

MARINA FERREIRA DOS REIS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
CORANTES ALIMENTARES EM POLPA DE FRUTA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Renata Pereira Lopes Moreira

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2020

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

R375d
2020

Reis, Marina Ferreira dos, 1991-

Desenvolvimento e validação de método para determinação
de corantes alimentares em polpa de fruta / Marina Ferreira dos
Reis. – Viçosa, MG, 2020.

81f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Renata Pereira Lopes Moreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.73-81.

1. Corantes. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência.
3. Surfactantes. 4. Alimentos - Análise. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Química. Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22 ed. 543.84

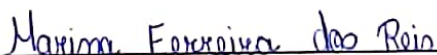
MARINA FERREIRA DOS REIS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
CORANTES ALIMENTARES EM POLPAS DE FRUTAS**

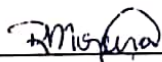
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Marina Ferreira dos Reis
Autora



Renata Pereira Lopes Moreira
Orientadora

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, por serem fonte de apoio incondicional. Ao meu irmão e minha cunhada, por todo carinho e orações. Ao meu amor, por me incentivar todos os dias.

ACRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica pela oportunidade de concretizar esse trabalho.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA)/ Laboratório Federal de Defesa Agropecuária – MG (LFDA – MG), pela oportunidade de realizar esse projeto em suas dependências.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Primeiramente, agradeço a Deus por me dar força e coragem para concluir mais uma etapa. Sem Ele nada disso seria possível.

Ao meus amados pais, Adelmo e Daisy, por não me deixarem desanimar e investirem tanto em mim na realização de mais um sonho. Essa conquista também é deles.

Ao meu irmão Matheus e à Thaís, pela amizade, carinho e orações.

Ao meu amor, Matheus, pelo amor, apoio e incentivo diário. Agradeço por viver meus sonhos comigo, pela paciência nos momentos difíceis e por ser meu melhor amigo.

À minha família querida por toda torcida.

À Renata, pela compreensão, paciência, amizade e, principalmente, por toda orientação e ensinamentos.

Aos meus amigos de Viçosa Mayra, Jean, Héryca, Tássia, Vinícius, Kamylla, Ana, Giovana, Maísa, Vivian, Junielly e Nathália por toda ajuda e preocupação.

Aos meus amigos de LANAQUA que se fizeram presentes, apesar da distância.

Às minhas amigas Débora e Marcela por serem amigas para todas as horas.

À Luísa e à Thaís, presentes que ganhei nesta jornada, vocês são especiais e agradeço por estarem sempre comigo.

À Eugênia Azevedo Vargas e ao Fernando Madureira por permitir que o trabalho fosse desenvolvido no LACQSA e a todos colegas de laboratório pela ajuda.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

*Pois dele, por ele, e para ele são todas as coisas.
A ele seja a glória para sempre. Amém.*

(Bíblia Sagrada, Livro de Romanos, capítulo 11,
versículo 36)

RESUMO

REIS, Marina Ferreira dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Desenvolvimento e validação de método para determinação de corantes alimentares em polpa de fruta.** Orientadora: Renata Pereira Lopes Moreira.

Os corantes alimentares são compostos potencialmente prejudiciais à saúde humana e, por isso, devem ser quantificados. O presente trabalho descreve o desenvolvimento e a validação de um método analítico para a determinação simultânea de corantes alimentares em polpa de fruta. Os analitos foram o amarelo crepúsculo, eritrosina, laranja G, tartrazina, vermelho N em polpa de goiaba utilizando sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). O preparo de amostra consistiu em uma massa de amostra (5,0 g), que teve o seu pH inicial ajustado (pH = 10,0), seguido de extração com acetonitrila (5,0 mL) assistida por ultrassom (5 minutos). A amostra foi centrifugada (4000 rpm, por 20 minutos a 20 °C) e teve seu pH final ajustado (pH = 3,0). Posteriormente, a amostra foi filtrada e, devido às interações entre os analitos em solução, foi necessária uma diluição do extrato adicionando o surfactante Tween 20 ($2,5 \times 10^{-36}$ g mL⁻¹) na etapa anterior à injeção (600 µL de amostra e 400 µL de solução de surfactante). O método foi validado, sendo as curvas analíticas preparadas em matriz, na faixa de 50 a 150 mg kg⁻¹ para todos os analitos estudados ($R^2 > 0,99$). A veracidade do método foi avaliada em termos de recuperação, obtendo-se recuperações de 93-110% para todos os analitos. Os coeficientes de variação de repetitividade ficaram entre 2,1 e 13,7%, enquanto para precisão intermediária os valores variaram entre 3,3 e 19,0%. Todos os parâmetros foram aceitáveis (recuperação entre 70-120% e CV_{repe} e CV_{repro} menores que 14 e 20%, respectivamente) para todos os analitos, exceto para eritrosina no terceiro nível (150 mg kg⁻¹). Os limites de detecção e quantificação foram determinados, sendo 15 mg kg⁻¹ e 30 mg kg⁻¹, respectivamente. Os valores de limite de decisão (CC_{α}) e de capacidade de detecção (CC_{β}) variaram entre 0,81000 e 107,82 mg kg⁻¹ e 1,6200 e 115,65 mg kg⁻¹, respectivamente. Os valores das incertezas relativas combinadas variaram entre 2,81 e 13,8%. Foram analisadas oito amostras de polpa de goiaba adquiridas em diferentes regiões de Minas Gerais, sendo que estas amostras não apresentaram contaminação. Conclui-se que a metodologia desenvolvida pode ser aplicada para análise de corantes em polpas de frutas de forma simples, rápida e eficiente, tornando-o adequado para monitoramento da qualidade de polpas de frutas em análises de rotina.

Palavras-chave: Corantes alimentares. Análise multirresíduo. Extração assistida por ultrassom. Surfactante. CLAE-DAD.

ABSTRACT

REIS, Marina Ferreira dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Development and validation of an analytical method for determining food dyes in fruit pulp.** Adviser: Renata Pereira Lopes Moreira.

Food colors are compounds that are potentially harmful to human health and, therefore, must be quantified. The present work describes the development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of food dyes in fruit pulp. The analytes were twilight yellow, erythrosine, orange G, tartrazine, red N in guava pulp using High Performance Liquid Chromatography system coupled to a diode array detector (HPLC-DAD). The sample preparation consisted of a sample mass (5.0 g), which had its initial pH adjusted (pH = 10.0), followed by extraction with acetonitrile (5.0 mL) assisted by ultrasound (5 minutes). The sample was centrifuged (4000 rpm, for 20 minutes at 20 °C) and its final pH was adjusted (pH = 3.0). Subsequently, the sample was filtered and, due to the interactions between the analytes in solution, a dilution of the extract was necessary by adding the surfactant Tween 20 (2.5×10^{-36} g mL⁻¹) in the step prior to injection (600 µL of sample and 400 µL of surfactant solution). The method was validated, with the analytical curves being prepared in a matrix, in the range of 50 to 150 mg kg⁻¹ for all the analytes studied ($R^2 > 0.99$). The veracity of the method was evaluated in terms of recovery, with recoveries of 93-110% for all analytes. The variation coefficients of repeatability were between 2.1 and 13.7%, while for intermediate precision the values varied between 3.3 and 19.0%. All parameters were acceptable (recovery between 70-120% and CV_{repe} and CV_{repro} less than 14 and 20%, respectively) for all analytes, except for erythrosine at the third level (150 mg kg⁻¹). The limits of detection and quantification were determined, being 15 mg kg⁻¹ and 30 mg kg⁻¹, respectively. The decision limit (CC_α) and detection capacity (CC_β) values ranged between 0.81000 and 107.82 mg kg⁻¹ and 1.6200 and 115.65 mg kg⁻¹, respectively. The values of the combined relative uncertainties ranged between 2.81 and 13.8%. Eight samples of guava pulp acquired in different regions of Minas Gerais were analyzed, and these samples showed no contamination. It is concluded that the developed methodology can be applied to the analysis of dyes in fruit pulps in a simple, fast and efficient way, making it suitable for monitoring the quality of fruit pulps in routine analyzes.

Keywords: Food dyes. Multiresidue analysis. Ultrasound-assisted extraction. Surfactant. CLAE-DAD.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura do Triton-X-100.....	30
Figura 2. Representação esquemática do procedimento de preparo de amostra	47
Figura 3. Cromatogramas obtidos para injeções individuais dos corantes (250 mg L ⁻¹ para o amarelo crepúsculo e 5,00 mg L ⁻¹ para tartrazina, vermelho N, laranja G e eritrosina).	52
Figura 4. Cromatograma obtido na injeção do pool dos corantes (250 mg L ⁻¹ para o amarelo crepúsculo e 5,00 mg L ⁻¹ para tartrazina, vermelho N, laranja G e eritrosina) com a Fase Móvel 01.....	53
Figura 5. Cromatograma obtido na injeção do pool dos corantes (250 mg L ⁻¹ para o amarelo crepúsculo e 5,00 mg L ⁻¹ para tartrazina, vermelho N, laranja G e eritrosina) no estudo de condicionamento da coluna.	54
Figura 6. Cromatograma obtido na injeção do pool dos analitos (60 mg L ⁻¹ para o amarelo crepúsculo e 6,0 mg L ⁻¹ para tartrazina, vermelho N, laranja G e eritrosina) com a Fase Móvel 02.	55
Figura 7. Estrutura do Tween 20.	56
Figura 8. Cromatogramas obtidos nas injeções dos pools dos analitos com surfactante nas concentrações de a) 3,0 x 10 ⁻³ g mL ⁻¹ ; b) 2,5 x 10 ⁻¹² g mL ⁻¹ e c) 2,5 x 10 ⁻³⁶ g mL ⁻¹ (15 mg L ⁻¹ para tartrazina, vermelho N e laranja G; 50 mg L ⁻¹ para amarelo crepúsculo; 100 mg L ⁻¹ para eritrosina) em 400 nm.....	56
Figura 9. Cromatogramas obtidos nas injeções dos pools dos analitos com surfactante nas concentrações de a) 3,0 x 10 ⁻³ g mL ⁻¹ ; b) 2,5 x 10 ⁻¹² g mL ⁻¹ e c) 2,5 x 10 ⁻³⁶ g mL ⁻¹ (15 mg L ⁻¹ para tartrazina, vermelho N e laranja G; 50 mg L ⁻¹ para amarelo crepúsculo; 100 mg L ⁻¹ para eritrosina) em 500 nm.....	59
Figura 10. Cromatogramas obtidos nas injeções dos pools dos analitos com diferentes concentrações de ácido fórmico na fase móvel aquosa. a) 0,09%, v/v; b) 0,10%, v/v e c) 0,15% v/v; (15 mg L ⁻¹ para tartrazina, vermelho N e laranja G; 50 mg L ⁻¹ para amarelo crepúsculo; 100 mg L ⁻¹ para eritrosina) em 400 nm.....	58

Figura 11. Cromatogramas obtidos nas injeções dos pools dos analitos com diferentes concentrações de ácido fórmico na fase móvel aquosa. a) 0,09%, v/v; b) 0,10%, v/v e c) 0,15% v/v; (15 mg L ⁻¹ para tartrazina, vermelho N e laranja G; 50 mg L ⁻¹ para amarelo crepúsculo; 100 mg L ⁻¹ para eritrosina) em 500 nm.....	58
Figura 12. Cromatograma obtido na injeção do pool dos analitos com surfactante na concentração de 2,5 x 10 ⁻³⁶ g mL ⁻¹ (15 mg L ⁻¹ para tartrazina, vermelho N e laranja G; 50 mg L ⁻¹ para amarelo crepúsculo; 100 mg L ⁻¹ para eritrosina)	59
Figura 13. Cromatograma obtido na injeção da amostra a partir do processo de extração ELL-PBT sem a presença de surfactante (15 mg L ⁻¹ para tartrazina, vermelho N e laranja G; 50 mg L ⁻¹ para amarelo crepúsculo; 100 mg L ⁻¹ para eritrosina) em 400 nm	60
Figura 14. Cromatograma obtido na injeção da amostra a partir do processo de extração ELL-PBT sem a presença de surfactante (15 mg L ⁻¹ para tartrazina, vermelho N e laranja G; 50 mg L ⁻¹ para amarelo crepúsculo; 100 mg L ⁻¹ para eritrosina) em 500 nm	61
Figura 15. Cromatograma obtido na injeção da amostra a partir do processo de extração ELL-PBT com a presença de surfactante (30 mg L ⁻¹ para tartrazina, vermelho N e laranja G; 100 mg L ⁻¹ para amarelo crepúsculo; 200 mg L ⁻¹ para eritrosina)	62
Figura 16. Cromatogramas obtidos nas injeções da amostra a partir do processo de extração simplificado na escolha do solvente extrator: a) acetona; b) metanol e c) acetonitrila. (30 mg L ⁻¹ para tartrazina, vermelho N e laranja G; 100 mg L ⁻¹ para amarelo crepúsculo; 200 mg L ⁻¹ para eritrosina) em 400 nm.....	63
Figura 17. Cromatogramas obtidos nas injeções da amostra a partir do processo de extração simplificado na escolha do solvente extrator: a) acetona; b) metanol e c) acetonitrila. (30 mg L ⁻¹ para tartrazina, vermelho N e laranja G; 100 mg L ⁻¹ para amarelo crepúsculo; 200 mg L ⁻¹ para eritrosina) em 500 nm.....	64
Figura 18. Cromatograma obtido na injeção da amostra a partir do processo de extração simplificado com pH da amostra igual a 10,0, pH final do extrato igual a 3,0 e sonicação por 5 min. (30 mg L ⁻¹ para tartrazina, vermelho N e laranja G; 100 mg L ⁻¹ para amarelo crepúsculo; 200 mg L ⁻¹ para eritrosina)	65

Figura 19. Curvas analíticas da tartrazina obtidas nos três dias de validação do método de determinação de corantes alimentares em polpa de goiaba.....	66
Figura 20. Cromatograma obtido na análise de uma amostra comercial a partir do método desenvolvido.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aditivos utilizados na indústria alimentícia e suas funções	21
Tabela 2. Informações químicas dos corantes alimentares.....	23
Tabela 3. Limites permitidos na legislação para os corantes	27
Tabela 4. Gradiente de fase móvel utilizado por Iammarino e colaboradores	29
Tabela 5. Métodos desenvolvidos para a determinação de corantes alimentares em diferentes matrizes.....	31
Tabela 6. Diferentes técnicas de preparo de amostra para a análise de corantes alimentares..	35
Tabela 7. Informações referentes aos padrões utilizados	42
Tabela 8. Informações sobre os materiais e equipamentos utilizados.....	43
Tabela 9. Gradiente otimizado das fases móveis utilizadas	43
Tabela 10. Gradiente de fase móvel utilizado no estudo da FM01	44
Tabela 11. Concentrações de surfactante utilizadas	45
Tabela 12. Coeficientes de variação e recuperações obtidas na ELL-PBT com adição de NaCl	61
Tabela 13. Coeficientes de variação obtidos na ELL-PBT com adição de NaCl e Tween 20 .	62
Tabela 14. Curvas analíticas obtidas através da combinação dos dados dos três dias de validação.....	66
Tabela 15. Resultados de veracidade, repetitividade e precisão intermediária encontrados para o método desenvolvido.....	67
Tabela 16. Limites de detecção (LD), de quantificação (LQ), de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção encontrados para cada analito	68

Tabela 17. Estimativa da incerteza combinada (u_c) e da incerteza expandida da medição (U) determinadas no procedimento de validação do método.....	69
Tabela 18. Resultados obtidos na análise de amostras obtidas em diferentes regiões de Minas Gerais	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIR: Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não alcólicas

ACPA: Área Cromatográfica do Pico da Amostra

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAC: Comissão *Codex Alimentarius*

CCFA: Comitê do *Codex* sobre Aditivos Alimentares

CC_α: Limite de Decisão

CC_β: Capacidade de Detecção

CLAE-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de doidos

CLAE-EM/EM: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrômetro de massas sequencial

CLAE-UV/Vis: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector Ultravioleta/Visível

CNNPA: Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos

C_{PII}: Correção devido à Precisão Intermediária do Método

CV: Coeficiente de Variação

CV_{repe}: Coeficiente de Variação de Repetitividade

CV_{repro}: Coeficiente de Variação de Reprodutibilidade

EFS: Extração em Fase Sólida

ELL: Extração Líquido – Líquido

ELL-PBT: Extração Líquido – Líquido com Partição a Baixa Temperatura

FAO: *Food Agriculture Organization*

FDA: *Food and Drug Administration*

FM: Fase Móvel

LD: Limite de Detecção

LMR: Limite Máximo de Resíduo

LQ: Limite de Quantificação

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MMQP – Método dos Mínimos Quadrados Ponderados

RSD: Desvio-Padrão Relativo

RSD_{Horwitz} : Desvio-Padrão Relativo de Horwitz

SD_{repro} : Desvio-Padrão de Reprodutibilidade

U: Incerteza expandida

UE: União Europeia

WHO: *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. Introdução	18
2. Revisão de literatura	18
2.1. Polpas de frutas.....	18
2.2. Aditivos alimentares	19
2.2.1. Corantes alimentícios.....	21
2.3. Legislação	23
2.3.1. Codex Alimentarius	24
2.3.2. União Europeia (UE)	25
2.3.3. Legislação brasileira	26
2.3.4. Limites permitidos para os corantes considerados nessa dissertação	27
2.4. Determinação de corantes alimentares	28
2.5. Preparo de amostra	34
2.5.1. Extração Líquido – Líquido com Partição a Baixa Temperatura (ELL-PBT)....	38
2.5.2. Simplificações no preparo de amostra	39
3. Objetivos	41
3.1. Objetivos específicos	41
4. Materiais e métodos	42
4.1. Reagentes e materiais	42
4.2. Preparo de soluções	42
4.3. Materiais e equipamentos	42
4.4. Otimização cromatográfica	44
4.4.1. Fase Móvel 01 (FM01)	44
4.4.2. Fase móvel 02 (FM02).....	44
4.4.3. Condicionamento da coluna	45
4.4.4. Presença de surfactante em solução.....	45
4.5. Preparo de amostra	45

4.5.1. Extração Líquido – Líquido com Partição a Baixa Temperatura (ELL-PBT)....	45
4.5.2. Preparo de amostra simplificado	46
4.7. Protocolo de validação	48
4.7.1. Linearidade	48
4.7.2. Veracidade, repetitividade e precisão intermediária.....	48
4.7.3. Limite de detecção (LD), de quantificação (LQ), de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)	49
4.7.4. Incerteza da Medição Analítica	50
4.8. Estudo de ocorrência	51
5. Resultados e Discussão.....	52
5.1. Otimização cromatográfica	52
5.1.1. Fase móvel 01 (FM01).....	52
5.1.2. Estudo de condicionamento da coluna	54
5.1.3. Fase móvel 02 (FM02).....	55
5.1.4. Presença de surfactante em solução.....	55
5.2. Otimização do preparo de amostra	59
5.2.2. Preparo de amostra simplificado	63
5.3. Validação do método.....	65
5.3.1. Linearidade	65
5.3.2. Veracidade, repetitividade e precisão intermediária.....	67
5.3.3. Limites de detecção (LD), de quantificação (LQ), de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)	68
5.3.4. Incerteza da medição analítica.....	68
5.4. Estudo de ocorrência	69
6. Conclusão	71
7. Próximas Etapas	72
8. Referências	73

1. Introdução

Aditivo alimentar é todo e qualquer ingrediente que é propositalmente adicionado a um alimento com o objetivo de preservar o seu sabor, melhorar a sua textura e aparência. Os corantes alimentares formam uma classe desses aditivos que são adicionados aos alimentos, com o intuito de torná-los mais atrativos aos consumidores, restaurando a aparência original perdida durante o processo de fabricação.

Entretanto, alguns corantes sintéticos possuem em sua estrutura um grupo cromóforo do tipo azo (N=N), além de anéis aromáticos. Portanto, são potencialmente perigosos à saúde humana, principalmente se consumidos em excesso. Dessa forma, para prevenir o uso indiscriminado dessas substâncias, leis e regulamentos, baseados em estudos toxicológicos em animais e estudos clínicos em humanos, foram implementados em diversos países. Sendo assim, diferentes métodos analíticos foram desenvolvidos visando a determinação e quantificação simultânea de vários corantes alimentares em diversas matrizes.

Dentre os alimentos que podem conter corantes, destacam-se as bebidas não-alcoólicas, as quais são amplamente consumidas em todo mundo. Entre as mais consumidas estão as bebidas obtidas a partir de frutas, uma vez que elas são fonte de vitaminas e minerais, além de apresentarem um sabor bem atrativo. Dentre as opções disponíveis no mercado, as polpas congeladas de fruta têm seu consumo expandido nos últimos anos, principalmente devido à praticidade de prepará-las para consumo.

Diante das informações apresentadas, esse trabalho visa desenvolver e validar um método para determinação simultânea de 5 corantes alimentares sintéticos empregando um simples preparo de amostra e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) como técnica analítica de determinação.

2. Revisão de literatura

2.1. Polpas de frutas

O ser humano pode ficar dias sem ingerir alimentos, mas não pode deixar de ingerir líquido entre três a cinco dias¹. Isso porque a água é responsável por 60 a 70% do peso corporal, sendo fundamental para a digestão, absorção, transferência, excreção e circulação de biomoléculas, bem como para a regulação da temperatura corporal.² Portanto, a água é o meio ideal para a ocorrência de muitas reações bioquímicas³. A ingestão de água ocorre pelo

consumo de água potável ou por meio de outras fontes, como sucos, água de coco, chás, entre outras bebidas não alcólicas. Bebidas não alcólicas incluem bebidas carbonatadas, sucos, bebidas energéticas, água engarrafada, café, chás e bebidas probióticas. Dentre elas, as bebidas carbonatadas são as mais consumidas, seguidas pela água engarrafada e os sucos, respectivamente⁴.

Entretanto, o consumo de bebidas carbonatadas, como os refrigerantes, tem diminuído ao longo dos anos. No Brasil, por exemplo, segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não alcólicas (ABIR), o consumo *per capita* caiu de 89,5 litros em 2010 para 61,82 litros em 2017. A produção diminuiu em 11% no mesmo período⁵. Tudo isso está ligado aos malefícios associados à ingestão desse tipo de bebida. Os refrigerantes são bebidas com alto teor de açúcar e o consumo de bebidas açucaradas é identificado como causa importante do aumento da obesidade⁶. Obesidade que é considerada fator de risco para outras doenças como doenças cardiovasculares, diabetes e alguns tipos de câncer⁷.

Dessa forma, o consumo de outros tipos de bebidas, como as polpas de frutas, cresce a cada ano. Isso acontece porque os consumidores têm cada vez mais interesse em consumir produtos mais saudáveis e práticos. Como as frutas são produtos perecíveis, as polpas se tornam uma boa alternativa, com alto valor nutritivo⁸, pois são fontes de cálcio, fibras e vitaminas. A polpa é obtida a partir das partes comestíveis das frutas carnosas, maduras e frescas, por meio de processos tecnológicos e sanitários adequados. O processamento e congelamento da polpa traz praticidade aos consumidores, além de conservar as características organolépticas dos frutos⁹.

Diante dessas informações, é importante analisar se esse tipo de produto se encontra de acordo com as normas vigentes. No Brasil, por exemplo, existe a Instrução Normativa Nº 49, de 26 de Setembro de 2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que estabelece os Padrões de Identidade e Qualidade de Suco e Polpa de Fruta¹⁰.

2.2. Aditivos alimentares

Segundo a Portaria SVS/MS 540, de 27/10/97 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA):

Aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos sem o propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as

características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento.

Os aditivos alimentares são empregados para preservar o sabor dos alimentos e também para melhorar a sua textura e aparência. Além disso, possuem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e tamponantes, que permitem a extensão do prazo de validade dos alimentos e impedem o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos^{11,12}.

O uso de aditivos alimentares teve início há cerca de cinco mil anos com o uso, por exemplo, de vinagre para conservação de legumes, ervas para melhorar o sabor e também coloração vegetal para melhorar a aparência dos alimentos¹¹. Atualmente, eles são utilizados em alimentos industrializados para manter ou melhorar as características biológicas, físico-químicas, reológicas e sensoriais. A indústria alimentícia emprega cerca de 25 classes de aditivos alimentares, seguindo a determinação de segurança alimentar baseada no *Codex Alimentarius* e também de acordo com a legislação de cada país¹³.

As classes nas quais os aditivos são classificados estão baseadas no uso industrial de cada um. Entretanto, alguns desses compostos podem aparecer em mais de uma classe, pois apresentam mais de uma ação principal, devido às suas diferentes funcionalidades. Nesse caso, a classificação dependerá da quantidade utilizada e do modo de processamento do alimento¹³.

Os aditivos alimentares podem ser classificados em 25 classes englobando, aproximadamente, 230 compostos. Pode-se ver na Tabela 1 algumas das principais classes, assim como alguns exemplos de aditivos alimentares. Os reguladores de acidez são substâncias capazes de controlar e/ou modificar o pH dos alimentos, influenciando nas suas características e também no seu prazo de validade¹³. Os conservantes são amplamente empregados de forma a evitar o crescimento de bactérias, leveduras e bolores nos alimentos¹⁴. Os antioxidantes são utilizados para evitar e /ou diminuir a velocidade das reações de oxidação que ocorrem em vitaminas, corantes naturais e elementos lipídicos dos alimentos, reações essas que provocam perda do valor nutricional, além de produzir cheiro e sabor desagradáveis. Os estabilizantes são usados para se evitar a separação de fases, garantindo a homogeneidade dos alimentos. Espessantes são utilizados em alimentos como, maionese, sorvetes e *cream cheese*, de forma a se obter alta viscosidade¹³. Os adoçantes são usados, principalmente, em produtos sem adição de açúcar, para conferir um sabor doce ao alimento¹⁵. Corantes são definidos como substâncias que conferem cor aos alimentos¹⁶.

Tabela 1. Aditivos utilizados na indústria alimentícia e suas funções¹⁷

Classe	Função	Aditivos
Reguladores de acidez	Conferir um sabor ácido, alterar ou controlar a acidez/alcalinidade	Ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, carbonato de potássio, carbonato de sódio
Conservantes	Impedir ou retardar a alteração provocada por microrganismos ou enzimas	Ácido benzóico e seus sais de cálcio, sódio e potássio
Antioxidantes	Retardar o aparecimento de alteração oxidativa	Butil-hidroxitolueno (BHT), butil-hidroxianisol (BHA)
Estabilizantes	Manter a dispersão uniforme de duas ou mais substâncias imiscíveis	Citrato de sódio, cloreto de cálcio
Espessantes	Aumentar a viscosidade	Goma guar, goma xantana
Edulcorantes	Conferir sabor doce	Sacarina, ciclamato de sódio
Corantes	Substância que confere, intensifica ou restaura a cor.	Tartrazina, eritrosina

A cor é o parâmetro mais importante avaliado pelos consumidores antes de decidir comprar algum produto¹³. Ela é uma característica fundamental, pois contribui de maneira relevante na aparência dos produtos, influenciando diretamente na sua escolha¹⁸. A cor afeta não apenas o aspecto visual, mas também está associada à qualidade, à variedade e ao frescor dos alimentos¹⁹. Por essa razão, os corantes vêm sendo utilizados pela indústria alimentícia por muitos anos²⁰, e em diferentes tipos de matrizes como forma de preservar ou restaurar a cor natural do produto e melhorar a sua aparência²¹.

Entretanto, algumas dessas substâncias podem oferecer risco à saúde humana, como reações alérgicas e intolerâncias¹⁸, além de apresentar potencial carcinogênico²¹, principalmente se consumidos em excesso. Considerando os possíveis efeitos dos corantes aos humanos, a detecção e quantificação destes compostos em alimentos é uma questão importante a ser considerada²².

2.2.1. Corantes alimentícios

Os corantes constituem uma das classes mais importantes dos aditivos alimentares. Isso porque a cor é uma característica fundamental do alimento, pois ela torna o produto visualmente mais atrativo ao consumidor²³. Além disso, a aparência, segurança, aceitabilidade e características sensoriais dos alimentos estão diretamente ligadas à sua cor²⁴. Por isso, o uso

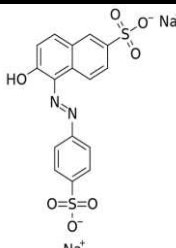
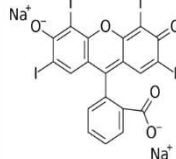
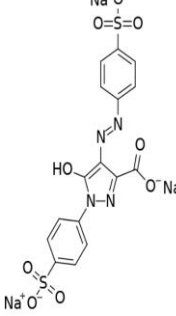
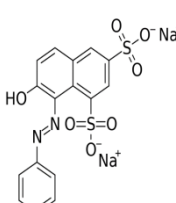
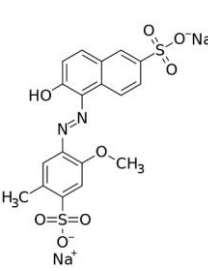
de corantes alimentares é uma prática comum ao redor do mundo²³, sendo utilizados em matrizes como bebidas, sucos, produtos de cárneos e doces²³.

Os corantes alimentícios podem ser classificados em naturais ou artificiais. Os corantes naturais são isolados de plantas, fungos ou insetos, como a clorofila e o carmin¹⁸. Enquanto os artificiais são quimicamente sintetizados, como tartrazina, amarelo sunset, amaranto e azul brilhante²⁵. Corantes naturais têm sido cada vez mais utilizados devido à preferência do consumidor, mas os corantes sintéticos ainda são amplamente empregados devido ao seu baixo custo e alta estabilidade²¹.

Geralmente, os corantes sintéticos possuem grupos funcionais azo (N=N) e anéis aromáticos em sua estrutura, o que os tornam prejudiciais à saúde humana²⁶. Esses corantes podem ser reduzidos pelas enzimas azoredutase nas bactérias intestinais e nas células hepáticas, liberando aminas aromáticas no organismo²², causando alergias, reações asmáticas, danos ao DNA, hiperatividade e potencial risco carcinogênico²¹. De acordo com Qi e colaboradores, os corantes sintéticos podem gerar alergias, crises asmáticas e outros distúrbios de saúde em indivíduos mais sensíveis, podendo ter efeito cancerígeno, caso consumidos em excesso²⁰. Dessa forma, o uso de corantes é estritamente controlado em todo mundo²³.

Pode-se ver na Tabela 2 algumas informações químicas referentes aos corantes considerados nessa dissertação. Como se pode perceber, quatro dos cinco compostos analisados contêm o grupo azo (N=N), sendo assim, suas análises são de fundamental importância.

Tabela 2. Informações químicas dos analitos

Analito, fórmula molecular e massa molecular	Sinônimos	Classe	Fórmula estrutural	Valores de pKa
Amarelo crepúsculo FCF C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂ 452,37 g/mol	Sunset Yellow FCF, Food Yellow 3	Sintético		pKa ₁ = - 3,5 pKa ₂ = - 0,62
Eritrosina C ₂₀ H ₆ I ₄ Na ₂ O ₅ 879,86 g/mol	Eritrosina B, Acid Red 51	Sintético		3,52
Tartrazina C ₁₆ H ₉ N ₄ Na ₃ O ₉ S ₂ 534,356 g/mol	Yellow 5, Food Yellow 4	Sintético		-2,69
Laranja G C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂ 452,37 g/mol	Orange G, Acid Orange 10	Sintético		pKa ₁ = - 2,96 pKa ₂ = - 0,32
Vermelho N C ₃₂ H ₂₂ N ₆ Na ₂ O ₆ S ₂ 496,4 g/mol	Vermelho Allura, Food Red N° 40	Sintético		pKa ₁ = - 4,14 pKa ₂ = 0,45

2.3. Legislação

Para prevenir o uso indiscriminado e também proteger os consumidores dos riscos à saúde, muitos países estabelecem regulamentações rigorosas sobre quais corantes são permitidos e em quais concentrações eles podem ser utilizados²⁷.

No Japão, todos os ingredientes, incluindo os corantes alimentares devem estar listados nos rótulos das embalagens. Na China, a quantidade máxima permitida para a maioria dos corantes não é maior que 100 mg kg⁻¹ ²¹. Nos Estados Unidos, apenas sete corantes são permitidos pela *Food and Drug Administration* (FDA): azul brilhante, carmim índigo, verde rápido, vermelho allura, eritrosina, tartrazina e amarelo crepúsculo. Na Europa a Diretiva 94/36/EC contém regras detalhadas para a utilização de corantes naturais e artificiais¹⁸. No Brasil, a utilização e o limite máximo permitido dos corantes em alimentos é regulado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)²³.

A seguir são apresentados: um resumo sobre as funções de um importante comitê internacional, o *Codex alimentarius*, que possui como objetivo estabelecer normas internacionais na área de alimentos²⁸, um breve comentário sobre a legislação europeia, que apresenta as normas de segurança alimentar mais rigorosas do mundo²⁹ e, por fim, um pequeno histórico sobre a legislação brasileira no que diz respeito à segurança alimentar e limites permitidos para os corantes estudados nessa dissertação.

2.3.1. Codex Alimentarius

A *Comissão Codex alimentarius* (CAC, do inglês) é uma organização intergovernamental estabelecida pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) e pela *World Health Organization* (WHO) em 1963. Atualmente, a *Comissão Codex Alimentarius* é constituída por 188 países membros e uma organização membro (União Europeia), da qual o Brasil é participante desde 1968³⁰. Além disso, possui mais de 200 organizações internacionais governamentais e não-governamentais como observadores³¹. A Comissão Codex desenvolve normas, diretrizes, códigos de conduta e importantes recomendações de forma a promover e manter a segurança alimentar³². Seu principal objetivo é proteger a saúde dos consumidores, promover o comércio de alimentos dentro de padrões internacionais, além de coordenar as normas alimentares estabelecidas por organizações internacionais governamentais e não governamentais³³.

O *Codex alimentarius* é desenvolvido pela CAC, que é uma coleção de padrões alimentares internacionalmente adotados e textos acreditados apresentados de maneira uniforme. O *Codex* inclui uma vasta gama de regulamentos para os principais alimentos (processados, semiprocessados ou crus), disposições relativas à higiene alimentar, resíduos de pesticidas e medicamentos veterinários, contaminantes, além dos aditivos alimentares. Além

disso, apresenta diretrizes sobre rotulagem e apresentação, métodos de análise e amostragem, inspeção e certificação de importação e exportação³¹.

Como os aditivos alimentares consistem em um grupo amplo de substâncias, eles estão sempre entre os temas discutidos nas reuniões da CAC, tendo, assim, uma subcomissão da CAC específica para tal assunto, denominada Comitê do Codex sobre Aditivos Alimentares (CCFA, do inglês)³¹. A CCFA deve:

a) estabelecer ou endossar níveis máximos permitidos para aditivos alimentares individuais;

b) preparar listas prioritárias de aditivos alimentares para avaliação dos riscos pelo Comitê Misto FAO / OMS de Peritos em Aditivos Alimentares;

(c) atribuir classes funcionais a aditivos alimentares individuais;

d) recomendar especificações de identidade e pureza para aditivos alimentares adotadas pela Comissão;

(e) considerar métodos de análise para a determinação de aditivos em alimentos; e

(f) considerar e elaborar normas ou códigos para assuntos relacionados, tais como a rotulagem de aditivos alimentares quando vendidos como tal³⁴.

2.3.2. União Europeia (UE)

As normas em vigor na União Europeia são as mais rigorosas de todo o mundo, uma vez que os controles obrigatórios são aplicados ao longo de toda cadeia agroalimentar. Além disso, a política alimentar da UE baseia-se em dados científicos sólidos e em uma avaliação rigorosa de riscos. Os aditivos alimentares, por exemplo, são cientificamente controlados antes de terem sua utilização autorizada, a fim de garantir que são seguros para a saúde humana²⁹.

Tendo em vista que as diferentes legislações dos Estados-membros da União Europeia prejudicam a livre circulação dos alimentos, e considerando a necessidade de proteger e manter o consumidor informado sobre a constituição do alimento, foram publicadas diferentes diretivas visando garantir o mesmo nível de proteção ao consumidor em todos os Estados-

membros²⁹. Essas Diretivas são atos legislativos que fixam os objetivos que devem ser atingidos por cada Estado–membro da UE³⁵.

A Diretiva 94/35/CE de 30 de Junho de 1994³⁶ estabelece quais edulcorantes podem ser utilizados e também a quantidade permitida. De modo semelhante, a Diretiva 95/2/CE de 20 de Janeiro de 1995³⁷ refere-se ao uso de aditivos alimentares em geral, com exceção dos corantes e edulcorantes nos gêneros alimentares, determinando quais aditivos são permitidos e sua concentração máxima. Para os corantes alimentares, foi criada a Diretiva 94/36/CE de 30 de Junho de 1994³⁸, com os mesmos objetivos das Diretivas citadas anteriormente.

Em 2008, o Parlamento Europeu e o Conselho publicaram o Regulamento CE N.º 1333/2008³⁹, que apresenta uma lista com os aditivos autorizados para a uso em diferentes gêneros alimentícios, assim como as condições de utilização. O Regulamento é um ato geral e obrigatório, sendo imediatamente imposto e aplicável em todos os Estados–membros da União Europeia⁴⁰. Esse regulamento substitui as diretivas citadas anteriormente, de forma a assegurar um elevado nível de proteção ao consumidor.

Além disso, o Regulamento CE N.º 1333/2008 também afirma que os aditivos devem ser permanentemente observados, sendo reavaliados sempre quando houver necessidade, levando em consideração as variações nas condições de uso e quaisquer novos dados científicos. Dessa forma, em 2011 foi publicado o Regulamento (UE) N.º 1129/2011 da Comissão⁴¹, que altera o anexo II do Regulamento CE N.º 1333/2008. Esse Regulamento apresenta a lista de aditivos que podem ser empregados e suas respectivas condições de uso, como a quantidade e em quais alimentos podem ser aplicados.

2.3.3. Legislação brasileira

A Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) por meio da Resolução CNNPA 21/75, de 17 de fevereiro de 1976 determina as medidas para análise dos aditivos alimentares. Para essas análises são utilizadas as técnicas analíticas adotadas ou recomendadas pela Farmacopéia Brasileira, Food Chemicals Codex, Food and Drug Administration, Comitê Misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos para Alimentos (JECFA)⁴². A Resolução do Conselho Nacional de Saúde N.º 04, de 24 de novembro de 1988 define os limites máximos de cada aditivo alimentar e também as suas condições de uso⁴³.

Para a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, segundo a Portaria Nº 540 - SVS/MS, de 27 de outubro de 1997⁴⁴, os aditivos devem, primeiramente, ser submetidos a uma avaliação toxicológica antes de serem colocados em uso. Eles devem ser mantidos sob constante avaliação e serem reavaliados caso as condições de uso sejam modificadas. Além disso, seu uso deve ser restrito a alimentos específicos, em condições específicas ao menor nível a fim de se alcançar o efeito desejado.

Em 1999 foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, como o objetivo de promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e consumo de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária⁴⁵.

De acordo com a ANVISA, para que os aditivos alimentares sejam aprovados no Brasil são consideradas referências internacionais como o *Codex Alimentarius* e a União Europeia. Ainda segundo esse órgão, os aditivos só podem ser utilizados na indústria alimentícia quando estiverem explicitamente definidos pela legislação para a categoria de alimentos correspondente, caso contrário, seu uso é proibido⁴⁶.

2.3.4. Limites permitidos para os corantes considerados nessa dissertação

Na Tabela 3 são listados os limites estabelecidos por cada legislação citada anteriormente para os corantes que serão considerados nesta dissertação.

Tabela 3. Limites permitidos na legislação para os corantes alimentares

Analito	CODEX*	União Europeia**	ANVISA***
Amarelo crepúsculo FCF	0,30 g kg ⁻¹	Autorizado	100 mg kg ⁻¹
Eritrosina	Não permitido para polpas de sucos	Não permitido para polpas de sucos	100 mg kg ⁻¹
Tartrazina	Não permitido para polpas de sucos	Autorizado	100 mg kg ⁻¹
Laranja G	Não permitido	Não permitido	Não permitido
Vermelho N	0,30 g kg ⁻¹	Autorizado	100 mg kg ⁻¹

Codex Alimentarius* – General Standards for Food Additives⁴⁷; ** União Europeia - Directiva 94/36/CE Do Parlamento Europeu e Do Conselho de 30 de Junho de 1994 relativa aos corantes para utilização nos géneros alimentícios³⁸; * ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução do Conselho Nacional de Saúde N.º 04, de 24 de Novembro de 1988 ⁴³

2.4. Determinação de corantes alimentares

Diante das informações mencionadas anteriormente, faz-se necessária a determinação de corantes alimentícios em diferentes matrizes, visando garantir a segurança alimentar. A literatura apresenta diversos métodos analíticos desenvolvidos visando a identificação e quantificação desses corantes em matrizes como: especiarias⁴⁸, vinhos e refrigerantes²⁷, sucos e gelatinas⁴⁹, doces e sorvetes¹⁸, entre outras. Alguns desses trabalhos, são mostrados na Tabela 5, assim como os principais resultados obtidos. Como se pode observar, as técnicas cromatográficas são bastante empregadas na determinação e quantificação de corantes alimentares em diferentes matrizes, permitindo a análise de uma grande quantidade de compostos com alta eficiência.

Os primeiros estudos de determinação de corantes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) relatam o uso de coluna de sílica, resultados que apresentam alguns inconvenientes. Como os corantes são compostos muito polares, a interação dos analitos com a fase estacionária se tornava irreversível, os tempos de análise eram muito longos, com picos irregulares e presença de cauda⁵⁰.

Uma alternativa para a análise desses compostos são as colunas de troca iônica. Nesse tipo de cromatografia a fase estacionária é constituída por um suporte onde são adicionados grupos funcionais ionizáveis. Eles podem ser do tipo aniônicos, que possuem sítios ativos carregados positivamente, retendo ânions ou trocadores catiônicos que possuem sítios carregados negativamente e retém cátions⁵¹. Chen e colaboradores desenvolveram um método para a determinação dos corantes amarantho, azul brilhante, camim índigo, vermelho novo, ponceau 4R, amarelo crepúsculo, tartrazina e vermelho allura em diferentes tipos de bebidas utilizando uma coluna de troca aniônica (250 mm x 4 mm; 13 μm) de baixa hidrofobicidade para reduzir a adsorção dos corantes na fase estacionária. Um gradiente de eluição com ácido clorídrico 2,0 mol L⁻¹ (eluente 1), acetonitrila (eluente 2) e água (eluente 3) foi empregado, uma vez que a presença da solução ácida suprimia a ionização dos analitos. Nesse trabalho, os limites de detecção variaram de 0,03 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e as recuperações variaram de 94,7 a 109,0%⁵².

A utilização de colunas C₁₈ em CLAE também é eficiente, entretanto se apresenta como um desafio para a análise de corantes alimentares. Prado e Godoy, por exemplo, relatam a necessidade de condicionamento da coluna cromatográfica antes que as análises dos

corantes sejam realizadas²⁴. Nesse trabalho os autores desenvolveram e validaram uma metodologia por CLAE acoplada com um detector de arranjo de diodos (DAD) para a análise dos corantes: amaranço, tartrazina, amarelo crepúsculo, ponceau 4R e azul de indigotina em amostras de pó de gelatina. Eles utilizaram uma coluna C₁₈ ODS-2 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm) e uma eluição isocrática de água: metanol (70:30, v/v), com uma vazão de 0,5 mL min⁻¹. Entretanto, a coluna deveria ser condicionada por 12,5 minutos pela passagem de uma fase móvel água: metanol (70:30, v/v) adicionada de 0,08 mol L⁻¹ de acetato de amônio, o pH do tampão não foi descrito. Os autores concluem que o condicionamento da coluna foi eficiente, pois a presença do tampão melhorou a resolução entre os picos dos corantes estudados, visto que a fase móvel (FM) tamponada pode afetar a afinidade do composto com a fase estacionária de duas maneiras: suprimindo a ionização dos compostos e/ou reduzindo a solubilidade dos analitos pela fase móvel.

Iammarino e colaboradores também descrevem a necessidade de recondicionamento da coluna antes de realizar novas injeções. Neste trabalho os autores possuem como objetivo a análise dos corantes: amaranço, ponceau 4R, carmim, ponceau SX, ponceau 3R, vermelho allura AC, carmoisina, eritrosina, Sudan I, Sudan II, Sudan III e Sudan IV em produtos cárneos utilizando CLAE-DAD. Eles utilizaram uma coluna C₁₈ RP-Gold (150 mm x 4,6 mm; 5 µm) e uma eluição gradiente usando duas fases móvel: a fase móvel A, constituída de tampão acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,0, e acetonitrila como fase móvel B, sendo o gradiente utilizado mostrado na Tabela 4. O tempo total de corrida foi de 52 min.

Tabela 4. Gradiente de fase móvel utilizado por Iammarino e colaboradores

Tempo (min)	Fase móvel B (%)
0 – 15	0 – 15
15 – 25	15 – 34
25 – 26	34 – 80
26 – 47	80
47 – 48	80 – 0
48 – 52	0

A condição descrita anteriormete permitiu a separação dos 12 analitos. Da mesma forma que o trabalho de Prado e Godoy citado anteriormente, o reequilíbrio da coluna se deu utilizando uma fase móvel tamponada, o que permitiu aumentar a afinidade dos compostos com a coluna utilizada⁵³.

Vidotti e colaboradores utilizaram o surfactante Triton-X-100 na fase móvel com o objetivo de modificar as características da coluna C₁₈ utilizada⁴⁹.

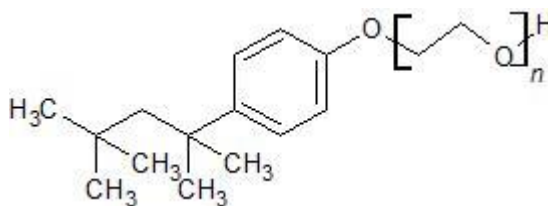


Figura 1. Estrutura do Triton-X-100

O objetivo dos autores foi realizar a determinação dos corantes: tartrazina, azul brilhante e amarelo crepúsculo em amostras de sucos artificiais e gelatinas sem o uso de solventes orgânicos na fase móvel. Para isso, eles utilizaram uma coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) e uma fase móvel contendo 0,25 mL de surfactante Triton-X dissolvido em 100 mL de tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0. Foi utilizada uma eluição isocrática com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. Os autores descrevem que os analitos estudados são bastante solúveis em água e apresentam baixa afinidade pela fase estacionária da coluna devido às características não polares do grupo C₁₈. Dessa forma, não é possível realizar a separação dos corantes utilizando apenas água na fase móvel, visto que dessa maneira eles saíam coeluídos. Por isso, o uso do surfactante na fase móvel. Segundo os autores, a presença do Triton-X na fase móvel faz com que a polaridade da coluna aumente à medida em que este surfactante interage com a fase estacionária. Além disso, a formação de micelas na fase móvel estabiliza as moléculas dos corantes, permitindo a separação entre eles.

Outros trabalhos descritos na literatura são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Métodos desenvolvidos para a determinação de corantes alimentares em diferentes matrizes

Analito(s)	Matriz	Técnica de separação	Coluna	Fase Móvel	Eluição	Preparo de amostra	FLT (ng mL ⁻¹)	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)	Rec. (%)	Ref.
Amarelo Sunset, amaranto, tartrazina, ponceau 4R, eritrosina e vermelho allura	Refrigerantes, confeitaria à base de açúcar e gelatina.	CLAE-UV/vis*	Gemini C18 (5 µm x 4,6 mm x 250 mm)	Fase móvel A: acetato de amônio 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,5) Fase móvel B: metanol: acetonitrila (30:70, v/v)	5 – 50% B (0 – 20 min) seguido de 50 – 5% B (20 – 30 min).	Acrescentou-se 300 µL de líquido iônico a 10,0 mL de amostra. Agitou-se manualmente. Centrifugou-se e o sobrenadante foi removido. A ele foi acrescentado metanol. 10 µL dessa mistura foram injetadas em HPLC.	0,05 – 2000	0,015 – 0,32	0,05 – 1,0	95,8-104,5	Wu. et. al. (2013) ¹⁹
Ponceau 4RC, orange II, vermelho allura, eritrosina, amarelo crepúsculo, azofloxina e ponceau xilidina	Carne, frango e rações animais.	CLAE-UV/Vis e CLAE-EM/EM**	Atlantis T3 (2,1 mm x 150 mm, 3 µm) (UV/Vis); Atlantis dC ₁₈ column (2,1 x 150 mm x 5 µm) (EM/EM)	Fase móvel A: acetato de amônio 20 mM. Fase móvel B: acetonitrila	5% B (inicial), 5 a 40% de B (de 0 a 4 min), 40 a 90% de B (de 4 a 9 min) e 90% de B (de 9 a 11 min). Retorno à condição inicial e reequilíbrio de 5 min. Total de 16 min de corrida.	Adicionou-se 10,0 mL de solução extratora (SE) etanol-amônia-água (80:1:19, v/v/v) a 2,0 g de amostra, agitou-se e centrifugou-se. Para análise por CLAE-UV/Vis: 2,5 mL do sobrenadante foram evaporados à (50 ° C) sob fluxo de N ₂ . O resíduo foi reconstituído com 0,5 mL de SE. Ajustou-se o pH para 5,0, filtrou-se e analisou-se por CLAE-UV/Vis. Para análise por CLAE-EM/EM: o pH do sobrenadante foi ajustado para 5,0, filtrou-se e analisou-se. As amostras em branco foram pré-tratadas da mesma maneira.	100 – 5000 (UV/Vis); 0,2 – 2000 (EM/EM)	6,43 – 74,81 (UV-Vis); 0,02 – 21,83 (EM/EM)	-----	71 – 97 (UV/Vis) 53 – 103 (EM/EM)	Zou et. al. (2013) ²¹

Tartrazina, amaranato, amarelo sunset, ponceau 4R e azul brilhante	Bebidas carbonatadas, pirulitos, gelatinas, chocolates e bebidas em pó.	CLAE-UV/Vis	Eclipse plus-C ₁₈ (4,6 mm x 150 mm x 3,5 µm)	Fase móvel A: acetato de amônio 0,02 mol.L ⁻¹ (pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial. Fase móvel B: Metanol	15 a 50% de B (0 a 6 minutos), seguido por 50 a 35% de B (6 a 10 minutos) e alterado para 35 a 15% de B (10 a 15 minutos)	As amostras foram previamente homogeneizadas e desgaseificadas. 0,5 mL de líquido iônico e 0,5 mL de solução tampão foram adicionados à amostra. A mistura foi diluída para 5,0 mL com água destilada e depois foi adicionado K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O, formando uma solução turva após agitação suave. A mistura foi centrifugada. O sobrenadante foi removido e 20 µL foram injetados em CLAE para quantificação.	0,61 – 2000	0,051 – 0,074	-----	93,2 – 98,9	Sha et. al. (2015) ²²
Amaranto, ponceau 4R, vermelho allura AC, azorubina, eritrosina	Bebidas, geléias e drágeas de chocolate.	CLAE-UV/Vis	Capital C ₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Fase móvel A: 80:10:10; acetato de amônio: acetonitrila: metanol. Fase móvel B: 55:20:25; acetato de amônio: acetonitrila: metanol. Fase móvel C: 10:40:50; água: acetonitrila: metanol.	0 a 5 min: 100% de fase móvel A. 5 a 7,5 min: 0 – 100% de fase móvel B. 7,5 a 12 min: 100% de fase móvel B. 12 a 12,1 min: 0 – 100% de fase móvel C. 12,1 a 21,5 min: 100 % de fase móvel C. 21,5 a 21,6 min: 0 – 100% de fase móvel A. 21,6 a 26 min: 100% de fase móvel A.	Adicionou-se NaCl a uma solução de corantes e agitou-se bem. Depois disso, foi adicionado SEP*** e agitada em vórtex por 1 min. Neste momento, formou-se uma solução turva que consistia em gotículas muito finas de SEP dispersas na amostra aquosa. A mistura foi centrifugada, fazendo com que as gotículas finas dispersas da fase de extração flutuassem no topo do tubo. Depois disso, a água foi retirada e o volume da fase SEP que permaneceu no tubo foi diluído para com metanol. 20 µL desta solução foram injetados em HPLC para análise.	0,5 – 500	0,01 - 0,08	0,03 - 0,24	90 - 97	Faraji, M. (2019) ⁵⁴

Amaranto, ponceau 4R, carmim, ponceau SX, ponceau 3R, vermelho allura AC, carmoisina, eritrosina, sudan I, II, III e IV	Produtos cárneos.	CLAE-UV/Vis	C ₁₈ RP-Gold (150 mm x 4,6 mm x 5 μm)	Fase móvel A: tampão acetato 0,02 M (pH 7,0). Fase móvel B: acetonitrila	0% B a 15% B em 15 min, um gradiente subsequente até 34% B em 10 min e depois até 80% B em 1min, isocrático por 21 min, gradiente para 0% de B em 1 min e uma etapa final de reequilíbrio de 4 min nesta composição de fase móvel.	As amostras foram previamente homogeneizadas. A extração foi feita com 20 mL de acetonitrila, metanol, água e amônia (50: 40: 9: 1 v/v/v/v), usando um agitador vórtex por 2 min a 2500 rpm. As amostras foram sonicadas por 2 h. Por fim, as amostras foram re-extraídas com agitador vortex por 1min a 2500rpm. Os sobrenadantes de cada amostra foram, então, filtrados antes de serem injetados.	1000 – 80000	1,4 – 7,5 mg kg ⁻¹	4,2 – 22,9 mg kg ⁻¹	84,6 – 105	Iammarino et. al. (2019) ⁵⁵
Tartrazina, Bordeaux-S, Ponceau 4R, eritrosina, verde rápido, amarelo crepúsculo, azorrubina, vermelho 40, carmim índigo e azul brilhante	Iogurte	CLAE-UV/Vis	NUCLEODUR C ₁₈ (150 X 4,6 mm; 3μm)	Fase móvel A: acetato de amônio 1%, pH 7,0. Fase móvel B: metanol: acetonitrila (80: 20, v/v)	0 a 2 min: 0% de FM B; 2 a 37 min: 0 – 80% de FM B; 37 a 40 min: 80% de FM B; 40 a 45 min: 80 – 0% de FM B; 45 a 50 min: 0% de FM B.	10,0 g de amostra foram misturadas com K ₄ Fe(CN) ₆ .3H ₂ O e ZnSO ₄ .7 H ₂ O, para precipitação das proteínas. A mistura foi imediatamente agitada e deixada em repouso por 10 min. Após esse período, uma solução de metanol: hidróxido de amônio (2,0 mol L ⁻¹) (80: 20, v/v) foi adicionada ao sistema. A mistura foi agitada e centrifugada e o sobrenadante recolhido. Essa etapa foi repetida mais duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados e tiveram seu volume completado para 50 mL com água deionizada. Uma alíquota de 1,0 mL foi filtrada e injetada no cromatógrafo.	500 - 25000	0,18 – 4,58	0,54 – 13,9	82 - 115	Bento et al. (2015) ²³

*CLAE-UV/Vis: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta/visível; **CLAE-EM/EM: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial; ***SEP: solvente eutéctico profundo.

2.5. Preparo de amostra

O preparo da amostra é uma etapa fundamental no processo de análise, pois possui como objetivo minimizar os possíveis interferentes da matriz, antes que ela seja inserida nos instrumentos de análise⁵⁶. Tais interferentes, além de comprometerem a vida útil dos equipamentos, podem agir como supressores do sinal analítico, superestimando ou subestimando o sinal⁵⁷.

Os alimentos, em geral, são matrizes bastante complexas e, dessa forma, faz-se necessário um pré-tratamento dessas amostras, de forma que elas estejam adequadas para análise. Atualmente, vários procedimentos de extração e *clean-up* são aplicados em análise de alimentos, como Microextração Líquido - Líquido Dispersiva⁵⁴, Extração com Líquidos Iônicos²², Extração em Fase Sólida (EFS)⁵⁸, Extração Líquido – Líquido com Partição a Baixa Temperatura⁵⁹ e preparos de amostra simplificado²⁴. A escolha do melhor procedimento deve levar em consideração menor consumo de reagentes e geração de resíduos, evitar o uso de solventes tóxicos, reduzir os custos, entre outros fatores⁶⁰.

Alguns trabalhos descritos na literatura empregando diferentes formas de preparo de amostra são descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Diferentes técnicas de preparo de amostra para a análise de corantes alimentares

Analito(s)	Matriz	Técnica de separação	Coluna	Fase Móvel	Eluição	Preparo de amostra	FLT (ng mL ⁻¹)	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)	Rec. (%)	Ref.
Ponceau 4R, carmim índigo, eritrosina, tartrazina, amarelo crepúsculo, verde rápido, amaranço, vermelho allura, azul brilhante, amarelo dimetil, fast garnet GBC, vermelho para, sudan I, II, III, IV, sudan laranja G, sudan vermelho 7B, B e G	Pimentas em pó e frutas em conserva	CLAE-EM/EM	Acclai m Polar Advant age C ₁₆ (150 mm x 4,6 mm; 3µm)	Fase móvel A: acetonitrila. Fase móvel B: acetato de amônio 0,02 mol L ⁻¹ com 1% de ácido acético	0 a 3 min: 98 – 50% de FM B; 3 a 8 min: 50 – 0% de FM B; 8 a 15 min: 0% de FM B; 15 a 15,5 min: 0 – 98% de FM B; 15,5 a 20 min: 98% de FM B.	10,0 g de amostra foram extraídas duas vezes com acetonitrila. Os extratos foram combinados e centrifugados. O sobrenadante foi filtrado e injetado no cromatógrafo.	0,1 – 200 ou 100 – 50000	-----	0,001 – 1,0 mg kg ⁻¹	91,1 – 100,4 (pimenta em pó) e 91,1 – 100,9 (frutas em conserva)	Tsai et. al. (2015) ¹⁶
Sudans: I, II, III, IV, vermelho G, laranja G, vermelho 7B, vermelho para, preto B e vermelho B; amarelo dimetil, rahodamina B, auramina O, vermelho toluidina e orange II	Molhos, algodão doce e pickles.	CLAE-EM/EM	Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm; 1,8 µm)	Fase móvel A: formiato de amônio 0,01 mol L ⁻¹ em água com ácido fórmico a 0,1%. Fase móvel B: formiato de amônio 0,01 mol L ⁻¹ em acetonitrila com ácido fórmico a 0,1%.	75% B (inicial), 75% B (de 0 a 2 min), 98% B (2 a 3,50 min), 75% B (3,50 a 5 min).	Pesou-se 1 g de amostra homogeneizada em um tubo de centrifuga e extraiu-se com 10 mL de ACN. A amostra foi agitada no vórtex e colocada em banho ultrassônico. Após a sonicação, a amostra foi centrifugada e o de sobrenadante foi transferido para um frasco de amostrador automático de CLAE.	1 - 100	700 – 5000 ng kg ⁻¹	700 - 15000 ng kg ⁻¹	93 – 104	Tamim et. al. (2019) ⁶¹

Sudan I, II, III, IV, sudan vermelho G e vermelho para	Pimentas	CLAE-UV/Vis	TC-C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)	Fase móvel A: acetato de amônio 0,05 mol L ⁻¹ . Fase móvel B: acetonitrila	0 a 12 min: 75 – 100% de FM B; 12 a 20 min: 100% de FM B; 21 a 25 min: 75% de FM B.	As amostras foram previamente homogeneizadas. 5,0 g de amostra foram fortificadas, agitadas e deixadas em repouso por 15 min. Em seguida, as amostras foram misturadas com solução de ácido fórmico: metanol (30:70, v/v). A mistura foi sonicada por 10 min, centrifugada. 25 mL de solução saturada de cloreto de sódio foi adicionado à amostra, que foi extraída duas vezes com 25 mL e 20 mL de clorofórmio, respectivamente. Os extratos foram combinados, evaporados sob fluco de N ₂ , reconstituído com 1,0 mL de metanol e injetado em CLAE-UV/Vis.	100 - 1250	-----	-----	94,1 – 99,2	Long et. al. (2011) ⁶²
Sudan I, II e III	Salmão em pó e especiarias em pó	CLAE-UV/Vis	LUNA C ₁₈ (150 mm x 3,0 mm; 100 Å)	Fase móvel A: acetonitrila. Fase móvel B: metanol	0 a 3 min: 30 – 10 % de FM B; 3 a 4 min: 10 – 30% de FM B; 4 a 6 min: 30% de FM B	As amostras foram previamente homogeneizadas e fortificadas com a solução de trabalho dos Sudans dissolvidos em acetonitrila. A acetonitrila foi evaporada. À amostra, foi adicionada uma solução de hexanoato de sódio. A mistura foi sonicada a uma temperatura controlada e resfriada. Adicionou-se H ₂ SO ₄ 6 mol L ⁻¹ e a fase de ácido hexanóico foi separada. A mistura foi centrifugada e a fase superior recolhida para análise em CLAE-UV/Vis.	0,06 – 450 µmol L ⁻¹	0,02 – 0,15 µmol L ⁻¹	0,06 – 0,30 µmol L ⁻¹	82 - 85	Pochivalov et. al. (2018) ⁶³

Azul Dispersivo 1, 3, 7, 35, 106 e 124. Laranja Dispersivo 1, 3, 11 e 37. Vermelho Dispersivo: 1, 11 e 17. Amarelo Dispersivo 1, 3, 49, Marrom Dispersivo 1, vermelho básico 9, vermelho ácido 26 e vermelho direto 28	Cápsulas de gelatina, oblatum, sucos, legumes	CLAE-EM/EM	Acquity BEH C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm; 1,7 µm)	Fase móvel A: acetonitrila. Fase móvel B: 0,1% de ácido fórmico em acetato de amônio 0,005 mol L ⁻¹ (para IES +). * Fase móvel A: acetonitrila. Fase móvel B: água (para IES -). **	0 a 2 min: 28 - 39% de FM A; 2 a 6 min: 39% de FM A; 6 a 9 min: 39 - 90% de FM A; 9 a 9,5 min: 90 - 28% de FM A; 9,5 a 10 min: 28% de FM A (para IES +). 0 a 2 min: 28 - 39% de FM A; 2 a 4 min: 39% de FM A; 4 a 4,5 min: 39 - 28% de FM A; 4,5 a 5 min: 28% de FM A (para IES -).	1,00 g de amostra e 2,00 g de sulfato de sódio anidro foram misturadas juntamente com 10 mL de solução metanol-amônia-água (1: 2, v/v). A amostra foi agitada, sonicada a 40 °C por 10min. Os sobranadantes foram coletados. O procedimento acima foi repetido duas vezes. Os extratos superiores foram reunidos e evaporados até a secura a 40 ° C. Os resíduos dos extratos foram reconstituídos em 1 mL de metanol e filtrados antes da análise CLAE-EM/EM.	5 - 1000	0,01 - 1,89 µg kg ⁻¹	0,05 - 6,35 µg kg ⁻¹	60,2 - 110,3	Liu et. al. (2019) ⁶⁴
Tartrazina, amarelo crepúsculo e azul brilhante	Refrigerantes de laranja e uva	CLAE-UV/Vis	SUPER COSIL LC-18 (150 mm x 4,6mm; 5 µm)	Fase móvel A: mistura de água e metanol; Fase móvel B: solução de acetato de amônio em metanol e água (as proporções variam de acordo com o analito)	A coluna foi previamente condicionada com a fase móvel tamponada por 12,5 min. A FM B foi imediatamente trocada FM A. Com essa FM, os analitos foram separados por eluição isocrática, com fluxo de 0,5 ou 1,0 mL min ⁻¹ , dependendo do analito.	As amostras foram homogeneizadas e desgaseificadas. Posteriormente, foram passadas através de cartucho de EFS***, que foi previamente condicionado com álcool isopropílico e ácido acético. Os corantes permaneceram na fase sólida e foram extraídos com álcool isopropílico. Os extratos foram evaporados, retomados com água, filtrados e injetados em CLAE.	7500 - 3,6 x 10 ⁶	3 - 24	12 - 24	81 - 101	Andrade et. al. (2014) ²⁵

*IES +: ionização por eletrospray no modo positivo; **IES -: ionização por eletrospray no modo negativo; ***EFS: extração em fase sólida.

2.5.1. Extração Líquido – Líquido com Partição a Baixa Temperatura (ELL-PBT)

A Extração Líquido – Líquido com Partição a Baixa Temperatura (ELL-PBT) é uma variação da Extração Líquido – Líquido Convencional (ELL) e foi desenvolvida por McCulley e Mckinley para a extração de pesticidas em plantas e matrizes animais, na qual os materiais gordurosos eram separados por precipitação em baixa temperatura⁶⁵.

A ELL-PBT consiste na adição de um solvente orgânico à amostra aquosa, formando uma mistura heterogênea. Quando esse sistema é submetido a uma baixa temperatura, há a formação de duas fases, o que leva a uma partição dos analitos entre a fase aquosa e a fase orgânica. A fase aquosa é congelada enquanto o solvente orgânico, com menor temperatura de congelamento, permanece líquido e é facilmente recolhido. A principal vantagem desse método é que os componentes da amostra, inclusive os interferentes, são congelados na fase aquosa, enquanto os analitos são extraídos pela fase orgânica⁶⁶.

Goulart e colaboradores utilizaram a ELL-PBT para analisar os piretróides deltametrina e cipermetrina em amostras de leite. Neste estudo, acetonitrila, usada como solvente extrator, foi adicionada à amostra na proporção 2:1, v/v, formando uma mistura homogênea contendo água e acetonitrila. A mistura contendo o material sólido do leite e solvente orgânico foi resfriada a -20 °C por 12 horas. O material sólido ficou aprisionado na fase aquosa permitindo que a fase orgânica, contendo os analitos de interesse, fosse facilmente recuperada. Esse método de extração e *clean-up* apresentou altos índices de recuperação, superiores a 80%⁵⁹.

Vieira e colaboradores otimizaram a ELL-PBT dos piretenóides λ -cialotrina, cipermetrina, deltametrina e permetrina em água por meio de um planejamento fatorial completo, 2³. Foram avaliadas as seguintes variáveis: proporção entre volume de solvente extrator (acetonitrila) e volume de amostra (1:1 ou 2:1), a adição de NaCl (0,020 e 0,100 mol L⁻¹) e o tempo de agitação (15 e 30 min). As condições otimizadas consistiram em uma proporção 2:1 (v/v) de acetonitrila e amostra, uma vez que contribuiu para o aumento da porcentagem de extração de pelo menos dois analitos estudados. A concentração de NaCl otimizada foi de 0,020 mol L⁻¹, pois os autores verificaram que maiores concentrações diminuía a extração dos compostos. O tempo otimizado foi de 15 minutos de agitação. Avaliou-se também o tempo de congelamento, que ficou estabelecido em 6 horas em freezer,

pois não houve significativas melhoras em tempos maiores. Foram obtidos altos valores de recuperação, superiores a 80%, e valores de limites de detecção entre 1,1 e 3,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e limites de quantificação entre 2,7 e 9,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ ⁶⁷.

2.5.2. Simplificações no preparo de amostra

Visando abranger os Princípios da Química Verde, que possui como objetivo o desenvolvimento e aplicação de produtos e processos químicos que reduzam ou eliminem o uso de substâncias nocivas à saúde e ao meio ambiente⁶⁸, vários trabalhos vem sendo desenvolvidos visando simplificar o procedimento de preparo de amostra.

Lorenzo e colaboradores analisaram os adoçantes artificiais: sacarina, sucralose, neotame, acessulfame de potássio, ciclamato de sódio, aspartame e neoesperidina dihidrochalcona em amostras de refrigerantes, sucos, bebidas em pó, chás, bebidas de soja, bebidas lácteas, cervejas e bebidas alcóolicas. A amostra teve o mínimo preparo, constituído de uma simples diluição e filtração. A diluição foi feita com uma mistura de água: metanol (92:8, v/v), afim de se obter a concentração desejada para quantificação na faixa linear de trabalho. As bebidas carbonatadas foram previamente desgaseificadas em um banho ultrassônico por 5 minutos antes da diluição. Por fim, as soluções diluídas da amostra foram filtradas e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector Ultravioleta-Visível (CLAE-UV/Vis e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrômetro de Massas Sequencial (CLAE-EM/EM). Eles obtiveram recuperações entre 90 e 114,6%, com valores de coeficiente de variação menores que 9,4%. Além disso, foi possível alcançar limites de quantificação abaixo dos valores permitidos pela legislação⁶⁹.

Bonan e colaboradores analisaram os corantes: tartrazina, amarantho, azocarmim B, orange II, azul brilhante, carmim índigo, azul patente V, vermelho allura, amarelo crepúsculo, ponceau 6R, azocarmim G, amarelo quinoleína, vermelho cochonilha A, vermelho 2G, azorubina, amarelo metanil e ponceau 2R em diferentes amostras de carnes, peixes, doces, bolos, geleias, produtos de panificação, molhos de frutas e vegetais e bebidas. Para as amostras de bebidas, uma simples diluição e filtração foram efetuadas. As amostras foram previamente desgaseificadas em banho ultrassônico. Em seguida, elas foram diluídas na proporção 1:1 (v/v) com água deionizada e, posteriormente, centrifugadas e filtradas para análise por CLAE-DAD. As recuperações obtidas estavam entre 62,9 e 101,1%. Os autores alegam que os valores de recuperação podem ter sido baixos devido à possibilidade de os

corantes ficarem retidos no filtro. Entretanto, o método proposto permitiu a detecção simultânea de corantes vermelhos, azuis e amarelos em um único preparo de amostra e corrida cromatográfica⁷⁰.

3. Objetivos

Pretendeu-se neste trabalho desenvolver, otimizar e validar um método analítico para determinação e quantificação de corantes artificiais em polpas de goiaba por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD). Os corantes são: amarelo crepúsculo FCF, eritrosina, tartrazina, vermelho N e laranja G.

3.1. Objetivos específicos

- Otimizar os parâmetros cromatográficos para a identificação e quantificação dos compostos estudados;
- Otimizar a metodologia de extração dos corantes alimentares;
- A partir das condições cromatográficas otimizadas, desenvolver as etapas de validação seguindo o Manual de Garantia da Qualidade do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) e às legislações específicas.
- Utilizar o método validado para análise de amostras comerciais de polpas de goiaba.

4. Materiais e métodos

4.1. Reagentes e materiais

Os padrões e reagentes utilizados neste trabalho foram descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Informações referentes aos padrões utilizados

Padrão/Reagente	Pureza (%)	Marca
Amarelo crepúsculo	NE*	NE*
Eritrosina	NE*	Riedel – De Haën AG
Laranja G	90	Sigma Aldrich
Tartrazina	85	Sigma Aldrich
Vermelho N	NE*	TCI América
Acetonitrila (grau CLAE)	99,9	Merck e J. T. Baker
Ácido clorídrico	38	Isobar
Ácido fórmico	88	Êxodo Científica
Hidróxido de sódio	99	Merck
Surfactante Tween 20	NE*	CRQ Produtos

*NE: não especificado

4.2. Preparo de soluções

As soluções estoque de cada padrão foram preparadas na concentração de 5000 mg L⁻¹ utilizando balões calibrados de 100,00 mL. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente, sendo obtidas através de diluições das soluções estoque. A solução de surfactante Tween 20 foi preparada em 0,15% (v/v) de ácido fórmico em água: acetonitrila (80:20, v/v) na concentração de 2,5 x 10⁻⁵ g mL⁻¹. A solução de Tween 20 utilizada no preparo da amostra (2,5 x 10⁻³⁶ g mL⁻¹) foi obtida através de diluições da solução estoque. Todas as soluções foram obtidas utilizando-se água tipo 1, obtida pelo sistema Milli Q (Milipore Corporation), estocadas em frascos âmbar e armazenadas em geladeira a 10 °C.

4.3. Materiais e equipamentos

Os materiais e equipamentos utilizados neste trabalho foram descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Informações sobre os materiais e equipamentos utilizados

Material	Marca/Descrição
Agitador vórtex	Logen Scientific/Vortex Motion II
Balança analítica	KERN/ALJ 220-4 (Sensibilidade 0,0001g)
Banho Ultrassônico	UNIQUE/UltraCleaner 1450A
Centrífuga	Thermo Scientific/ Heraeus Multifuge X3R
Coluna Cromatográfica	Coluna LUNA C ₁₈ (3,0 x 150 mm) 3 µm (Phenomenex)
Filtros de membrana	Analítica/ PTFE 0,45 µm
Micropipetas	Gilson/Pipetman (Capacidades: 100, 1000 e 5000 µL)
pHmetro	Metrohm/ 781 pH/Ion Meter
Vials	Shimadzu/ Capacidade: 1,5 mL

Para a análise dos corantes alimentares foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu modelo Nexera X2 LC-30AD acoplado com detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A com detecção a 430 nm para a tartrazina, 485 nm para o amarelo crepúsculo FCF e laranja G, 510 nm para o vermelho N e 540 nm para a eritrosina.

Para a separação cromatográfica foi empregada uma coluna LUNA C₁₈ (150 mm x 3,0 mm; 3 µm; Phenomenex, EUA). A fase móvel utilizada consistiu de um gradiente das fases A: 0,15% de ácido fórmico em água: acetonitrila (80:20, v/v) e B: 0,10% de ácido fórmico em acetonitrila. O gradiente utilizado é descrito na Tabela 9. A vazão de fase móvel foi de 0,375 mL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 10 µL. A temperatura da coluna foi fixada em 30 °C.

Tabela 9. Gradiente otimizado das fases móveis utilizadas

Tempo (min)	Fase móvel A^a (%)	Fase móvel B^b (%)
0 a 4	100	0
4 a 6,5	100 – 93	0 – 7
6,5 a 10	93 – 90	7 – 10
10 a 12	90	10
12 a 13	90 – 83	10 – 17
13 a 15	83 – 10	17 – 90
15 a 21	10 – 0	90 – 100
21 a 25	0	100
25 a 26	0 – 20	100 – 80
26 a 27	20 – 100	80 – 0
27 a 30	100	0

^a0,15% de ácido fórmico em água: acetonitrila (80:20, v/v); ^b0,10% de ácido fórmico em água: acetonitrila (80:20, v/v).

4.4. Otimização cromatográfica

Foram empregadas diferentes condições cromatográficas a fim de se obter a melhor condição de análise. Os procedimentos são descritos nos itens a seguir.

4.4.1. Fase Móvel 01 (FM01)

Foi realizada uma eluição gradiente utilizando-se duas fases móveis, sendo a fase móvel A constituída de uma solução de acetato de amônio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e acetonitrila (90: 10, v/v) pH = 6,299 e a fase móvel B constituída por 0,1% de acetato de amônio em acetonitrila. O gradiente de eluição está descrito na Tabela 10. A vazão de fase móvel foi estabelecida em $0,375 \text{ mL min}^{-1}$, o volume de injeção foi de $10 \mu\text{L}$ e a temperatura da coluna foi de $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Pequenas adaptações do gradiente descrito na Tabela 10 foram realizadas e, como foram muitas, não serão mostradas para simplificação.

Tabela 10. Gradiente de fase móvel utilizado no estudo da FM01

Tempo (min)	Fase móvel A ^a (%)	Fase móvel B ^b (%)
0 a 4	100	0
4 a 8	100 – 62	0 – 38
8 a 12	62 – 40	38 - 60
12 a 15	40 – 20	60 - 80
15 a 21	20 – 15	80 - 95
21 a 25	5	95
21 a 26	5 – 100	95 - 0
26 a 30	100	0

^aAcetato de amônio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e acetonitrila (90: 10, v/v) pH = 6,299; ^b0,1% de acetato de amônio em acetonitrila

4.4.2. Fase móvel 02 (FM02)

Foi realizada uma eluição gradiente utilizando-se duas fases móveis, sendo a fase móvel A constituída de 0,10% de ácido fórmico em água e acetonitrila (80: 20, v/v) e a fase móvel B constituída por 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila. A vazão de fase móvel foi estabelecida em $0,375 \text{ mL min}^{-1}$, o volume de injeção foi de $10 \mu\text{L}$ e a temperatura da coluna foi de $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Pequenas adaptações do gradiente, descrito na Tabela 9 do item 4.3, e na porcentagem de ácido fórmico presente na fase móvel A (0,09; 0,10 ou 0,15% de ácido fórmico) foram realizadas e, como foram muitas, não serão mostradas para simplificação. Entre as análises são necessários 30 minutos de condicionamento da coluna através da passagem de 100% da fase móvel A por 25 minutos seguido da passagem de 95% de fase móvel A por 5 minutos.

4.4.3. Condicionamento da coluna

O condicionamento da coluna foi realizado conforme Prado e Godoy²⁴. Preliminarmente à injeção dos analitos, a coluna foi condicionada pela passagem de uma fase móvel composta por 0,1 mol L⁻¹ de acetato de amônio em água: metanol (70: 30, v/v) durante 12,5 minutos com um fluxo de 0,5 mL min⁻¹. Na sequência, os padrões foram injetados utilizando uma fase móvel água: metanol (70: 30, v/v) com um fluxo de 0,375 mL min⁻¹ no modo isocrático. A temperatura da coluna foi fixada em 30 °C e o volume de injeção foi de 10 µL, o tempo total de corrida foi de 10 minutos.

4.4.4. Presença de surfactante em solução

O uso de surfactante foi realizado conforme adaptações do trabalho descrito por Vidotti et. al⁴⁹. Para a execução dos experimentos, foi utilizado o Tween 20, um surfactante não iônico, derivado do polioxietileno. As concentrações de surfactante utilizadas estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11. Concentrações de surfactante utilizadas

Ensaio	Concentração de Tween 20 (g/mL)	Ensaio	Concentração de Tween 20 (g/mL)	Ensaio	Concentração de Tween 20 (g/mL)
01	1 x 10 ⁻²	11	2,5 x 10 ⁻⁶	21	2,5 x 10 ⁻¹⁶
02	2 x 10 ⁻³	12	2,5 x 10 ⁻⁷	22	2,5 x 10 ⁻¹⁷
03	3 x 10 ⁻³	13	2,5 x 10 ⁻⁸	23	2,5 x 10 ⁻¹⁸
04	5 x 10 ⁻³	14	2,5 x 10 ⁻⁹	24	2,5 x 10 ⁻²¹
05	3 x 10 ⁻⁴	15	2,5 x 10 ⁻¹⁰	25	2,5 x 10 ⁻²⁴
06	6 x 10 ⁻⁴	16	2,5 x 10 ⁻¹¹	26	2,5 x 10 ⁻²⁷
07	2 x 10 ⁻⁴	17	2,5 x 10 ⁻¹²	27	2,5 x 10 ⁻³⁰
08	1 x 10 ⁻⁴	18	2,5 x 10 ⁻¹³	28	2,5 x 10 ⁻³³
09	5 x 10 ⁻⁵	19	2,5 x 10 ⁻¹⁴	29	2,5 x 10 ⁻³⁶
10	2,5 x 10 ⁻⁵	20	2,5 x 10 ⁻¹⁵		

4.5. Preparo de amostra

4.5.1. Extração Líquido – Líquido com Partição a Baixa Temperatura (ELL-PBT)

As condições avaliadas na realização do preparo de amostra utilizando Extração Líquido – Líquido com Partição a Baixa Temperatura (ELL-PBT) estão descritas a seguir.

- 5,00 g da amostra (polpa de goiaba) foram pesados em um tubo de polipropileno de 50,00 mL;

- As amostras foram fortificadas em 15; 22,5 e 30 mg L⁻¹ (tartrazina, vermelho N e laranja G); 50; 75 e 100 mg L⁻¹ (amarelo crepúsculo); 100; 150 e 200 mg L⁻¹ (eritrosina) e agitadas em vórtex por 1 minuto;
- 100 µL de NaCl 0,1 mol L⁻¹, com e sem Tween 20 (2,5 x 10⁻³⁶ g mL⁻¹), foram adicionados à amostra, que foi novamente agitada em vórtex por aproximadamente 1 min;
- 5,00 mL de acetonitrila foram adicionados ao sistema que foi novamente agitado em vórtex por aproximadamente 1 min;
- As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, a 15 °C, por 10 min;
- As amostras foram deixadas em congelador a -30 °C durante a noite;
- Os sobrenadantes das amostras foram cuidadosamente separados e colocados em tubos de polipropileno de 50,00 mL, previamente identificados;
- Os extratos foram evaporados a 40 °C sob fluxo de nitrogênio e recuperados com 1,0 mL de solvente contendo surfactante (água: acetonitrila (80: 20, v/v) contendo 2,5 x 10⁻³⁶ g mL⁻¹ de Tween 20);
- Os extratos foram filtrados utilizando-se filtros de membrana PTFE de 0,45 µm;
- Por fim, 10 µL dos extratos foram injetadas no sistema CLAE-DAD.

4.5.2. Preparo de amostra simplificado

Para a realização do preparo de amostra simplificado foram avaliados quatro fatores: tipo de solvente extrator, pH inicial da amostra, pH final do extrato e o efeito do uso de ultrassom. Foram utilizados os seguintes solventes: acetona, metanol e acetonitrila. O pH da amostra foi avaliado em 3,0; 6,0 8,0 e 10,0. O pH final do extrato foi estudado em 3,0 e 5,0. O efeito do uso do ultrassom no processo de extração foi avaliado ao submeter o sistema a banho ultrassônico por 5 minutos. O procedimento de otimização é descrito a seguir.

- 5,00 g da amostra (polpa de goiaba) foram pesados em um tubo de polipropileno de 50,00 mL;
- As amostras foram fortificadas em 15; 22,5 e 30 mg L⁻¹ (tartrazina, vermelho N e laranja G); 50; 75 e 100 mg L⁻¹ (amarelo crepúsculo e eritrosina) e agitadas em vórtex por 1 minuto;
- O pH da amostra foi ajustado para 3,0; 6,0; 8,0 ou 10,0;

- 5,00 mL de solvente extrator (acetonitrila) foram adicionados ao sistema que foi novamente agitado em vórtex por aproximadamente 30 s;
- O sistema foi mantido sob banho de ultrassom por 5 min;
- As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, à 20 °C, por 20 min;
- Os sobrenadantes das amostras foram cuidadosamente separados e tiveram seu valor ajustado para 3,0 ou 5,0;
- Os extratos foram filtrados utilizando-se filtros de membrana PTFE de 0,45 μm ;
- 600 μL de extrato foram transferidos para vials, juntamente com 400 μL de solução 0,15% de ácido fórmico em água: acetonitrila (80:20, v/v) contendo $2,5 \times 10^{-36}$ g mL^{-1} de surfactante Tween 20.
- Por fim, 10 μL da amostra foram injetados em CLAE-UV/Vis.

O preparo de amostra otimizado é descrito na Figura 2.

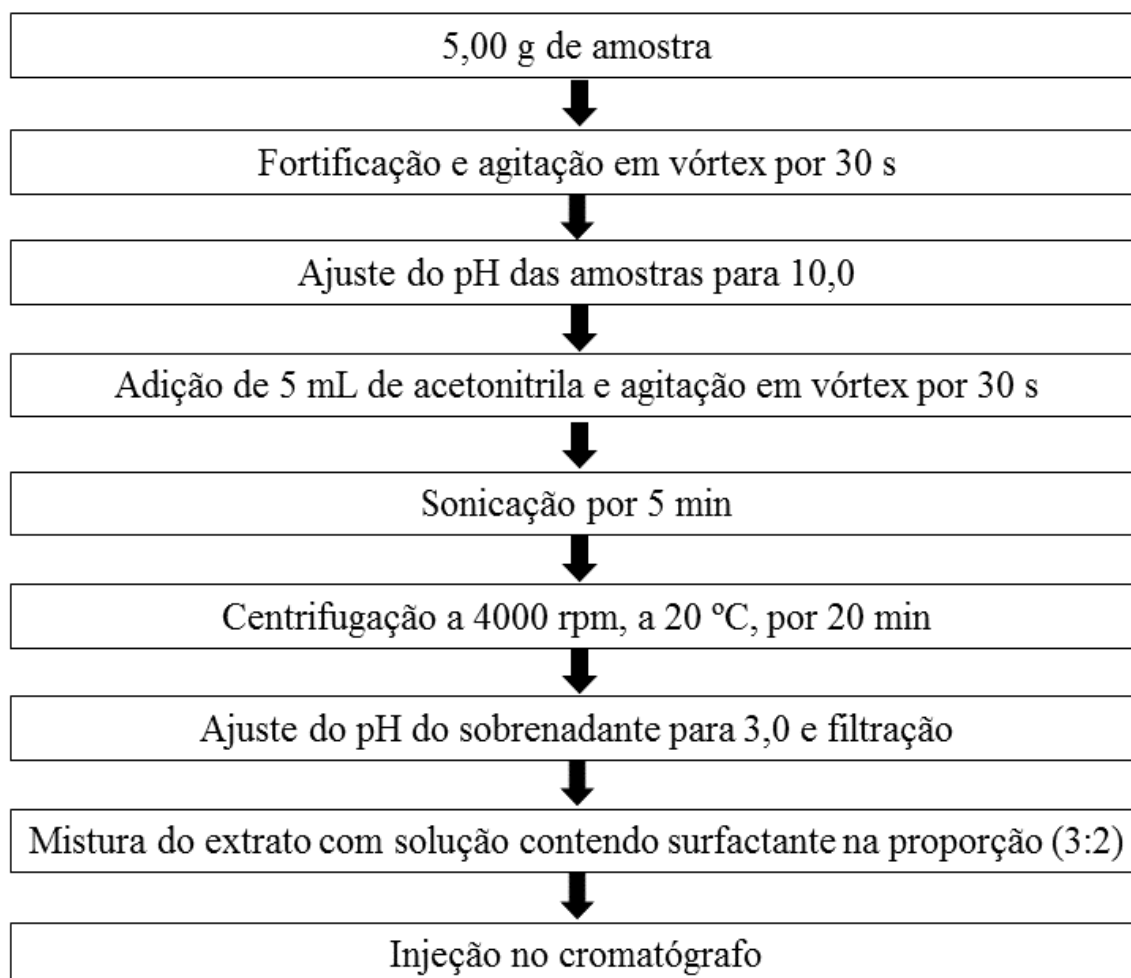


Figura 2. Representação esquemática do procedimento de preparo de amostra

4.7. Protocolo de validação

A validação do método foi efetuada em conformidade com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Resíduos e Contaminantes em Alimentos, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)⁷¹ e com a SANTE/11813/2017⁷². Os detalhes da validação são descritos nos próximos itens.

4.7.1. Linearidade

As curvas analíticas foram construídas em matriz, conforme procedimento descrito no item 4.5.2. A curva analítica foi construída de forma que o Limite Máximo de Resíduo (LMR) se encontrasse no centro da curva. A linearidade foi investigada nos pontos: 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 vezes o LMR, sendo que cada ponto foi preparado independentemente três vezes. As curvas foram construídas utilizando a área do pico do analito em função da concentração (mg kg^{-1}). A linearidade foi avaliada a partir do valor de R^2 e do teste de linearidade descrito no Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA, onde o valor de $t_{\text{calculado}}$ deve ser maior que $t_{\text{crítico}}$ (tabelado, para nível de confiança de 95%).

$$t_{rw} = |r_w| \sqrt{\frac{N_x - 2}{1 - r_w^2}} \quad (\text{Eq. 01})$$

Se o valor de t_{rw} para a regressão da curva de calibração for maior ou igual ao valor de t crítico (tabelado) bilateral, para nível de confiança igual a 95% e $(N_x - 2)$ graus de liberdade, considera-se que a faixa é linear, isto é, rejeita-se a hipótese nula $H_0: r_w = 0$ de que não há correlação entre x e y .

4.7.2. Veracidade, repetitividade e precisão intermediária

Para a avaliação da veracidade, repetitividade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdias) foi feito um estudo de recuperação com as amostras fortificadas em três níveis diferentes de concentração: 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LMR. Desse modo, as amostras brancas foram fortificadas nos níveis desejados, em replicatas ($n=6$), e submetidas ao processo de extração descrito anteriormente no item 4.5.2. A repetitividade foi estimada analisando-se os coeficientes de variação de repetitividade (%) das amostras obtidas em um mesmo dia, em cada nível de concentração. A precisão intermediária foi estimada

analisando-se os coeficientes de variação de reprodutibilidade (%) das amostras obtidas em três dias diferentes, em cada nível de concentração.

Os resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária foram comparados com valores descritos como aceitáveis pela SANTE/11813/2017⁷². De acordo com esta normativa, os valores de recuperação devem estar compreendidos entre 70 – 120% e os valores de coeficiente de variação de repetitividade (CV_{repe}) e reprodutibilidade (CV_{repro}) devem ser $\leq 20\%$. Entretanto, o Manual de Garantia da Qualidade do MAPA adota como limites, os valores calculados a partir da equação de Horwitz (Equação 2) para cada nível de fortificação, sendo que o CV_{repe} não deve ultrapassar dois terços do CV_{repro} . Dessa forma, neste trabalho foi empregado como critério de aceitabilidade os seguintes valores: $CV_{repe} \leq 14\%$ e $CV_{repro} \leq 20\%$.

$$RSD_{Horwitz} = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (\text{Eq. 02})$$

Em que: $RSD_{Horwitz}$ é o Desvio-Padrão de Horwitz e C é a concentração em $\mu\text{g kg}^{-1} \times 10^{-9}$.

4.7.3. Limite de detecção (LD), de quantificação (LQ), de decisão (CC_{α}) e capacidade de detecção (CC_{β})

Assumiu-se o primeiro ponto da curva como LQ e LD sendo metade do valor de LQ. Para o cálculo dos valores de CC_{α} e CC_{β} , utilizou-se as Equações 3 e 4⁷¹ e os limites máximos permitidos pela ANVISA (100 mg kg^{-1}). Como o laranja G não possui limite máximo permitido utilizou-se a interpolação da curva no eixo y, considerando a concentração igual a zero. Os valores de CC_{α} e CC_{β} estão diretamente ligados com a capacidade do método concluir que uma amostra é ou não conforme, por isso é de extrema importância que sejam reportados.

$$CC_{\alpha} = LMR + 1,64 \times SD_{repro} \quad (\text{Eq. 03})$$

$$CC_{\beta} = CC_{\alpha} + 1,64 \times SD_{repro} \quad (\text{Eq. 04})$$

Em que: LMR é o Limite Máximo de Resíduo e SD_{repro} é o Desvio-Padrão de Reprodutibilidade.

Os valores de CC_{β} não deve ultrapassar mais de duas vezes o valor em fração do CV_{repro} estabelecido neste trabalho, ou seja, 20%. Portanto, o valor de CC_{β} não deve ser maior que 140 mg kg^{-1} .

$$CC_{\beta} \leq \left(1 + 2 \times \frac{CV_{repro}}{100}\right) \times LMR \quad (\text{Eq. 05})$$

Em que: LMR é o Limite Máximo de Resíduo e CV_{repro} é o Coeficiente de Variação de Reprodutibilidade estabelecido neste trabalho.

4.7.4. Incerteza da Medição Analítica

Para o cálculo da incerteza de medição analítica, foi utilizada a metodologia *Top-Down* como descrita no Manual de Garantia Da Qualidade Analítica do MAPA⁷¹, segundo o Guia para a Expressão da Incerteza da Medição⁷³. Nesta metodologia, procura-se fazer uma combinação das principais fontes de incerteza do procedimento de medição. Para estimar a incerteza foi utilizada a Equação 6.

$$C_{ANALITO}(\text{mg/kg}) = \frac{(ACPA-a)}{b} + C_{PII} \quad (\text{Eq. 06})$$

Em que $ACPA$ é a área cromatográfica do pico da amostra, a é o intercepto da curva analítica, b é a inclinação da curva analítica; C_{PII} é a correção devido aos desvios dos níveis analisados considerando os três dias de validação.

Foi utilizado um nível de confiança de 95% e um fator de abrangência (k) de 1,96.

O critério de aceitabilidade para a incerteza é dado pela Equação 7⁷¹. Considerando o CV_{repro} adotado neste trabalho como 20%, o valor da incerteza relativa combinada não deve ultrapassar 27%.

$$\frac{u_c(c_{anal})}{c_{anal}} \leq \left(1 + \frac{1}{3}\right) \times CV_{repro} \quad (\text{Eq. 07})$$

Em que u_c é a incerteza combinada, c_{anal} é a concentração do analito na amostra e CV_{repro} é o Coeficiente de Variação de Reprodutibilidade estabelecido neste trabalho.

4.8. Estudo de ocorrência

Para o estudo de ocorrência, foram utilizadas oito amostras de polpa de goiaba adquiridas em supermercados de diferentes regiões de Minas Gerais. Após inspeção visual, as amostras foram removidas das embalagens originais, armazenadas em frascos de plástico inertes e acondicionadas em câmara fria a -10 °C até o momento da análise.

5. Resultados e Discussão

5.1. Otimização cromatográfica

5.1.1. Fase móvel 01 (FM01)

Primeiramente, foram realizados testes para otimização da parte cromatográfica, de forma que houvesse separação adequada dos corantes. Para isso, os analitos foram injetados individualmente para que fosse possível determinar o tempo de retenção de cada um deles. Os experimentos foram realizados conforme descrito no item 4.4.1 e o resultado pode ser observado na Figura 3, no qual são mostradas as sobreposições dos cromatogramas obtidos para todos os corantes, injetados individualmente. Como se pode observar, os tempos de retenção foram diferentes para todos os analitos, isto é, 1,8; 5,9; 8,2; 8,7 e 9,7 minutos para tartrazina, amarelo crepúsculo, laranja G, vermelho N e eritrosina, respectivamente.

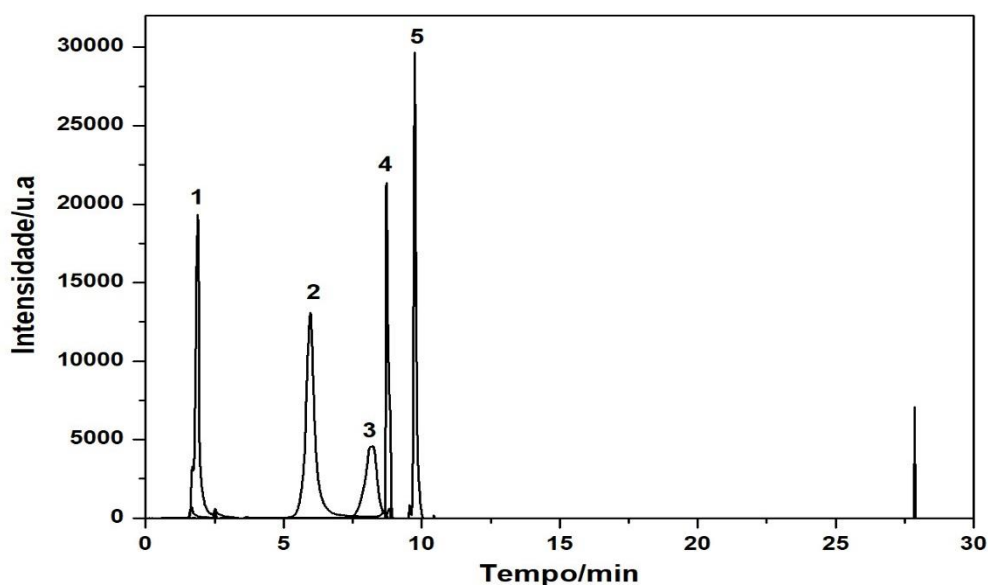


Figura 3. Sobreposições dos cromatogramas obtidos para injeções individuais dos corantes (250 mg L^{-1} para o amarelo crepúsculo e $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ para tartrazina, vermelho N, laranja G e eritrosina). Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \text{ }\mu\text{L}$; coluna cromatográfica LUNA C_{18} ($3,0 \times 150 \text{ mm}$) $3 \text{ }\mu\text{m}$ (Phenomenex); fase móvel: (A) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de amônio e acetonitrila (90: 10, v/v) $\text{pH} = 6,299$ e (B) $0,1\%$ de acetato de amônio em acetonitrila; programa de gradiente: 0 a 4 min: 0% de FM B; 4 a 8min: 0 – 38% de FM B; 8 a 12 min: 38 – 60% de FM B; 12 a 15 min: 60 – 80% de FM B; 15 a 21 min: 80 – 95% de FM B; 21 a 25 min: 95% de FM B; 21 a 26 min: 95 – 0% de FM B; 26 a 30 min: 0% de FM B; temperatura da coluna: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; vazão: $0,375 \text{ mL min}^{-1}$. Os analitos são identificados por números, cuja identificação é descrita como: 1 – tartrazina (430 nm); 2 – amarelo crepúsculo (485 nm); 3 – laranja G (485 nm); 4 – vermelho N (510 nm); 5 – eritrosina (540 nm).

O tampão acetato é bastante utilizado na separação de corantes alimentares, sendo conhecido como um modificador para a separação de corantes azo²³. Ele é usado como agente de emparelhamento de íons em uma coluna C_{18} ⁷⁴. Iammarino e colaboradores usaram esse tampão em $\text{pH} 7,0$ para a determinação de 12 corantes, entre eles vermelho N e eritrosina em

produtos cárneos⁵³. Karanikolopoulos et. al. utilizaram acetato de amônio em pH 7,5 na análise dos corantes azorrubina, amarelo crepúsculo, amaranço, ponceau 4R, eritrosina, vermelho N e vermelho 2G em peixes⁷⁵. Martin e colaboradores utilizaram tampão acetato de amônio para determinação de 18 corantes, como a tartrazina, amarelo crepúsculo, eritrosina e vermelho N em produtos de confeitaria¹⁸.

Entretanto, ao reproduzir as condições cromatográficas do item 4.4.1 em uma injeção do pool, isto é, uma solução contendo os cinco analitos, a separação dos compostos não foi observada, havendo uma co-eluição de todos os compostos em aproximadamente 2 minutos, como pode ser observado na Figura 4.

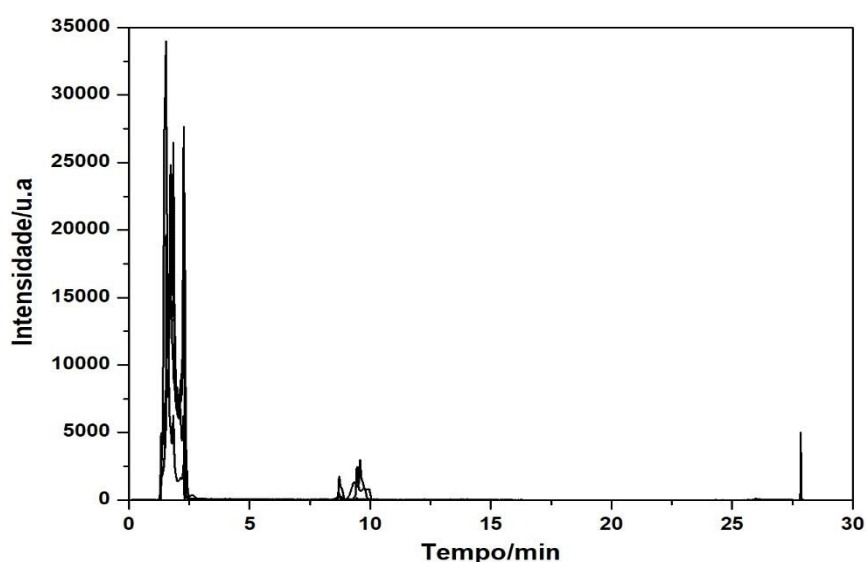


Figura 4. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na injeção do pool (250 mg L^{-1} para o amarelo crepúsculo e $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ para tartrazina, laranja G, vermelho N e eritrosina) em 400 e 500 nm. Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \mu\text{L}$; coluna cromatográfica LUNA C_{18} ($3,0 \times 150 \text{ mm}$) $3 \mu\text{m}$ (Phenomenex); fase móvel: (A) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de amônio e acetonitrila (90: 10, v/v) pH = 6,299 e (B) 0,1% de acetato de amônio em acetonitrila; programa de gradiente: 0 a 4 min: 0% de FM B; 4 a 8 min: 0 – 38% de FM B; 8 a 12 min: 38 – 60% de FM B; 12 a 15 min: 60 – 80% de FM B; 15 a 21 min: 80 – 95% de FM B; 21 a 25 min: 95% de FM B; 21 a 26 min: 95 – 0% de FM B; 26 a 30 min: 0% de FM B; temperatura da coluna: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; vazão: $0,375 \text{ mL min}^{-1}$.

Diante do cromatograma apresentado acima, sugere-se que haja uma interação entre os analitos em solução, que acarreta na co-eluição. Dessa forma, foi proposto um estudo de condicionamento da coluna utilizando uma fase móvel tamponada. No trabalho desenvolvido por Prado e Godoy²⁴, a utilização de uma fase móvel contendo acetato de amônio melhorou a resolução entre os analitos, afetando a afinidade dos compostos pela fase móvel de duas maneiras, suprimindo a ionização dos corantes e reduzindo a solubilidade deles na fase móvel.

5.1.2. Estudo de condicionamento da coluna

Diante da proposta de se realizar um condicionamento da coluna antes das injeções, foi realizado um experimento conforme descrito no item 4.4.3. O cromatograma obtido pode ser observado na Figura 5.

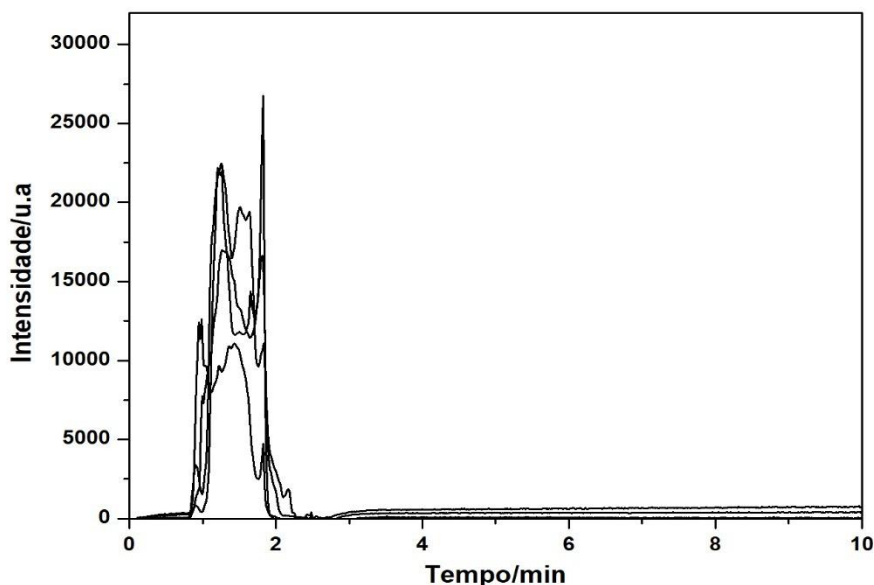


Figura 5. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na injeção do pool (250 mg L^{-1} para o amarelo crepúsculo e $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ para tartrazina, vermelho N, laranja G e eritrosina) em 400 e 500 nm. Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \text{ }\mu\text{L}$; coluna cromatográfica LUNA C_{18} ($3,0 \times 150 \text{ mm}$) $3 \text{ }\mu\text{m}$ (Phenomenex); condicionamento da coluna: passagem de fase móvel composta por $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de amônio em água: metanol (70: 30, v/v) durante 12,5 minutos com um fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$; eluição isocrática; fase móvel água: metanol (70: 30, v/v); temperatura da coluna: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; vazão: $0,375 \text{ mL min}^{-1}$.

Como se pode observar na Figura 5, o condicionamento não foi eficiente na separação dos analitos considerados nessa dissertação. Andrade e colaboradores utilizaram uma solução de acetato de amônio e metanol no condicionamento da coluna para separar os corantes tartrazina, amarelo crepúsculo, amaranço e azul brilhante em amostras de refrigerantes²⁵. Segundo os autores, a adição de uma substância iônica, como o acetato de amônio, aumenta significativamente o tempo de retenção dos compostos pois, pares iônicos são criados na fase móvel e a retenção é controlada pela interação dos compostos com a fase estacionária. Entretanto, mesmo utilizando condições semelhantes às apresentadas no artigo, o resultado obtido não foi satisfatório.

Diante disso, avaliou-se a fase móvel utilizando ácido fórmico. Em seu trabalho sobre determinação de conservantes alimentares em carnes e peixes, Molognoni¹⁴ afirma que o uso de ácido fórmico como aditivo na fase móvel melhorou a separação de todos os analitos, dispensando o uso de tampões.

5.1.3. Fase móvel 02 (FM02)

Diante dos resultados obtidos anteriormente, foi proposto uma mudança nas condições cromatográficas segundo descrito no item 4.4.2, alterando a composição da fase móvel e também o gradiente de eluição. O cromatograma obtido é apresentado na Figura 6.

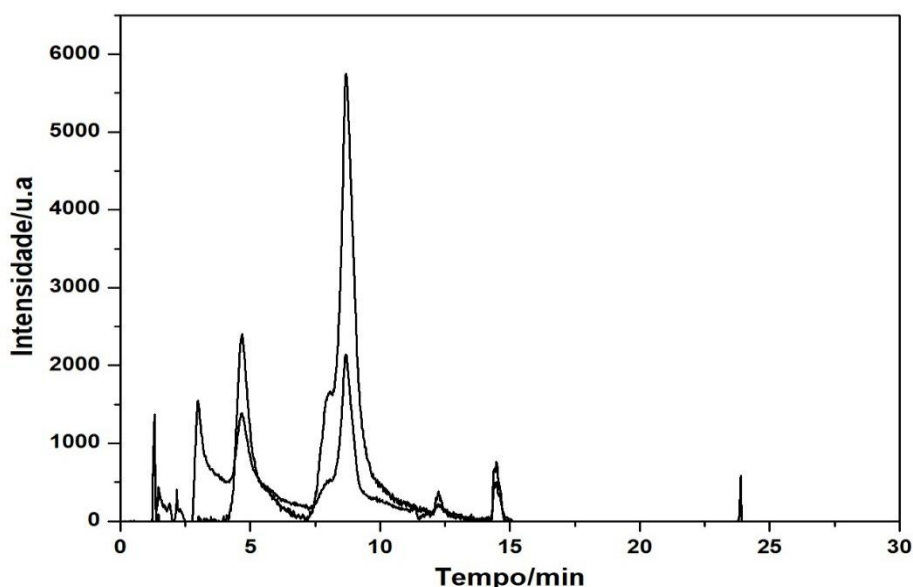


Figura 6. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na injeção do pool dos analitos (60 mg L^{-1} para o amarelo crepúsculo e $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ para tartrazina, vermelho N, laranja G e eritrosina) em 400 e 500 nm. Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \mu\text{L}$; coluna cromatográfica Coluna LUNA C_{18} ($3,0 \times 150 \text{ mm}$) $3 \mu\text{m}$ (Phenomenex); fase móvel: (A) 0,10% de ácido fórmico em água e acetonitrila (80: 20, v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila; programa de gradiente: 0 a 4 min: 0% de FM B; 4 a 8 min: 0 – 38% de FM B; 8 a 12 min: 38 – 55% de FM B; 12 a 15 min: 55 – 75% de FM B; 15 a 21 min: 75 – 85% de FM B; 21 a 22 min: 85 – 95% de FM B; 22 a 25 min: 95% de FM B; 25 a 26 min: 95 – 0% de FM B; 26 a 30 min: 0% de FM B; temperatura da coluna: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; vazão: $0,375 \text{ mL min}^{-1}$.

Como se pode perceber, a modificação apresentou melhor resultado do que os obtidos anteriormente, entretanto, ainda não foi possível identificar os picos referentes a cada analito. Além disso, ao reinjetar o pool na mesma condição, ocorria nova co-eluição dos analitos em 2 minutos de corrida, indicando que não havia reprodutibilidade entre as análises. De acordo com os três resultados anteriores, há uma evidência muito grande de interação entre os analitos. Dessa forma, foi utilizado um surfactante com o objetivo de estabilizar as moléculas dos corantes em solução.

5.1.4. Presença de surfactante em solução

Para estabilização dos corantes em solução aquosa foi utilizado o Tween 20, cuja estrutura é apresentada na Figura 7. As condições utilizadas são descritas no item 4.4.4.

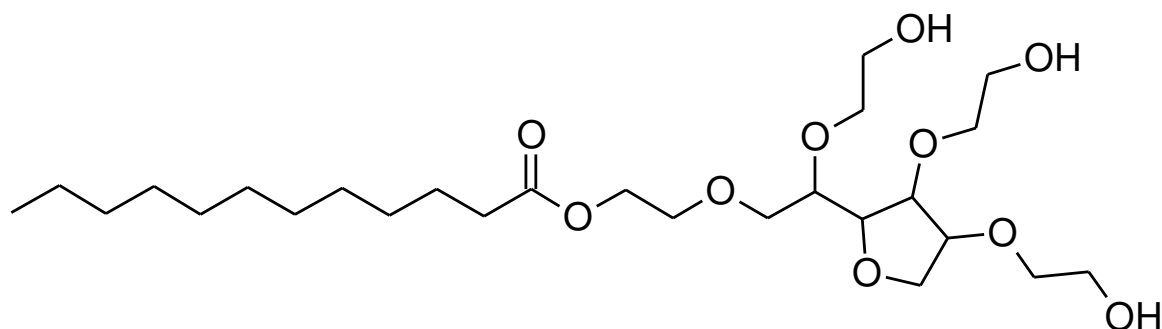


Figura 7. Fórmula estrutural do Tween 20

Três concentrações de surfactante diferentes estão apresentadas nos cromatogramas descritos nas Figuras 8, cujo comprimento de onda monitorado foi de 400 nm, e Figura 9, cujo comprimento de onda monitorado foi de 500 nm. Como é possível perceber, a presença do surfactante em solução foi fundamental para a separação dos analitos, além de garantir a repetitividade entre as injeções consecutivas. A presença do surfactante em solução altera as características do solvente, induzindo a formação de micelas, estabilizando as cargas das moléculas dos corantes⁴⁹. É possível observar que a concentração de $2,5 \times 10^{-12} \text{ g mL}^{-1}$ de surfactante, indicada por uma seta nas Figuras 8 e 9, apresentou melhor resolução cromatográfica, favorecendo a análise quantitativa.

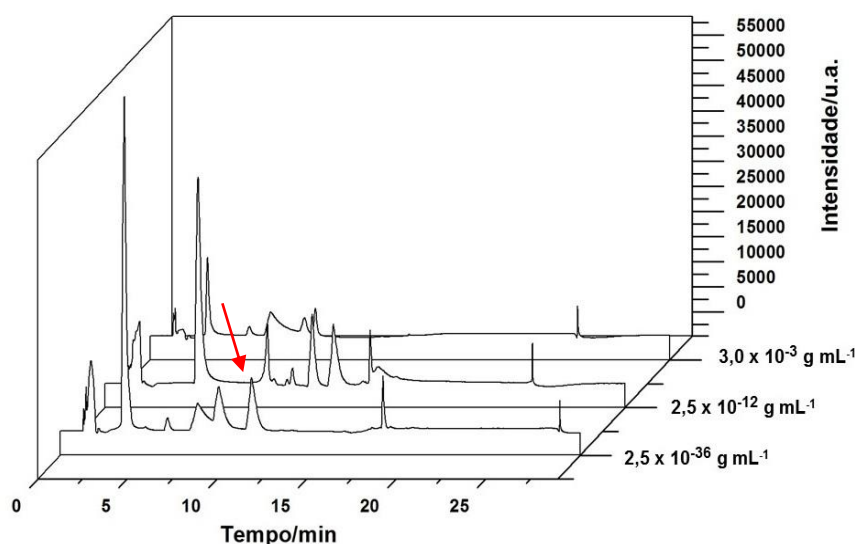


Figura 8. Cromatogramas obtidos nas injeções dos pools dos analitos com surfactante nas concentrações de a) $3,0 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; b) $2,5 \times 10^{-12} \text{ g mL}^{-1}$ e c) $2,5 \times 10^{-36} \text{ g mL}^{-1}$ (15 mg L^{-1} para tartrazina, vermelho N e laranja G; 50 mg L^{-1} para amarelo crepúsculo; 100 mg L^{-1} para eritrosina). Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \mu\text{L}$; coluna cromatográfica Coluna LUNA C₁₈ ($3,0 \times 150 \text{ mm}$) $3 \mu\text{m}$ (Phenomenex); fase móvel: (A) 0,10% de

ácido fórmico em água e acetonitrila (80: 20, v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila; temperatura da coluna: 30 °C; vazão: 0,375 mL min⁻¹; comprimento de onda apresentado: 400 nm.

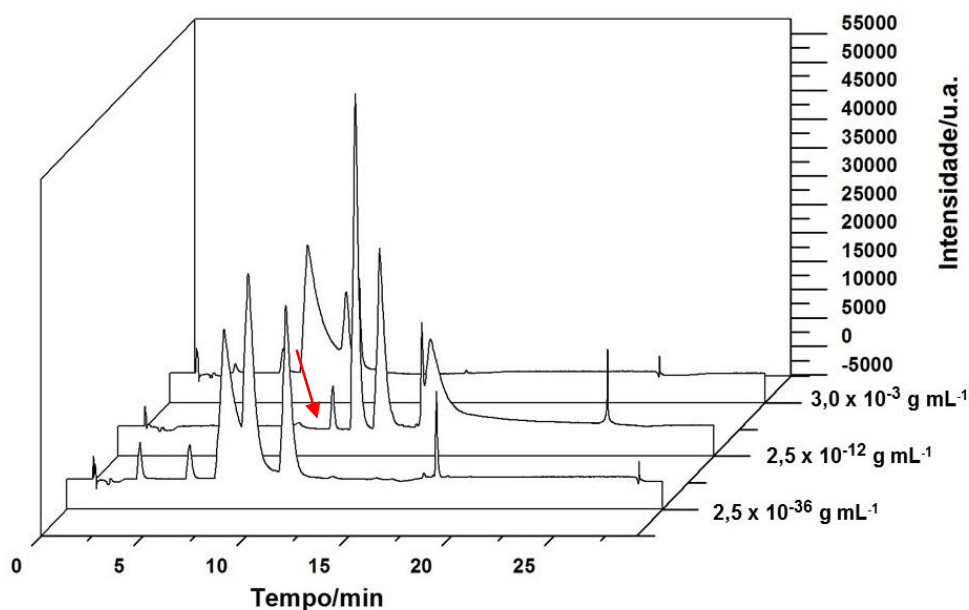


Figura 9. Cromatogramas obtidos nas injeções dos pools dos analitos com surfactante nas concentrações de a) $3,0 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; b) $2,5 \times 10^{-12} \text{ g mL}^{-1}$ e c) $2,5 \times 10^{-36} \text{ g mL}^{-1}$ (15 mg L^{-1} para tartrazina, vermelho N e laranja G; 50 mg L^{-1} para amarelo crepúsculo; 100 mg L^{-1} para eritrosina). Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \mu\text{L}$; coluna cromatográfica Coluna LUNA C₁₈ ($3,0 \times 150 \text{ mm}$) $3 \mu\text{m}$ (Phenomenex); fase móvel: (A) 0,10% de ácido fórmico em água e acetonitrila (80: 20, v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila; temperatura da coluna: 30 °C; vazão: $0,375 \text{ mL min}^{-1}$; comprimento de onda apresentado: 500 nm.

Entretanto, ao reinjetar o pool dos analitos com a concentração de $2,5 \times 10^{-12} \text{ g mL}^{-1}$ de surfactante, foi observado um deslocamento da linha de base, indicando que a presença do surfactante estaria sobrecarregando a coluna. Sendo assim, a concentração de $2,5 \times 10^{-36} \text{ g mL}^{-1}$ foi escolhida para prosseguimento das análises, necessitando ainda de melhora na separação e resolução dos picos.

Dessa forma, três concentrações de ácido fórmico na fase móvel aquosa foram testadas visando alcançar o objetivo desejado. Os cromatogramas obtidos para as três concentrações estão apresentados nas Figuras 10 e 11. Como é possível perceber pela indicação das setas, existe a presença de um ombro no tempo de retenção igual a 8,3 minutos, indicando sobreposição de picos, o que não ocorre quando se aumenta a concentração de ácido fórmico para 0,15%.

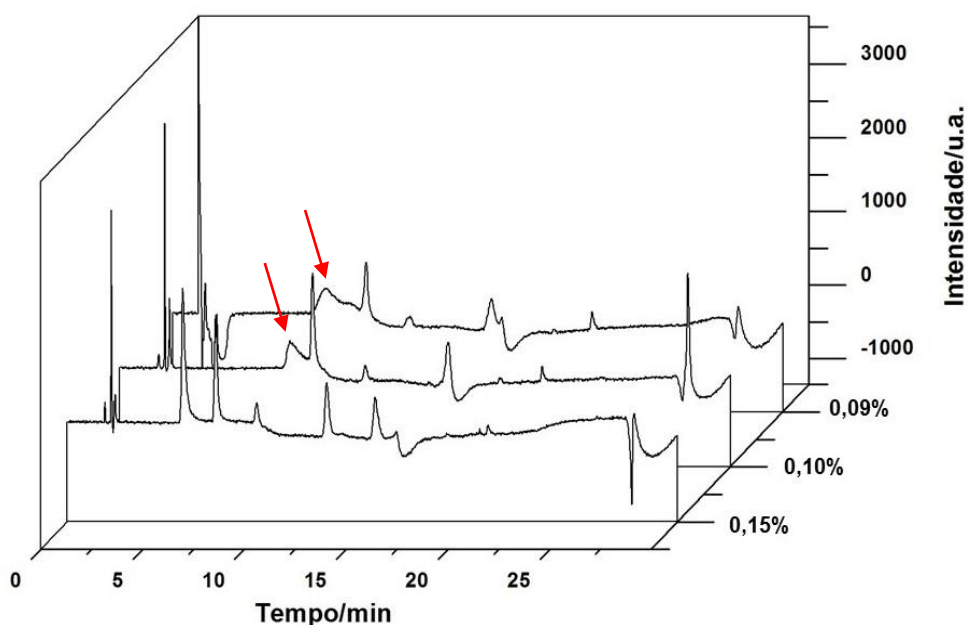


Figura 10. Cromatogramas obtidos nas injeções dos pools dos analitos com diferentes concentrações de ácido fórmico na fase móvel aquosa. a) 0,09%, v/v; b) 0,10%, v/v e c) 0,15% v/v; (15 mg L^{-1} para tartrazina, vermelho N e laranja G; 50 mg L^{-1} para amarelo crepúsculo; 100 mg L^{-1} para eritrosina). Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \mu\text{L}$; coluna cromatográfica Coluna LUNA C_{18} ($3,0 \times 150 \text{ mm}$) $3 \mu\text{m}$ (Phenomenex); fase móvel: (A) 0,10% de ácido fórmico em água e acetonitrila (80: 20, v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila; temperatura da coluna: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; vazão: $0,375 \text{ mL min}^{-1}$; comprimento de onda apresentado: 400 nm .

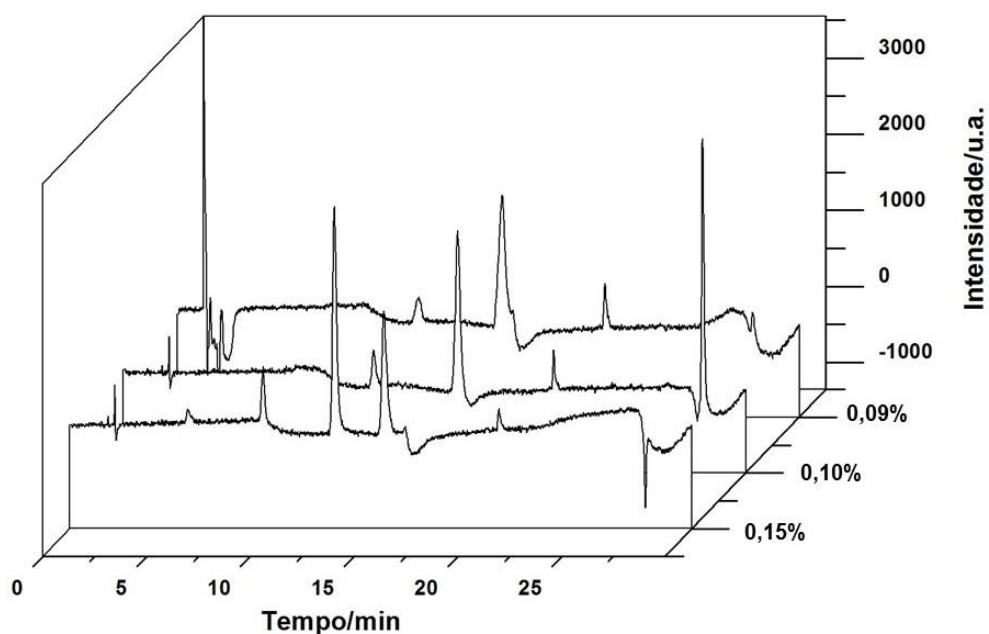


Figura 11. Cromatogramas obtidos nas injeções dos pools dos analitos com diferentes concentrações de ácido fórmico na fase móvel aquosa. a) 0,09%, v/v; b) 0,10%, v/v e c) 0,15% v/v; (15 mg L^{-1} para tartrazina, vermelho N e laranja G; 50 mg L^{-1} para amarelo crepúsculo; 100 mg L^{-1} para eritrosina). Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \mu\text{L}$; coluna cromatográfica Coluna LUNA C_{18} ($3,0 \times 150 \text{ mm}$) $3 \mu\text{m}$ (Phenomenex); fase móvel: (A) 0,10% de ácido fórmico em água e acetonitrila (80: 20, v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila; temperatura da coluna: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; vazão: $0,375 \text{ mL min}^{-1}$; comprimento de onda apresentado: 500 nm .

O cromatograma com a melhor separação obtida utilizando fase móvel aquosa contendo 0,15% de ácido fórmico é apresentado na Figura 12. É possível comprovar que uma maior concentração de ácido fórmico em fase móvel permite uma melhor resolução dos picos e, por isso, foi escolhida para o prosseguimento das análises.

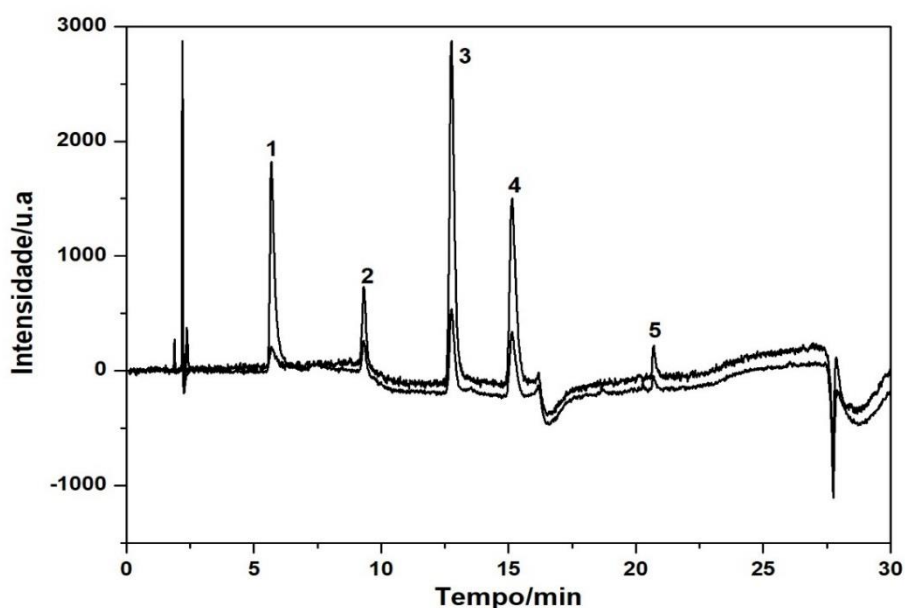


Figura 12. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na injeção do pool dos analitos com surfactante na concentração de $2,5 \times 10^{-36} \text{ g mL}^{-1}$ (15 mg L^{-1} para tartrazina, vermelho N e laranja G; 50 mg L^{-1} para amarelo crepúsculo; 100 mg L^{-1} para eritrosina) em 400 e 500 nm. Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \mu\text{L}$; coluna cromatográfica Coluna LUNA C_{18} ($3,0 \times 150 \text{ mm}$) $3 \mu\text{m}$ (Phenomenex); fase móvel: (A) 0,15% de ácido fórmico em água e acetonitrila (80: 20, v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila; programa de gradiente: 0 a 4 min: 0% de FM B; 4 a 7 min: 0 – 10% de FM B; 7 a 10 min: 10% de FM B; 10 a 13 min: 10 – 17% de FM B; 13 a 15 min: 17 – 90% de FM B; 15 a 21 min: 90 – 95% de FM B; 21 a 25 min: 95% de FM B; 25 a 26 min: 95 – 0% de FM B; 26 a 30 min: 0% de FM B; temperatura da coluna: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; vazão: $0,375 \text{ mL min}^{-1}$. Os analitos são identificados por números, cuja identificação é descrita como: 1 – tartrazina; 2 – amarelo crepúsculo; 3 – laranja G; 4 – vermelho N; 5 – eritrosina.

É importante ressaltar que é necessário um tempo de condicionamento de 30 minutos entre as injeções, como descrito no item 4.4.2. Um procedimento semelhante foi descrito por Prado e Godoy na determinação dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo, ponceau 4R, indigotina e amaranto em amostras de pó de gelatina. Diante dos resultados obtidos, o próximo passo foi otimizar o procedimento de preparo da amostra.

5.2. Otimização do preparo de amostra

Matrizes complexas, como os alimentos, possuem diversos componentes que podem causar interferência na análise, tornando-a mais complexa. Sendo assim, o procedimento de

preparo das amostras torna-se necessário, de forma com que essas matrizes estejam adequadas para análise em CLAE-UV/Vis. Neste estudo será avaliado o melhor procedimento de extração para análise dos corantes em polpa de goiaba.

5.2.1. Extração Líquido – Líquido com Partição a Baixa Temperatura (ELL-PBT)

Nas Figuras 13 e 14 são mostrados os cromatogramas obtidos de uma amostra analisada segundo procedimento descrito no item 4.5.1, sem a presença de surfactante na etapa de adição da solução de NaCl. A Tabela 12 abaixo apresenta os valores de coeficientes de variação e recuperação obtidos para esse procedimento. Como é possível observar, mesmo com a adição de NaCl os analitos não foram extraídos de forma eficiente.

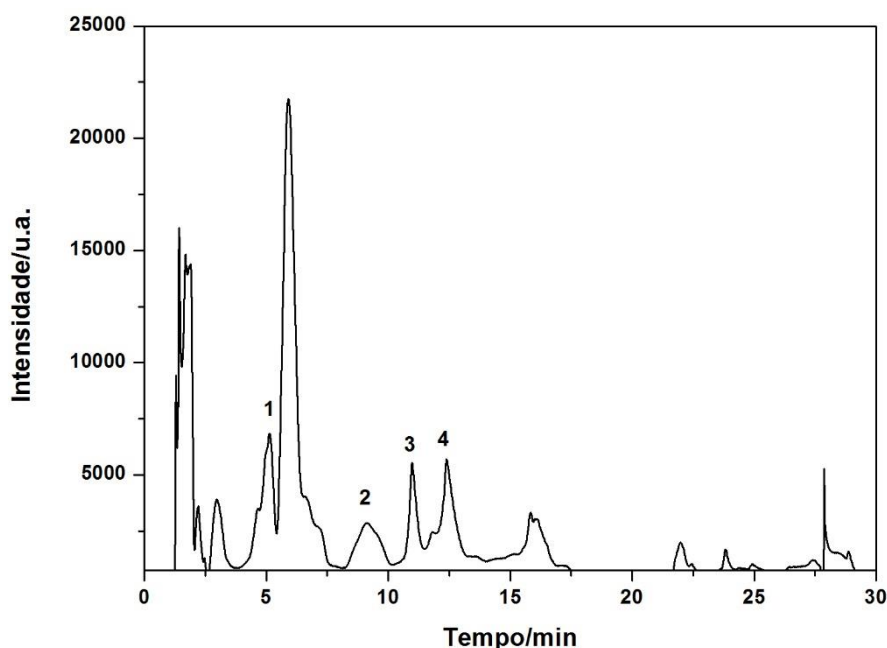


Figura 13. Cromatograma obtido na injeção do extrato da amostra a partir do processo de extração ELL-PBT sem a presença de surfactante (15 mg L^{-1} para tartrazina, vermelho N e laranja G; 50 mg L^{-1} para amarelo crepúsculo; 100 mg L^{-1} para eritrosina). Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \mu\text{L}$; coluna cromatográfica Coluna LUNA C_{18} ($3,0 \times 150 \text{ mm}$) $3 \mu\text{m}$ (Phenomenex); fase móvel: (A) 0,10% de ácido fórmico em água e acetonitrila (80: 20, v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila; temperatura da coluna: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; vazão: $0,375 \text{ mL min}^{-1}$. Os analitos são identificados por números, cuja identificação é descrita como: 1 – tartrazina; 2 – amarelo crepúsculo; 3 – laranja e 4 – vermelho N; comprimento de onda apresentado: 400 nm .

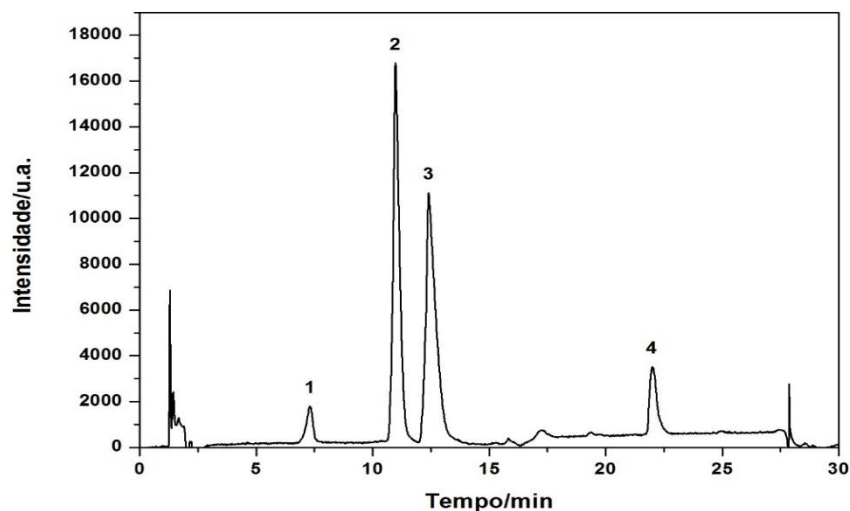


Figura 14. Cromatograma obtido na injeção do extrato da amostra a partir do processo de extração ELL-PBT sem a presença de surfactante (15 mg L⁻¹ para tartrazina, vermelho N e laranja G; 50 mg L⁻¹ para amarelo crepúsculo; 100 mg L⁻¹ para eritrosina). Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL; coluna cromatográfica Coluna LUNA C₁₈ (3,0 x 150 mm) 3 µm (Phenomenex); fase móvel: (A) 0,10% de ácido fórmico em água e acetonitrila (80: 20, v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila; temperatura da coluna: 30 °C; vazão: 0,375 mL min⁻¹. Os analitos são identificados por números, cuja identificação é descrita como: 1 – amarelo crepúsculo; 2 – laranja; 3 – vermelho N e 4 – eritrosina; comprimento de onda apresentado: 500 nm.

Tabela 12. Coeficientes de variação e recuperações obtidas na ELL-PBT com adição de NaCl

Analito	Recuperação (%) para o nível 1 de fortificação*	CV (%)
Amarelo crepúsculo	32	23
Eritrosina	ND*	19
Laranja G	63	11
Tartrazina	3	18
Vermelho N	46	24

*15 mg L⁻¹ para tartrazina, vermelho N e laranja G; 50 mg L⁻¹ para amarelo crepúsculo; 100 mg L⁻¹ para eritrosina.

Faraji et. al. observaram um efeito positivo da adição de sal no procedimento de preparo de amostra para a extração dos corantes amarantho, ponceau 4R, vermelho N, azorrubina e eritrosina em amostras de bebidas, geleias e chocolates⁵⁴. Era esperado que a adição de NaCl favorecesse a extração dos analitos devido ao efeito *salting-out*⁶⁷, entretanto não foi o observado.

Dessa forma, um novo procedimento foi feito com adição de surfactante juntamente com NaCl. Segundo Pochivalov e colaboradores, o uso do surfactante na extração favorece a formação de micelas, resultando em uma extração eficiente dos analitos⁶³. Foi realizada uma ELL-PBT com adição de NaCl e Tween 20. O cromatograma obtido de uma amostra

analisada pode ser observado na Figura 15. Os valores de coeficiente de variação e recuperação podem ser observados na Tabela 13.

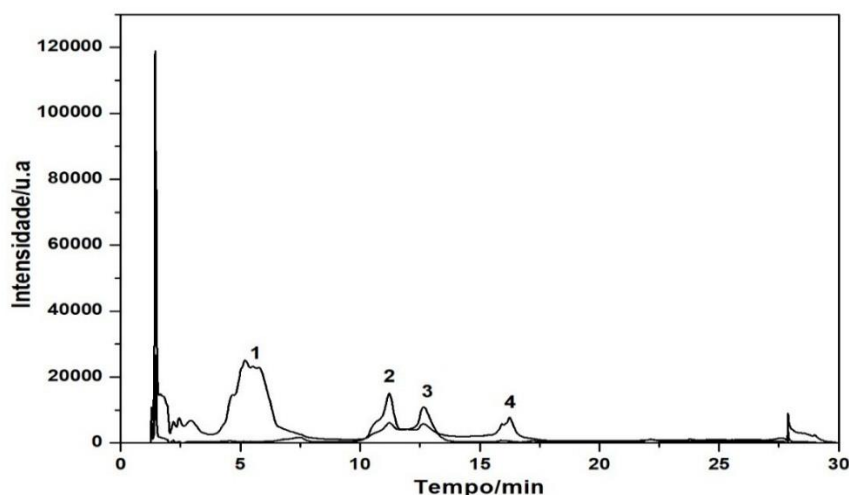


Figura 15. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na injeção do extrato da amostra a partir do processo de extração ELL-PBT com a presença de surfactante (30 mg L^{-1} para tartrazina, vermelho N e laranja G; 100 mg L^{-1} para amarelo crepúsculo; 200 mg L^{-1} para eritrosina) em 400 e 500 nm. Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \mu\text{L}$; coluna cromatográfica Coluna LUNA C_{18} ($3,0 \times 150 \text{ mm}$) $3 \mu\text{m}$ (Phenomenex); fase móvel: (A) 0,10% de ácido fórmico em água e acetonitrila (80: 20, v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila; temperatura da coluna: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; vazão: $0,375 \text{ mL min}^{-1}$. Os analitos são identificados por números, cuja identificação é descrita como: 1 – tartrazina; 2 – amarelo crepúsculo; 3 – laranja G; 4 – vermelho N.

Tabela 13. Coeficientes de variação obtidos na ELL-PBT com adição de NaCl e Tween 20

Analito	Recuperação (%) para o nível 3 de fortificação*	CV (%)
Amarelo crepúsculo	25	38
Eritrosina	45	5
Laranja G	53	23
Tartrazina	8	31
Vermelho N	41	51

* 30 mg L^{-1} para tartrazina, vermelho N e laranja G; 100 mg L^{-1} para amarelo crepúsculo; 200 mg L^{-1} para eritrosina.

Por meio de análise dos cromatogramas e integração dos picos obtidos, foi possível perceber que o procedimento não apresenta repetitividade, fato que pode ser comprovado ao analisar os altos valores de coeficiente de variação obtidos. Além disso, baixos valores de recuperação foram alcançados, indicando que a extração dos analitos não foi eficiente.

Pochivalov et. al utilizaram hexanoato de sódio como surfactante para a extração dos corantes sudan I, sudan II e sudan III em amostras de especiarias. Segundo os autores, os

analitos são extraídos das amostras sólidas para a solução micelar dos íons hexanoato. Entretanto, o uso do surfactante neste caso, não permitiu que os analitos fossem extraídos de forma eficiente e repetitiva.

Diante disso, foi proposto um novo método de extração, mais simplificado, visando obter repetitividade e recuperação aceitável.

5.2.2. Preparo de amostra simplificado

Nas Figuras 16 e 17 são mostrados os cromatogramas obtidos de uma amostra analisada segundo procedimento descrito no item 4.5.2, comparando o uso da acetona (Figuras 16 a e 17 a), metanol (Figuras 16 b e 17 b) e acetonitrila (Figuras 16 c e 17 c) como solventes de extração. Como é possível observar, os três solventes utilizados apresentaram comportamento semelhante, não sendo completamente eficientes para a extração dos analitos. Entretanto, optou-se pelo uso da acetonitrila pois se trata de um solvente compatível com a fase móvel utilizada. Tsai e colaboradores também utilizaram acetonitrila como solvente extrator para a extração de 20 corantes, incluindo a tartrazina, vermelho N, amarelo crepúsculo e eritrosina¹⁶.

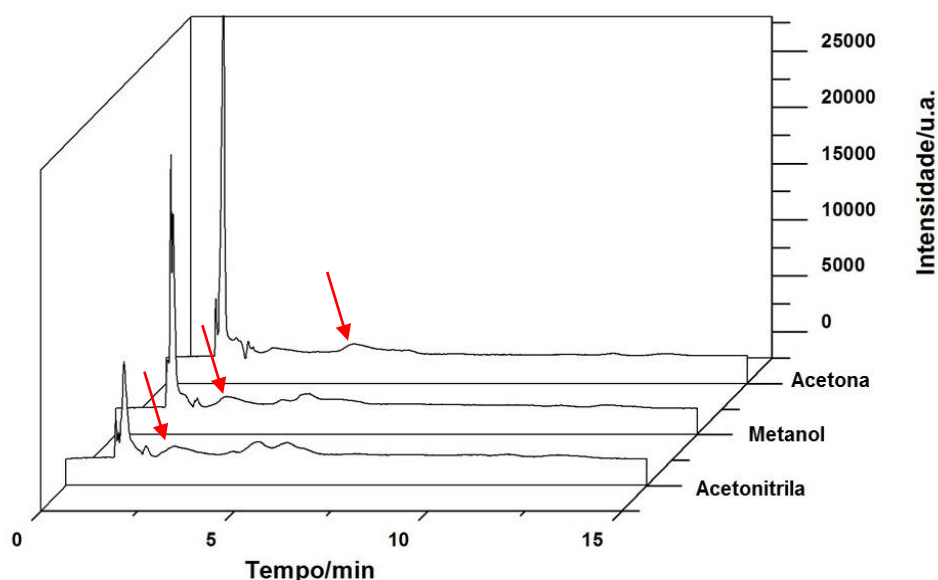


Figura 16. Cromatogramas obtidos nas injeções do extrato da amostra a partir do processo de extração simplificado na escolha do solvente extrator: a) acetona; b) metanol e c) acetonitrila. (30 mg L^{-1} para tartrazina, vermelho N e laranja G; 100 mg L^{-1} para amarelo crepúsculo; 200 mg L^{-1} para eritrosina). Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \mu\text{L}$; coluna cromatográfica Coluna LUNA C_{18} ($3,0 \times 150 \text{ mm}$) $3 \mu\text{m}$ (Phenomenex); fase móvel: (A) 0,15% de ácido fórmico em água e acetonitrila (80: 20, v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila; temperatura da coluna: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; vazão: $0,375 \text{ mL min}^{-1}$; comprimento de onda apresentado: 400 nm .

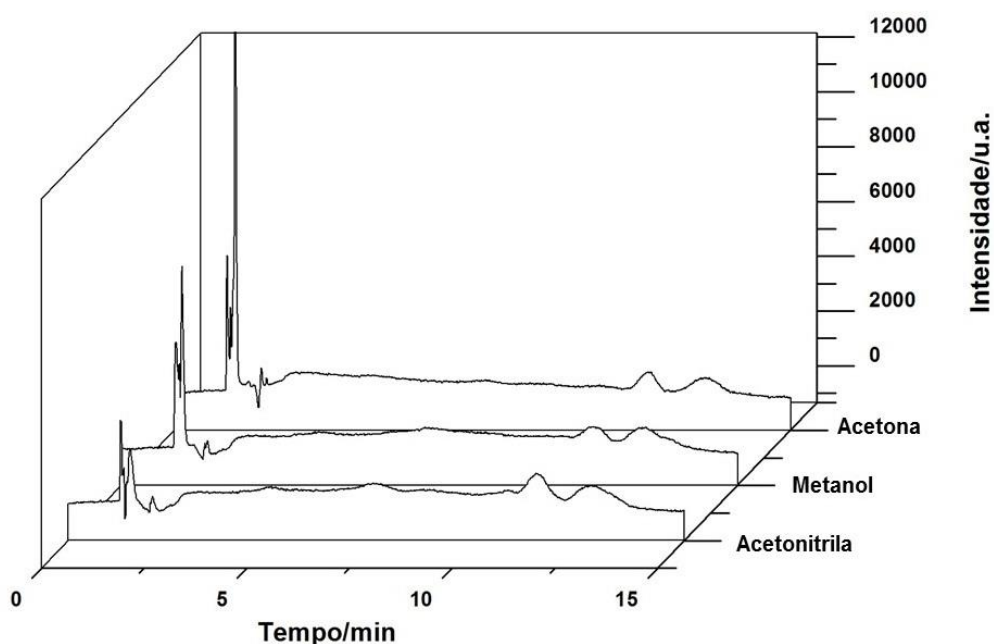


Figura 17. Cromatogramas obtidos nas injeções do extrato da amostra a partir do processo de extração simplificado na escolha do solvente extrator: a) acetona; b) metanol e c) acetonitrila. (30 mg L⁻¹ para tartrazina, vermelho N e laranja G; 100 mg L⁻¹ para amarelo crepúsculo; 200 mg L⁻¹ para eritrosina). Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL; coluna cromatográfica Coluna LUNA C₁₈ (3,0 x 150 mm) 3 µm (Phenomenex); fase móvel: (A) 0,15% de ácido fórmico em água e acetonitrila (80: 20, v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila; temperatura da coluna: 30 °C; vazão: 0,375 mL min⁻¹; comprimento de onda apresentado: 500 nm.

Entretanto, ainda houve a necessidade de melhorar o processo de extração. Dessa forma, foram avaliados os efeitos do pH inicial da amostra e também do pH final do extrato, assim como o uso do ultrassom no procedimento de preparo da amostra. Na Figura 18 é possível observar o resultado dessas modificações.

Como é possível observar, o ajuste do pH inicial da amostra para 10,0 após a fortificação foi de extrema importância na análise pois permite que os analitos sejam extraídos de uma forma mais eficiente. O ajuste do pH final do extrato para 3,0 permite uma melhor resolução e formato dos picos. Por fim, o uso do ultrassom apresenta um efeito bastante positivo no procedimento de extração. Segundo Tiwari, o uso do ultrassom melhora o rendimento de extração e a qualidade do extrato⁷⁶. Diversos autores utilizaram o ultrassom nos processos de extração, como Iammarino e colaboradores na extração de 12 corantes, entre eles a eritrosina⁵³; Qi et. al. utilizaram banho ultrassônico para extrair vermelho N, eritrosina, tartrazina, amarelo crepúsculo e outros 7 corantes²⁰, Bonan et. al. também aplicaram o banho ultrassônico para a extração do vermelho N, tartrazina, amarelo crepúsculo e de outros 14 corantes⁷⁰.

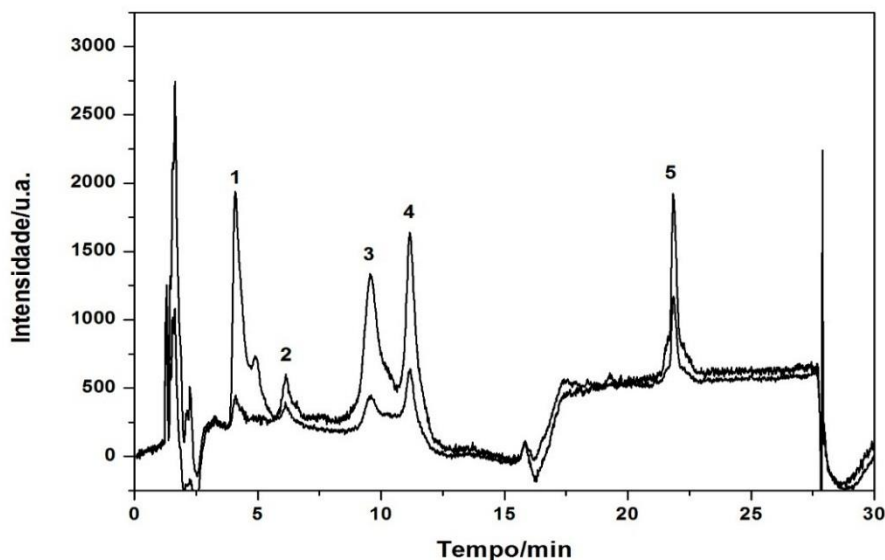


Figura 18. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na injeção do extrato da amostra a partir do processo de extração simplificado com pH da amostra igual a 10,0, pH final do extrato igual a 3,0 e sonicação por 5 min. (30 mg L^{-1} para tartrazina, vermelho N e laranja G; 100 mg L^{-1} para amarelo crepúsculo; 200 mg L^{-1} para eritrosina) em 400 e 500 nm. Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \text{ }\mu\text{L}$; coluna cromatográfica Coluna LUNA C_{18} ($3,0 \times 150 \text{ mm}$) $3 \text{ }\mu\text{m}$ (Phenomenex); fase móvel: (A) 0,15% de ácido fórmico em água e acetonitrila (80: 20, v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila; temperatura da coluna: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; vazão: $0,375 \text{ mL min}^{-1}$. Os analitos são identificados por números, cuja identificação é descrita como: 1 – tartrazina; 2 – amarelo crepúsculo; 3 – laranja G; 4 – vermelho N; 5 – eritrosina.

Diante disso, o próximo passo foi validar o método de análise desenvolvido utilizando uma curva analítica matrizada como forma de se evitar que baixas recuperações sejam obtidas.

5.3. Validação do método

5.3.1. Linearidade

Primeiramente, foi analisado a faixa de trabalho a ser utilizada no método proposto. Curvas analíticas matrizadas foram preparadas conforme descrito no procedimento 4.5.2. As curvas foram construídas utilizando-se a área do pico do analito em função da concentração. A Figura 19 mostra um exemplo de curva analítica que foi obtida para a tartrazina.

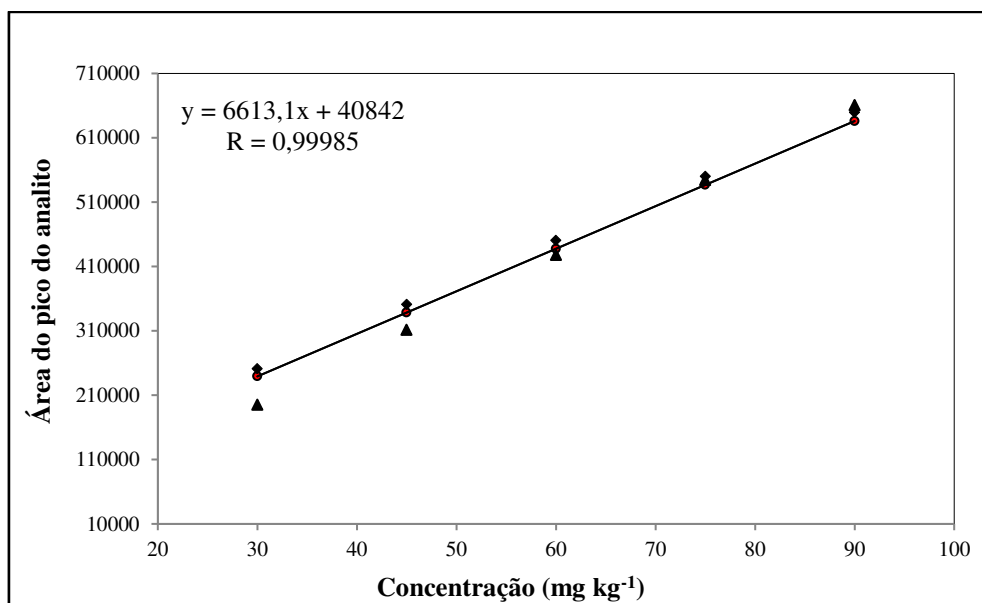


Figura 19. Curvas analíticas da tartrazina obtidas nos três dias de validação do método de determinação de corantes alimentares em polpa de goiaba.

Os valores de coeficiente de determinação (R^2), assim como os demais parâmetros das curvas analíticas dos analitos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Curvas analíticas obtidas através da combinação dos dados dos três dias de validação

Analito	Equação da reta	R^2	$t_{\text{crítico}}$	$t_{\text{calculado}}$
Amarelo crepúsculo	$y = 108,5x + 1939,70$	0,99941	9,28	71,36
Eritrosina	$y = 3592,2x + 39858,82$	0,99871	9,28	48,16
Laranja G	$y = 2820x + 19016,62$	0,99967	9,28	95,17
Tartrazina	$y = 6801,9x + 32082,39$	0,99985	9,28	142,65
Vermelho N	$y = 7489,7x - 27827,07$	0,99994	9,28	4418,61

Os parâmetros das curvas foram obtidos através do Método de Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP), visto que a resposta instrumental obtida é heterocedástica, apresentando variância heterogênea ao longo da curva. Como pode ser observado, os resultados são satisfatórios, com valores de R^2 superiores a 0,99871. Além disso, pelo teste de linearidade é possível concluir que a faixa de trabalho escolhida é linear, pois o valor de $t_{\text{calculado}}$ é maior que o valor de $t_{\text{crítico}}$ para todos os analitos, ou seja, a área do pico do analito é proporcional à sua concentração.

5.3.2. Veracidade, repetitividade e precisão intermediária

A veracidade do método, repetitividade e precisão intermediária foram avaliados por meio de ensaios de recuperação conforme descrito na seção 4.7.2. As amostras foram fortificadas em cada nível de interesse e extraídas conforme item 4.5.2. Os dados obtidos foram previamente testados quanto à presença de *outliers* por meio do teste de Grubbs, sendo retirados do tratamento sem que o limite de 22% dos resultados fosse excedido, conforme recomendado pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica⁷¹. Os resultados estão mostrados na Tabela 15.

Tabela 15. Resultados de veracidade, repetitividade e precisão intermediária encontrados para o método desenvolvido neste trabalho

Analito	Repetitividade ^a			Precisão intermediária		
	50 mg kg ⁻¹	100 mg kg ⁻¹	150 mg kg ⁻¹	50 mg kg ⁻¹	100 mg kg ⁻¹	150 mg kg ⁻¹
Amarelo Crepúsculo	110 (9,8)	102 (9,3)	97 (8,7)	13,1	7,9	11,1
Eritrosina	101 (3,0)	103 (4,2)	23 (95,8)	3,3	4,7	78,2
Laranja G	101 (9,1)	106 (7,4)	105 (10,5)	19,0	7,0	10,6
Tartrazina	109 (8,2)	102 (6,0)	101 (10,1)	11,5	5,4	8,4
Vermelho N	110 (3,3)	104 (6,3)	93 (8,5)	8,8	6,6	9,7

^a Coeficiente de variação entre parêntesis. Em negrito os resultados insatisfatórios.

Os valores de recuperação, repetitividade e precisão intermediária se apresentaram maiores do que o permitido pelo Manual de Garantia da Qualidade do MAPA⁷¹. Entretanto, devido às dificuldades encontradas ao longo do trabalho, optou-se por comparar os resultados com outros Guias de Validação, como a SANTE/11813/2017⁷² para análise de pesticidas.

Adotando-se os critérios descritos no item 4.7.2, pode-se perceber que os valores encontrados foram satisfatórios, pois a recuperação permaneceu entre 96-110 % para todos os analitos, e os coeficientes de variação de repetitividade e precisão intermediária foram inferiores a 14 e 20 %, respectivamente, exceto para a eritrosina no terceiro nível. Tal resultado indica que este analito não pode ser utilizado neste método nessa faixa de concentração.

Resultados semelhantes foram encontrados por Chen e colaboradores na extração dos corantes tartrazina, amarantho, carmim, amarelo crepúsculo, vermelho N, azul brilhante e eritrosina em amostras de refrigerantes e vinhos. Neste estudo foram encontrados valores de

recuperação entre 84 e 116,2%, valores de desvio-padrão relativo de repetitividade e reprodutibilidade entre 1,4 e 8,6% e 1,5 e 9,7%, respectivamente⁷⁷. Sha et. al. obtiveram recuperações entre 93,2 e 98,9% e desvio-padrão relativo entre 1,6 e 3,2% para determinação dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo, amaranto, ponceau 4R, e azul brilhante²².

Entretanto, a vantagem do método proposto nesta dissertação é a simplicidade do processo de extração, como descrito anteriormente. Enquanto Chen propõe uma extração em fase sólida dispersiva magnética e Sha utiliza uma microextração mediada por líquido iônico, este trabalho propõe uma simples extração mediada por ultrassom.

5.3.3. Limites de detecção (LD), de quantificação (LQ), de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)

Os valores encontrados para LD, LQ, $CC\alpha$ e $CC\beta$ estão representados na Tabela 16. Os valores de LD e LQ se apresentaram satisfatórios, visto que se encontram bem abaixo dos valores de LMR dos analitos em estudo, indicando que o método é capaz de detectar e quantificar estas substâncias mesmo em pequenas concentrações. Os valores de $CC\alpha$ variaram entre 0,81 e 107,82 mg kg⁻¹ para o laranja G e amarelo crepúsculo, respectivamente. O valor de $CC\alpha$ para o laranja G se apresentou inferior aos demais, visto que se trata de uma substância banida. Para os demais analitos, os valores se encontram próximos do valor de LMR, como recomendado pelo MAPA⁷¹. Isso significa dizer que uma substância é considerada violada quando o valor encontrado for maior ou igual a $CC\alpha$. Os valores de $CC\beta$, de acordo com a expressão descrita no item 4.7.3, não devem ultrapassar o valor de 140 mg kg⁻¹ e estão, portanto, dentro do valor aceitável.

Tabela 16. Limites de detecção (LD), de quantificação (LQ), de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção para cada analito

Analito	LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)	$CC\alpha$ (mg kg ⁻¹)	$CC\beta$ (mg kg ⁻¹)
Amarelo Crepúsculo	15	30	107,82	115,65
Eritrosina	15	30	104,74	109,48
Laranja G	15	30	0,81000	1,6200
Tartrazina	15	30	105,40	110,79
Vermelho N	15	30	106,74	113,48

5.3.4. Incerteza da medição analítica

Os resultados da incerteza da medição analítica obtidas para os três níveis estudados são apresentados na Tabela 17. Pode-se ver que os resultados da incerteza expandida variaram

entre 2,75 e 36,89 mg kg⁻¹. Os valores de incerteza relativa combinada variaram entre 2,81 e 13,8%. Como descrito no item 4.7.4, os valores de incerteza relativa combinada não podem exceder 27% e, dessa forma, conclui-se que os resultados encontrados são satisfatórios para todos os analitos.

Tabela 17. Estimativa da incerteza combinada (u_c) e da incerteza expandida da medição (U) determinada no procedimento de validação do método quantitativo de análise de corantes alimentares em polpa de goiaba

Analito	Incerteza combinada			Incerteza expandida ^a		
	50 mg kg ⁻¹	100 mg kg ⁻¹	150 mg kg ⁻¹	50 mg kg ⁻¹	100 mg kg ⁻¹	150 mg kg ⁻¹
Amarelo Crepúsculo	6,92 (13,8)	12,9 (12,9)	18,8 (12,5)	13,5	25,2	36,9
Eritrosina	6,48 (13,0)	10,8 (10,8)	15,1 (10,0)	12,7	21,1	29,5
Laranja G	5,06 (10,1)	10,2 (10,2)	15,3 (10,2)	9,91	19,9	29,3
Tartrazina	1,78 (3,56)	3,18 (3,18)	4,59 (3,06)	3,5	6,2	9,0
Vermelho N	1,40 (2,81)	2,85 (2,85)	4,30 (2,86)	2,8	5,6	8,4

^a Nível de confiança: 95%; Fator de abrangência (k): 1,96; Incerteza relativa combinada (%) entre parêntesis.

Para o cálculo da incerteza foram consideradas como fontes contribuintes da incerteza a precisão intermediária obtida pelos dados da validação do método, o desvio da resposta instrumental e a curva analítica, conforme descrito no item 4.7.4. A maior contribuição foi devido à curva analítica, indicando que as curvas devem ser analisadas e acompanhadas a medida em que as análises de rotina forem executadas.

5.4. Estudo de ocorrência

O método desenvolvido foi aplicado na análise de oito amostras de polpa de goiaba (A₁ a A₈) obtidas em supermercados de diferentes regiões de Minas Gerais. Os resultados estão indicados na Tabela 18. Pode-se ver na Figura 20 um exemplo de cromatograma obtido para uma das amostras. Verificou-se que essas amostras não apresentaram contaminação com os corantes incluídos no método.

Tabela 18. Resultados obtidos na análise de amostras obtidas em diferentes regiões de Minas Gerais

Analito	Amostras							
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈
Amarelo	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
Crepúsculo	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
Eritrosina	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
Laranja G	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
Tartrazina	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
Vermelho N	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*

*ND: não detectado

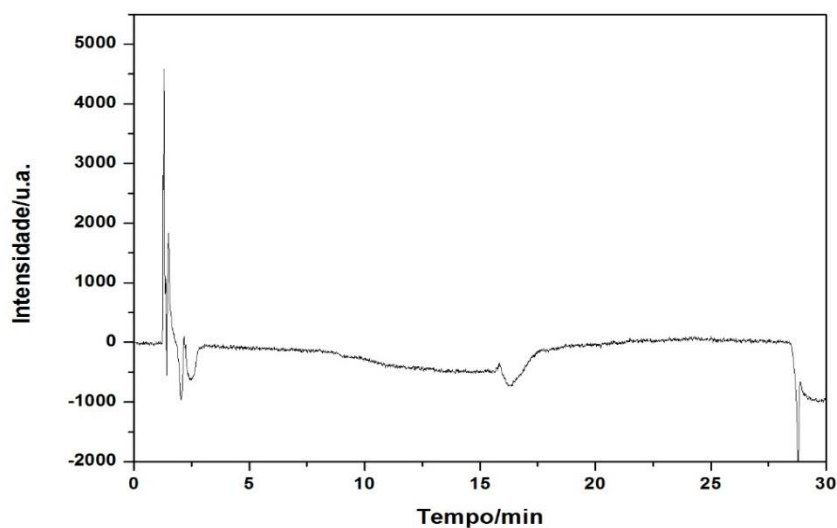


Figura 20. Cromatograma obtido na injeção do extrato da amostra comercial (A₁) a partir do processo de extração otimizado. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 μ L; coluna cromatográfica Coluna LUNA C₁₈ (3,0 x 150 mm) 3 μ m (Phenomenex); fase móvel: (A) 0,15% de ácido fórmico em água e acetonitrila (80: 20, v/v) e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila; temperatura da coluna: 30 °C; vazão: 0,375 mL min⁻¹.

6. Conclusão

Neste trabalho foi desenvolvido um procedimento de extração simples, rápido e eficiente para determinação simultânea de corantes alimentícios iônicos em polpas de frutas. O diferencial no método foi o ajuste inicial e final do pH da amostra, seguido de uma extração com acetonitrila assistida por ultrassom, centrifugação e filtração. Outro diferencial no método foi o uso de surfactante para estabilização dos analitos em solução. A praticidade do método permite que várias amostras sejam analisadas em um mesmo dia, com uma frequência analítica de 24 amostras/dia. O método validado atendeu aos critérios de veracidade, repetitividade e precisão intermediária. Pode-se concluir, portanto, que ele pode ser aplicado em análises de rotina para o controle de qualidade e segurança alimentar, seguindo as principais normativas nacionais e internacionais de qualidade analítica. O método também permite a expansão do escopo, tanto no sentido de abranger um maior número de analitos, quanto no sentido de englobar outras matrizes. Por fim, esta dissertação pode ser considerada como uma fonte de consulta bibliográfica, podendo ser útil na elaboração de trabalhos envolvendo corantes alimentares e cromatografia líquida.

7. Próximas Etapas

Expandir o escopo do método, tanto no sentido de contemplar outros corantes alimentares (por exemplo, sudan I, sudan II e sudan III, proibidos pela legislação brasileira), polpas de diferentes sabores (como abacaxi, morango, maracujá, acerola, entre outros) e também matrizes diferentes (refrigerantes, sucos concentrados, iogurtes, etc).

8. Referências

1. Be Water - Águas de Paredes. A Água Fonte de Vida e Saúde. *Control da Qual da Água*. 2013. Site: <https://www.paredes-bewater.com.pt/pt/573/controlo-da-qualidade-da-agua>. Acessado em 21 de dezembro de 2019.
2. Yoo J Il, Choi, M.D. H, Song SY, Park KS, Lee DH, Ha YC. Relationship between water intake and skeletal muscle mass in elderly Koreans: A nationwide population-based study. *Nutrition*. 2018;53:38-42. doi:10.1016/j.nut.2018.01.010
3. Riveros-Perez E, Riveros R. Water in the human body: An anesthesiologist's perspective on the connection between physicochemical properties of water and physiologic relevance. *Ann Med Surg*. 2018;26(November 2017):1-8. doi:10.1016/j.amsu.2017.12.007
4. Abdel-Rahman GN, Ahmed MBM, Sabry BA, Ali SSM. Heavy metals content in some non-alcoholic beverages (carbonated drinks, flavored yogurt drinks, and juice drinks) of the Egyptian markets. *Toxicol Reports*. 2019;6(February):210-214. doi:10.1016/j.toxrep.2019.02.010
5. Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não alcólicas. Refrigerantes. Site: <https://abir.org.br/o-setor/dados/refrigerantes/>. Acessado em 08 de dezembro de 2019.
6. Chun S, Choi Y, Chang Y, et al. Sugar-sweetened carbonated beverage consumption and coronary artery calcification in asymptomatic men and women. *Am Heart J*. 2016;177:17-24. doi:10.1016/j.ahj.2016.03.018
7. Anari R, Amani R, Veissi M. Sugar-sweetened beverages consumption is associated with abdominal obesity risk in diabetic patients. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. 2017;11:S675-S678. doi:10.1016/j.dsx.2017.04.024
8. Costa DO, Cardoso GR, Silva GM V. A evolução do setor produtivo e comercialização de polpa de fruta no Brejo Paraibano: Estudo de caso na COAPRODES. *Xxxiii Encontro Nac Eng Produção*. 2013:1-16.
9. Polpas F. Polpa de fruta congelada. Site: <https://www.falpolpas.com.br/polpas-de-frutas/>. Acessado em 21 de dezembro de 2019.

10. *BRASIL. MAPA* - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União. Instrução Normativa N.º 49, de 26 de setembro de 2018.
11. Tomaska LD, Brooke-Taylor S. Food Additives: Food Additives - General. In: *Encyclopedia of Food Safety*. ; 2013. doi:10.1016/B978-0-12-378612-8.00234-1
12. Gören AC, Bilsel G, Şimşek A, et al. HPLC and LC-MS/MS methods for determination of sodium benzoate and potassium sorbate in food and beverages: Performances of local accredited laboratories via proficiency tests in Turkey. *Food Chem.* 2015;175:273-279. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.094
13. Martins FCOL, Sentanin MA, De Souza D. Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. *Food Chem.* 2019. doi:10.1016/j.foodchem.2018.08.060
14. Molognoni L, Daguer H, de Sá Ploêncio LA, De Dea Lindner J. A multi-purpose tool for food inspection: Simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS. *Talanta.* 2018. doi:10.1016/j.talanta.2017.08.081
15. Blekas GA. Food Additives: Classification, Uses and Regulation. *Encycl Food Heal.* January 2016:731-736. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00304-4
16. Tsai CF, Kuo CH, Shih DY. Determination of 20 synthetic dyes in chili powders and syrup-preserved fruits by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Food Drug Anal.* 2015;23(3):453-462. doi:10.1016/j.jfda.2014.09.003
17. Albuquerque MV, dos Santos SA, Cerqueira N, da Silva JA. Educação Alimentar: Uma Proposta de Redução do Consumo de Aditivos Alimentares. *Soc Bras Química.* 2012;34(02):51-57.
18. Martin F, Oberson JM, Meschiari M, Munari C. Determination of 18 water-soluble artificial dyes by LC-MS in selected matrices. *Food Chem.* 2016. doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.067
19. Wu H, Guo JB, Du LM, et al. A rapid shaking-based ionic liquid dispersive liquid phase microextraction for the simultaneous determination of six synthetic food colourants in soft drinks, sugar- and gelatin-based confectionery by high-performance

- liquid chromatography. *Food Chem.* 2013;141(1):182-186. doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.015
20. Qi P, Lin ZH, Chen GY, et al. Fast and simultaneous determination of eleven synthetic color additives in flour and meat products by liquid chromatography coupled with diode-array detector and tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2015. doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.075
21. Zou T, He P, Yasen A, Li Z. Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors. *Food Chem.* 2013. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.084
22. Sha O, Zhu X, Feng Y, Ma W. Aqueous two-phase based on ionic liquid liquid–liquid microextraction for simultaneous determination of five synthetic food colourants in different food samples by high-performance liquid chromatography. *Food Chem.* 2015;174:380-386. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2014.11.068
23. De Araújo Siqueira Bento W, Lima BP, Paim APS. Simultaneous determination of synthetic colorants in yogurt by HPLC. *Food Chem.* 2015. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.050
24. Prado MA, Godoy HT. Determinação de corantes artificiais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em pó para gelatina. *Quim Nova.* 2004;27(1):22-26. doi:10.1590/s0100-40422004000100005
25. Florindo Guedes MI, de Matos Ribeiro L, Marques Ávila MM, et al. Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC. *Food Chem.* 2014. doi:10.1016/j.foodchem.2014.01.100
26. Al-Degs YS. Determination of three dyes in commercial soft drinks using HPLC/GO and liquid chromatography. *Food Chem.* 2009;117(3):485-490. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2009.04.097
27. Chen X-H, Zhao Y-G, Shen H-Y, Zhou L-X, Pan S-D, Jin M-C. Fast determination of seven synthetic pigments from wine and soft drinks using magnetic dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2014;1346:123-128. doi:10.1016/J.CHROMA.2014.04.060

28. *BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Codex Alimentarius. 2016.*
29. Comissão Europeia. *Do campo para a mesa: Segurança alimentar. 2014. doi:10.2775/78882*
30. Codex Alimentarius. Codex Alimentarius - Members. Site: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/members/en/>. Acessado em 05 de novembro de 2019.
31. Stankovic I. Codex Alimentarius. In: *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press; 2015:191-196. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00180-X
32. Cheng C. Codex Alimentarius Commission. *Encycl Food Secur Sustain*. January 2019:50-55. doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.22376-7
33. Kotwal V. Codex Alimentarius Commission: Role in International Food Standards Setting. *Encycl Food Heal*. January 2016:197-205. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00397-4
34. Codex Committee on Food Additives (CCFA). Site: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/committees/committee/en/?committee=CCFA>. Acessado em 12 de março de 2019.
35. Europeia U. Regulamentos, diretivas e outros atos legislativos. Site: https://europa.eu/european-union/eu-law/legal-acts_pt. Acessado em 05 de novembro de 2019.
36. União Europeia. Parlamento Europeu, Conselho da União Europeia. DIRECTIVA 94/35/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 30 de Junho de 1994 relativa aos edulcorantes para utilização nos gêneros alimentares. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. 1994.
37. União Europeia. Parlamento Europeu, Conselho da União Europeia. DIRECTIVA 95/2/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 20 de Fevereiro de 1995 Relativa Aos Aditivos Alimentares Com Excepção Dos Corantes e Dos Edulcorantes. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. 1995.
38. União Europeia. Parlamento Europeu, Conselho da União Europeia. DIRECTIVA

- 94/36/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 30 de Junho de 1994 relativa aos corantes para utilização nos gêneros alimentícios. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. 1994.
39. União Europeia. Parlamento Europeu, Conselho da União Europeia. REGULAMENTO (CE) N.º 1333/2008 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 16 de Dezembro de 2008 relativo aos aditivos alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*. 2008.
40. Assuntos Europeus. Site: <http://ccipd.pt/faqs/assuntos-europeus/>. Acessado em 05 de novembro de 2019.
41. União Europeia. Parlamento Europeu, Conselho da União Europeia. Regulamento (UE) N.º1129/2011. *Jornal Oficial da União Europeia*. 2011.
42. *BRASIL. CNNPA* - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. RESOLUÇÃO CNNPA N.º 21/75. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 17 de fevereiro de 1976.
43. *BRASIL. ANVISA* - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO CNS/MS N.º 04, de 24 de novembro de 1988. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 19 de dezembro de 1988.
44. *BRASIL. SVS/MS* - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. PORTARIA N.º 540 - SVS/MS, de 27 de outubro de 1997. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 28 de outubro de 1997.
45. *BRASIL. ANVISA* - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Institucional. Site: <http://portal.anvisa.gov.br/institucional>. Acessado em: 06 de dezembro de 2019.
46. *BRASIL. ANVISA* - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Institucional. Site: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=417464&_101_type=content&_101_groupId=33. Acessado em 12 de março de 2019.

47. WHO FAO. General Standard for Food Aditives. *Codex Stan 192-1995*. 2018.
48. Sebaei AS, Youssif MI, Abdel-Maksoud Ghazi A. Determination of seven illegal dyes in Egyptian spices by HPLC with gel permeation chromatography clean up. *J Food Compos Anal*. 2019;84(June):103304. doi:10.1016/j.jfca.2019.103304
49. Vidotti EC, Costa WF, Oliveira CC. Development of a green chromatographic method for determination of colorants in food samples. *Talanta*. 2006;68(3):516-521. doi:10.1016/j.talanta.2005.01.059
50. Prado MA, Godoy HT. Corantes artificiais em alimentos. 2003:237-250.
51. Ferreira-silva B, Valnice M, Zanoni B. Cromatografia aplicada na análise de corantes. 2016;(December):10-41.
52. Chen Q, Mou S, Hou X, Riviello JM, Ni Z. Determination of eight synthetic food colorants in drinks by high-performance ion chromatography. 1998;827:73-81.
53. Iammarino M, Mentana A, Centonze D, Palermo C, Mangiacotti M, Chiaravalle AE. Chromatographic determination of 12 dyes in meat products by HPLC-UV-DIODE array detection. *MethodsX*. 2019;6:856-861. doi:10.1016/j.mex.2019.04.018
54. Faraji M. Determination of some red dyes in food samples using a hydrophobic deep eutectic solvent-based vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2019;1591:15-23. doi:10.1016/j.chroma.2019.01.022
55. Iammarino M, Mentana A, Centonze D, Palermo C, Mangiacotti M, Chiaravalle AE. Simultaneous determination of twelve dyes in meat products: Development and validation of an analytical method based on HPLC-UV-diode array detection. *Food Chem*. 2019;285(657):1-9. doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.133
56. Jalili V, Barkhordari A, Ghiasvand A. New extraction media in microextraction techniques. A review of reviews. *Microchem J*. 2019;(September):104386. doi:10.1016/j.microc.2019.104386
57. Maciel EVS, de Toffoli AL, Neto ES, Nazario CED, Lanças FM. New materials in sample preparation: Recent advances and future trends. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2019;119:115633. doi:10.1016/j.trac.2019.115633

58. Qi P, Zeng T, Wen Z, Liang X, Zhang X. Interference-free simultaneous determination of Sudan dyes in chili foods using solid phase extraction coupled with HPLC-DAD. *Food Chem.* 2011;125(4):1462-1467. doi:10.1016/j.foodchem.2010.10.059
59. Goulart SM, de Queiroz MELR, Neves AA, de Queiroz JH. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. *Talanta.* 2008;75(5):1320-1323. doi:10.1016/j.talanta.2008.01.058
60. Armenta S, Garrigues S, Esteve-Turrillas FA, de la Guardia M. Green extraction techniques in green analytical chemistry. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2019;116:248-253. doi:10.1016/j.trac.2019.03.016
61. Al Tamim A, AlRabeh M, Al Tamimi A, AlAjlan A, Alowaiifeer A. Fast and simple method for the detection and quantification of 15 synthetic dyes in sauce, cotton candy, and pickle by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Arab J Chem.* 2019. doi:10.1016/j.arabjc.2019.09.008
62. Long C, Mai Z, Yang X, et al. A new liquid-liquid extraction method for determination of 6 azo-dyes in chilli products by high-performance liquid chromatography. *Food Chem.* 2011;126(3):1324-1329. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.089
63. Pochivalov A, Davletbaeva P, Cherkashina K, Lezov A, Vakh C, Bulatov A. Surfactant-mediated microextraction approach using switchable hydrophilicity solvent: HPLC-UV determination of Sudan dyes in solid food samples. *J Mol Liq.* 2018;271:807-814. doi:10.1016/j.molliq.2018.09.072
64. Liu W, Liu J, Zhang Y, et al. Simultaneous determination of 20 disperse dyes in foodstuffs by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2019;300(January):125183. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125183
65. MCCULLY, K. A.; MCKINLEY WP. Determination of chlorinated pesticide residues in fat by electron capture gas chromatography. *J Assoc Off Agric Chem.* 1964;47:652.
66. Silvério FO, Silva JGS, Aguiar MCS, Cacique AP, De Pinho GP. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa

- temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quim Nova*. 2012;35(10):2052-2056. doi:10.1590/S0100-40422012001000027
67. Vieira HP, Neves AA, Queiroz MELR de. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. *Quim Nova*. 2007;30(3):535-540. doi:10.1590/s0100-40422007000300006
68. Rodrigues GD, Da Silva LHM, Do Carmo Hespanhol Da Silva M. Alternativas verdes para o preparo de amostra e determinação de poluentes fenólicos em água. *Quim Nova*. 2010;33(6):1370-1378. doi:10.1590/s0100-40422010000600027
69. Lorenzo RA, Pena MT, Fernández P, González P, Carro AM. Artificial sweeteners in beverages by ultra performance liquid chromatography with photodiode array and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Control*. 2015. doi:10.1016/j.foodcont.2014.06.035
70. Bonan S, Fedrizzi G, Menotta S, Elisabetta C. Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Dye Pigment*. 2013. doi:10.1016/j.dyepig.2013.03.029
71. BRASIL. MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Manual de Garantia Da Qualidade Analítica Para Resíduos e Contaminantes Em Alimentos.*; 2011.
72. Group A, Product C, Valenciana G. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in. 2017.
73. BRASIL. INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. *GUM 2008 - Guia Para a Expressão de Incerteza de Medição.*; 2012.
74. Yamjala K, Nainar MS, Ramiseti NR. Methods for the analysis of azo dyes employed in food industry - A review. *Food Chem*. 2016;192:813-824. doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.085
75. Karanikolopoulos G, Gerakis A, Papadopoulou K, Mastrantoni I. Determination of synthetic food colorants in fish products by an HPLC-DAD method. *Food Chem*. 2015. doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.026

76. Tiwari BK. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2015;71:100-109. doi:10.1016/j.trac.2015.04.013
77. Chen XH, Zhao YG, Shen HY, Zhou LX, Pan SD, Jin MC. Fast determination of seven synthetic pigments from wine and soft drinks using magnetic dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2014;1346:123-128. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.060