL**

5.1 RESUMO

Com a globalização a cada dia surgem novas marcas e fornecedores de produtos alimentícios, como por exemplo preparados sólidos para refresco e refrigerantes.

Os preparados sólidos para refresco são compostos principalmente de açúcar cristal e/ou edulcorantes, acidulantes, estabilizantes e corantes artificiais. Devido aos problemas que o excesso de alguns aditivos podem causar à saúde dos consumidores, principalmente os corantes artificiais, é necessário métodos analíticos para a determinação destes compostos para fins de desenvolvimento de novos produtos, controle da qualidade e fiscalização.

O método desenvolvido neste trabalho foi baseado na espectrofotometria na região do visível para a determinação de corantes artificiais em preparados sólidos para refresco e refrigerantes, utilizando os valores de absorvância e espectro da segunda derivada para identificação e quantificação dos corantes presentes nas amostras analisadas.

Os testes de repetibilidade apresentaram coeficiente de variação inferior a 6,4% (absorbância) e 5,2% (segunda derivada) para as amostras analisadas. A metodologia proposta apresenta eficiência com 97,1 – 100,7% (absorbância) e 97,2 – 101,3% (segunda derivada) de recuperação, sendo de execução simples e rápida.

5.2 SUMMARY

With the globalization, each day we have new brands and suppliers of nutritive products, such as solid drinks and soft drinks.

The solid drinks are composed mainly by crystal sugar and/or edulcorater, acidifying, stabilizing and artificial dyes. Due to problems that the excess of some additives can cause to the consumer health, mainly the artificial dyes, analytical methods are necessary to determine these compounds in order to develop new products, quality control and fiscalization.

The method developed in this work was based on spectrophotometry in the visible region to determine artificial food dyes in solid drinks and soft drinks, using the absorbance and second derivative spectrum for identification and quantification of the dyes in the analyzed samples.

The repetition tests showed coefficient of variation less than 6,4% (absorbance) and 5,2% (second derivate) for the analyzed samples. The proposed methodology shows efficiency with 97,1 – 100,7% (absorbance) and 97,2 – 101,3 (second derivate) of recovering, being the execution simple and fast.

5.3 INTRODUÇÃO

Os consumidores e a a globalização estão fazendo que aumente a demanda por alimentos considerados seguros e de alta qualidade. Muitos dos aspectos de segurança e qualidade são regulamentados e as exigências para os rótulos existem para proteger os consumidores.

Os corantes sintéticos, principalmente os corantes azo, são utilizados em grande variedade de produtos alimentícios durante muitos anos. A cor é um atributo importante de qualidade e muitos produtos processados são coloridos devido a destruição da sua cor natural durante o processamento ou para colorir produtos que são incolores, como por exemplo os refrigerantes e refrescos (Greenway et al, 1992).

Em alguns produtos é adicionado um corante inorgânico (dióxido de titânio) que funciona como agente turvador.

Devido a necessidade de controle destes aditivos é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de corantes em alimentos, principalmente para verificar a presença dos permitidos por lei e sua concentração, confirmar a ausência dos não declarados e avaliar a estabilidade dos mesmos durante o processamento e estocagem (Greenway et al, 1992).

Existem vários métodos para a determinação de corantes artificiais, entre os quais podemos destacar a espectrofotometria, cromatografia líquida de alta, eletroforese capilar e voltametria.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método analítico simples e rápido para a determinação de corantes artificiais em

preparados sólidos para refresco e refrigerantes utilizando a espectrofotometria na região do visível através da absorvância e do espectro da segunda derivada.

Para a determinação da concentração dos corantes por espectrofotometria na região do visível, a turbidez presente nas amostras após diluição deve ser removida. Não existe um método totalmente satisfatório que remova a turbidez sem remover a cor. A filtração proporciona resultados que são reprodutíveis dia-a-dia e entre laboratórios, entretanto, alguns processos de filtração podem remover a cor das soluções. O processo de centrifugação não interfere com a coloração das soluções, mas os resultados variam com o tipo de amostra, velocidade e tempo de centrifugação. (Standard Methods, 1992).

A análise quantitativa por espectrofotometria segue a lei de Beer, onde:

$$A = a.b.c$$

A = absorvância

a = absortividade

b = caminho ótico (cm)

c = concentração.

A absortividade da substância de interesse pode ser determinada através de padrões ou obtida através da literatura (ASTM, 1982).

Os principais tipos de cálculos para determinação da concentração podem ser baseados nas seguintes equações (ASTM, 1982):

- um componente ou dois componentes sem sobreposição de bandas de absorção:

$$c = A / a \cdot b$$

- dois componentes, com sobreposição de banda de absorção de somente um componente:

- determine o componente sem interferência (componente x) utilizando um comprimento de onda selecionado que não exista contribuição do componente y:

$$c_x = A / a_{x1} \cdot b$$

- calcule a contribuição deste componente em outro comprimento de onda, onde os dois componentes apresentem absorção:

$$A_{2x} = a_{2x} \cdot b \cdot c_x$$

- calcule a concentração do componente y:

$$c_y = (A_2 - A_{2x}) / a_2 \cdot b$$

O uso da segunda derivada do espectro de absorção permite eliminar a interferência causada por sobreposição de bandas dos componentes presentes nas amostras.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 AMOSTRAGEM

Foram analisadas trinta (30) amostras de preparados sólidos para refresco de diferentes marcas e sabores, 5 (cinco) amostras de refrigerantes sabor laranja de marcas diferentes e 1 (uma) amostra de refrigerante sabor uva. Todas as amostras foram adquiridas em supermercados da região de Campinas/SP. Cada amostra foi composta pelo mistura de duas embalagens do produto de mesmo lote e homogeneizadas para a retirada da amostra para análise. A determinação foi realizada em duplicata sendo que cada replicata é a média de 3 medidas espectrofotométricas.

Cada amostra foi composta de duas embalagens de mesmo lote do produto a ser analisado, sendo que as amostras de preparado sólido para refresco foram trituradas em almofariz para homogeneização e utilizado de 0,5 a 5 g que foram solubilizadas em tampão de acetato de amônio 0,02% (pH=4,8) e avolumado para 50 mL. Os refrigerantes foram degaseificados e diluídos na proporção de 1:1 em tampão acetato.

5.4.2 REAGENTES

Os reagentes acetato de amônio p.a. e ácido acético p.a. utilizados como tampão foram adquiridos da Merck. Os padrões dos corantes sintéticos (Amarelo de tartazina, Amarelo crepúsculo, Amaranato, Vermelho

40, Azul de indigotina e Azul brilhante) foram fornecidos pela Hilton Davis. Foi utilizado água destilada/deionizada para a preparação da solução tampão.

5.4.3 EQUIPAMENTOS

Foi utilizado um espectrofotômetro UV-Visível, Lâmbda 20 da Perkin Elmer com resolução de 1nm para a obtenção dos valores de absorvância e dos espectros em absorvância e segunda derivada.

Para correção do pH da solução de acetato de amônio 0,02% foi utilizado um pHmetro Micronal, previamente calibrado em pH 4,00 e 7,00 utilizando solução padrão Merck.

Para a determinação da turbidez das amostras em solução, foi utilizado um turbidímetro digital da HACH, Ratio XR.

5.4.4 MÉTODOS

O procedimento espectrofotométrico, proposto neste trabalho foi baseado principalmente nas metodologias desenvolvidas por Berzas-Nevado et all. (1993).

Todas as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 μm de poro (Millex) para completa remoção da turbidez.

e levadas ao espectrofotômetro para obtenção dos espectros (absorvância e segunda derivada) e valores de absorvância, sendo utilizado cubeta de quartzo com 10mm de caminho ótico.

O comprimento de onda de máxima absorção foi determinado utilizando os espectros em absorvância e segunda derivada.

A quantificação no método por absorvância foi realizada através de cálculos matemáticos utilizando a absorvância de cada corante obtida através curvas de calibração externa em diferentes comprimentos de onda.

No método da segunda derivada foi utilizado para quantificação curva de calibração externa, sendo utilizado o sinal da segunda derivada de cada corante nos comprimentos de onda específico (isento de interferência dos demais presentes na amostra) x concentração do corante (mg/L).

As curvas de calibração externa foram construídas com 5 concentrações diferentes de cada padrão isolados.

A determinação do valor de turbidez (NTU = unidade de turbidez nefelométrica) foi realizada através de turbidimetria (turbidímetro Hach), sendo utilizado as amostras diluídas em tampão acetato antes e após filtração.

No caso de sobreposições espectrais que não puderam ser resolvidos através de cálculos matemáticos ou espectro da segunda derivada foi utilizado a propriedade de estabilidade/instabilidade dos corantes em meio alcalino. Foi adicionado solução de hidróxido de sódio-50% aos padrões de corantes e amostras e obtidos novos espectros na região do visível.

Os limites de detecção foram obtidos através de diluições sucessivas

dos padrões, sendo calculado como sendo correspondente à concentração que produziu um valor do sinal medido três vezes maior que o nível de ruído médio medido com a solução de controle ou branco (Leite, 1998). Os limites de quantificação foram calculados como sendo duas vezes o valor dos limites de detecção para cada corante.

Os testes do fator de recuperação de padrões foram realizados em duplicata, adicionando os padrões nas amostras analisadas; sendo que o valor adicionado não deve ser superior ao dobro da resposta do sinal da matriz. O melhor fator de recuperação é o obtido através da diferença entre o produto matriz sem o analito de interesse com o produto matriz com o analito. Caso isto não seja viável, o padrão deverá ser adicionado sobre a matriz já contendo o analito (Leite, 1998).

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A turbidez das amostras é decorrente principalmente da presença de corante inorgânico (dióxido de titânio) e interfere significativamente na determinação dos corantes artificiais por espectrofotometria na região do visível. Os valores de turbidez (expresso em NTU - unidade de turbidez nefelométrica) determinados através de turbidímetro das amostras de preparados sólidos para refresco antes e após filtração em membrana filtrante de $0,45\mu\text{m}$, estão apresentados na tabela I.

Tabela I: Turbidez da solução de preparados sólidos para refresco pronto para o consumo determinada através de turbidímetro, antes e após filtração.

AMOSTRAS		TURBIDEZ (N.T.U)	
Sabor	Marca	sem filtração	após filtração ($0,45\mu\text{m}$)
Abacaxi	X	498	<10
	Z	392	<10
Limão	X	761	<10
	Y	1393	<10
Morango	X	417	<10
	Y	42	<10
	Z	216	<10
Uva	X	326	<10
	Y	27	<10
	Z	159	<10

Os valores de turbidez (NTU) obtidos através de turbidimetria das amostras de preparados sólidos para refresco de diferentes marcas e sabores, solubilizadas em água estão apresentados na figura 1.

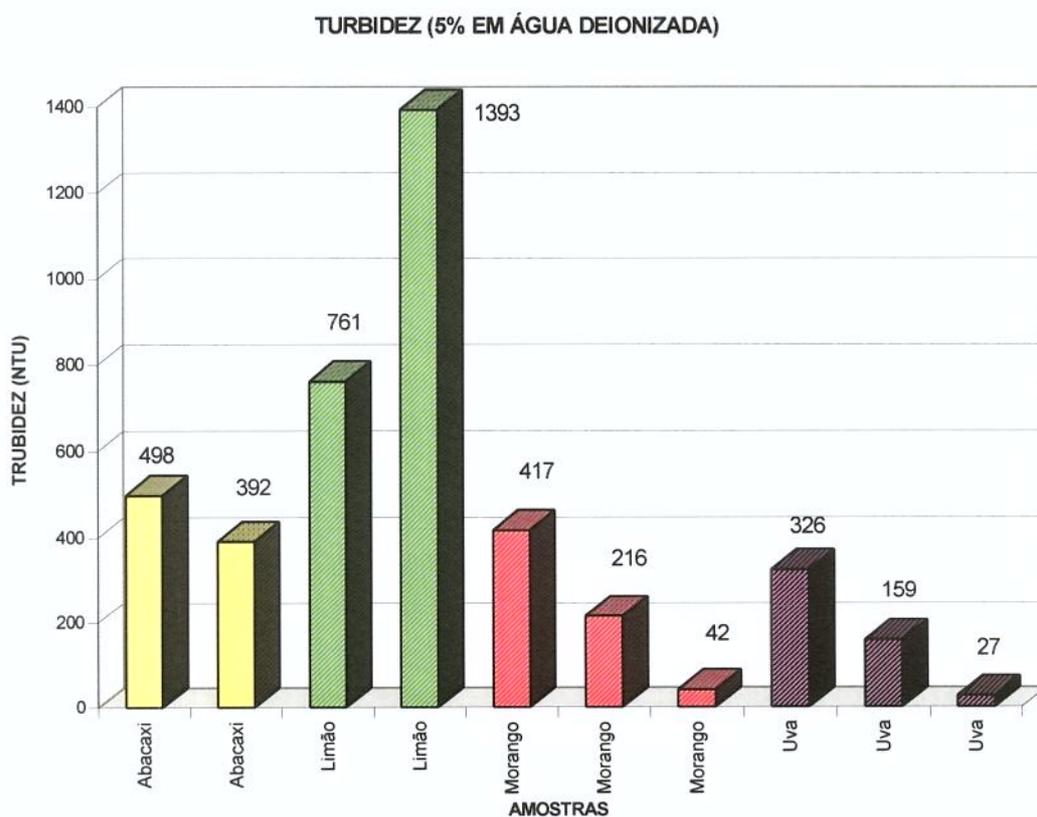


Figura 1: Valores de turbidez (NTU) de amostras de preparados sólidos para refresco.

Os espectros dos padrões em absorvância estão apresentados na figura 2 e os espectros na segunda derivada na figura 3.

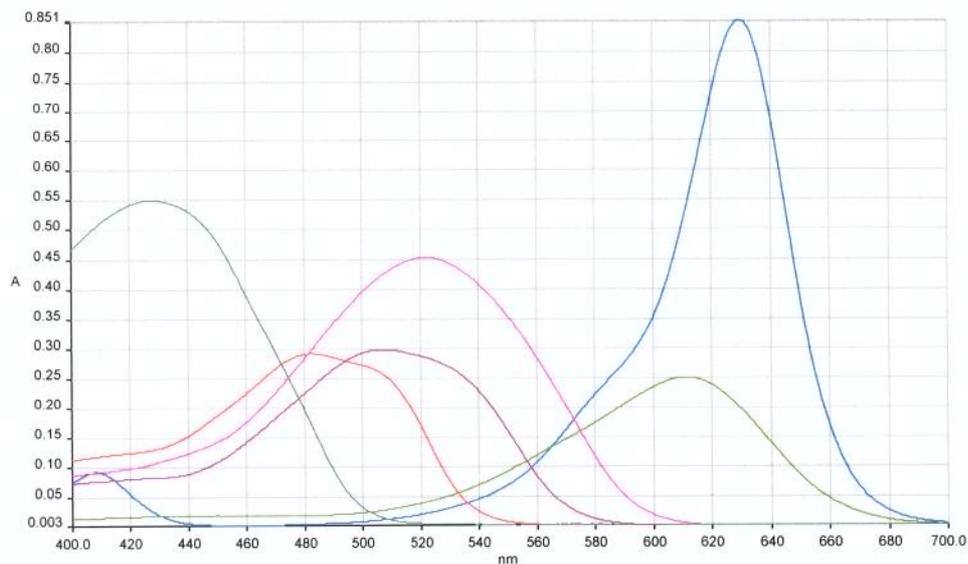
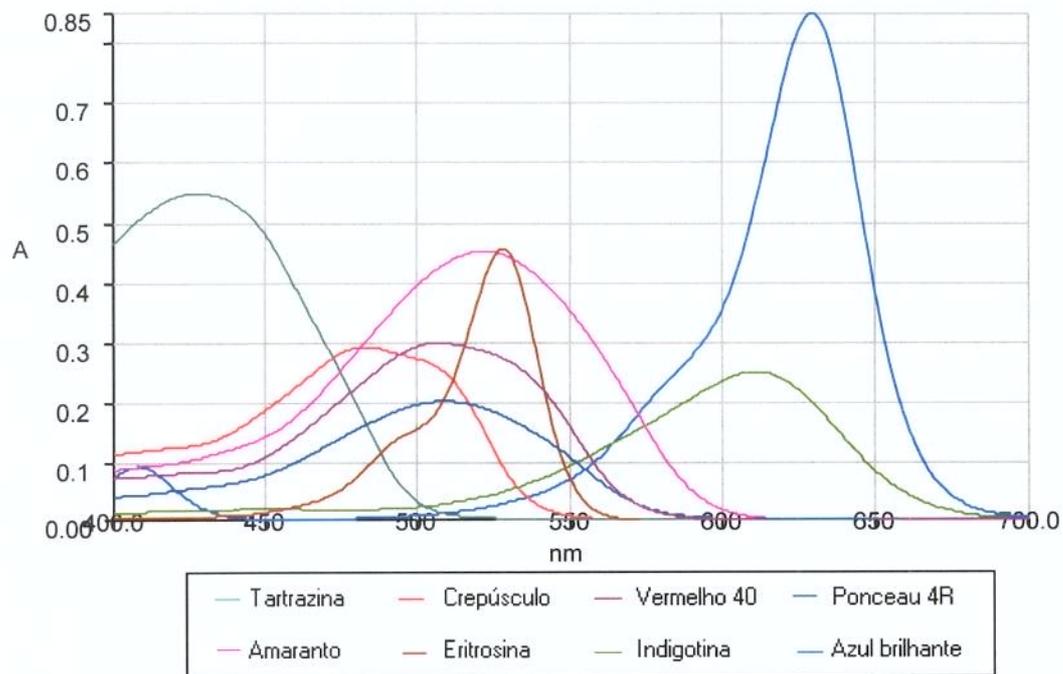
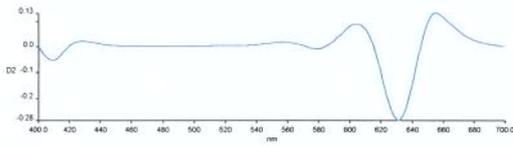
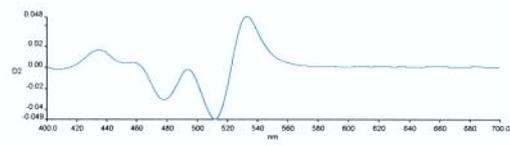


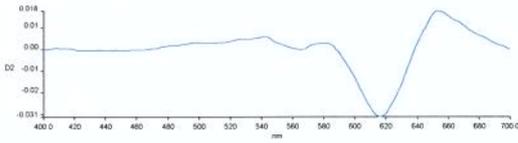
Figura 2: Espectro dos padrões de corantes artificiais na região do visível em absorvância. Tampão acetato 0,02%, pH=4,8. Região espectral: 700 - 400nm, caminho ótico = 10 mm, slit = 1mm. Corantes: amarelo de tartrazina, amarelo crepúsculo, vermelho 40, Ponceau 4R, amaranato, eritrosina, azul de indigotina e azul brilhante



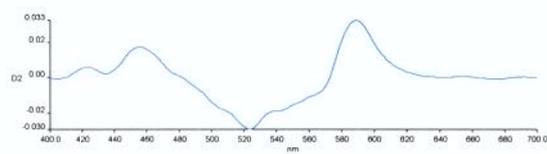
Azul brilhante



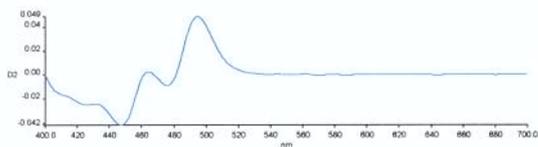
Amarelo crepúsculo



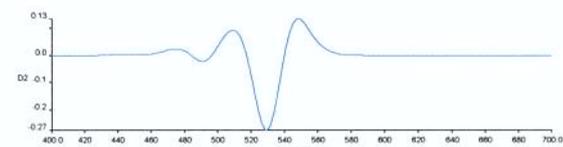
Azul de indigotina



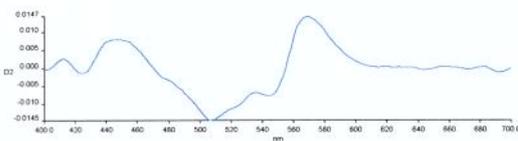
Amaranto



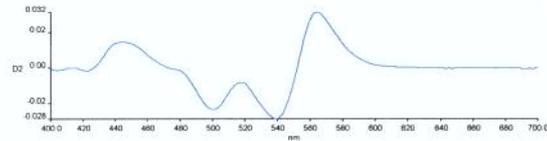
Amarelo de tartrazina



Eritrosina



Ponceau 4R



Vermelho 40

Figura 3: Espectro dos padrões de corantes artificiais na região do visível em 2º derivada. Tampão acetato 0,02%, pH=4,8. Região espectral: 700 - 400nm, caminho ótico = 10 mm, slit = 1mm. Corantes: azul brilhante (631nm); amarelo crepúsculo (514nm); azul de indigotina (617nm); amaranto (590nm); amarelo de tartrazina (425,448nm); eritrosina (528nm); Ponceau 4R (570nm); vermelho 40 (540nm).

O espectro de uma amostra de refrigerante em segunda derivada contendo um único corante está apresentado na figura 4 e o espectro de uma amostra de refrigerante contendo a mistura de três corantes está apresentada na figura 5.

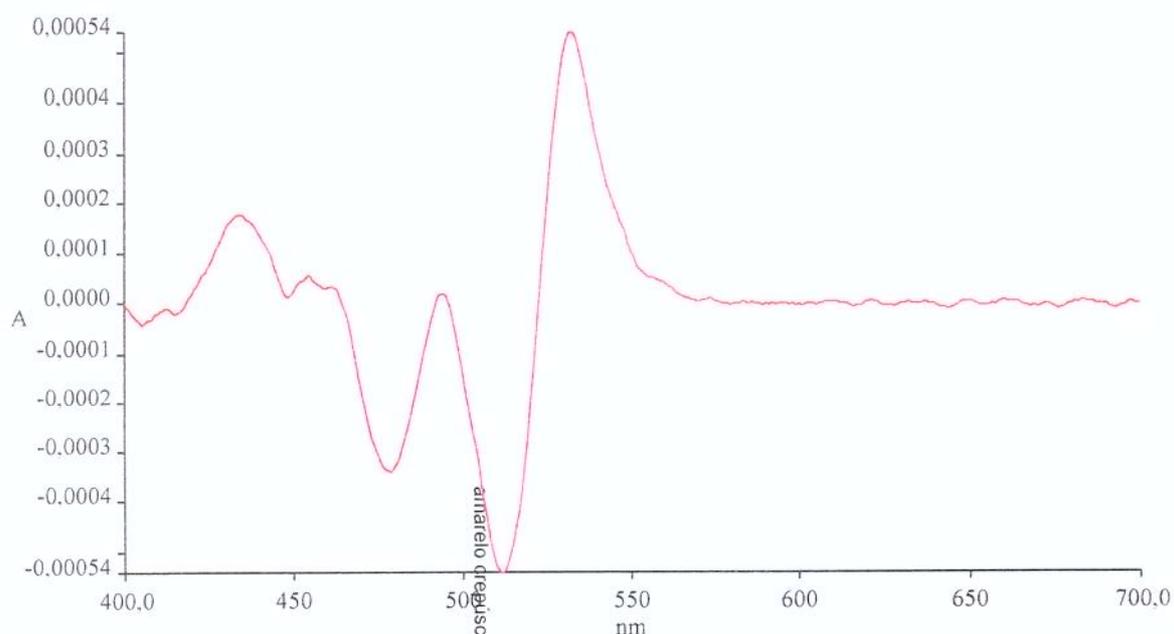


Figura 4: Espectro na região do visível em segunda derivada da amostra de refrigerante (sabor laranja). Tampão acetato 0,02%, pH=4,8. Região espectral: 700 - 350nm, caminho ótico = 10mm, slit = 1mm. Corante: amarelo crepúsculo.

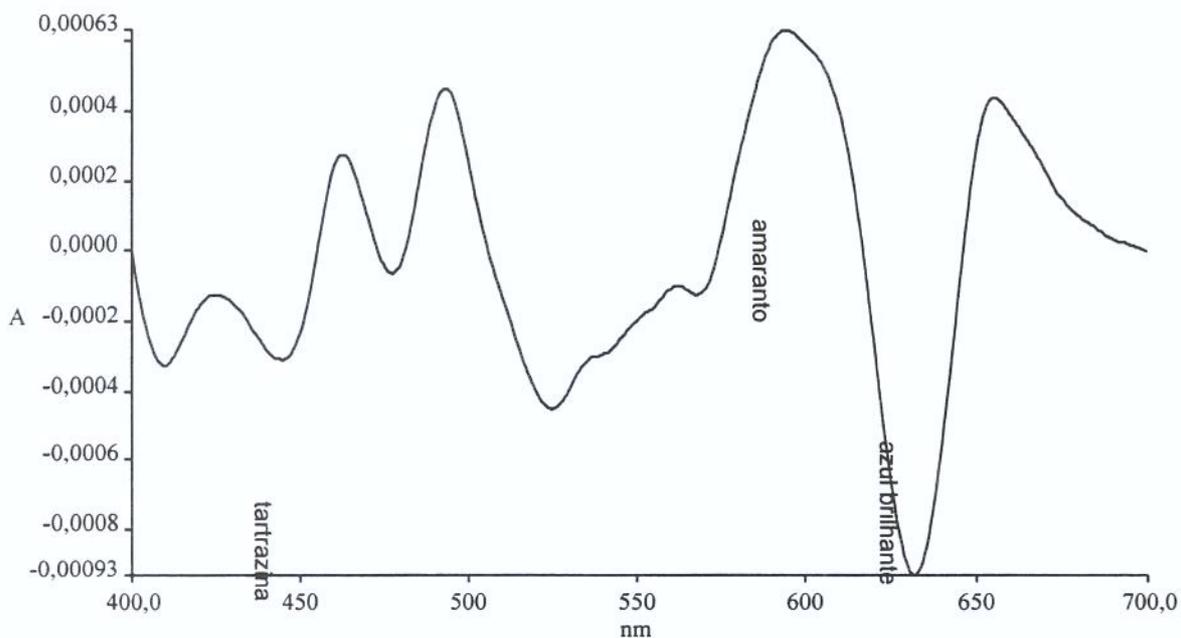


Figura 5: Espectro na região do visível em 2° derivada da amostra de refrigerante (sabor uva). Tampão acetato 0,02%, pH=4,8. Região espectral: 700 - 350nm, caminho ótico = 10mm, slit = 1mm. Corantes: amarelo de tartrazina, amarantho e azul brilhante.

As curvas de calibração utilizando os espectros dos padrões em segunda derivada estão apresentadas nas figuras 6 e 7, e apresentaram boa linearidade nas concentrações pré-estabelecidas, sendo a regressão linear (método dos mínimos quadrados) a forma utilizada para estimar a melhor reta que passa pelos pontos obtidos experimentalmente (Leite, 1998).

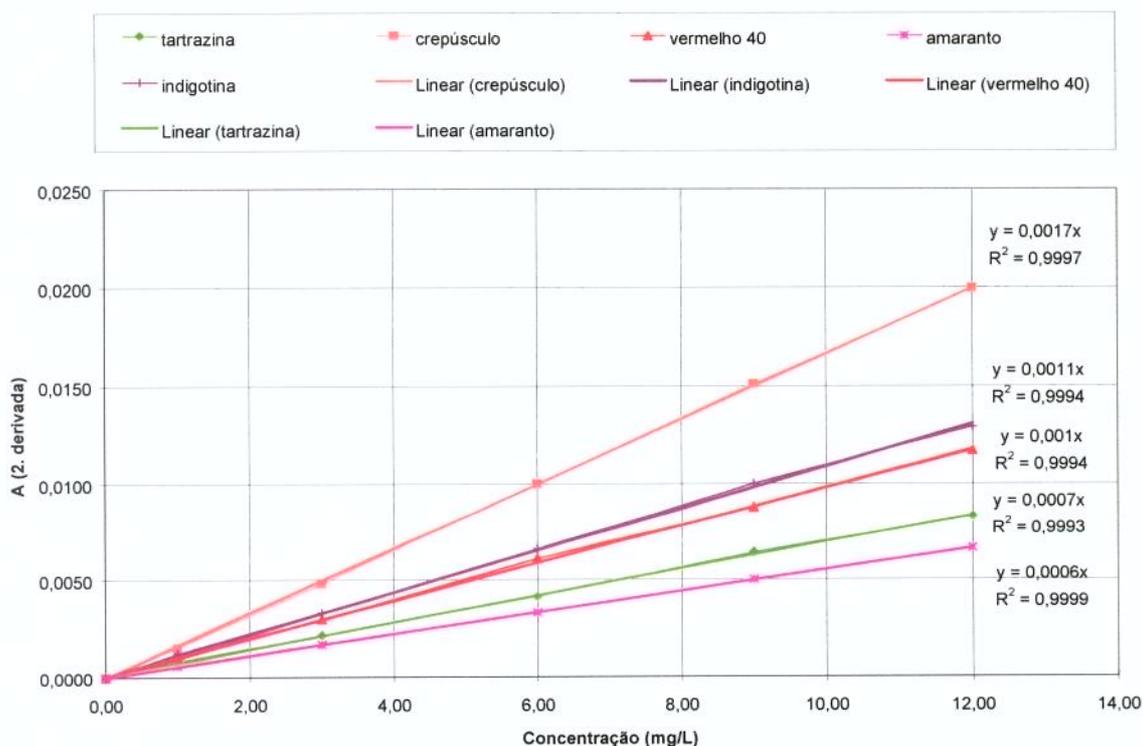


Figura 6: Curva de calibração para determinação de corantes artificiais por espectrofotometria na região do visível (segunda derivada). Tampão acetato 0,02%, pH=4,8. Região espectral: 700 - 350nm, caminho ótico = 10 mm, slit = 1mm.

Corantes: amarelo de tartrazina, amarelo crepúsculo, amaranato, vermelho 40, azul de indigotina.

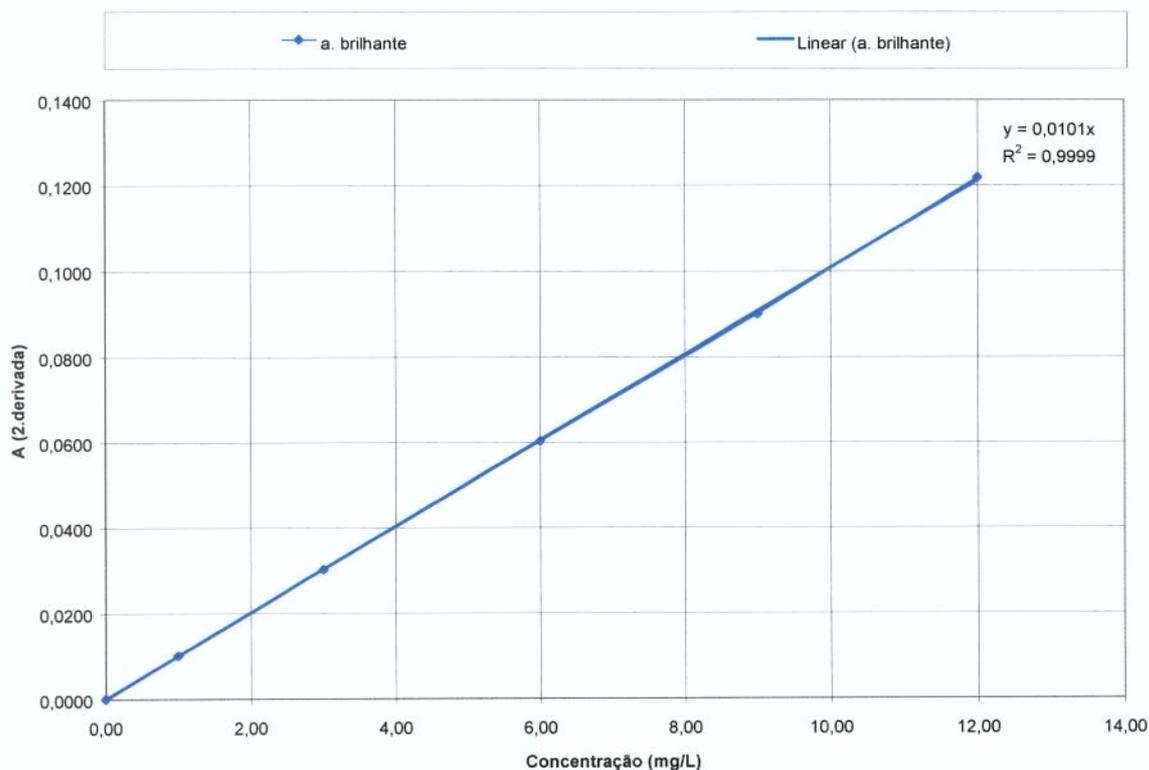


Figura 7: Curva de calibração de corante artificial por espectrofotometria na região do visível (segunda-derivada). Tampão acetato 0,02%, pH=4,8. Região espectral: 700-350nm, caminho ótico=10mm, slit=1mm. Corante: azul brilhante.

Os corantes e suas respectivas quantidades presentes nas amostras analisadas estão apresentadas na tabela II a e b (preparados sólidos para refresco) e tabela III a e b (refrigerantes).

Os fatores de recuperação para os corantes analisados estão apresentados na tabela IV e os desvios-padrão e coeficientes de variação médio de cada corante estão apresentados na tabela V.

Tabela II a: Corantes artificiais presentes em preparados sólidos para refresco e respectivas concentrações determinada através de espectrofotometria na região do visível (absorvância):

SABOR	MARCA	CORANTE (mg/100g)						Total
		tartrazina	crepúsculo	amaranto	vermelho 40	indigotina		
Laranja	A		4,98±0,05					4,98
	B	1,3±0,1	1,49±0,01					2,8
	C	0,92±0,01	1,34±0,03					2,26
	D	1,9±0,1	1,03±0,04					2,9
	E	0,31±0,02	0,99±0,02					1,30
	F	1,80±0,10	0,71±0,02					2,51
	K	1,28±0,06	1,48±0,03					2,76
	L	2,01±0,06	1,04±0,03					3,05
	B	2,05±0,04		0,76±0,03				2,81
	B				3,25±0,04	0,92±0,00		4,17
Uva	E			4,0±0,9		0,81±0,04		4,8
	F				3,1±0,1	0,9±0,1		4,0
	G				3,46±0,07	1,14±0,08		4,60
	H				6,1±0,1	1,61±0,06		7,7
	I			2,76±0,07		1,04±0,03		3,80
	K				3,86±0,06	1,37±0,07		5,23

Tabela II a: Continuação:

Corantes artificiais presentes em preparados sólidos para refresco e respectivas concentrações determinada através de espectrofotometria na região do visível (absorvância)

SABOR	MARCA	CORANTE (mg/100g)						Total
		tartrazina	crepúsculo	amaranto	vermelho 40	indigotina		
Maracujá-mamão	D	1,88±0,04	0,68±0,07					2,56
	F	0,34±0,06	0,04±0,03					0,38
Abacaxi	G	0,89±0,04	0,16±0,08					1,05
	J	0,26±0,03	0,14±0,04					0,40
Limão	H	0,7±0,1						0,7
Lima-limão	J	0,90±0,03	0,11±0,05					1,01
Guaraná	A	1,56±0,06		0,62±0,06		0,29±0,04		2,47
	B		0,43±0,02	0,89±0,05				1,32
Morango	D		2,27±0,05	3,34±0,06				5,61
	E			1,64±0,02				1,64
	F			1,23±0,04				1,23
	H			5,62±0,03				5,62
Tangerina	J		1,71±0,04	0,09±0,01				1,80
Maçã-verde	J		0,82±0,04	0,06±0,00		0,07±0,02		0,95

Tabela III a: Corantes artificiais presentes em refrigerantes e respectivas concentrações determinadas através de espectrofotometria na região do visível (absorvância)

SABOR	MARCA	CORANTE (mg/100g)						Total
		tartrazina	crepúsculo	amaranto	vermelho 40	indigotina	a.brilhante	
Laranja	A	3,19±0,04						3,19
	B	2,05±0,03						2,05
	C	5,62±0,07						5,62
	D	3,10±0,04						3,10
	E	3,01±0,03						3,01
Uva	A	0,21±0,05		3,98±0,08			4,07±0,04	8,26

Tabela II b: Corantes artificiais presentes em preparados sólidos para refresco e respectivas concentrações determinada através de espectrofotometria na região do visível (2° derivada):

SABOR	MARCA	CORANTE (mg/100g)						Total	
		tartrazina	crepúsculo	amaranto	vermelho 40	indigotina			
Laranja	A		4,83±0,07					4,83	
	B	1,20±0,01	1,23±0,01					2,43	
	C	0,78±0,04	1,23±0,02					2,01	
	D	1,74±0,04	0,77±0,03					2,51	
	E	0,25±0,03	0,88±0,04					1,13	
	F	1,63±0,03	0,47±0,01					2,10	
	K	1,16±0,02	1,28±0,02					2,44	
	L	1,96±0,04	0,99±0,03					2,95	
	Mamão-laranja	B	1,73±0,04		0,75±0,05				2,48
	Uva	B				2,47±0,10		0,68±0,05	3,15
E				3,6±0,1			0,44±0,03	4,0	
F					1,91±0,04		0,65±0,04	2,56	
G					3,21±0,04		0,90±0,04	4,11	
H					6,03±0,06		1,59±0,04	7,62	
I				2,52±0,04			0,99±0,04	3,51	
K					3,83±0,04		1,39±0,03	5,22	

Tabela II b: Continuação:

Corantes artificiais presentes em preparados sólidos para refresco e respectivas concentrações determinadas através de espectrofotometria na região do visível (2° derivada)

SABOR	MARCA	CORANTE (mg/100g)						Total
		tartrazina	crepúsculo	amaranto	vermelho 40	indigotina		
Maracujá-mamão	D	1,81±0,03	0,61±0,04					2,42
	F	0,36±0,03	0,04±0,04					0,40
	G	0,58±0,03	0,14±0,06					0,72
	J	0,30±0,03	0,12±0,03					0,42
Limão	H	0,61±0,05						0,61
Lima-limão	J	0,86±0,03	0,13±0,03					0,96
Guaraná	A	1,62±0,03		0,65±0,07		0,32±0,03		2,59
	B		0,51±0,04	0,92±0,03				1,43
	D		2,21±0,03	3,48±0,03				5,69
	E			1,68±0,05				1,68
Morango	F			1,28±0,02				1,28
	H			5,88±0,04				5,88
Tangerina	J		1,74±0,03	0,09±0,01				1,83
Maçã-verde	J		0,77±0,03	0,06±0,02		0,06±0,02		0,89

Tabela III b: Corantes artificiais presentes em refrigerantes e respectivas concentrações determinadas através de espectrofotometria na região do visível (2° derivada)

SABOR	MARCA	CORANTE (mg/100g)					Total
		tartrazina	crepúsculo	amaranto	vermelho 40	indigotina	
Laranja	A	3,39±0,01					3,39
	B	1,86±0,04					1,86
	C	5,3±0,1					5,3
	D	2,94±0,04					2,94
	E	2,89±0,04					2,89
Uva	A	0,19±0,04		3,38±0,06			4,06±0,03
							7,63

Tabela IV a: Determinação da % de recuperação de corantes artificiais determinado através de espectrofotometria na região do visível (absorvância):

Adição	Recuperação					
	tartrazina	crepúsculo	amaranto	vermelho 40	indigotina	azul brilhante
Refresco						
I	98,9	99,9	99,3	98,7	100,3	
II	102,4	98,9	98,5	101,0	96,4	
Média	100,7	99,4	98,9	99,9	98,4	
Refrigerante						
I	95,8		95,4			98,8
II	98,3		97,9			100,0
Média	97,1		96,7			99,4

Tabela IV b: Determinação da % de recuperação de corantes artificiais determinado através de espectrofotometria na região do visível (2° derivada):

Adição	Recuperação						
	tartrazina	crepúsculo	amaranto	vermelho 40	indigotina	azul brilhante	
Refresco							
I	99,5	101,1	98,5	98,8	98,9		
II	102,9	100,1	98,0	99,9	95,7		
Média	101,2	100,6	98,3	99,4	97,3		
Refrigerante							
I	98,5		95,9				100,6
II	99,7		98,5				101,9
Média	99,1		97,2				101,3

Tabela V a: Desvios-padrão e coeficientes de variação médio de cada corante artificial presente nas amostras de preparados sólidos para refresco analisadas obtidos na determinação por espectrofotometria na região do visível (absorvância).

Corante	Desvio-padrão	Coeficiente de variação (%)
Amaranto	0,11	5,66
Amarelo crepúsculo	0,04	3,28
Amarelo de tartrazina	0,06	6,32
Azul de indigotina	0,05	6,33
Azul brilhante	0,04	4,25
Vermelho 40	0,09	2,44

Tabela V b: Desvios-padrão e coeficientes de variação médio de cada corante artificial presente nas amostras de preparados sólidos para refresco analisadas obtidos na determinação por espectrofotometria na região do visível (2° derivada).

Corante	Desvio-padrão	Coeficiente de variação (%)
Amaranto	0,05	4,89
Amarelo crepúsculo	0,03	3,18
Amarelo de tartrazina	0,03	4,58
Azul de indigotina	0,03	5,05
Azul brilhante	0,03	3,75
Vermelho 40	0,05	1,81

Os limites de detecção e quantificação dos corantes artificiais analisados por espectrofotometria na região do visível estão indicados na tabela VI:

Tabela VI: Limites de detecção e quantificação de corantes artificiais por método espectrofotométrico na região do visível (absorvância):

Corante	Limite de detecção (mg/L)	Limite de quantificação (mg/L)
Amaranto	0,14	0,28
Amarelo crepúsculo	0,27	0,54
Amarelo de tartrazina	0,14	0,28
Azul de indigotina	0,13	0,26
Azul brilhante	0,05	0,10
Vermelho 40	0,11	0,22

Os limites de detecção e quantificação utilizando o espectro da segunda derivada foram considerados os mesmos.

Os valores de absorvidade dos corantes determinados através das curvas de calibração utilizando tampão acetato 0,02% (pH= 4,8), em diferentes comprimentos de onda, e foram baseados nas misturas de corantes presentes. Estes valores foram utilizados nos cálculos matemáticos da concentração de corantes presentes nas amostras analisadas e estão apresentados na tabela VII:

Tabela VII: Valores de absorvidade dos corantes em tampão acetato 0,02% (pH=4,8):

Corante	Comprimento de onda (nm)	Absorvidade
Amaranto	400	$7,242 \times 10^{-3}$
Amaranto	525	$3,833 \times 10^{-2}$
Vermelho 40	500	$4,728 \times 10^{-2}$
Vermelho 40	525	$3,833 \times 10^{-2}$
Azul indigotina	500	$3,588 \times 10^{-3}$
Amarelo crepúsculo	400	$1,665 \times 10^{-2}$

Foi observado sobreposição espectrais que não puderam ser resolvidas por cálculos matemáticos e espectro da segunda derivada com os corantes azul de indigotina e azul brilhante. Foi adicionado solução de hidróxido de sódio-50% aos padrões destes corantes, sendo observado esmaecimento da coloração do azul de indigotina.

Os espectros das amostras de refresco sabor uva (contendo azul de indigotina) e do refrigerante sabor uva (contendo azul brilhante) com e sem adição de solução de hidróxido de sódio-50% estão apresentados na Figura 8, sendo observado que a banda referente ao azul brihante permaneceu inalterada e a referente ao azul de indigotina desapareceu com a adição de hidróxido de sódio.

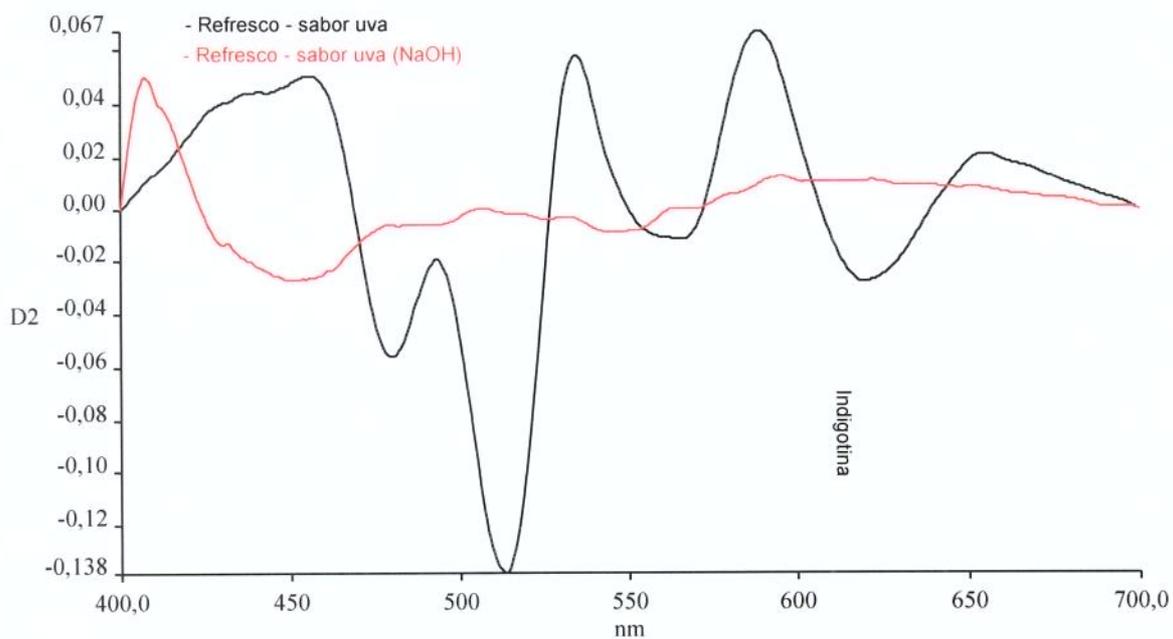
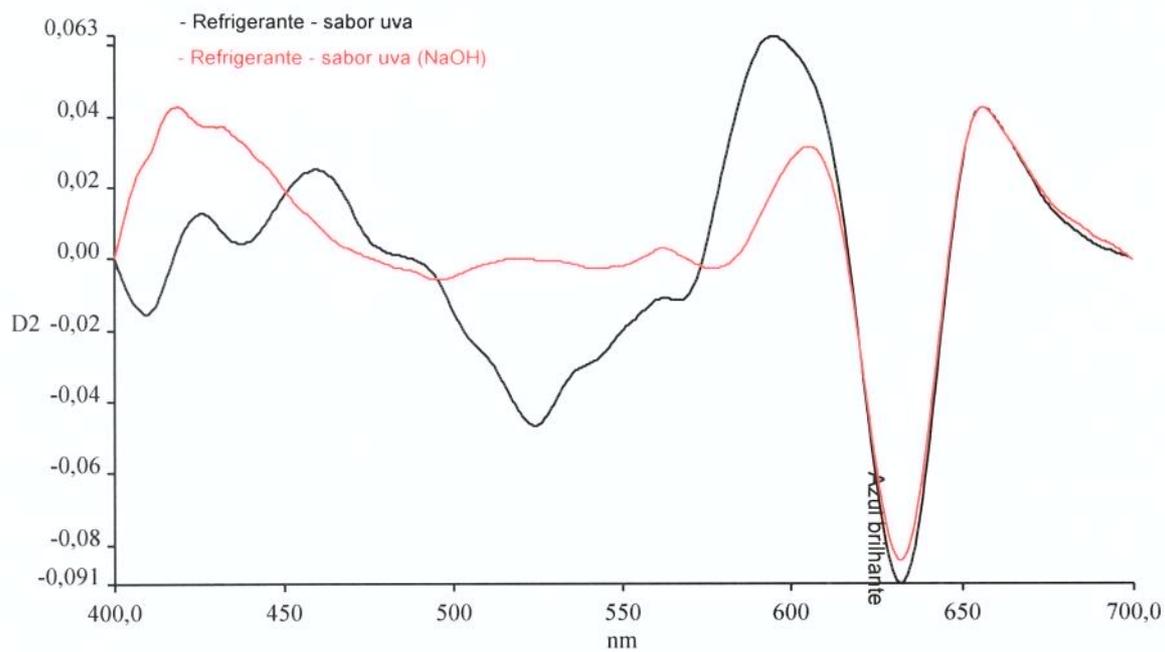


Figura 8: Espectros na região do visível em 2º derivada das amostras de refrigerante e refresco (sabor uva) com e sem adição de solução de hidróxido de sódio-50%. Região espectral: 700 - 400nm, caminho ótico = 10 mm, slit = 1mm.

5.6 CONCLUSÕES

O uso da espectrofotometria na caracterização de compostos químicos é bastante generalizada, sendo de grande importância na análise de alimentos. Os métodos espectrofotométricos apresentam a vantagem de serem de execução mais simples e rápida quando comparado com os métodos cromatográficos.

Um corante em solução pode ser identificado pelo seu espectro de absorção no visível e ultravioleta, desde que mantidas as condições analíticas, principalmente de pH. A significativa alteração dos espectros dos corantes pela diferença de pH, produz variação na identificação e quantificação dos mesmos, sendo utilizado solução tampão nos trabalhos desenvolvidos.

Quando o espectro não pode ser correlacionado com um corante conhecido, o corante desconhecido pode ser uma mistura de corantes, sendo necessário o uso de cálculos matemáticos, espectros das derivadas ou tratamentos quimiométricos para a confirmação da identidade.

A metodologia analítica desenvolvida, utilizando a espectrofotometria na região do visível, permitiu a determinação quantitativa dos corantes representes nas amostras de preparados sólidos para refresco e refrigerantes, sem necessidade de separação cromatográfica.

O tampão utilizado foi acetato de amônio à 0,02% e pH=4,8, permitindo a repetibilidade das determinações, uma vez que a estabilidade do corante e sua absorvância é dependente do pH da solução na qual está dissolvido.

Os resultados obtidos através da segunda derivada do espectro apresentaram melhores desvio-padrão, coeficiente de variação e recuperação de padrão, quando comparado com os obtidos utilizando-se os valores de absorvância em diferentes comprimentos de onda

Porém as duas metodologias analíticas por espectrofotometria na região do visível propostas neste estudo podem ser empregadas para determinação de corantes em vários tipos de preparados sólidos para refresco e refrigerantes. A preparação da amostra é simples, consistindo em pesagem, diluição em tampão acetato e filtração para os preparados sólidos para refresco e refrigerantes.

A filtração é necessária para a eliminação da turbidez causada pela presença principalmente de corante inorgânico (dióxido de titânio) presente em muitas das amostras analisadas. O processo de filtração é de execução mais simples e rápida do que a centrifugação, bem como minimiza a possibilidade de erro devido a tempo e velocidade de centrifugação insuficiente para a completa clarificação da amostra.

O valores obtidos de recuperação foram bons, indicando não haver perda dos compostos durante a preparação das amostras e interferência devido as sobreposições de bandas espectrais. Os coeficientes de variação obtidos para todos os corantes artificiais foram inferiores à 7,5%.

O método desenvolvido neste trabalho não se aplica a determinação simultânea de azul de indigotina e azul brilhante devido as sobreposições espectrais, porém os testes de estabilidade destes corantes em pH alcalino indicaram que não havia a mistura deste dois corantes nas amostras analisadas, estando em conformidade com o declarado nas embalagens dos produtos.

O método foi avaliado para as seguintes misturas de corantes: amarelo de tartrazina/amaranto; amaranto/azul de indigotina; vermelho 40/azul de indigotina; amarelo de tartrazina/amarelo crepúsculo; amarelo crepúsculo/amaranto; amaranto/vermelho 40; amarelo de tartrazina/amaranto/azul brilhante; amarelo de tartrazina/amaranto/azul de indigotina e para os corantes isolados.

As amostras analisadas estão em conformidade com a legislação Brasileira no que se refere a corantes em alimentos. A Legislação Brasileira permite a presença de no máximo três corantes artificiais por produto e o limite máximo de 10mg/100g ou 10mg/100mL no produto pronto para consumo.

Este trabalho foi realizado em laboratório certificado pela norma ISO 9002, sendo utilizado vidrarias certificadas, equipamentos calibrados e juntamente com os resultados obtidos de limites de detecção e quantificação, desvio-padrão e % de recuperação, podemos concluir que o método analítico desenvolvido é adequado para a identificação e quantificação dos corantes artificiais presentes em amostras de refrigerantes e preparados sólidos para refresco, permitindo sua aplicação no controle da qualidade, desenvolvimento e fiscalização destes produtos alimentícios.

5.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERZAS-NEVADO, J., RODRIGUES FLORES, J., VILLASENOR LLERENA, M. J., RODRIGUEZ FARINAS, N. Rapid spectrophotometric method to resolve ternary mixtures of tartrazine, quinoline yellow and patent blue V in commercial products. *Journal Analytical Chemistry*, v.365, n. 4, p. 383-388, 1999.
- BERZAS-NEVADO, J., GUIBERTEAU-CABANILLAS, C., CONTENTO-SALCEDO, A. M., MARTIN-VILLAMUELAS, R. Spectrophotometric simultaneous determination of Amaranth, Ponceau 4R, Allura red and Red 2G by partial least-squares and principal component regression multivariate calibration. *Analytical Letter*, v.32, n. 9, p. 1879-1898, 1999.
- BERZAS-NEVADO, J., GUIBERTEAU-CABANILLAS, C., CONTENTO-SALCEDO, A. M., FLORES, J. R., LLERENA, M. J. V. Rapid spectrophotometric method for determining erythrosine, amaranth and tartrazine in ternary mixtures. *Analytical Letter*, v.30, n. 14, p. 2565-2578, 1997.
- BERZAS-NEVADO, J., GUIBERTEAU-CABANILLAS, C., CONTENTO-SALCEDO, A. M. Simultaneous spectrophotometric determination of three food dyes using the first derivative of ratio spectra. *Talanta*, v.42, n. 12, p. 2043-2051, 1995.
- BERZAS-NEVADO, J., GUIBERTEAU-CABANILLAS, C., CONTENTO-SALCEDO, A.M. Determination of colourants in binary mixture by derivative spectrometry using zero-crossing and ratio spectra. *Analysis*, v.22, n. 1, p. 5-13, 1994.

- BONATO, P. S., BRAGA, G. L., SILVA, H. C., DEL LAMA, M. P. F. M., CARLUCCI, N. T. Evaluation of artificial food dyes used in Brazil. **Revista Farmácia Bioquímica Universidade de São Paulo**. v. 28, n. 1, p. 30-42, 1992.
- BUYUKPAMUKCU, E., SALDAMLI, I. Determination of synthetic food colorants in water-soluble food by TLC and UV-vis spectrophotometer. **Current Status Future Trends Analytical Food Chemistry**. v. 2, p. 291-294, 1995.
- CAPITAN-VALLVEY, L. F., FERNANDEZ, M. D., DE ORBE, I., AVIDAD, R. Simultaneous determination of colorants tartrazine, ponceau 4R and sunset yellow FCF in foodstuffs by solid-phase spectrophotometry using partial least-squares multivariate calibration. **Talanta**. v. 47, n. 4, p. 861-868, 1998.
- GARCIA PENALVER, L., SIMAL LOZANO, J., LOPEZ HERNANDEZ, J. A comparison of three spectrophotometric methods for simultaneous quantification of mixtures of E102 and E110 food additives. **Spectroscopy European**. v. 11, n. 1, p. 8-12, 1999.
- KWIATKOSKA-PURCHNIARZ, B., PODOLSKA, M., BIALECKA, W., TUSZUNSKA, E. Identification of synthetic dyes in pharmaceutical by spectroscopic method. **Acta Polish Pharmaceutical**, v. 54, n.3, p. 171-178, 1997.
- LOPEZ-DE-ALBA, P. L., LOPEZ-MARTINEZ, L., WROBEL-KACZMARCZYK, K., WROBEL-ZASADA, K., AMADOR-HERNANDEZ, J. New spectrophotometric method for binary mixtures. **Bol. Soc. Chil. Quim.** v.41, n. 2, p.111-119, 1996.

NI, Y., GONG, X. Simultaneous spectrophotometric determination of food colorants. **Analytical Chemical Acta**, v. 354, n. 1-3, p. 163-171, 1997.

SAGUY, I., MIZRAHI, S., KOPELMAN, J. Matematical approach for the determiantion of dyes concentration in mixtures, **Journal of food science**, v. 43, p. 121 – 123, 1978.

5.8 SUGESTÕES

O procedimento para avaliação da turbidez dos preparados sólidos para refresco pode ser adequado para correlacionar a turbidez em NTU com a quantidade presente de corante inorgânico (dióxido de titânio) utilizado para conferir turbidez ao produto quando pronto para o consumo.

Os limites de detecção / quantificação podem ser reduzidos aumentando o caminho ótico, ou seja utilizando cubetas de 50mm em substituição as cubetas de 10mm.

O método poderá ser utilizado para a determinação de ponceau 4R e eritrosina levando-se em consideração as matrizes e as combinações dos corantes a serem determinados. Também poderá ser aplicado na determinação de corantes artificiais em outros tipos de amostras, como por exemplo, medicamentos.

A alteração da coloração de cada corante artificial (como esmaecimento e aumento da intensidade) com a variação do pH da solução a ser analisada, poderá ser utilizada na identificação e quantificação dos mesmos.

CAPÍTULO 6

**COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA
DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS
EM PREPARADOS SÓLIDOS PARA REFRESCO
POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA E ESPECTROFOTOMETRIA NA
REGIÃO DO VISÍVEL**

6.1 RESUMO

A estatística aplicada à química analítica é uma ferramenta de uso cada vez mais frequente dos analistas, pois não é possível aceitar ou rejeitar um resultado somente pela aparência.

Resultados analíticos sem o mínimo de tratamento estatístico é como um método analítico sem validação, temos um número e não um resultado representativo da amostra analisada.

É necessário um modelo simples que possa ser aplicado ao desenvolvimento, otimização e execução dos métodos analíticos pelos laboratórios de pesquisa, controle da qualidade, entre outros.

O objetivo deste trabalho foi comparar os três métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de corantes artificiais em preparados sólidos para refresco por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria na região do visível utilizando absorvância (VIS A) e segunda derivada (VIS 2'DERIV).

O modelo proposto neste trabalho é adequado à laboratórios de controle da qualidade e desenvolvimento preparados sólidos para refresco e utilizou a análise de variância (ANOVA) para a comparação dos resultados obtidos pelos três métodos analíticos diferentes.

6.2 SUMMARY

The statistic applied to the analytical chemistry is a tool that is being used by the analysts with more frequency, since it is not possible to accept or reject a result only by the appearance.

Analytical results without a minimum of statistical treatment are like an analytical method without validation, we have a number and not a representative result of the analyzed sample.

A simple model is necessary that can be applied to the development, optimization and execution of the analytical methods by research, quality control and other laboratories.

The objective of this work was to compare the three analytical methods developed for artificial food dye determination in solid drinks by high performance liquid chromatography (HPLC) and visible spectrophotometry using absorbance (VIS A) and second derivative (VIS 2'DERIV).

The model proposed in this work is proper for quality control and research laboratories of the solid drinks and used variance analysis to compare the results obtained by three different analytical methods.

6.3 INTRODUÇÃO

Os consumidores e a globalização estão fazendo que aumente a demanda por alimentos considerados seguros e de alta qualidade. Muitos dos aspectos de segurança e qualidade são regulamentados e as exigências para os rótulos existem para proteger os consumidores. É necessário métodos analíticos que detectem adulteração e possam ser utilizados no controle da qualidade e fiscalização destes produtos.

Os órgãos regulamentadores exigem a validação dos métodos analíticos, sendo considerado em alguns casos, requisito essencial para obtenção de registro (Brittain, 1998).

A validação de um método analítico é definida como sendo um processo através do qual estudos de laboratório são realizados para garantir que o método em uso atenda às exigências desejadas (Brittain, 1998). Para que um método analítico possa ser validado é necessário um tratamento estatístico dos resultados.

O tratamento estatístico pode ser aplicado aos resultados obtidos por um mesmo método analítico ou para a comparação entre vários métodos .

O modelo de tratamento estatístico proposto neste trabalho para a comparação dos resultados obtidos pelos métodos espectrofotométricos e cromatográfico incluiu teste Q e análise de variância (ANOVA).

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

• EQUIPAMENTOS

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Milton Roy, composto de sistema isocrático e válvula injetora tipo Rheodyne com capacidade de injeção de 20 μ l. A coluna cromatográfica utilizada foi RP-18 Sigma Aldrich Spherisorb Octadecil (250mm x 4,6mm e partículas com 5 μ m de diâmetro). A detecção e quantificação foi realizada utilizando um detector UV-Visível variável à 510nm, possibilitando a determinação de todos os corantes em uma única corrida cromatográfica.

• METODOLOGIA ANALÍTICA

O procedimento cromatográfico por CLAE, utilizado no desenvolvimento do método analítico foi baseado principalmente na metodologia de Prado & Godoy (1998) e Berzas-Nevedo et al. (1997 e 1998).

Cada amostra foi composta de duas embalagens de mesmo lote do produto a ser analisado, sendo que as amostras de preparado sólido para refresco foram trituradas em almofariz para homogeneização e utilizado de 0,5 a 5 g que foram solubilizadas em fase móvel e avolumado para 50mL.

Todas as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 μ m de poro (Millex) e injetadas no cromatógrafo.

A fase móvel utilizada foi tampão acetato de amônio 0,05M: metanol (80:20), sendo o tempo de corrida cromatográfica de 20 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto.

Os corantes foram detectados e quantificados em 510nm.

A identificação feita por comparação dos tempos de retenção obtidos com padrões injetados nas mesmas condições das amostras, verificação da alteração das áreas relativa ao corante x comprimento de onda e por co-cromatografia. A quantificação foi realizada através de curvas de calibração externa, construídas com 5 concentrações diferentes de cada padrão.

As amostras e padrões foram analisados em duplicata e as injeções realizadas em triplicata.

Os limites de detecção foram obtidos através de diluições sucessivas dos padrões, sendo calculado como sendo correspondente à concentração que produziu um valor do sinal medido três vezes maior que o nível de ruído médio medido com a solução sacarose (Leite, 1998).

6.4.2 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO VISÍVEL

- **EQUIPAMENTOS**

Foi utilizado um espectrofotômetro UV-Visível, Lâmbda 20 da Perkin Elmer com resolução de 1nm para a obtenção dos valores de absorvância e dos espectros em absorvância e segunda derivada.

• **MÉTODOLOGIA ANALÍTICA**

O procedimento espectrofotométrico, proposto neste trabalho foi baseado principalmente nas metodologias desenvolvidas por Berzas-Nevado et all. (1993).

Cada amostra foi composta de duas embalagens de mesmo lote do produto a ser analisado, sendo que as amostras de preparado sólido para refresco foram trituradas em almofariz para homogeneização e utilizado de 0,5 a 5g que foram solubilizadas em tampão de acetato de amônio 0,02% (pH=4,8) e avolumado para 50mL. Os refrigerantes foram desgaseificados e diluídos na proporção de 1:1 em tampão acetato.

Todas as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 μ m de poro (Millex) para completa remoção da turbidez e levadas ao espectrofotômetro para obtenção dos espectros e valores de absorvância, sendo utilizado cubeta de quartzo com 10mm de caminho ótico.

Os corantes foram detectados e quantificados por absorção na região do visível de 350 - 700nm.

A quantificação no método por absorbância foi realizada através de cálculos matemáticos utilizando a absorvidade de cada corante obtida através curvas de calibração externa.

No método da segunda derivada foi utilizado para quantificação dos corantes curva de calibração externa utilizando corantes padrão, sendo utilizado o valor de absorvância (segunda derivada) x concentração do corante (mg/l).

Os limites de detecção foram obtidos através de diluições sucessivas dos padrões, sendo calculado como sendo correspondente à concentração que produziu um valor do sinal medido três vezes maior que o nível de ruído médio medido com a solução de controle ou branco (Leite, 1998).

6.4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

- **EQUIPAMENTOS**

Microcomputador IBM ThinkPad 390X ou similar: equipado com Microsoft Excel 97.

Calculadora científica Texas TI-30X IIS ou similar.

- **METODOLOGIA**

- **Teste Q.**

Neste teste os valores são rejeitados com base na amplitude das medidas.

Para a aplicação do teste Q foi determinado a diferença existente entre a maior e a menor média (faixa) e entre a menor média e a média mais próxima em módulo aplicado aos conjuntos de resultados de cada corante artificial obtido pelos três métodos analíticos desenvolvidos: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria na região do visível por absorvância (VIS A) e segunda derivada (VIS 2' DERIV).

Foi obtido o valor Q pela divisão da diferença em módulo pela faixa e comparado com os valores tabelados.

- **Análise de variância.**

A comparação de mais de duas médias de resultados analíticos é uma prática frequente na química analítica (Vogel, 1992), visando garantir que os resultados diferentes são comparáveis e que a precisão dos dois são coerentes (Leite, 1998).

A análise de variância pode ser aplicada aos resultados obtidos na mesma amostra por analistas diferentes, análise da mesma amostra em equipamentos diferentes, análise da mesma amostra por métodos diferentes entre outras.

A análise de variância foi realizada através do Excel para os conjuntos de resultados de cada corante artificial determinado pelos três métodos analíticos desenvolvidos: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria na região do visível por absorvância (VIS A) e segunda derivada (VIS 2' DERIV).

Foi determinado a estimativa da variância para cada conjunto de medidas, sendo determinado o valor de **F**.

6.4.4 AMOSTRAS

Foram analisadas trinta (30) amostras de preparados sólidos para refresco de diferentes marcas e sabores. Todas as amostras foram adquiridas em supermercados da região de Campinas/SP. Cada amostra

foi composta pela mistura de duas embalagens do produto de mesmo lote e homogeneizadas para a retirada da amostra para análise. A determinação foi realizada em duplicata.

Foram utilizados os resultados da determinação de corantes artificiais presentes em preparados sólidos para refresco através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria na região do visível por absorvância (VIS A) e segunda derivada (VIS 2' DERIV) para o teste Q e análise de variância (ANOVA).

6.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados médios da determinação da concentração dos corantes artificiais (mg/100g) em preparados sólidos para refresco por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrofotometria na região do visível por absorvância (VIS A) e por segunda derivada (VIS 2'DERIV) estão apresentados nas tabelas 1 a 5:

Tabela 1: Concentração média (mg/100g) de amarelo de tartrazina em amostras de preparados sólidos para refresco:

SABOR	CLAE	VIS (A)	VIS (2'DERIV)
LARANJA	1,23	1,25	1,20
LARANJA	1,25	1,28	1,16
LARANJA	0,89	0,92	0,78
LARANJA	1,89	1,94	1,74
LARANJA	1,94	2,01	1,96
LARANJA	0,27	0,31	0,25
LARANJA	1,76	1,80	1,63
MAMÃO/LARANJA	1,95	2,05	1,73
MARACUJÁ/MAMÃO	2,02	1,88	1,81
ABACAXI	0,28	0,34	0,36
ABACAXI	0,47	0,89	0,58
LIMÃO	0,56	0,66	0,61
GUARANÁ	1,52	1,56	1,62
ABACAXI	0,29	0,26	0,30
LIMA-LIMÃO	0,91	0,90	0,86

Tabela 2: Concentração média (mg/100g) de amarelo crepúsculo em amostras de preparados sólidos para refresco:

SABOR	CLAE	VIS (A)	VIS (2'DERIV)
LARANJA	5,01	4,98	4,83
LARANJA	1,37	1,49	1,23
LARANJA	1,41	1,48	1,28
LARANJA	1,29	1,34	1,23
LARANJA	0,98	1,03	0,77
LARANJA	0,98	1,03	0,77
LARANJA	0,91	0,99	0,88
LARANJA	0,66	0,71	0,47
MARACUJÁ/MAMÃO	0,63	0,68	0,61
ABACAXI	0,02	0,04	0,04
ABACAXI	0,10	0,16	0,14
MORANGO	0,49	0,43	0,51
MORANGO	1,90	2,27	2,21
TANGERINA	2,04	1,71	1,74
MAÇÃ-VERDE	0,87	0,82	0,77
ABACAXI	0,11	0,14	0,12
LIMA-LIMÃO	0,12	0,11	0,13

Tabela 3: Concentração média (mg/100g) de vermelho 40 em amostras de preparados sólidos para refresco:

SABOR	CLAE	VIS (A)	VIS (2'DERIV)
UVA	2,98	3,14	1,91
UVA	3,16	3,25	2,47
UVA	3,34	3,46	3,21
UVA	5,97	6,14	6,03
UVA	4,01	3,86	3,83

Tabela 4: Concentração média (mg/100g) de azul de indigotina em amostras de preparados sólidos para refresco:

SABOR	CLAE	VIS (A)	VIS (2'DERIV)
UVA	0,84	0,87	0,65
UVA	0,78	0,81	0,44
UVA	0,89	0,92	0,68
UVA	1,08	1,14	0,90
GUARANÁ	0,37	0,29	0,32
UVA	1,06	1,04	0,99
UVA	1,56	1,61	1,59
UVA	1,34	1,37	1,39
MAÇÃ-VERDE	0,074	0,066	0,063

Tabela 5: Concentração média (mg/100g) de amarantho em amostras de preparados sólidos para refresco:

SABOR	CLAE	VIS (A)	VIS (2'DERIV)
MAMÃO/LARANJA	0,74	0,76	0,745
UVA	3,92	3,99	3,55
GUARANÁ	0,69	0,62	0,65
MORANGO	1,31	1,23	1,28
MORANGO	0,85	0,89	0,92
MORANGO	3,54	3,34	3,48
MORANGO	5,95	5,62	5,88
MORANGO	1,72	1,64	1,68
UVA	2,58	2,76	2,52
TANGERINA	0,094	0,089	0,088
MAÇÃ-VERDE	0,052	0,064	0,054

6.5.1. Teste Q.

Os resultados dos testes Q para cada corante artificial determinado através de CLAE, VIS A e VIS 2'DERIV estão apresentados na tabela 6:

Tabela 6: Teste Q aplicado aos valores médios de concentração de cada corante artificial presente em amostras de preparados sólidos para refresco

Corante	Q (menor)	Q (maior)	Q 90% (n=3; 0,94)	Q 98% (n=3; 0,97)
amaranto	0,26	0,74	inferiores	inferiores
vermelho 40	0,84	0,16	inferiores	inferiores
tartrazina	0,44	0,56	inferiores	inferiores
indigotina	0,88	0,11	inferiores	inferiores
amarelo crepúsculo	0,69	0,31	inferiores	inferiores

Os valores encontrados para o teste Q indicaram que os valores médios encontrados para todos os corantes artificiais nas amostras analisadas foram inferiores os tabelados para o níveis de confiança de 90 e 98%.

6.5.2. Análise de variância.

Os resultados da comparação das médias da concentração de corantes artificiais em preparados sólidos para refresco determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrofotometria na região do visível por absorvância (VIS A) e por segunda derivada (VIS 2'DERIV) estão apresentados na tabela 7:

Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) aplicado aos resultados médios de concentração de cada corante artificial presente em amostras de preparados sólidos para refresco, comparando os três métodos analíticos desenvolvidos: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrofotometria na região do visível por absorvância (VIS A) e por segunda derivada (VIS 2'DERIV).

Corante	F	F crítico
amaranto	0,003	3,316
vermelho 40	0,178	3,885
tartrazina	0,086	3,220
indigotina	0,173	3,403
amarelo crepúsculo	0,032	3,191

Os valores de F obtidos para os corantes analisados foram inferiores ao F-crítico na análise de variância.

6.6 CONCLUSÕES

Os valores encontrados para o teste Q indicaram que os valores médios encontrados para todos os corantes artificiais nas amostras analisadas pelos três métodos analíticos devem ser aceitos.

Pela análise de variância (ANOVA) os valores de F encontrados são inferiores aos valores de F tabelados no nível de 5%, indicando que não houve diferença significativa entre os três métodos analíticos desenvolvidos para a determinação da concentração de corantes artificiais nas amostras de preparados sólidos para refresco.

Assim podemos confirmar que os três métodos citados podem ser usados indiferentemente para a determinação destes corantes artificiais (amarelo de tartrazina, amarelo crepúsculo, amaranato, vermelho 40, azul de indigotina) nestes tipos de amostras de preparados sólidos para refresco.

6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACCAN, N., ANDRADE, J. C., GODINHO, O. E. S., BARONE, J. S. Erros e tratamentos dos dados analíticos. *In: Química analítica quantitativa elementar.*, Ed. Unicamp, 2.ed., p. 3-29, 1985.
- BEIGUELMAN, B. A análise de variância. *In: Curso prático de bioestatística.*, Revista Brasileira de Genética, 3.ed., p. 153-181, 1994.
- BERZAS-NEVADO, J., RODRIGUES FLORES, J., VILLASENOR LLERENA, M. J., RODRIGUEZ FARINAS, N. Rapid spectrophotometric method to resolve ternary mixtures of tartrazine, quinoline yellow and patent blue V in commercial products. *Journal Analytical Chemistry*, v.365, n. 4, p. 383-388, 1999.
- BERZAS-NEVADO, J., GUIBERTEAU-CABANILLAS, C., CONTENTO-SALCEDO, A. M., MARTIN-VILLAMUELAS, R. Spectrophometric simultaneous determination of Amaranth, Ponceau 4R, Allura red and Red 2G by partial least-squares and principal component regression multivariate calibration. *Analytical Letter*, v.32, n. 9, p. 1879-1898, 1999.
- BERZAS-NEVADO, J., GUIBERTEAU-CABANILLAS, C., CONTENTO-SALCEDO, A. M. A reverse phase HPLC method to determine six food dyes using buffered mobile phase. *Analytical Letter*, v.31, n. 14, p. 2513-2535, 1998.
- BOX, G. E. P., HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. The arithmetic and geometry of the analysis of variance table. *In: Statistics for experimenters.*, John Wiley & Sons, Inc, p. 170-175, 1978.

- BRITTAIN, H.G. Validação de métodos analíticos não-cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, Junho, p. 4-9, 1998.
- CLURCZAK, E.W. Validação de métodos em espectroscopia para análises farmacêuticas. **Pharmaceutical Technology**, Junho, p. 22 - 28, 1998.
- GREENWAY, G. M., KOMETA, N., MACRAE, R. Determination of food colours by HPLC with online dialysis for sample preparation. **Food Chemistry**. v. 43, n. 2, p. 137-140, 1992.
- KRULL, I.S. & SWARTZ, M.E. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, Junho, p. 12-20, 1998.
- LAWRENCE, J. F., LANCASTER, F. E., CONACHER, H. B. S. Separation and detection of synthetic food colours by ion-pair HPLC. **Journal of Chromatography**. v. 210, p. 168 - 172, 1981.
- LEITE, F. Rejeição de valores. **In: Validação em análise química.**, Ed. Átomo, 3.ed., p. 50-52, 1998.
- LEITE, F. Comparação de resultados. **In: Validação em análise química.**, Ed. Átomo, 3.ed., p. 73-75, 1998.
- 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, 1998.
- VOGEL, A.I. Erros e estatísticas. **In: Análise química quantitativa**, Ed. Guanabara Koogan, 5.ed., p. 105 - 124, 1992.

SAGUY, I., MIZRAHI, S., KOPELMAN, J. Matemtical approach for the determiantion of dyes concentration in mixtures, ***Journal of food science***, v. 43, p. 121 – 123, 1978.

CAPÍTULO 7

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS
EM PREPARADOS SÓLIDOS PARA REFRESCO
E REFRIGERANTES POR CROMATOGRÁFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E
ESPECTROFOTOMETRIA NO
INFRAVERMELHO E VISÍVEL**

7.1 RESUMO

A validação de um método analítico é um processo constante e gradativo, tendo início nas primeiras fases do desenvolvimento, antes do início do uso de equipamentos e obtenção dos dados, dando continuidade durante todo o desenvolvimento e transferência da metodologia.

Vários fatores devem ser considerados para validar um método analítico, entre eles, a confiabilidade analítica desejada, os custos e recursos humanos envolvidos.

Devido ao custo existente, a validação é feita de acordo com a exigência de órgãos de fiscalização ou clientes, para reduzir custos decorrentes de reanálise e para obter um resultado e não apenas um número.

A validação total de todos os métodos de um laboratório é quase que impossível, porém validar é um processo de melhoramento contínuo.

O objetivo deste trabalho foi propor um modelo para validação dos equipamentos analíticos utilizados para a determinação da identidade dos preparados sólidos para refresco através de espectrometria no infravermelho e determinação de corantes artificiais em refrigerantes e preparados sólidos para refresco por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria na região do visível.

O modelo proposto neste trabalho é adequado à laboratórios de controle da qualidade, desenvolvimento e fiscalização de preparado sólido para refresco e refrigerante.

7.2 SUMMARY

The validation of an analytical method is a constant and gradual process, which has the beginning in the first phases of the development, before the beginning of the use of the equipment and obtention of data, proceeding during all the development and transference of methodology.

Many factors must be considered to validate an analytical method, among them, the desired analytical reliability, costs and human resources involved.

Due to the existing cost, the validation is done according to demands of fiscalization agencies and customers, to reduce costs from reanalysis and to obtain a result and not only a number.

The total validation of all the methods of a laboratory is almost impossible, however, validation is a process of continuous improvement.

The objective of this work is to propose a standard to validate the analytical equipments used to determine the identity solide powder through infrared spectrometry and determination of artificial food dyes in soft drinks and solid powder by high performance liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometry in the visible region.

The method proposed in this work is proper to quality control, research and fiscalization laboratories of drink powder and soft drink.

7.3 INTRODUÇÃO

Os consumidores e a globalização estão fazendo que aumente a demanda por alimentos considerados seguros e de alta qualidade. Muitos dos aspectos de segurança e qualidade são regulamentados e as exigências para os rótulos existem para proteger os consumidores. É necessário métodos analíticos que detectem adulteração e possam ser utilizados no controle da qualidade e fiscalização destes produtos.

Os órgãos regulamentadores exigem a validação dos métodos analíticos, sendo considerado em alguns casos, requisito essencial para obtenção de registro (Brittain, 1998).

A validação de um método analítico é definida como sendo um processo através do qual estudos de laboratório são realizados para garantir que o método em uso atenda às exigências desejadas (Brittain, 1998). Segundo Clurczak (1998) a definição da validação de um método analítico varia de indústria para indústria.

Existem diversos guias descrevendo a validação de métodos cromatográficos, porém não há muitos trabalhos a respeito da validação de métodos não cromatográficos (Brittain, 1998).

Segundo a USP 23 (United States Pharmacopeia), os parâmetros de performance analítica a serem avaliadas são precisão, exatidão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e variação, resistência e robustez; não havendo neste capítulo distinção entre método cromatográfico e não cromatográfico, podendo ser utilizado o mesmo conjunto de parâmetros para qualquer tipo de método analítico (Brittain, 1998).

A seguir apresentamos a definição dos parâmetros de performance analítica (Swartz & Krull, 1998 e Brittain, 1998);

Precisão: indica o grau de repetibilidade entre os resultados de determinações individuais quando o procedimento é realizado várias vezes em uma mesma amostra homogênea, nas mesmas condições de testes. Geralmente é expressa através do desvio-padrão relativo ou desvio-padrão dos resultados obtidos.

Exatidão: indica o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. É expressa como o percentual de resposta obtidos através do ensaio de uma quantidade conhecida da substância a ser determinada em um meio de constituição definida.

Especificidade: segundo a USP, a especificidade de um método analítico indica sua capacidade de determinar de forma correta a substância de interesse na presença de componentes que poderiam interferir com sua determinação numa mistura complexa. O termos especificidade e seletividade são geralmente utilizados simultaneamente. A edição da USP 22, (1990) utiliza o termo seletividade, enquanto que a edição 23 (1995) utiliza especificidade.

Linearidade: representa a capacidade do método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em estudo dentro de uma variação conhecida. A linearidade é expressa em termos de variância em torno da inclinação da linha, calculada através da regressão linear padrão, dos resultados obtidos através da determinação das concentrações variadas da substância em estudo.

Teoricamente a linearidade determina a região da curva de calibração que apresenta relação direta sinal/concentração (Leite, 1998).

Limite de detecção: indica a concentração mais baixa da substância em estudo que pode ser detectada dentro de um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento analítico.

É calculado na prática como sendo correspondente à concentração capaz de produzir um valor do sinal medido três vezes maior que o nível de ruído médio medido com a solução de controle ou branco (Leite, 1998).

Limite de quantificação: representa a concentração mais baixa da substância em estudo que pode ser determinada de maneira quantitativa com precisão e exatidão aceitáveis utilizando um determinado procedimento analítico.

Resistência: segundo a USP, corresponde ao grau de reprodutibilidade dos resultados obtidos em várias condições, incluindo diferentes laboratórios, equipamentos, analistas, reagentes, dias, etc., sendo expressa através do desvio padrão relativo.

Rusticidade (robustez): corresponde à capacidade de um método não sofrer alteração por pequenas variações em seus parâmetros. A robustez do método é avaliada através da modificação de parâmetros como a composição da fase móvel, pH, temperatura, força iônica, etc. e a respectiva avaliação de seu efeito, caso ocorra, sobre os resultados a serem obtidos pela metodologia.

Os equipamentos analíticos devem ter um projeto apropriado, uma capacidade adequada e uma manutenção própria. Para que o equipamento possa ser utilizado o mesmo deve ser qualificado e validado. A qualificação instrumental inclui a validação estrutural (instalações do fabricante) e

validação funcional (instalações do usuário: antes do uso e depois do uso) (Swartz & Krull, 1998).

O processo de validação é complexo, e praticamente impossível uma única pessoa implementá-lo numa empresa ou laboratório, sendo necessário a colaboração e comprometimento de todos os envolvidos.

Outro fator importante para a validação, é a formação profissional, pois, por mais rotineiras que sejam as análises de um laboratório, é necessário que o profissional seja treinado (Leite, 1998).

Segundo o FDA (1993) o procedimento usual para validação consiste no estudo de recuperação. Os resultados de recuperação devem estar na faixa de 80 - 110% para analitos em concentrações superiores a 0,1 ppm e entre 60 - 110% para concentrações inferiores a 0,1 ppm.

Calibração: conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, a relação entre os valores indicados por um instrumento de medição ou sistema de medição ou valores representados por uma medida materializada ou material de referência, e os valores correspondentes das grandezas estabelecidos por padrões; ou seja, procedimento experimental através do qual é determinada a correlação entre o valor verdadeiro convencional e a indicação do sistema de medição (portaria do INMETRO, 1999).

Padrão: medida materializada, instrumento de medição, material de referência ou sistema de medição destinado a definir, realizar, conservar ou reproduzir uma unidade ou um ou mais valores de uma grandeza para servir como referência.

Erro sistemático: é a parcela do erro sempre presente nas medições realizadas em idênticas condições de operação.

Erro aleatório: quando uma medição é realizada várias vezes, nas mesmas condições sendo observado variações nos valores obtidos.

Metrologia: ciência que estuda a medição.

O modelo de validação proposto neste trabalho para os métodos espectrofotométricos e cromatográfico incluiu a validação instrumental e os parâmetros de performance analítica

7.4 MATERIAL E MÉTODOS

7.4.1 EQUIPAMENTOS

Pipeta automática: Eppendorf volume variável de 100 à 1000 μ l ou similar

Balança analítica: Metler modelo AJ-150 ou similar.

Turbidímetro: Hach modelo Ratio/XR ou similar.

Espectrofotômetro infravermelho: Perkin Elmer modelo 1620 ou similar.

Espectrofotômetro UV-visível: Perkin Elmer modelo Lâmbda 20 ou similar.

Cromatógrafo líquido: Bomba isocrática, com amostrador de 20 μ m e injetor manual tipo Rheodyne e detector UV-visível variável, Milton Roy. Integrador Spectra Physics e coluna cromatográfica C-18, 250 x 4,6mm, empacotada com partículas de 5 μ m. Coluna de guarda C-18 empacotada com partículas de 10 μ m.

7.4.2. MATERIAL

Foram utilizados vidrarias (balões volumétricos e provetas) certificadas.

7.4.3 REAGENTES

Padrões para turbidímetro Hach, certificado 2254443-01/02/03/04.

Padrões para espectrofotômetro Bausch & Lomb (Spectronic Standards), certificado 525.

Filme de poliestireno Perkin Elmer, certificado número 186-2082.

Padrões de corantes artificiais para alimentos: amarelo de tartrazina, amarelo crepúsculo, vermelho 40, amaranto, azul de indigotina, azul brilhante, obtidos da Hilton Davis.

7.4.4 MÉTODOS

7.4.4.1 Procedimento para calibração de balança analítica.

Foi verificado o estado geral do equipamento bem como as condições ambientais de temperatura e umidade a fim de viabilizar a aferição/calibração da balança.

Após a verificação e nenhum problema detectado foi iniciado o procedimento de verificação da calibração, zerando a balança e com pesos padrão foi executado as pesagens em 5 pontos pré determinados, anotando os resultados obtidos.

Com os resultados obtidos foram calculados os desvios, sendo que estes devem ser igual ou inferior ao valor pré-estabelecido ($\pm 0,05\%$).

7.4.4.2 Procedimento para calibração da pipeta automática Eppendorf.

Utilizando a pipeta automática de volume variável Eppendorf foi pipetado uma alíquota de 500 μ l de água destilada à 25°C, para um béquer de 50mL, previamente tarado em uma balança analítica., e determinado a massa do volume de água. Foi repetido o mesmo procedimento com

alíquotas de 1000 μ l de água destilada. As determinações foram realizadas em triplicata, sendo calculado a média e o desvio-padrão das leituras.

Com os resultados obtidos foram calculados os desvios, sendo que estes devem ser igual ou inferior ao valor pré-estabelecido (1mg máximo).

7.4.4.3 Procedimento para calibração do espectrofotômetro no infravermelho com filme de poliestireno.

O teste mais usual para verificar o posicionamento dos comprimentos de onda é a leitura de um filme de poliestireno, onde os comprimentos de onda e bandas são bem conhecidos. O espectro do poliestireno permite verificar a performance dos espectrofotômetros no infravermelho devido o filme não perder suas características com o passar do tempo (Leite, 1998).

O equipamento foi colocado nas condições “Default” estabelecidas pelo fabricante (Perkin Elmer) e ligado a mais de uma hora em ambiente com umidade de no máximo 50% e temperatura entre 20 e 25°C.

O equipamento foi purgado por no mínimo 15 minutos, sendo utilizado nitrogênio super seco para remoção de umidade.

Foi obtido o espectro do filme de poliestireno padrão sendo acumulado 16 “Scans” (corridas), e comparado com a tabela de bandas características nas frequências pré-estabelecidas:

Frequência (cm ⁻¹)	3027	2851	1944	1802	1601	1495	1181	1154	1028	907
--------------------------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-----

7.4.4.4 Procedimento para calibração do espectrofotômetro UV-visível.

Os testes mais utilizados para verificar a calibração dos espectrofotômetros UV-visível utilizam soluções de dicromato de potássio e filtros específicos (Leite, 1998 e ASTM E 925-83).

Foi verificado a calibração do espectrofotômetro UV-visível Perkin Elmer, Lâmbda 20 utilizando solução ácida de dicromato de potássio e comprimento de onda variável, filtro de óxido de holmio e filtros de vidro específicos para determinados comprimentos de onda.

Calibração com solução ácida de dicromato de potássio e comprimento de onda variável:

Foi ajustado o zero óptico do equipamento ao ar, ou seja, sem as cubetas nos suportes para os dois feixes de luz e ajustado o monocromador em 235nm e abertura da fenda (slit) de 1nm.

A cubeta de referência foi preenchida com ácido sulfúrico 0,01N e a outra cubeta com solução de dicromato de potássio 60mg/L (preparada pela diluição do sal em ácido sulfúrico 0,01N), sendo utilizado cubeta de 10mm de caminho óptico).

Foi realizado a leitura de absorvância nos seguintes comprimentos de onda: 257; 313; 350nm.

O valor de absorvância da solução ácida de dicromato de potássio para cada comprimento de onda foi comparado com os limites de conformidade.

Calibração do comprimento de onda nas regiões do ultravioleta e visível com filtro de óxido de holmio:

Foi ajustado o zero óptico do equipamento ao ar, ou seja, sem as cubetas nos suportes para os dois feixes de luz e examinado o filtro de óxido de holmio sendo removido qualquer contaminação na superfície.

Os comprimentos de onda máximo foram registrados, sendo monitorados os seguintes:

Comprimento de onda (nm)	279,4	287,5	360,9	418,7	453,3	536,2	637,5
-----------------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Calibração da transmitância na região do visível com filtros de vidro específicos:

Foi examinado os filtros de vidro e removido qualquer contaminação na superfície.

A absorvância do branco (ar x ar) foi determinada para verificar a necessidade de ajuste na linha de base. Foi medido a transmitância dos filtros em 590nm, sendo que cada filtro foi orientado do mesmo modo no suporte do equipamento.

7.4.4.5 Procedimento para calibração do turbidímetro.

Após a estabilização do equipamento e verificação das cubetas contendo os padrões, sendo removido qualquer contaminação na superfície foi realizado a leitura da turbidez (NTU) para cada faixa específica.

As faixas de turbidez especificadas para cada padrão foram :

Turbidez	1,251	15,66	167,2	1518
(Unidade de turbidez Nefelométrica - NTU)	à	à	à	à
	1,382	17,30	184,8	1678

Nota: Padrões certificados (25443-01/02/03/04).

7.4.4.6 Procedimento para calibração do cromatógrafo líquido de alta eficiência, com detector UV-visível.

Após a estabilização do equipamento e verificação das condições de temperatura, fluxos, vazamentos e recebimento de sinais foi iniciado a análise cromatográfica dos padrões de corantes artificiais para alimentos.

Este teste foi realizado em equipamento avaliado nas manutenções preventivas, sendo utilizado as condições cromatográficas utilizadas no método desenvolvido para a determinação de corantes artificiais em preparados sólidos para refresco e refrigerantes. Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Milton Roy, composto de sistema isocrático e válvula injetora tipo Rheodyne com capacidade de injeção de 20 ml. A coluna cromatográfica utilizada foi RP-18 Sigma Aldrich Spherisorb Octadecil (250mm x 4,6mm e partículas com 5 μ m de diâmetro). A detecção e quantificação foi realizada utilizando um detector UV-Visível variável à 510nm, possibilitando a determinação de todos os padrões dos corantes em uma única corrida cromatográfica.

Foi preparado uma solução “mãe” dos corantes (amarelo de tartrazina, amarelo crepúsculo, amaranço, azul de indigotina e vermelho 40) em fase móvel as quais foram utilizadas para a preparação das

soluções diluídas nas concentrações de 1,00; 3,00; 6,00; 9,00 e 12,00 mg/L.

Foi injetado as soluções diluídas dos padrões no sistema cromatográfico na condição do método analítico desenvolvido, respeitando o tempo de estabilização e integração.

Foi calculado a relação (R) área (A) / concentração (C) para cada padrão e respectivas concentrações. O valor da relação A/C foi utilizado no cálculo da % de variação, onde:

$$\% \text{Variação} = \frac{(R_{\text{maior}} - R_{\text{menor}})}{R_{\text{menor}}} \cdot 100$$

7.4.4.7 Avaliação da rusticidade do método analítico.

Foi avaliado os seguintes parâmetros nas metodologias analíticas desenvolvidas para a determinação da identidade de preparados sólidos para refresco por espectrometria no infravermelho e determinação de corantes artificiais em preparados sólidos para refresco e refrigerantes por espectrofotometria na região do visível e cromatografia líquida de alta eficiência:

- Tamanho de partículas das amostras de preparados sólidos para refresco na obtenção dos espectros por reflectância interna difusa. Foi obtido espectro na região do infravermelho médio utilizando acessório de reflectância interna difusa, utilizando sacarose não triturada e triturada em almofariz e passada através de peneira de 100 mesh.

- Concentração de tampão (acetato de amônio) na fase móvel utilizada no método para determinação de corantes por CLAE. Foi utilizado fase móvel com tampão acetato nas concentrações de 0,01; 0,05 e 0,10M e

sem adição de tampão e observado o efeito na separação dos corantes artificiais para alimentos em coluna C-18 fase reversa.

- Remoção da turbidez das soluções das amostras para a determinação de corantes por espectrofotometria no visível. Foi avaliado o efeito da centrifugação e filtração utilizando filtro Millex de 0,45 μ m de poro para a remoção da turbidez das soluções das amostras de preparados sólidos para refresco e refrigerantes.

7.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.5.1. Calibração da balança analítica.

Os valores de massa (g) obtido de cada peso padrão foi utilizado para o cálculo do desvio e estão apresentado na tabela 1:

Tabela 1: Verificação da calibração da balança analítica:

Massa padrão (g)	0,0000	37,4999	74,9992	112,5004	149,9999
Valores	0,0000	37,5001	74,9992	112,5007	149,9999
obtidos (g)	0,0000	37,4997	74,9991	112,5005	149,9997
	0,0000	37,5001	74,9992	112,5004	150,0002
Média	0,0000	37,5000	74,9992	112,5005	149,9999
Desvio-padrão	0,0000	0,0002	0,0001	0,0002	0,0003
Desvio encontrado					
(Desvio permissível ±0,050%)	0,000%	0,000%	0,0000%	0,000%	0,000%

Os desvios encontrados para todos os padrões de massa estão de acordo com o desvio máximo permissível, indicando que a balança analítica está dentro dos parâmetros de conformidade para a finalidade a que se destina.

7.5.2. Calibração da pipeta automática Eppendorff.

Os valores da massa de cada volume de água destilada foi utilizado para o cálculo do desvio e estão apresentado na tabela 2:

Tabela 2: Desvio obtido na calibração da pipeta Eppendorf.

Volume de água (µl)	500			1000		
Massa esperada (mg)*	498,5			997,0		
	massa 1	massa 2	média	massa 1	massa 2	média
Massa encontrada (mg)	498,6	498,6	498,6	997,2	997,5	997,4
	498,9	499,0	499,0	997,8	997,9	997,9
	498,7	498,9	498,8	997,3	997,3	997,3
Média (mg)	498,8			997,5		
Desvio-padrão	0,2			0,3		
Desvio encontrado (mg)	0,3			0,5		
D.permissível (1 mg)						

* Densidade da água à 25°C = Massa esperada / Volume da alíquota

Densidade da água (25°C) = 0,99704 g/mL ou mg/µl (Physikalisch-Technische Bundesanstalt).

Os desvios encontrados estão de acordo com o desvio máximo permissível, portanto a pipeta Eppendorf está dentro dos parâmetros de conformidade para a finalidade a que se destina.

7.5.3. Calibração do espectrofotômetro no infravermelho com filme de poliestireno.

O espectro obtido teve suas bandas características comparadas com os valores pré-estabelecidos, sendo que para frequências entre 4000 - 2000 cm^{-1} é aceito variação de $\pm 10\text{cm}^{-1}$ e entre 2000 - 600 cm^{-1} é aceito variação de $\pm 5\text{cm}^{-1}$. Os valores obtidos estão apresentados na tabela 3:

Tabela 3: Comparação das bandas características do filme de poliestireno com os valores pré-estabelecidos:

Número de corridas: 16. Temperatura: 23°C; umidade do ar: 54%

Frequência (cm^{-1})	3027	2851	1944	1802	1601	1495	1181	1154	1028	907
Padrão N°186-2082										
Valores obtidos	3025	2849	1942	1802	1601	1493	1181	1154	1028	906
Média	3025	2849	1942	1802	1601	1493	1181	1154	1028	906
Desvio-padrão	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Varição	-2	-2	-2	0	0	-2	0	0	0	-1
Varição admissível (+/-)	10 cm^{-1}	10 cm^{-1}	10 cm^{-1}	10 cm^{-1}	5 cm^{-1}					

Os desvios encontrados para todas as frequências determinadas com o filme de poliestireno padrão estão dentro dos limites estabelecidos, indicando que o equipamento pode ser utilizado, levando a obtenção de resultados confiáveis.

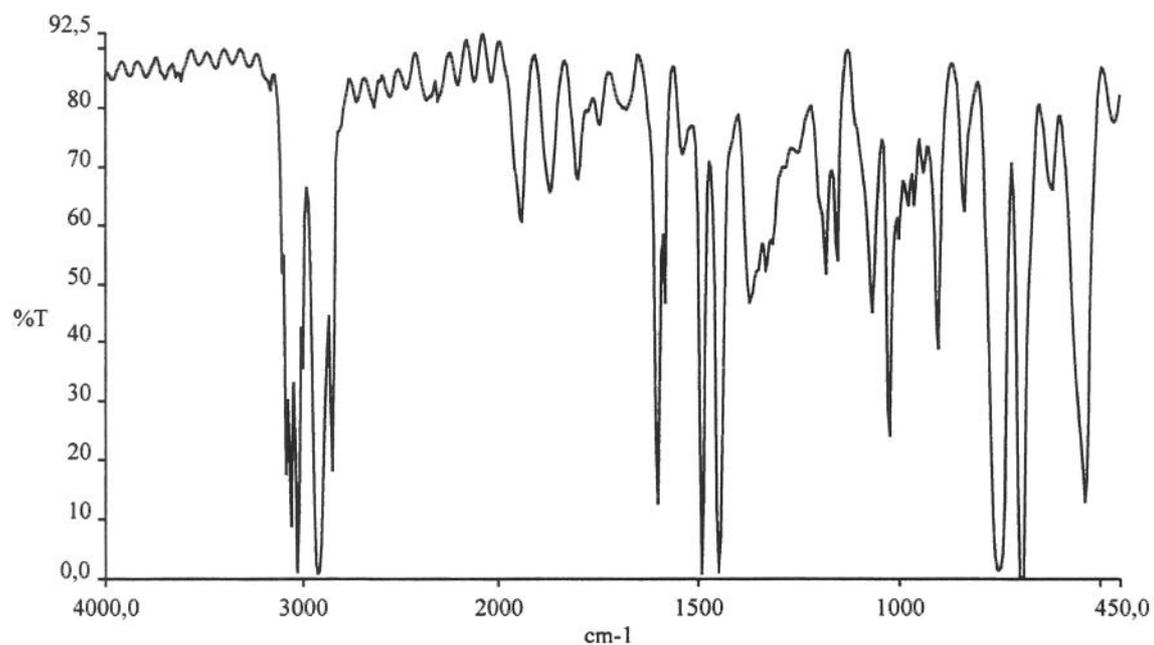


Figura 1: Espectro do filme de poliestireno na região do infravermelho mediano (4000 - 450cm⁻¹) em absorvância.

7.5.4. Calibração do espectrofotômetro UV-visível.

Verificação da calibração com solução ácida de dicromato de potássio e comprimento de onda variável:

Os valores de absorvância da solução ácida de dicromato de potássio (60mg/L) nos comprimentos de onda pré-estabelecidos estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Verificação da absorvância do espectrofotômetro UV-Visível, na região do ultravioleta utilizado solução de dicromato de potássio.

Comprimento de onda (nm)	235	257	313	345	350
Faixa de absorvância certificada (solução 60mg/L)	0,730 à 0,752	0,840 à 0,875	0,285 à 0,293	0,627 à 0,647	0,633 à 0,653
Absorvância medida	0,741	0,853	0,286	0,631	0,647
	0,739	0,856	0,289	0,635	0,651
	0,742	0,853	0,290	0,637	0,649
Média	0,741	0,856	0,288	0,634	0,649
Desvio-padrão	0,002	0,002	0,002	0,003	0,002

Calibração do comprimento de onda nas regiões do ultravioleta e visível com filtro de óxido de holmio:

Os valores de comprimento de onda máximo monitorados estão apresentados na tabela 5 e o espectro do filtro de óxido de holmio na figura 2.

Tabela 5: Comprimentos de onda máximo do filtro de óxido de holmio:

Faixa do comprimento de onda (nm)	278,4 à 280,4	286,5 à 288,5	359,9 à 361,9	417,7 à 419,7	452,2 à 454,2	535,2 à 537,2	636,5 à 638,5
Valor do comprimento de onda observado (nm)	279,0	287,5	360,5	418,4	453,3	536,4	637,6
	279,3	286,7	360,2	418,3	452,9	536,7	637,3
	279,3	287,5	360,7	418,4	453,5	536,3	637,7
Média	279,2	287,2	360,5	418,4	453,2	536,5	637,5
Desvio-padrão	0,2	0,5	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2

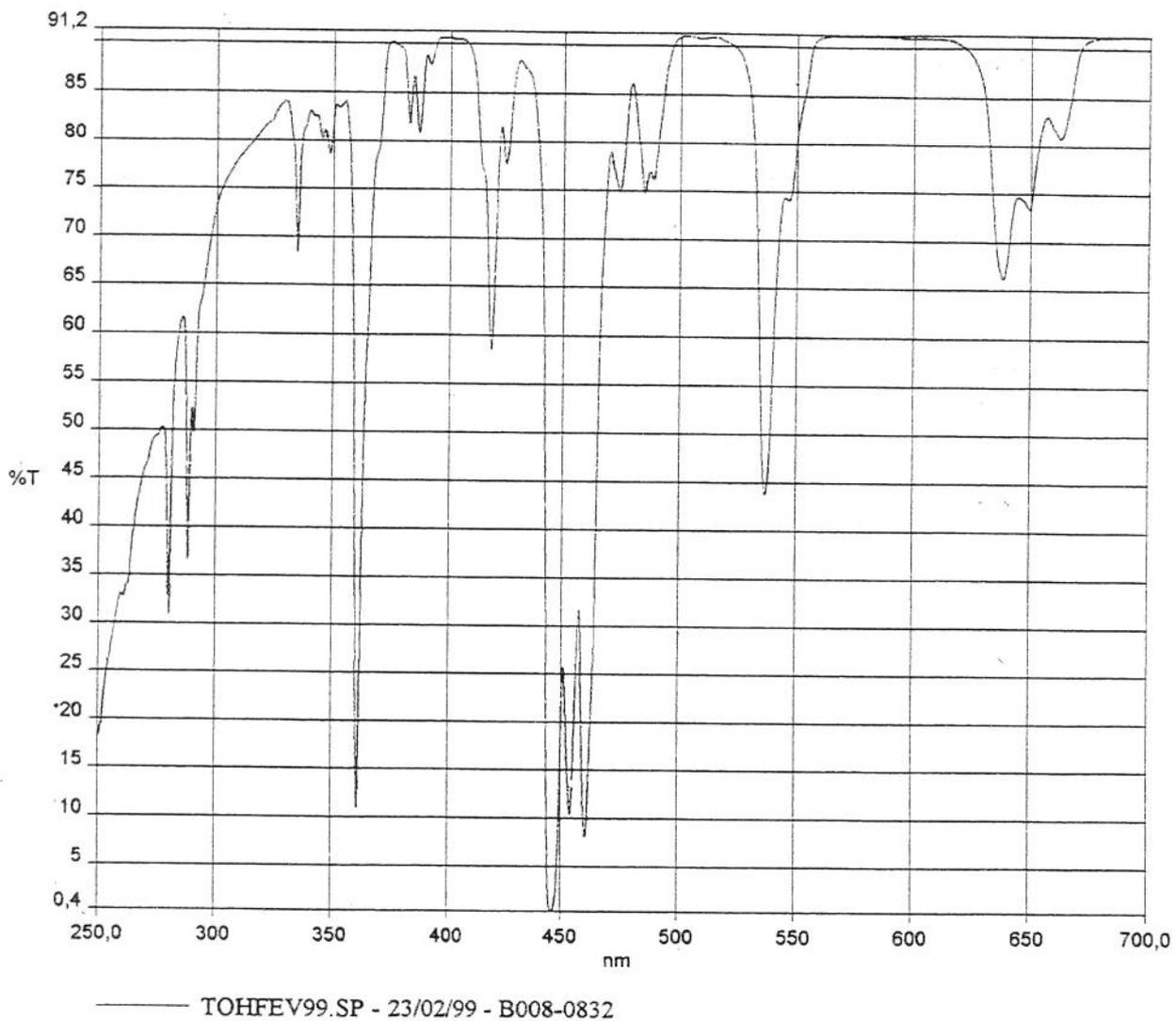


Figura 2: Espectro do filtro de óxido de holmio em absorvância na região do ultravioleta e visível (região espectral: 700 - 250nm, abertura da fenda: 1nm).

Calibração da transmitância na região do visível com filtros de vidro específicos:

Os valores de absorvância do branco e transmitância de cada filtro à 590nm estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Transmitância de cada filtro em comprimento de onda específico obtido na região do visível:

Comprimento de onda (590nm)	%T=9,8 A=1,009	%T=10,1 A=0,996	%T=50,0 A=0,301	%T=50,0 A=0,301
Absorvância do branco (Valor máximo permitido <0,005A)	0,001	0,000	0,000	0,000
Absorvância certificada	0,991	0,977	0,292	0,292
	â	â	â	â
	1,027	1,015	0,306	0,306
Absorvância medida	1,023	1,008	0,303	0,305
	1,023	1,009	0,304	0,305
	1,023	1,008	0,303	0,305
Média	1,023	1,008	0,303	0,305
Desvio-padrão	0,000	0,001	0,001	0,000

Todos os testes realizados para a verificação da calibração do espectrofotômetro UV-visível apresentaram desvios dentro dos valores pré-

estabelecidos indicando que o equipamento está conforme com as normas do fabricante.

7.5.5. Calibração do turbidímetro.

Os valores de turbidez referente aos padrões foram medidos em diferentes dias, sendo calculado a média e o desvio-padrão e estão apresentado na tabela 7.

O valor médio da turbidez encontrada para cada padrão foi comparada com a faixa especificada para o mesmo.

Tabela 7: Valores de turbidez obtidos na calibração do turbidímetro.

Padrões (Nº do certificado)	225443-01	225443-02	225443-03	225443-04
Padrões de Turbidez	1,251	15,66	167,2	1518
	à	à	à	à
(Unidade de turbidez Nefelométrica - NTU)	1,382	17,30	184,8	1678
Valores	1,381	16,71	170,4	1621
de turbidez	1,358	16,70	170,8	1624
medido (NTU)	1,348	16,40	170,2	1615
Média	1,362	16,60	170,5	1620
Desvio-padrão	0,017	0,18	0,3	5

Os valores de turbidez encontrado para cada padrão específico está em conformidade com os valores estabelecidos.

7.5.6. Procedimento para calibração do cromatógrafo líquido de alta eficiência, com detector UV-visível.

Os valores % de variação da relação (área/concentração) de cada padrão de corante testado obtidos nas corridas cromatográficas e o valor da redução quadrática estão apresentados na tabela 8:

Tabela 8: Valores da relação (área / concentração) dos corantes artificiais para alimentos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Corante	%Variação	Regressão quadrática
Amarelo de tartrazina	4,02	0,9994
Amarelo crepúsculo	3,43	1,0000
Amaranto	2,86	0,9999
Azul de indigotina	4,39	0,9999
Vermelho 40	4,07	0,9999

Os valores de % de variação obtidos para todos os corantes testados foram inferiores a 5%, e são considerados estatisticamente coerentes neste tipo de relação sinal/concentração, o que significa que o equipamento está apto para o procedimento analítico.

Os valores de redução quadrática obtido nas curvas de calibração dos corantes testados foram superiores à 0,9990, indicando boa linearidade das curvas.

Outros dados foram obtidos através de testes realizados nas manutenções preventivas do equipamento e estão apresentados na tabela 9 (calibração do comprimento de onda, detector UV-Visível) e tabela 10 (calibração de fluxo da bomba isocrática).

Tabela 9: Calibração do comprimento de onda do detector UV-Visível:

Valor esperado	Valor obtido
656nm \pm 1nm	656,1nm

Tabela 10: Calibração de fluxo da bomba isocrática:

Valor esperado	Valor obtido
1mL/min \pm 10%	0,99mL/min
Condições ambientais	
Temperatura (°C)	Umidade do ar (%)
23,4 \pm 0,8	55

Nota: Estes valores foram obtidos do certificado de calibração do equipamento realizado por empresa especializada, seguindo procedimento documentado.

Simulações mostram que podemos obter uma curva de calibração utilizando 5 padrões com regressão quadrática superior à 0,9990, porém com variação entre as áreas relativa a mesma concentração superior à 5% como apresentado na tabela 11.

Tabela 11: Simulação do cálculo do % de variação aplicado a uma curva de calibração de corante artificial para alimentos (amarelo crepúsculo), por cromatografia líquida de alta eficiência:

Concentração (mg/L)	Área (510nm)	R=A/C	Área (510nm)	R=A/C
0,00	0	0	0	0
1,00	75792	75792^a	<u>70202</u>	70202^a
3,00	235184,3	78395^b	235184,3	78395^b
6,00	460074,9	76679	460074,9	76679
9,00	691830,7	76870	691830,7	76870
12,00	920550,3	76713	920550,3	76713
Regressão quadrática		1,0000		0,9999
%Variação		3,43		11,67

Nota: valores em negrito indicam R maior (^b) e R menor (^a) utilizados no cálculo da relação (R). Valores sublinhados indicam alteração do valor da área obtida no cromatograma para fins de simulação de cálculo da regressão linear e % de variação.

A simulação indica que para obtermos resultados confiáveis a variação entre as áreas obtidas de uma mesma solução padrão ou amostra não pode ser superior a 5%.

7.5.7. Avaliação da rusticidade do método analítico.

7.5.7.1 Tamanho de partículas das amostras de preparados sólidos para refresco na obtenção dos espectros por reflectância interna difusa:

O espectro da amostra de sacarose não triturada não permitiu a identificação, devido ao espalhamento da irradiação decorrente da irregularidade da superfície da amostra. O espectro da amostra de sacarose triturada e passada através de peneira de 100 mesh apresentou boa resolução, indicando a necessidade de controle nas etapas de preparação das amostras (trituração e passagem através da peneira) para garantir a exatidão, repetibilidade e reprodutibilidade analítica.

7.5.7.2. Concentração de tampão (acetato de amônio) na fase móvel utilizada no método para determinação de corantes por CLAE:

Foi avaliada a concentração de acetato de amônio adicionada a fase móvel como tampão e sua influencia na separação de corantes artificiais para alimentos apresentado na Tabela 12:

Tabela 12: Avaliação da composição da fase móvel para determinação de corantes por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna RP-18, fase reversa (250mm x 4,6mm e partículas com 5µm de diâmetro) e fluxo de 1,0mL/minuto.

Tampão	Metanol	Concentração Acetato de Amônio	Resultado (separação cromatográfica)
80	20	-	não há separação dos corantes
80	20	0,01M	separação incompleta dos corantes
80	20	0,05M	separação completa
80	20	0,10M	separação completa, porém aumenta em muito o tempo de retenção de alguns corantes
			Tempo de retenção (Vermelho 40)
80	20	0,01M	<10 minutos
80	20	0,05M	10 minutos
80	20	0,10M	>30 minutos

A concentração de acetato de amônio do tampão (fase móvel) é responsável pela completa separação dos corantes, sendo portanto fundamental o controle da preparação da fase móvel para garantir a exatidão, repetibilidade e produtividade analítica.

7.5.7.3 Remoção da turbidez das soluções das amostras para a determinação de corantes por espectrofotometria no visível:

A turbidez das soluções de preparados sólidos para refresco e de refrigerantes é devido principalmente a presença de agente turvador (dióxido de titânio). Foi avaliado a remoção da turbidez das amostras em solução através de centrifugação e filtração em membrana Millex de 0,45 μm de porosidade.

Devido principalmente a presença de estabilizantes, que tem a função de manter o agente turvador em suspensão, não foi obtido resultados satisfatórios ao se utilizar a centrífuga, sendo necessário adequar o tempo e a velocidade de centrifugação para cada amostra, o que dificultou a padronização da metodologia analítica para determinação de corantes artificiais por espectrofotometria na região do visível.

O uso de membranas filtrantes (Millex) de 0,45 μm de porosidade permitiu a filtração de maneira eficiente, removendo a turbidez das amostras como apresentado na tabela 13:

Tabela 13: Turbidez da solução de preparados sólidos para refresco pronto para o consumo determinada através de turbidímetro, antes e após filtração.

AMOSTRAS		TURBIDEZ (N.T.U)		
Sabor	Marca	sem filtração	centrifugação	após filtração (0,45µm)
Abacaxi	X	498	53	<10
	Z	392	46	<10
Limão	X	761	64	<10
	Y	1393	69	<10
Morango	X	417	47	<10
	Y	42	20	<10
	Z	216	41	<10
Uva	X	326	37	<10
	Y	27	21	<10
	Z	159	32	<10

Os melhores resultados para remoção de turbidez foram obtidos após filtração em membrana filtrante (Millex) de 0,45 μ m, removendo a turbidez que causa aumento da absorvância, interferindo na exatidão, repetibilidade e reprodutibilidade no método analítico para a determinação de corantes artificiais por espectrofotometria na região do visível.

7.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos testes de calibração proposto neste trabalho indicam que todos os equipamentos utilizados nas determinações estão de acordo com as especificações e portanto aptos para os ensaios analíticos.

Para a obtenção de resultados analiticamente confiáveis é necessário implementar e manter um programa mínimo de validação analítica nos laboratórios de controle da qualidade, pesquisa e desenvolvimento, fiscalização de produtos alimentícios.

A avaliação da rusticidade dos métodos analíticos desenvolvidos foi baseada principalmente na estabilidade das soluções a serem analisadas, influência da composição e fluxo da fase móvel, sendo considerada adequada aos tipos de matrizes analisadas.

Os métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de identidade de preparado sólido para refresco e determinação de corantes artificiais por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria na região do visível por absorvância e segunda derivada em refrescos e refrigerantes foram considerados validados baseados nos testes de validação instrumental e nos resultados de recuperação (dentro dos limites estabelecidos de 80 – 110%), coeficiente de variação (inferior a 10%), limite de detecção e limite de quantificação apresentados nos capítulos anteriores.

7.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRITTAIN, H.G.. Validação de métodos analíticos não- cromatográficos. ***Pharmaceutical Technology***, Junho, p. 4-9, 1998.
- CLURCZAK, E.W.. Validação de métodos em espectroscopia PARA análises farmacêuticas. ***Pharmaceutical Technology***, Junho, p. 22 - 28, 1998.
- HUGLES, E.B. & MAUNSELL, A.E.. The analysis of fruit and fruit products. *The analyst* (59), 231. 1934.
- KRULL, I.S. & SWARTZ, M.E.. Validação de métodos cromatográficos. ***Pharmaceutical Technology***, Junho, p. 12-20, 1998.
- KRULL, I.S. & SWARTZ, M.E.. LC-GC, v.15, n. 6, p. 534-540, 1997.
- KRULL, I.S. & SWARTZ, M.E.. LC-GC, v. 15, n. 9, p. 842-845, 1997.
- KRULL, I.S. & SWARTZ, M.E.. LC-GC, v. 15, n. 12, p. 1122-1129, 1997.
- LEITE, F.. Validação em análise química. Ed. Átomo. 3.ed.. 1998.
- SWARTZ, M. E. & KRULL, I. S. ***Analytical method development and validation***. Marcel Dekker, Nova Iorque, 1997.
- YOUNG, P. L. & GORENSTEIN, M. V.. LC-GC, v. 12, n. 11, p. 832 - 838, 1994.
- U.S. Food and Drug Administration.. Recommendation for submission of chemical and technological data for direct food additive and GRAS food ingredient petitions. Chemistry review branch. Maio, 1993.
- YOUNG, P.L. & GORENSTEIN, M.V.. LC-GC, v. 12 , n. 11, p. 832-838, 1994.

CONCLUSÕES

GERAIS

1. Os métodos desenvolvidos para a verificação da identidade de preparados sólidos para refresco e determinação de corantes artificiais em refrigerantes e refresco em pó, são de execução simples e rápida e atenderam os objetivos do presente trabalho em desenvolver metodologias alternativas simples e de menor custo.

2. Os resultados indicam que há um bom potencial para o uso da espectrometria no infravermelho com uso de reflectância difusa para auxiliar na identidade de produtos alimentícios como os preparados sólidos para refresco.

3. No caso da identificação da adição de polpa aos preparados sólidos para refresco tradicionais, os valores de correlação obtidos para os produtos com e sem adição de polpa foram muito próximos para uma identificação mais conclusiva, provavelmente devido a pequena concentração de polpa adicionada aos produtos frente aos outros componentes presentes. O uso do DRIFT indica uma potencialidade para determinações semi-quantitativas, que poderá ser utilizada para a determinação do teor de polpa de fruta adicionada aos produtos.

4. O método desenvolvido para a determinação de corante artificiais por CLAE utilizou coluna C-18 fase reversa e eluição isocrática, sendo que a fase móvel utilizada foi tampão acetato de amônio 0,05M:metanol (80:20). O tempo de corrida cromatográfica foi de 20 minutos, não sendo necessário tempo adicional para reestabilização da coluna. O comprimento de onda utilizado de 510nm, permitiu a identificação e quantificação dos corantes artificiais presentes utilizando uma única corrida cromatográfica.

5. As metodologias analíticas desenvolvidas, utilizando a espectrofotometria na região do visível (absorvância e segunda derivada), permitiram a determinação quantitativa dos corantes representes nas amostras de preparados sólidos para refresco e refrigerantes, sem necessidade de separação cromatográfica. O método desenvolvido neste trabalho não se aplica a determinação simultânea de azul de indigotina e azul brilhante devido as sobreposições espectrais, porém não foi encontrado a mistura deste dois corantes nas amostras analisadas. A estabilidade do azul brilhante em pH alcalino, permite sua identificação através do espectro na região do visível, utilizando a segunda derivada, enquanto que o azul de indigotina apresenta instabilidade neste pH. O método foi avaliado para as seguintes misturas de corantes: amarelo de tartrazina/amaranto; amaranto/azul de indigotina; vermelho 40/azul de indigotina; amarelo de tartrazina/amarelo crepúsculo; amarelo crepúsculo/amaranto; amaranto/vermelho 40; amarelo de tartrazina/amaranto/azul brilhante; amarelo de tartrazina/amaranto/azul de indigotina e para os corantes isolados.

6. Foi realizado análise estatística com os valores obtidos da determinação da concentração de corantes artificiais nos preparados sólidos para refresco utilizando os três métodos analíticos desenvolvidos: cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria na região do visível utilizando absorvância e espectrofotometria utilizando segunda derivada. Pela análise de variância (ANOVA) os valores de F encontrados são inferiores aos valores de F tabelados no nível de 5%, indicando que não houve diferença significativa entre os três métodos analíticos. Assim os três métodos citados podem ser usados indiferentemente para a determinação destes corantes artificiais (amarelo de tartrazina, amarelo

crepúsculo, amaranço, vermelho 40, azul de indigotina) nestes tipos de amostras.

7. Os resultados obtidos nos testes de calibração proposto neste trabalho indicam que todos os equipamentos utilizados nas determinações estão de acordo com as especificações e portanto aptos para os ensaios analíticos.

8. Para a obtenção de resultados analiticamente confiáveis é necessário implementar e manter um programa mínimo de validação analítica nos laboratórios de controle da qualidade, pesquisa e desenvolvimento, fiscalização de produtos alimentícios.

9. Os métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de corantes artificiais por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria na região do visível por absorvância e segunda derivada foram considerados validados baseados nos resultados dos testes de validação instrumental e nas análises estatísticas dos resultados obtidos.

ANEXOS

PLANILHA DE CÁLCULO

A- Azul brilhante (absorvância):

AB	
A (630)	
A (std)	0,8438
Conc (std)	6
A (sample)	0,1907
	AI
C (mg/L)	1,3560
Massa (g)	50,23
Volume (mL)	1000
C (mg/100g)	2,6996
Volume (mL)	1500
Massa (g)	50
C (mg/100mL)	0,0900

C- Azul de indigotina / amarantho (absorvância):

AI		V40 (525)		AM	
A (std)	0,2184	A (std)	0,04305		0,221
Conc (std)	6	Conc (std)	6		6
A (sample)	0,4416	Absortividade	0,007175		0,03683333
		A(525)	2,3025		
	AI		AM		
C (mg/L)	12,1319		60,1480682		
Massa (g)	50,23				
Volume (mL)	1000				
C (mg/100g)	24,1526		119,7453		
Volume (mL)	1500				
Massa (g)	50				
C (mg/100mL)	0,8051		3,9915		

E- Amarelo crepúsculo/amarelo de tartrazina (absorvância):

AT + AC							
A (525)				AT (400)			
				AC		AT	
A (std)	0,1103			A (std)	0,0999	0,21065	
Conc (std)	6			Conc (std)	6	6	
A (sample)	0,1965			Absortividade	0,01665	0,03510833	
				A (400)	1,1834		
				AT			
C (mg/L)	10,6890			28,6378633			
Massa (g)	51,1						
Volume (mL)	1000						
C (mg/100g)	20,9179			56,0428			
Volume (mL)	1500						
Massa (g)	50						
C (mg/100mL)	0,6973			1,8681			