

ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA POR CLAE PARA ANÁLISE DE CORANTES ARTIFICIAIS ORGÂNICOS COM VALIDAÇÃO PARA PREPARADOS SÓLIDOS PARA REFRESCOS

ANDRÉ L.U.RODRIGUES¹; FELIPE FOZZATTI²; MARTA G.SILVA³

Nº 0701026

RESUMO

O Método validado para análise de corantes artificiais orgânicos em pó para preparo de refrescos apresentou-se seletivo, com linearidade acima de 0,99, com sensibilidade adequada para quantificar os corantes avaliados, com boa exatidão e com coeficiente de variação adequada para o teste de precisão.

ABSTRACT

The validated method to artificial dyes analyse in powder juice shown selective , with linearity above 0,99, with the needed sensibility to quantify the evaluated dyes, good accuracy and adequate coefficient of variation to precision test.

Keywords: Artificial dyes, powder juice, HPLC.

INTRODUÇÃO

Os corantes artificiais sintéticos apresentam uma vasta gama de cores, larga estabilidade química e menor preço, o que resultou em um emprego cada vez maior destes pela indústria alimentícia. Contudo, sob o ponto de vista toxicológico, algumas destas substâncias ainda estão em estudos e possuem uma concentração máxima para ingestão. No Brasil, a ANVISA, através das resoluções de nº 382 a 388 de 9 de agosto de 1999, permite o uso de onze tipos de corantes artificiais em balas, confeitos, sobremesas e refrescos (ANVISA, 1999). Porém com o estreitamento das relações comerciais entre os países fica cada vez mais difícil fazer o controle, visto que cada país possui suas próprias legislações. Portanto, métodos validados para análise qualitativa e quantitativa de corantes artificiais são de fundamental importância para viabilizar o cumprimento da legislação e assegurar a saúde dos consumidores (ANVISA, 2005; Prado & Godoy, 2004; Vodotti & Rollemberg, 2006).

Este trabalho teve como objetivo validar um método por CLAE para a matriz pó para preparo de refrescos nos sabores manga, uva e pêra nas versões normal e light, e limão nas versões normal, light e diet. Os critérios para validação utilizados foram: seletividade, linearidade, sensibilidade, exatidão e precisão.

1. BOLSISTA CNPq: Graduação em Química, QUÍMICA/UNICAMP, Campinas-SP, ✉ andrelur@gmail.com

2. BOLSISTA CNPq: Graduação em Engenharia Química, QUÍMICA/UNICAMP, Campinas-SP.

3. ORIENTADOR: Pesquisador, QUÍMICA/ITAL, Campinas-SP.

MATERIAL E MÉTODOS

As embalagens de refrescos de mesmo sabor e marca foram abertas e o conteúdo misturado. Cerca de 1 ou 3g de amostra, dependendo do sabor e intensidade de cor, foram pesados em béquer, adicionados 25mL de água deionizada e levados ao banho com ultrassom por 10 minutos. O extrato foi filtrado em papel Whatman nº 42 e em membrana de mistura de ésteres, com poro de 0,45 µm, para posterior injeção no equipamento.

No estudo foi utilizado um cromatógrafo marca SHIMADZU, modelo CLASS-10A, com detector de arranjo de diodos modelo SPD-M10A, e monitoração simultânea à de 435, 520 e 600nm. A coluna utilizada foi LiChrospher 100 RP-18, 125x4 mm, 5µm. As fases móveis utilizadas foram: Solução A: KH_2PO_4 0,01M, B: KH_2PO_4 0,01M : Metanol (10:90) (v/v). O gradiente utilizado foi: Tempo 0: 100% de A e 0% de B; Tempo 30: 0% de A e 100% de B; Tempo 60: 100% de A e 0% de B; Tempo 70: STOP, com vazão de 1,0mL por minuto.

Para o preparo dos padrões analíticos, cerca de 100mg de cada corante foram dissolvidos em água deionizada e sua concentração corrigida segundo a Tabela 1. Para a quantificação dos corantes presentes no pós para preparo de refrescos foi utilizada uma mistura dos corantes presentes no pós com as concentrações descritas nas Tabelas 2 e 3.

Para a validação foram avaliados os seguintes critérios:

- Seletividade;
- Linearidade com a construção de uma curva de calibração para cada corante avaliado com seis pontos, considerando a origem, a faixa de trabalho está na Tabela 2 e a linearidade foi avaliada segundo a fórmula descrita a seguir:

$$T = \frac{|R|\sqrt{(N-2)}}{\sqrt{(1-R^2)}} \quad T = \text{Student's } t\text{-distribuição; } N = \text{número de medidas;}$$

R = coeficiente de correlação linear.

- Sensibilidade com a construção de uma curva padrão suplementar com 3 pontos injetados em triplicatas para os corantes avaliados, sendo os limites de detecção e quantificação determinados com as fórmulas abaixo:

$$\text{Limite de detecção} = \frac{Y_{BL} + 3S_{BL}}{B} \frac{1}{\sqrt{N}} \quad \text{Limite de quantificação} = \frac{Y_{BL} + 10S_{BL}}{B} \frac{1}{\sqrt{N}}$$

Y_{bl} = estimativa da resposta do branco, coeficiente linear obtido na equação da curva – concentração/área;

S_{bl} = estimativa de desvio padrão do branco, coeficiente linear obtido na equação da curva – concentração/s;

B = interseção da curva quando $x=0$;

N = número de medidas

- Exatidão através da recuperação em triplicata do padrão adicionado a amostra, e avaliado segundo a fórmula abaixo:

$$t_{ob} = \frac{[X - \bar{X}]}{s \cdot \sqrt{n}}$$

T = Student's t-distribuição; X = corresponde a 100%; \bar{X} = valor médio das repetições; s = estimativa de desvio padrão; n = número de repetições

- Precisão do método com 5 repetições analíticas com a mesma massa.

TABELA 1: Corante, massa (M), diluição (Dil), solvente, comprimento de onda (λ), absortividade molar (E), absorvância (A), concentração corrigida (C cor) e percentagem encontrada (% enc).

Corante	M (mg)	Dil (mL)	Solvente	$E_{1cm}^{1\%}$	λ	A	C cor (mg/100mL)	% enc
Amarelo tartrazina	100,4	100-1:25-1:3	MeOH: NH ₄ OH (95:05)	426	536,0	0,514	71,92	71,63
Crepúsculo	100,9	100-1:25-1:3	MeOH: NH ₄ OH (95:05)	481	564,1	0,570	75,78	75,10
Vermelho 40	101,2	100-1:25-1:3	MeOH: NH ₄ OH (95:05)	505	536,0	0,611	85,49	84,98
Indigotina	100,6	100-1:25- 1:10	MeOH: NH ₄ OH (95:05)	610	1840,0	0,578	96,48	95,90
Azul brilhante FCF	100,0	100-1:25- 1:10	MeOH: NH ₄ OH (95:05)	630	1840,0	0,458	62,23	62,23

*Takahashi et al., 1988

TABELA 2: Diluições dos padrões utilizados para quantificar os corantes em refrescos de manga e uva.

Corante	Diluição	Concentração injetada (µg/mL)
Amarelo tartrazina	100-1:25-1:10	2,88
Crepúsculo	100-1,25-0,5:10	1,52
Vermelho 40	100-1:25-0,5:10	1,71
Indigotina	100-1:25-0,3:10	1,16
Azul brilhante FCF	100-1:25-0,3:10	0,75

TABELA 3: Diluições dos padrões utilizados para quantificar os corantes em refrescos sabores de pêra e limão.

Corante	Diluição	Concentração injetada (µg/mL)
Amarelo tartrazina	100-1:25-2:10-2:10	1,11
Crepúsculo	100-1,25-2:10-2:10	1,04
Azul brilhante FCF	100-1:25-2:10-2:10	0,17

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de seletividade utilizou-se a análise do branco dos reagentes (aplicação da metodologia analítica sem a matriz da amostra). O cromatograma obtido nas mesmas condições de análise dos corantes e nenhuma absorvância foi observada, Figura 1.

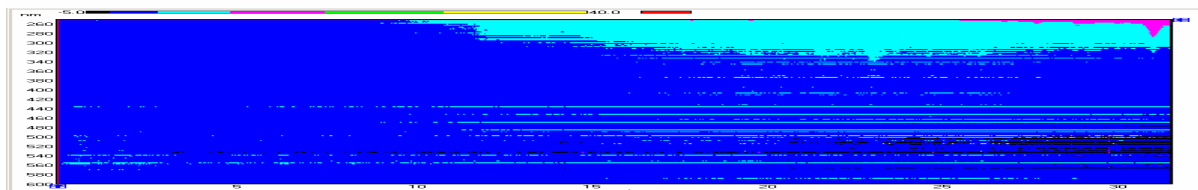


FIGURA 1: Branco dos reagentes, cromatograma planar – varredura entre 250 e 600nm

A linearidade para os corantes avaliados apresentou coeficiente de correlação acima de 0,99 e o t obtido da fórmula apresentou correlação significativa para as concentrações estudadas e os resultados estão na Tabela 4.

TABELA 4: Concentrações dos corantes, coeficientes de correlação (r), t obtido para os refrescos.

Corante	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	r	t
Amarelo tartrazina	0; 1,52; 2,28; 3,004; 3,80; 7,60	0,99	57,70
	0; 0,55; 0,83; 1,11; 1,38; 1,66	0,99	22,85
Crepúsculo	0; 0,76; 1,14; 1,43; 2,15; 2,87	0,99	22,41
	0; 0,52; 0,78; 1,04; 1,30; 1,56	0,99	21,35
Vermelho 40	0; 0,94; 1,41; 1,76; 2,64; 3,52	0,99	24,35
Indigotina	0; 0,65; 0,98; 1,17; 2,15; 3,13	0,99	33,27
Azul brilhante FCF	0; 0,70; 0,84; 1,54; 2,24	0,99	141,41
	0; 0,09; 0,13; 0,17; 0,21; 0,26	0,99	23,99

Os limites de detecção e quantificação calculados estão na Tabela 5.

Para a exatidão foram feitas 5 repetições analíticas com amostras adicionadas de padrões. Os resultados estão na Tabela 6 e o método não apresentou diferença significativa entre a recuperação média e 100% a um nível de confiança de 95%.

Para o cálculo da precisão foram feitos 6 repetições analíticas e todas as repetições apresentaram resultados dentro do coeficiente de variação máxima para a concentração avaliada, os resultados estão na Tabela 7.

TABELA 5: Corantes, refrescos e limites de detecção e quantificação.

Corante	Refresco	Concentrações (/100g)	
		Limite de detecção	Limite quantificação
Tartrazina	Manga normal	3,90 (mg)	11,71 (mg)
	Manga light	11,71 (mg)	30,29 (mg)
	Pêra e limão, normal e light	13,09 (µg)	23,54 (µg)
Crepúsculo	Manga normal	0,72 (mg)	7,63 (mg)
	Manga light	2,15 (mg)	22,88 (mg)
	Pêra e limão, normal e light	5,71 (µg)	8,09 (µg)
Vermelho 40	Uva normal	10,12 (mg)	24,52 (mg)
	Uva light	30,35 (mg)	73,55 (mg)
Indigotina	Uva light	1,62 (mg)	2,03 (mg)
	Uva normal	0,52 (mg)	1,20 (mg)
Azul brilhante	Uva light	1,57 (mg)	3,59 (mg)
	Pêra e limão, normal e light	2,55 (µg)	5,08 (µg)

TABELA 6: corante, refresco, concentração do padrão adicionado (PA), recuperação média (R), estimativa de desvio padrão (s), coeficiente de variação (CV).

Corante	Refresco	PA (mg/100g)	R (%)	s	CV (%)
Tartrazina	Manga normal	47,95	107,70	1,61	3
	Manga light	215,76	75,88	4,38	3
	Pêra normal	0,46	113,12	0,04	7
	Pêra light	4,61	106,17	0,32	7
	Limão normal	0,28	96,79	0,02	8
	Limão light	0,46	102,52	0,06	13
Crepúsculo	Manga normal	37,89	87,81	2,98	9
	Manga light	113,67	100,26	6,19	5
	Pêra normal	0,43	92,27	0,07	17
	Pêra light	2,16	97,49	0,13	6
Vermelho 40	Uva normal	113,99	83,59	8,32	9
	Uva light	341,96	110,06	45,77	12
Indigotina	Uva normal	19,30	107,05	1,06	5
	Uva light	11,58	98,19	0,90	8
Azul brilhante	Uva normal	4,15	103,13	0,56	13
	Uva light	12,45	104,18	1,04	8
	Limão light	0,43	92,09	1,07	13

TABELA 7: Concentração média (M), estimativa de desvio padrão (s), coeficiente de variação (CV) e coeficiente de variação máxima (CV Max).

Corante	Refresco	M (mg/100g)	s	CV (%)	CV Max(%)
Tartrazina	Manga normal	33,25	1,69	5	7
	Manga light	119,96	7,67	6	6
	Pêra normal	0,37	0,04	10	13
	Pêra light	0,96	0,11	11	11
	Limão normal	0,23	0,01	4	14
	Limão light	2,10	0,09	4	10
	Limão diet	6,68	0,42	6	9
Crepúsculo	Manga normal	49,64	2,54	5	6
	Manga light	88,98	3,94	4	6
	Pêra normal	0,47	0,02	4	13
	Pêra light	0,65	0,06	9	12
Vermelho 40	Uva normal	66,08	2,73	4	6
	Uva light	618,29	20,13	3	4
Indigotina	Uva light	8,16	0,51	6	8
Azul brilhante	Uva normal	5,96	0,35	6	9
	Uva light	8,94	0,59	7	8
	Limão diet	0,70	0,07	10	12

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução nº 388, de 05 de agosto de 1999**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 22 de Nov. 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Brasília, 2005. 1018p.

MAC DOUGALL, D. **Color in food – Improving quality**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2002. 378p.

PRADO, M.A.; GODOY, H.T. Determination of synthetic dyes by high performance liquid chromatography (HPLC) in jelly powder. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, nº 1, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br>> Acesso em: 15 Fev, 2007.

TAKAHASHI, M.Y.; YABIKU, H.Y., MARSIGLIA, D.A.P. Determinação quantitativa de corantes artificiais em alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 48, n. ½, p. 7-15, 1988.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C. Derivative spectrophotometry: a simple strategy for simultaneous determination of food dyes. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, nº 2, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em 15 de Fev, 2007.