

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ - REITORIA DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

MARA ELIZA DOS SANTOS

**ANÁLISE SIMULTÂNEA DOS CORANTES AMARELO TARTRAZINA E
AMARELO CREPÚSCULO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS
EMPREGANDO-SE MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

PONTA GROSSA

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ - REITORIA DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**ANÁLISE SIMULTÂNEA DOS CORANTES AMARELO TARTRAZINA E
AMARELO CREPÚSCULO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS
EMPREGANDO-SE MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

MARA ELIZA DOS SANTOS

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Noemi Nagata.

Ponta Grossa

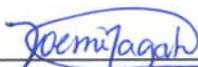
2005

TERMO DE APROVAÇÃO

MARA ELIZA DOS SANTOS

ANÁLISE SIMULTÂNEA DOS CORANTES AMARELO TARTRAZINA E AMARELO CREPUSCULO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS EMPREGANDO-SE MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte Banca Examinadora:



Prof^a. Dra. Noemi Nagata
UEPG/PR



Prof^a. Dra. Orlynei Maciel Guimarães
UFPR/PR



Prof. Dr. Ivo Mottim Demiate
UEPG/PR

Ponta Grossa, 24 de fevereiro de 2005.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho para algumas pessoas que são para mim exemplos.

À minha mãe, Ivone,
pelo seu exemplo de luta e coragem e
por ter me ensinado a valorizar as pequenas coisas da vida.

Meu marido, Rafael,
Que com sua compreensão
sempre me tratou com amor e carinho
apoiando-me em todas as decisões.
Aproveito o momento para agradecer
pelo dia em que você entrou em minha vida...

Às crianças mais lindas que conheço: Gabrielzinho, Manuzinha e Giulinha.

Vocês são demais, amo muito vocês...

Todas essas pessoas me mostram a cada instante que são as coisas mais
simples da vida nos tornam felizes. Que Deus abençoe a todos nós.

AGRADECIMENTOS

Tenho a satisfação e o orgulho em dividir esta conquista com você Noemi, minha querida orientadora e amiga de todas as horas que permitiu a construção de uma relação de respeito e carinho. Meu agradecimento especial não somente pela sabedoria com que conduziu este trabalho mas também pela orientação firme e competente que aliada à sensibilidade e à dedicação foi inestimável para que eu chegasse a esse momento.

A Elenise Sauer, minha “mãe científica”, meu sincero agradecimento pelo apoio, por suas palavras de incentivo e principalmente por sua paciência e dedicação. Durante todo o tempo que trabalhamos juntas e mesmo depois, sempre procurou dividir comigo seu conhecimento, e em outros momentos me ensinando ir à luta com determinação.

Ao prof. Dr. Patrício Peralta-Zamora, um super obrigado pela hospitalidade com a qual fui recebida na UFPR e por ter se mostrando sempre muito prestativo e amável.

Ao professor Ciro Zimmermann, pelas dicas, observações e palavras de incentivo.

Ao prof. Dr. Egon Schnitzler pelos padrões utilizados em todo o trabalho experimental e pela sua contribuição no exame de qualificação.

Aos professores Dr. Ivo Mottin Demiate e prof. Dra. Orliney Maciel Guimarães, membros da comissão da banca de defesa, pelas críticas e sugestões que muito contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Amigas e companheiras da equipe super b.... Cristiane, Lígia, Márcia e Simoninha por todos os momentos de alegria e descontração que dividimos e nos proporcionamos nas situações difíceis. Meninas, vocês são ótimas!

Às técnicas de laboratório do CTA Dani e Denise, pelo profissionalismo, cooperação e convívio agradável.

Aos amigos Giuliano, pela dica do mestrado, Cliciane e Eliete pelo apoio e companheirismo nos momentos difíceis.

A prof. Dr. Neiva Deliberali Rosso, pela compreensão e apoio.

As profs. Dras. Karen e Cristiana pela colaboração e disposição.

Aos colegas Tiago, Francisco, Crislaine, Bianca e Poliana por compartilharem comigo a essência do trabalho laboratorial....

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos pelo exemplo de dedicação, convívio alegre e pelas trocas de experiências.

A CAPES, pelo apoio, representado pela bolsa de estudos, vinda em momento oportuno.

Agradeço o apoio e o carinho da minha família, Mariane, Milton, Mayk, Sonia, Jeziel, Alessandro, Camila, Guilherme, Leony, André. E também ao meu pai, que mesmo não estando aqui, sei que ficaria orgulhoso.

Agradeço a Deus pelos dons, pela vida, pela capacidade de aprendizado, pelo crescimento e principalmente por mais essa etapa cumprida.

RESUMO

Corantes sintéticos são amplamente utilizados pela indústria alimentícia, principalmente para conferir, restaurar ou intensificar a cor dos alimentos, garantindo um aspecto padronizado frente aos consumidores, que usualmente associam a cor com a qualidade do alimento. Em função destes aspectos, e do potencial toxicológico que alguns corantes podem apresentar, o controle de qualidade destes compostos é de fundamental importância. Com este objetivo, muitos métodos analíticos podem ser empregados, sendo que dentre os mais usuais destacam-se os métodos cromatográficos e espectrofotométricos. A espectroscopia UV-Vis apresenta alta sensibilidade, baixo custo e simplicidade operacional. Entretanto, a sua baixa seletividade usualmente obriga a utilização de processos matemáticos que permitam contornar os constantes problemas de interferência espectral. Neste trabalho foi estudada a potencialidade de metodologias matemáticas, tais como: o princípio da aditividade espectrofotométrica, a espectrofotometria derivativa e as técnicas multivariadas (Regressão por Componentes Principais - PCR e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais - PLSR), na determinação espectrofotométrica simultânea de dois corantes alimentícios: amarelo crepúsculo (AC) e tartrazina (AT), previamente extraídos com lã natural. Estas metodologias foram avaliadas e comparadas em função das suas capacidades de previsão, sendo que o modelo PLSR otimizado (faixa espectral de 305 a 645 nm, empregando-se 1ª derivada como transformação dos dados e 2 componentes principais) apresentou o menor valor de RMSEP (AT = 0,191 e AC = 0,102). A faixa de concentração estudada foi de 1,0 mg L⁻¹ a 16,0 mg L⁻¹ para AC e de 2,0 mg L⁻¹ a 22,0 mg L⁻¹ para AT. O conjunto de validação externa apresentou erros relativos médios de 1,97% para AC e 1,39% para AT. A aplicação desta metodologia apresentou resultados concordantes com os estabelecidos pela legislação brasileira.

Palavras-Chaves: Corantes Sintéticos, Alimentos, Espectroscopia UV-Vis Espectrofotometria Derivativa, Calibração Multivariada.

ABSTRACT

Synthetic dyes are widely used by the food industry, mainly to assure the esthetic quality of commercialized foods. In view of these technical aspects and mainly due to the toxic character of some synthetic dyes the quality control of these additives appears as a very important task. With this purpose, a large variety of analytical methodologies can be used. Among others, spectrophotometric and chromatographic methodologies are the most useful. UV-Vis spectroscopy shows high sensibility, low cost and operational simplicity. However, its low selectivity usually implies the necessity of mathematical tools intended to overcome the customary problems of spectral interference. In this work, the potentiality of mathematical methodologies, such as: spectrophotometric additivity principle, derivative spectrophotometry and multivariate techniques (Principal Component Regression - PCR and Partial Least Square Regression - PLSR) were evaluated, aiming the simultaneous spectrophotometric determination of two food dyes: Tartrazine (TY) and Sunset Yellow (SY), previously extracted in natural wool. These methodologies were evaluated and compared by means of its prevision capacities. The lower RMSEP value (TY = 0.191 and SY = 0.102) was obtained for the PLSR model, using a spectral range between 305 and 645 nm, with data transformation by first derivative and two principal components. Using calibration sets between 1.0 to 16.0 mg L⁻¹ for TY and 2.0 to 22.0 mg L⁻¹ for SY, previsions errors of 1.97 % and 1.39 % were calculated, respectively. The application of this methodology shown results that agree with those established by the Brazilian legislation.

Key Words: Synthetic dyes, Foods, UV-Vis spectroscopy, Derivative spectrophotometry, Multivariate Calibration.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	Os corantes em alimentos	17
2.1.1	Potencial toxicológico dos corantes alimentícios	18
2.1.2	Características dos corantes alimentícios: Amarelo Tartrazina e Amarelo Crepúsculo	20
2.2	Análise de corantes	25
2.2.1	Métodos usuais	25
2.2.1.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	25
2.2.1.2	Eletroforese Capilar (EC).....	27
2.2.1.3	Métodos Eletroanalíticos.....	29
2.2.1.4	Métodos espectrofotométricos	30
2.2.2	Método de Calibração Multivariada	36
2.2.2.1	Transformação de Dados	39
2.2.2.2	Pré-Processamento de Dados.....	40
2.2.2.3	Análise por Componentes Principais (PCA)	40
2.2.2.4	Regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR)	43
2.2.3	Emprego das técnicas de Calibração Multivariada.....	45
3	OBJETIVOS	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	Reagentes	51
4.2	Matéria-prima.....	51
4.3	Instrumentação	52
4.4	Programas Computacionais.....	52

4.5	Estabilidade dos Padrões Sintéticos em meio básico tamponado.....	53
4.6	Recuperação dos Padrões Sintéticos	54
4.6.1	Preparo de Soluções.....	54
4.6.2	Procedimento Analítico	56
4.7	Metodologias para Quantificação dos Corantes AT e AC.....	57
4.7.1	Calibração Multivariada.....	57
4.7.2	Primeira Derivada.....	59
4.7.3	Princípio da Aditividade.....	59
4.7.4	Validação dos Modelos de Quantificação	60
4.8	Preparo da Amostra.....	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	Características dos Corantes AT e AC	62
5.1.1	Estabilidade dos Padrões Sintéticos AT e AC	64
5.2	Recuperação dos Padrões Sintéticos	70
5.3	Princípio da Aditividade	72
5.4	Método da Primeira Derivada	74
5.5	Modelos de Calibração Multivariada	79
5.5.1	PLSR.....	80
5.6	Comparação entre as metodologias matemáticas estudadas	90
5.7	Aplicação do Método de Calibração Multivariada: PLSR na determinação de AT e AC em amostras alimentícias	91
6	CONCLUSÃO.....	94
	REFERÊNCIAS	96
	GLOSSÁRIO	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do corante amarelo tartrazina.	22
Figura 2: Estrutura do corante amarelo crepúsculo.....	23
Figura 3: Ilustração do método da aditividade espectrofotométrica.	34
Figura 4: Organização dos dados para calibração multivariada.....	38
Figura 5: Gráfico tridimensional do conjunto de dados composto por 35 amostras.	41
Figura 6: A. Gráfico tridimensional ilustrando os eixos das componentes principais; B. Gráfico bidimensional da PC1 vs PC2: Scores representados por (—) e Loadings por (.....)	42
Figura 7: Composição das misturas sintéticas do conjunto de calibração e previsão.	58
Figura 8: Espectro de absorção UV-VIS do corante AC em água e tampão pH 10.	62
Figura 9: Espectro de absorção UV-VIS do corante AT em água e tampão pH 10.	63
Figura 10: Perfil de Estabilidade do Corante Amarelo Tartrazina.....	64
Figura 11: Espectros UV-VIS sobrepostos do corante AT na condição T1.....	67
Figura 12: Perfil de Estabilidade do Corante Amarelo Crepúsculo.....	68
Figura 13: Espectros UV-VIS sobrepostos do corante AC na condição C1.	70
Figura 14: Espectros derivados dos corantes AT e AC em diversas concentrações.	75
Figura 15: Primeira derivada dos espectros de alguns padrões sintéticos utilizados para a obtenção da reta de calibração do corante AT ($AC = 1 \text{ mg L}^{-1}$).....	76

Figura 16: Primeira derivada dos espectros de alguns padrões sintéticos utilizados para a obtenção da reta de calibração do corante AC ($AT = 14 \text{ mg L}^{-1}$)....	77
Figura 17: Primeira derivada dos espectros das amostras que compõem o conjunto de validação.	78
Figura 18: Primeira derivada dos espectros de absorção (200 e 800 nm).	81
Figura 19: PRESS em função do número de componentes principais para modelo PLSR com derivada dos dados e faixa espectral completa.	82
Figura 20: Coeficientes de regressão do modelo PLSR com derivada dos dados e faixa espectral completa.	83
Figura 21: Espectros UV-VIS característicos da mistura de corantes AT e AC (faixa espectral: 305 – 645 nm).	84
Figura 22: Primeira derivada dos espectros das amostras do conjunto de calibração (faixa espectral: 305 -645 nm).	84
Figura 23: PRESS em função do número de componentes principais para modelo PLSR com derivada dos dados e faixa espectral reduzida.	85
Figura 24: Coeficientes de regressão do modelo PLSR com derivada dos dados e faixa espectral reduzida.	86
Figura 25: Valores reais vs valores previstos pelo modelo PLSR com derivada dos dados e faixa espectral reduzida.	87
Figura 26: Resíduos <i>studentizados</i> em função da <i>leverage</i> para o modelo PLSR na análise de corantes.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de corantes sintéticos alimentícios.	16
Tabela 2: Produtos alimentícios contendo corantes AT e AC.	24
Tabela 3: Testes Estatísticos para Perfil de Estabilidade T1, T2 e T3.	66
Tabela 4: Testes Estatísticos para Perfil de Estabilidade C1, C2 e C3.	69
Tabela 5: Parâmetros das retas de calibração para cada corante estudado.	71
Tabela 6: Fator de recuperação do corantes AT e AC.	71
Tabela 7: Retas de Calibração obtidas para os corantes AT e AC em 402 nm e 460 nm.	72
Tabela 8: Resultados de previsão e RMSEP para o princípio da aditividade.	74
Tabela 9: Parâmetros para determinação de AT e AC via primeira derivada.	77
Tabela 10: Resultados de Previsão e RMSEP para primeira derivada.	79
Tabela 11: Percentual de Variância Capturada pelo Modelo PLSR.	85
Tabela 12: Características dos modelos desenvolvidos e seus respectivos RMSEP.	89
Tabela 13: Erros relativos (%) na análise de corantes em mg L ⁻¹ por PLSR.	90
Tabela 14: Resultados de RMSEP para as metodologias matemáticas estudadas.	91
Tabela 15: Média dos teores de corantes artificiais (mg L ⁻¹) em amostras de alimentos.	92

1 INTRODUÇÃO

Desde muito tempo (cerca de 20.000 anos atrás) o homem começou a exercitar-se no uso das cores. Evidências arqueológicas indicam que os antigos egípcios usavam hena, carmim e outros corantes com o intuito de colorir a pele e os cabelos, desde aproximadamente 5000 a.C. Com os alimentos, o interesse pelas cores não foi diferente. A prática da coloração dos produtos alimentícios remonta aos tempos mais antigos. Os primeiros registros indicam que os corantes começaram a ser utilizados em alimentos na China, Índia e Egito cerca de 1500 a.C. (ANTUNES; ARAÚJO, 2002). Até meados do século XIX, os únicos corantes disponíveis eram de origem animal, vegetal ou mineral e nessa mesma época os pigmentos naturais foram progressivamente sendo substituídos por corantes sintéticos, submetidos às disposições legais próprias de cada país.

Os corantes sejam naturais ou sintéticos, estão presentes praticamente em todos os alimentos que chegam à mesa. Isso é decorrente da cor ser uma das primeiras qualidades sensoriais pela qual os alimentos são julgados (BERZAS NEVADO *et al.*, 1995). Mais importante que este fato é a associação que o consumidor faz entre qualidade, sabor e estado de conservação com a cor do alimento (MASCRENHAS *et al.*, 1999).

Os corantes também são utilizados para conferir, restaurar ou intensificar a cor dos alimentos (ANVISA, 1977), de tal modo que os produtos industrializados tenham uma aparência próxima ao produto natural, garanta um aspecto padronizado e possibilite aumentar o número e a variedade de produtos manufaturados. O apelo publicitário usado pelas empresas do ramo também emprega armas bem conhecidas: cores atrativas, capazes de despertar o centro

do apetite no hipotálamo, e imagens que dão água na boca. A cor de um alimento pode originar uma reação imediata de aceitação, principalmente nos dias de hoje, onde há uma tendência crescente no desenvolvimento de embalagens transparentes.

A relação entre os corantes alimentícios e a saúde humana também é de interesse forense, pois se utilizados em níveis superiores aos permitidos nas legislações podem ser tóxicos e as conseqüências vão desde alergias até riscos de câncer (GENNARO *et al.*, 1994). Estudos demonstram que as evidências toxicológicas para corantes sintéticos são consideravelmente maiores que para corantes naturais devido sua complexidade química (BERZAS *et al.*, 1999). Por este motivo, os aditivos utilizados na alimentação devem estar sujeitos a um controle rigoroso para provar sua inocuidade.

O controle de qualidade e/ou toxicológico dos corantes tem sido usualmente realizado por métodos cromatográficos ou espectrofotométricos. No primeiro, características como alto custo e o envolvimento de várias etapas de extração dificultam a obtenção de uma análise rápida. No caso dos métodos espectrofotométricos, embora mais acessíveis, apresentam limitada seletividade.

A deficiência de seletividade do método espectrofotométrico decorrente das interferências espectrais que resultam em faixas de absorção amplamente sobrepostas (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 1998) pode ser contornada com a utilização de métodos de calibração multivariada através da obtenção de um modelo matemático que descreva a relação entre as respostas (absorbâncias) e as concentrações dos componentes das amostras (corantes), minimizando custo e tempo da análise.

A Tabela 1 apresenta alguns corantes sintéticos alimentícios com seus respectivos códigos E e FD&C (Federal Food, Drug and Cosmetic Act), e a Dose Diária Admitida (DDA).

Tabela 1: Lista de corantes sintéticos alimentícios.

Código E*	Nome/Cor	DDA mg/Kg de peso corporal
E102; FD&C Yellow nº 5	Tartrazina / Amarela	0-7,5
E104	Amarelo de Quinolina	0-0,75
E110; FD&C Yellow nº 6	Amarelo Crepúsculo FCF	0-2,5
E122	Vermelho Azorubina	0-2,0
E123; FD&C Red nº 2	Vermelho Amaranto	0-0,5
E124	Vermelho de Ponceau 4R	0-0,125
E127; FD&C Red nº 3	Eritrosina / Vermelho	0-2,5
E129; FD&C Red nº 40	Vermelho Allura / Vermelho	0-7
E131	Azul Patente V	0-2,5
E132; FD&C Blue nº 2	Índigo Carmim / Azul	0-5,0
E133; FD&C Blue nº 1	Erioglaucina Azul Brilhante FCF	0-12,5
E142; FD&C Green nº 3	Verde Ácido Brilhante FCF	0-5,0
E 151	Negro Brilhante BN	0-0,75

* Sistema de Identificação dos Aditivos pela ESCF (Comunidade Científica Européia para Alimentos).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Os corantes em alimentos

Um dos atributos mais importantes na comercialização dos alimentos é o impacto visual causado pela cor (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001), sendo esta propriedade muitas vezes determinante na escolha de um produto (MASCRENHAS *et al.*, 1999). De acordo com Queija *et al.* (2001), a cor é tão fundamental que é capaz de aumentar o prazer de consumir um determinado alimento.

Além das suas propriedades sensoriais, segundo Berzas *et al.* (1999) alguns corantes como Tartrazina, Azul Patente e Índigo Carmim são normalmente acrescentados ao alimento com o intuito principal de substituir o agente de coloração natural que foi perdido durante o processamento do alimento ou para reduzir a variação entre os produtos fabricados (ASHKENAZI; YARNITKY; CAIS, 1991).

Em função da sua incontestável importância, os corantes como aditivos alimentícios têm sido amplamente utilizados pela indústria em sucos, balas, guloseimas, gelatinas, refrigerantes, laticínios (KAPOR *et al.*, 2001).

Recentemente, os aditivos alimentícios têm despertado o interesse dos pesquisadores não somente pelas suas características benéficas ao processamento e venda de um determinado produto, mas também pelo seu potencial tóxico à saúde humana. Com esta finalidade, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para avaliação da toxicidade, adulteração, quantificação, confirmação da presença ou ausência em produtos alimentícios, bem como a

estabilidade dos corantes durante o processamento e a estocagem dos mesmos (GENNARO *et al.*, 1994).

2.1.1 Potencial toxicológico dos corantes alimentícios

De acordo com Antunes e Araújo (2000) muitos compostos presentes nos alimentos, sejam eles naturais, adicionados ou produzidos durante o processamento, já foram testados quanto a mutagenicidade ou antimutagenicidade em diferentes sistemas experimentais.

No início da década de 90, aproximadamente 2.700 aditivos químicos para alimentos estavam disponíveis no comércio (ZEIGER, 1993), sendo que a presença de diferentes e inúmeros compostos químicos justifica o interesse e a necessidade de se avaliar a inocuidade dos aditivos, bem como de regulamentar seu uso (ASHKENAZI; YARNITKY; CAIS, 1991).

O termo aditivo de cor pode ser aplicado a qualquer pigmento que possa ser extraído de fontes naturais (legumes, verduras, minerais, etc), ou sintetizado em laboratório (corantes artificiais), sendo que em qualquer um dos casos estas substâncias apresentam a característica de colorir alimentos, drogas e cosméticos (BERZAS NEVADO; RODRÍGUEZ FLORES; VILLASEÑOR LLERENA, 1998).

Em 1962, a Food and Agricultural Organization (FAO) e World Health Organization (WHO) designaram um comitê, conhecido por *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), para avaliar sistematicamente o potencial tóxico, a mutagenicidade e carcinogenicidade dos aditivos para alimentos. Baseado em dados experimentais, o JECFA tem a missão de

recomendar, ou não, o uso de um determinado aditivo e estabelecer o valor da Ingestão Diária Aceitável (IDA), quando necessário. A IDA indica a quantidade que pode ser ingerida diariamente e por toda a vida, não representando riscos à saúde humana, dentro dos conhecimentos atuais. Para a regulamentação interna do uso de aditivos para alimentos, muitos países possuem um órgão específico. Nos Estados Unidos, o órgão responsável é o *Food and Drug Administration* (FDA). No Brasil, a regulamentação do uso de aditivos para alimentos, inclusive dos corantes era realizada pela Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (DINAL) do Ministério da Saúde até 1990. Atualmente, esta fiscalização é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, também conhecida pela sigla ANVISA (ANTUNES; ARAÚJO, 2002).

Dados de segurança para cada corante alimentício sintético foram determinados e têm sido constantemente atualizados pela FAO/WHO. Sua utilização é estritamente controlada por leis e regulamentos (FUH; CHIA, 2002; Del GIOVINE; BOCCA, 2003) cuja proibição ou a indicação dos valores para a IDA têm sido estabelecidos em função das características de toxicidade e potencial mutagênico que cada um dos corantes apresentam, especialmente quando consumidos em grandes quantidades (BERZAS NEVADO; GUIBERTAEU CABANILLAS; CONTENTO SALCEDO, 1998).

Antunes e Araújo (2000) relatam em sua revisão uma série de estudos deste tipo. Alguns destes trabalhos demonstraram o efeito mutagênico e/ou carcinogênico de alguns corantes, tal como o corante amarelo-manteiga. Atualmente seu uso está proibido, mas há algumas décadas, ele era amplamente utilizado para dar à margarina a coloração da manteiga.

O Vermelho Amaranto é o aditivo de cor que provoca maior controvérsia quanto a sua utilização. Ele tem sido usado em alimentos desde 1908, mas em 1970 um grupo de pesquisa russo alegou o efeito carcinogênico e embriotóxico deste corante. Posteriormente, o FDA conduziu um estudo similar e confirmou os resultados, fazendo com que este aditivo fosse banido do comércio norte-americano desde 1976 (PÉREZ-URQUIZA; BELTRAN, 2000). Na Itália e França a legislação restringiu o uso deste corante, podendo ser empregado somente em caviar (GENNARO *et al.*, 1997; QUEIJA *et al.*, 2001). Por outro lado, outros países da Europa não fazem qualquer tipo de restrição, sendo que no Brasil a utilização deste corante também é permitida (GENNARO *et al.*, 1997; PRADO; GODOY, 2004).

A falta de uniformidade nas legislações nacionais provoca constantemente situações como as descritas no parágrafo anterior. Dentre os corantes artificiais permitidos no Brasil, o Vermelho Amaranto, Vermelho de Ponceau 4R, Azul Patente V e Vermelho Azorubina são proibidos nos Estados Unidos (EUA) (PRADO; GODOY, 2004; QUEIJA *et al.*, 2001).

2.1.2 Características dos corantes alimentícios: Amarelo Tartrazina e Amarelo Crepúsculo

Os corantes sintéticos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química, podendo ser do tipo azo, triarilmetano e fenilmetano, xantana, quinolina, antraquinona ou fenol. Dentre estes, um dos grupos mais importante, e

extensivamente utilizado na indústria alimentícia, são os corantes que apresentam o grupo azo, ou seja, ligações do tipo -N=N- (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

Para demonstrar a extensão do uso de corantes do tipo azo, um estudo da década de 70 estimou que o consumo médio individual anual de alimentos nos EUA era de 645kg, sendo 5,5g compostos apenas por corantes sintéticos. Desta quantidade, cerca de 85% estariam representados por Amarelo Tartrazina (AT), Amarelo Crepúsculo (AC) e Amarantho. Dentre os corantes mais utilizados é possível citar: AT e AC (na tonalidade amarela) e o Carmim, Vermelho de Ponceau 4R e Vermelho Allura (na tonalidade vermelha) (GENNARO; ABRIGO; CIPOLLA, 1994).

Fisicamente, os corantes são compostos químicos que absorvem na região UV-VIS. Esta característica é decorrente das suas estruturas químicas conterem grupos cromóforos que são tipicamente representados por estruturas aromáticas ou quinônicas unidas por ligações duplas, grupos alifáticos unidos a grupos carbonílicos por ligações duplas, grupos azo ou grupos nitro, grupos hidroxílicos ou grupos amino que podem aumentar a intensidade de absorção específica para um determinado corante (DEL GIOVINE; BOCCA, 2003).

A Figura 1 apresenta a estrutura química do corante AT. Trata-se de um corante azo constituído essencialmente por 5-hidróxi-1-(4-sulfonatofenil)-4-(4-sulfonatofenilazo)-H-pirazolo-3-carboxilato trissódico ($MM = 534,37 \text{ g mol}^{-1}$), no qual são autorizados também os sais de cálcio e potássio. Como principais componentes não corados é possível encontrar cloreto de sódio e/ou sulfato de sódio na sua composição, no entanto o teor de matérias corantes totais não deve ser inferior a 85% (DIRETIVA 95/45/CE, 1995).

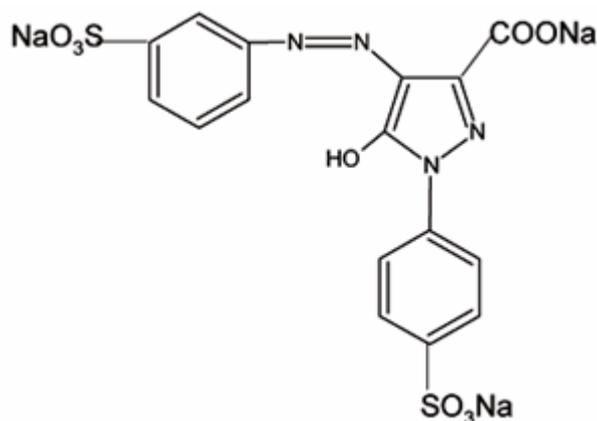


Figura 1: Estrutura do corante amarelo tartrazina.

O corante AT apresenta alta solubilidade em meio aquoso, podendo ser identificado e quantificado por espectrofotometria UV-VIS, cujo máximo de absorção localiza-se no comprimento de onda próximo a 426 nm (soluções aquosas em pH 7) (DIRETIVA 95/45/CE, 1995).

Altinöz e Toptan (2002) descrevem em seu trabalho que o corante AT pode estar presente em alimentos como bebidas, iogurtes, sorvetes, doces, geléias pós para sucos (BERZAS NEVADO; RODRÍGUEZ FLORES; VILLASEÑOR LLERENA, 1998) sendo também amplamente utilizado como aditivo em produtos cosméticos (CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 1997). Alguns estudos dos efeitos deste corante na saúde humana demonstram que ele pode produzir urticária, asma e outros desconfortos em algumas pessoas (CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 1997; QUEIJA *et al.*, 2001).

O corante AC também é um corante do tipo azo (Figura 2) constituído basicamente por 2-hidróxi-1-(4-sulfonatofenilazo) naftaleno-6-sulfonato dissódico (MM = 452,37 g mol⁻¹) no qual são autorizados também os sais de cálcio e potássio (Figura 2). Como principais componentes não corados é possível encontrar cloreto de sódio e/ou sulfato de sódio na sua composição, no entanto o

teor de matérias corantes totais não deve ser inferior a 85% (DIRETIVA 95/45/CE, 1995).

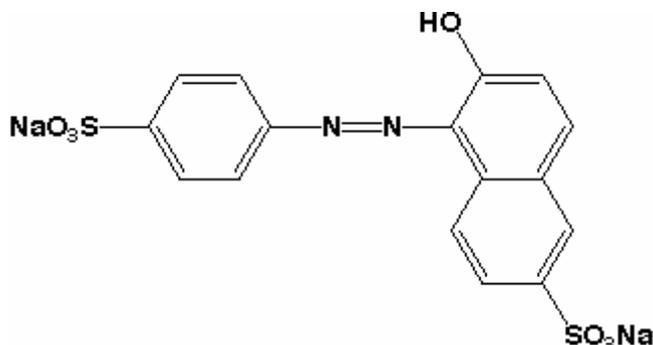


Figura 2: Estrutura do corante amarelo crepúsculo.

O corante AC apresenta alta solubilidade em meio aquoso, podendo ser identificado e quantificado por espectrofotometria UV-VIS, cujo máximo de absorção localiza-se no comprimento de onda próximo a 485 nm (soluções aquosas em pH 7) (DIRETIVA 95/45/CE, 1995).

Em um estudo realizado por Del Giovine e Bocca (2003) o corante AC foi determinado via eletroforese capilar em amostras de sorvete. Este corante também está presente em amostras de refrigerantes e sucos concentrados de limão e laranja (DOMINGUES; DIEGO; MENDEZ, 1990). Com relação aos seus efeitos na saúde humana, estudos indicam que ele pode causar reações alérgicas, urticária, vômitos e até broncoconstrição quando associado ao corante Amarantho (CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 1997; QUEIJA *et al.*, 2001).

A Tabela 2 evidencia alguns produtos e os sabores mais comuns nos quais os corantes AC e AT estão associados em produtos alimentícios comerciais brasileiros.

Tabela 2: Produtos alimentícios contendo corantes AT e AC.

Marca	Produto	Sabor	Corantes
A	Suco em pó	Limão	AT
A	Suco em pó	Laranja	AC; AT
A	Suco em pó	Manga	AC; AT
A	Suco em pó	Maracujá	AC; AT
A	Suco em pó	Pêra	AC; AT
A	Suco em pó	Abacaxi	AC; AT
B	Suco em pó	Abacaxi	AC; AT
B	Suco em pó	Laranja	AC; AT
B	Suco em pó	Lima-limão	AC; AT
B	Suco em pó	Maracujá	AC; AT
B	Suco em pó	Uva Itália	AT
B	Suco em pó	Abacaxi	AC; AT
B	Suco em pó	Carambola	AC; AT
C	Isotônico	Tangerina	AC
C	Isotônico	Laranja	AC; AT
D	Suco líquido	Laranja	AC; AT
D	Suco líquido	Abacaxi	AC; AT
E	Gelatina	Abacaxi	AC; AT
E	Gelatina light	Tangerina	AC; AT
E	Gelatina light	Pêra	AC; AT
E	Gelatina light	Maracujá	AC; AT

Dados obtidos diretamente das embalagens dos produtos disponíveis comercialmente.

2.2 Análise de corantes

2.2.1 Métodos usuais

Em função da alta demanda de utilização dos corantes e da sua necessidade de fiscalização, os métodos de avaliação destes aditivos, nas mais diversas matrizes em diferentes concentrações, têm sido rotineiramente requeridos. Tais determinações visam tanto o controle de qualidade das indústrias alimentícias e águas de rejeitos, quanto na análise destes compostos em órgãos de vigilância e controle da saúde humana. Os métodos usualmente empregados baseiam-se principalmente nos métodos cromatográficos ou nos métodos espectrofotométricos (KAPOR *et al.*,2001).

2.2.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Dentre os métodos cromatográficos, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica analítica que mais ganha espaço nas determinações destes analitos. Isto pode ser evidenciado pela coletânea de trabalhos citados no artigo de revisão dedicado especialmente à análise de corantes (naturais e sintéticos) por CLAE de Gennaro *et al.* (1994).

Recentemente, Prado e Godoy (2004) determinaram corantes artificiais em pó para gelatina comum e *diet* de vários sabores por CLAE. As amostras foram dissolvidas em água quente, centrifugadas, sendo o sobrenadante filtrado em membrana e depois injetado no cromatógrafo. Os autores verificaram que na

maioria das amostras analisadas o limite estabelecido pela legislação brasileira não foi ultrapassado.

Gennaro *et al.* (1997), empregaram o método de CLAE em fase reversa (fase estacionária C₁₈ e fase móvel água-acetonitrila em pH 6,4) para separar e quantificar corantes azo (Vermelho Azorubina, Vermelho Amaranço e Vermelho de Ponceau 4R) responsáveis pela coloração dos açúcares usados em confeitaria. Os resultados demonstraram que outros componentes da amostra, tais como açúcares e gorduras, não interferem na análise e que as amostras não continham Vermelho Azorubina.

González, Gallego e Valcárcel (2003) realizaram um estudo similar que foi publicado em duas revistas científicas distintas. O objetivo principal destes trabalhos envolve a determinação de corantes sintéticos e naturais em produtos lácteos liofilizados e em alimentos com alto teor de gordura, via CLAE. Através de um sistema automático FIA (Análise por Injeção de Fluxo) os corantes sintéticos foram previamente extraídos em fase sólida por uma coluna de algodão, enquanto os corantes naturais foram retidos em coluna de Fase Reversa (RP-C₁₈). Posteriormente a eluição de cada uma das colunas foi realizada individualmente, sendo injetada manualmente no cromatógrafo equipado com detector de fotodiodo. A técnica apresentou boa precisão com taxa de recuperação em torno de $94 \pm 4\%$.

A investigação dos componentes coloridos de vinhos tintos, as antocianinas, é usualmente realizada via CLAE. No trabalho realizado por Berente, Reichenbächer e Danzer (2001) otimizou-se e comparou-se a eficiência de separação de cinco colunas recentemente desenvolvidas para CLAE, sendo que uma delas determinou 20 antocianinas em uma única corrida cromatográfica.

Este eficiente método de separação também tem possibilitado o controle de qualidade dos próprios corantes alimentícios. É o caso do trabalho realizado por Bailey Jr. e Travis (1985) que teve como objetivo realizar um estudo preliminar da sulfonação do índigo com ácido sulfúrico para obtenção de Índigo Trisulfonado (um dos microconstituintes do corante FD&C Azul N° 2) purificado via CLAE. Amostras do corante comercial foram analisadas, e geralmente o composto em estudo apareceu em níveis inferiores a 1%.

Oka *et al.* (2002) aplicaram a Cromatografia de Contra Corrente (CCC) refinando a zona de pH para a purificação do corante alimentício Vermelho N° 106 (R-106; vermelho ácido; Color Index N° 45100). No estudo foram obtidas várias frações dos componentes do corante Vermelho N° 106, sendo o componente principal obtido com 99,9% de pureza e caracterizado via espectrometria de massa.

Embora a metodologia de CLAE seja extremamente útil nos procedimentos de quantificação, e principalmente nas separações destes aditivos alimentícios, a técnica apresenta alto custo e geralmente as amostras necessitam de pré-tratamento para torná-las compatíveis com a fase estacionária.

2.2.1.2 Eletroforese Capilar (EC)

Uma das mais recentes tendências na análise de corantes está representada pela Eletroforese Capilar (EC). Pérez-Urquiza e Beltrán (2000) aplicaram a eletroforese capilar por zona (ECZ), acoplada à detecção por fotodiodos para determinar corantes azo (AT, AC, Vermelho Amarantho, Vermelho

de Ponceau 4R, Azul Patente V e Vermelho Allura) em gêneros alimentícios como bebidas, geléias e xaropes. Dentre as vantagens apontadas pelos autores pode-se destacar: curto tempo de análise, facilidade na preparação da amostra (diluição, centrifugação, neutralização e extração), boa linearidade mesmo em níveis de ppm e boa reprodutibilidade.

Um trabalho recente compara a técnica de ECZ com CLAE, Del Giovine e Bocca (2003) analisaram amostras de sorvetes contendo AC, Vermelho Azorubina e Vermelho de Ponceau 4R, e concluíram que a EC propicia quantificações muito similares a CLAE principalmente quando comparados em termos de reprodutibilidade, sensibilidade e linearidade.

Outro estudo que compara as técnicas de ECZ com CLAE foi proposto por Berzas Nevado, Guilberteau Cabanillas e Contento Salcedo (1999) para a separação e determinação de sete corantes. Um trabalho de otimização do processo de separação foi realizado, sendo o método desenvolvido rápido e sensível (limite de detecção variando de 0,35 a 2,12 mg L⁻¹), podendo ser aplicado para análise quantitativa em alimentos e amostras de bebida com resultados muito similares aos obtidos por CLAE.

Huang *et al.* (2003) descrevem em seu trabalho uma técnica que combina um método de concentração em capilar para amostras de grande-volume e a alta eficiência de separação da EC. Este estudo visa análise e detecção de corantes em diversas amostras de alimentos como: refrigerantes, geléias e bebidas lácteas. Segundo os autores após otimização do processo de separação, esta técnica reduziu significativamente os limites de detecção de oito corantes por até duas ordens de magnitude quando comparada a técnica com o vaso capilar convencional.

Embora a EC possa ser considerada como o estado da arte nas quantificações dos corantes, trata-se de uma técnica de custo elevado sendo pouco difundida (principalmente quando comparada à espectrofotometria), necessitando de um acompanhamento técnico especializado durante sua utilização.

2.2.1.3 Métodos Eletroanalíticos

Os métodos eletroanalíticos, embora apresentem alta sensibilidade, não são usualmente empregados na análise de corantes, uma vez que sofrem problemas de interferência de matriz. Kapor *et al.* (2001) otimizaram um procedimento para análise de Índigo Carmim e Tartrazina via voltametria de redissolução catódica, em suco artificial em pó e balas. Um trabalho semelhante foi realizado por Combeau *et al.* (2002), cujo objetivo foi a identificação e determinação simultânea de Vermelho Azorubina, Vermelho Allura e Vermelho de Ponceau 4R via polarografia de pulso diferencial em amostras de refrigerantes. Em ambos os casos, as determinações quantitativas foram realizadas via adição de padrão, para evitar os problemas de interferência já citados e os resultados obtidos demonstram que a técnica é precisa e rápida não requerendo um pré-tratamento demorado das amostras.

A determinação de AC e AT via polarografia de pulso diferencial foi realizada por Becerro Dominguez, Gonzalez Diego e Hernandez Mendez (1990). Neste trabalho o comportamento eletroanalítico dos dois corantes em presença de polivinilpirrolidina (PVP), foi estudado em amostras de refrigerantes e de sucos

concentrados de limão e laranja. Foi observado que em pH 10,0 é possível determinar AC na presença de até 10 vezes mais AT. Enquanto a determinação de AT na presença de AC só foi possível em pH 1,6 e quando a razão AC/AT é menor que 1.

Ashkenazi e Yarnitzky (1991) descrevem um sistema com coluna de extração em fase sólida (DC-SPE) para separação e concentração de cinco corantes sintéticos alimentícios a serem analisados via voltametria de onda quadrada. Os resultados obtidos foram comparáveis àqueles produzidos pela CLAE demonstrando que o sistema desenvolvido apresenta-se como um método útil, simples e rápido para monitorar corantes sintéticos em alimentos.

2.2.1.4 Métodos espectrofotométricos

Embora os métodos espectrofotométricos apresentem baixa seletividade, a literatura demonstra que se trata da técnica mais utilizada na determinação destes aditivos alimentícios. Altinöz e Toptan (2002) descreveram o emprego desta técnica, associada a duas metodologias matemáticas (derivada da razão de espectros e Método da Aditividade), para determinar simultaneamente AT e Vermelho de Ponceau 4R em alimentos que contêm sacarose e ácido cítrico. Os resultados obtidos foram comparados ao método CLAE e não foi encontrada diferença estatística significativa entre estas metodologias.

Outro trabalho de espectrofotometria similar foi realizado por Berzas Nevado *et al.* (1995). O processamento matemático via primeira derivada da razão de espectros foi utilizado na determinação simultânea de Vermelho

Amaranto, Vermelho de Ponceau 4R e Ácido Carmínico em diferentes produtos alimentícios comerciais. Os dados de linearidade (Ácido Carmínico até 64 mg L^{-1} , Vermelho Amaranto e Vermelho de Ponceau 4R até 32 mg L^{-1}) e parâmetros analíticos foram concordantes com àqueles obtidos por CLAE.

Zeng *et al.* (1993) utilizaram um algoritmo matemático para analisar simultaneamente de forma quantitativa e qualitativa os seguintes corantes: Vermelho Amaranto, Vermelho de Ponceau 4R, AT, AC, Índigo Carmim e Azul Brilhante. Estes aditivos foram previamente extraídos de balas, refrigerantes e geléias. O método proposto não requer o conhecimento prévio dos corantes presentes na amostra, além de possibilitar analisá-los simultaneamente. A metodologia de extração foi certificada verificando-se a taxa de recuperação destes corantes quando adicionados às amostras reais.

O Método de Adição de Padrão no Ponto-H (HPSAM) é uma outra possibilidade na determinação de misturas ternárias de corantes como descrito por Ni, Qi e Kokot (2001) na análise de AC, AT e Vermelho de Ponceau 4R. Neste método, a concentração de um dos corantes é calculada a partir da sobreposição espectral em dois comprimentos de onda (pré-definidos pela razão dos espectros dos outros dois corantes) onde ocorra uma relação de absorbância igual dos corantes interferentes. Geralmente, estes pares de comprimentos de onda são facilmente selecionados propiciando um resultado analítico com melhor precisão. De acordo com os autores, o HPSAM pode ser satisfatoriamente aplicado a espectros UV-VIS de corantes alimentícios com alta sobreposição espectral.

Um método espectrofotométrico rápido para a análise de corantes alimentícios sintéticos foi utilizado por Hofer e Jenewein (1997). A metodologia sugere a extração dos corantes por adsorção em lã e utiliza a análise de

regressão linear. Basicamente, realiza-se uma comparação computacional de medidas do espectro UV-VIS do corante com umas séries de espectros de referência. O espectro calculado (aquele com melhor ajuste ao espectro medido) é obtido dos espectros de referência por meio de análise de regressão linear. Assim, os corantes alimentícios presentes na amostra são obtidos do cálculo dos parâmetros da análise de regressão linear. O método foi testado com misturas de corantes puros e amostras de alimentos coloridas artificialmente, sendo similares os valores calculados e os valores medidos para os espectros.

Em função da baixa seletividade dos métodos espectrofotométricos, a análise de misturas de corantes normalmente é acompanhada de um pré-tratamento matemático para posterior quantificação, como é descrito por Langhals (2002); Ni, Qi e Kokot (2001). No entanto, em determinações quantitativas simultâneas de corantes que apresentam alta sobreposição espectral, os resultados podem ficar altamente comprometidos.

2.2.1.4.1 Método de aditividade espectrofotométrica

Para a realização de uma análise espectrofotométrica é necessário conhecer o espectro de absorção da amostra que se quer determinar. Isto é feito para se definir qual o comprimento de onda da radiação incidente que causará o máximo de absorção pela espécie a ser determinada e assim obter-se a melhor sensibilidade na sua quantificação (BERBERAN-SANTOS, 1990).

As determinações quantitativas podem ser realizadas quando a radiação incidente é monocromática, através da Lei de Beer. Nela, a absorbância (A) é

diretamente proporcional ao comprimento do caminho óptico (**b**), (geralmente constante) e a concentração da espécie absorvedora (**c**), conforme Eq. 01 (LYKOS, 1992). Onde ϵ é uma constante de proporcionalidade denominada absortividade.

$$\mathbf{A = \epsilon bc} \qquad \mathbf{Eq. 01}$$

Uma outra característica particular da Lei de Beer é a aditividade das absorbâncias. Em muitos casos, é possível determinar simultaneamente duas ou mais espécies diferentes presentes numa amostra, utilizando esta mesma lei. Teoricamente, isto pode ser realizado desde que não ocorra nenhuma interação entre as espécies e que o espectro de absorção observado pela mistura seja a soma dos espectros individuais que seriam obtidos caso cada uma das espécies estivesse presente sozinha na solução e sob as mesmas condições experimentais. Na prática, estas condições ideais não ocorrem, mas mesmo assim, ainda é possível a determinação de espécies químicas em uma mistura. Neste caso, segundo Lykos (1992) para cada comprimento de onda, a absorbância total devido às espécies presentes na solução pode ser expressa como a soma das absorbâncias de cada uma delas: (Eq. 02)

$$\mathbf{A_{\lambda i} = \sum A_{\lambda n} = b \sum \epsilon_n c_n} \qquad \mathbf{Eq. 02}$$

Para o caso particular de duas substâncias, as equações simultâneas Eq. 03 e 04 podem ser obtidas para representar um sistema como mostrado pela Figura 3.

$$A_{\lambda_1} = A_{1(\lambda_1)} + A_{2(\lambda_1)} = \epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2 \quad \text{Eq. 03}$$

$$A_{\lambda_2} = A_{1(\lambda_2)} + A_{2(\lambda_2)} = \epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2 \quad \text{Eq. 04}$$

Onde A_{λ_1} e A_{λ_2} são os valores de absorvância medidos em dois comprimentos de onda diferentes (correspondentes aos máximos de absorção de cada uma das espécies de interesse) λ_1 e λ_2 , e os índices 1 e 2 representam dados para cada uma das duas substâncias (Figura 3).

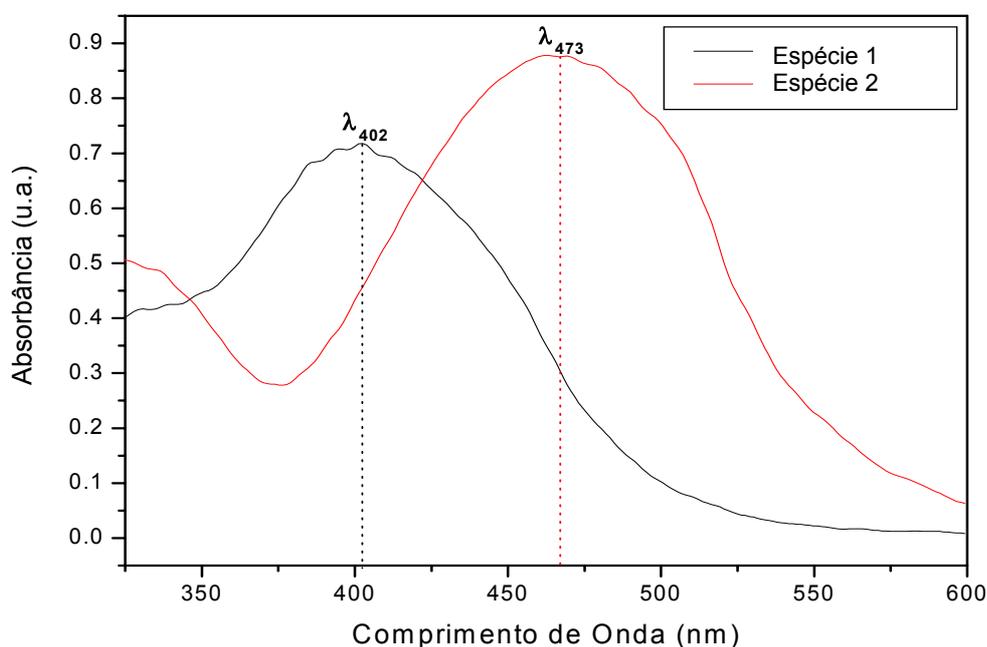


Figura 3: Ilustração do método da aditividade espectrofotométrica.

Queija *et al.* (2001) determinaram vários corantes sintéticos em amostras de alimentos que incluíam: pastilhas mastigáveis de três formas e várias cores, balas com recheio de chocolate, balas de goma, gelatinas utilizando o método da aditividade, descrito nesta seção. Os resultados apresentados demonstraram que as quantidades encontradas dos diversos corantes estavam dentro dos limites estabelecidos pela legislação, no entanto, foi detectada a presença de corantes que eram proibidos em muitos países da União Européia.

2.2.1.4.2 Método da primeira derivada

De acordo com Özgür, Alpdogan e Koyuncu (2002) um problema analítico clássico é a determinação simultânea de dois ou mais compostos em uma mesma amostra sem prévia separação química. Deste modo, a espectrofotometria derivativa é uma técnica analítica de grande utilidade e que oferece maior seletividade resolvendo problemas de sobreposição espectral, embora produza uma considerável perda de precisão e sensibilidade. A perda de qualidade destes dois parâmetros analíticos é decorrente das medidas serem realizadas em comprimentos de onda muito críticos, cuja localização pode ser difícil, algumas vezes podem não existir ou serem extremamente próximos para as espécies de interesse (ÖZGÜR; BOZDOGAN; ERÇAG, 2001).

A espectrofotometria derivativa consiste na representação das derivadas da absorbância em relação ao comprimento de onda ($dA/d\lambda$), em função do comprimento de onda. A diferenciação da lei Lambert-Beer permite obter as Equações 05, 06 e 07 que mostram que as derivadas $dnA/d\lambda n$ são sempre proporcionais às concentrações do analito (c), sendo as aplicações analíticas baseadas neste fato (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

$$dA/d\lambda = c b (d\varepsilon/ d\lambda) \quad \text{Eq. 05}$$

$$d^2A/d\lambda^2 = c b (d^2\varepsilon/d\lambda^2) \quad \text{Eq. 06}$$

$$dnA/d\lambda n = c b (dn\varepsilon/ d\lambda n) \quad \text{Eq. 07}$$

A derivação dos espectros não aumenta o conteúdo de informações do espectro original, no entanto permite uma interpretação mais completa do mesmo,

pois evidencia com maior clareza seus máximos, mínimos e pontos de inflexão, desde que seja possível localizá-los (FARHAT; ABRIL; GALÁN, 2003).

A determinação de misturas binárias de corantes utilizando métodos derivativos apresentou resultados satisfatórios em um estudo realizado por Berzas Nevado, Rodriguez Flores e Vilaseñor Llerena (1994) que compararam o método da 1ª derivada com o método da 1ª derivada da razão espectral, sendo este último o que apresentou os melhores resultados para misturas sintéticas.

Özgür, Alpdogan e Koyuncu, (2002) determinaram AC e Eritrosina na forma pura e em tabletes utilizando espectrofotometria UV-VIS e o método da 1ª derivada da razão espectral. Os resultados obtidos foram comparados à determinação via CLAE e os resultados foram similares.

2.2.2 Método de Calibração Multivariada

A quimiometria é uma área da química que utiliza ferramentas matemáticas e estatísticas (FERREIRA *et al.*, 1999) para desenvolver metodologias multivariadas que extraiam informações de espectros, cromatogramas, parâmetros físicos, ou qualquer conjunto de medidas de uma mesma amostra que apresentem baixa seletividade (BEEBE; KOWALSKI, 1987). Estas metodologias também permitem identificar qualitativamente as espécies presentes e quantitativamente aquelas que são de real interesse (SCARMINIO *et al.*, 1998).

Nas situações mais simples, modelos lineares como $y = a + x \cdot b$ são utilizados para expressar a relação entre uma medida única (y) de um instrumento (por ex.: absorvância de uma solução diluída em um único comprimento de onda),

e a concentração (\mathbf{x}) do analito. Tipicamente, são obtidas medidas instrumentais de espécimes nas quais a concentração do analito é determinada por algum tipo de ensaio preciso, independente e de forma inerente (por ex.: análise química via úmida). Estes dados (\mathbf{x}) são utilizados junto com as medidas instrumentais (\mathbf{y}) para construir um modelo que definia \mathbf{a} e \mathbf{b} a partir da melhor correlação conseguida entre a concentração do analito e as medias instrumentais. Este modelo é então usado para predizer a concentração do analito associados às amostras futuras baseadas somente nas medidas instrumentais (THOMAS, 1994).

No entanto, existem muitos casos em que o modelo linear não deve ser empregado. Na análise quantitativa cujos componentes apresentam espectros superpostos a determinação pode ser feita com a utilização de métodos matemáticos e estatísticos multivariados (FERREIRA *et al.*, 1999).

A base da calibração multivariada é estabelecer uma relação entre duas matrizes ou blocos de dados químicos, quando houver uma dependência entre as propriedades que descreve cada uma delas. A calibração multivariada consiste basicamente de duas fases: a calibração e a previsão. Na fase de calibração, “n” espectros para um conjunto de amostras com composição conhecida são obtidos em “p” valores de comprimentos de onda diferentes, formando uma matriz \mathbf{X} , com “n” linhas e “p” colunas. Também uma matriz \mathbf{Y} pode ser formada contendo “n” linhas com os valores de concentração correspondendo às diferentes amostras, “q” colunas, indicando o número de diferentes analitos presentes nas amostras. O próximo passo é desenvolver um modelo matemático apropriado (determinando o vetor dos coeficientes de regressão – \mathbf{b}) que melhor possa reproduzir \mathbf{Y}_{cal} a partir dos dados da matriz \mathbf{X}_{cal} (Eq.08). Esse modelo é utilizado na fase de previsão

(com um conjunto teste) para estimar as concentrações (Y_{prev}) dos constituintes de novas amostras, a partir de seus espectros (X_{teste}) (Eq.09). Como estas metodologias trabalham com matrizes de dados, o processo de isolar o fator Y da Eq.08 para obtenção da Eq.09, implica na utilização da matriz transposta de X , ou seja, $(X_{teste})^t$.

$$X_{cal} = b * Y_{cal} \quad \text{Eq. 08}$$

$$Y_{teste} = (X_{teste})^t * b \quad \text{Eq. 09}$$

Os dados para a calibração multivariada podem ser organizados conforme demonstrado na Figura 4. Os valores absorvância (ABS) dos espectros, a cada valor de comprimento de onda (nm), são as variáveis independentes, e as concentrações dos analitos nas amostras, as variáveis dependentes (NAGATA *et al.*, 2000).

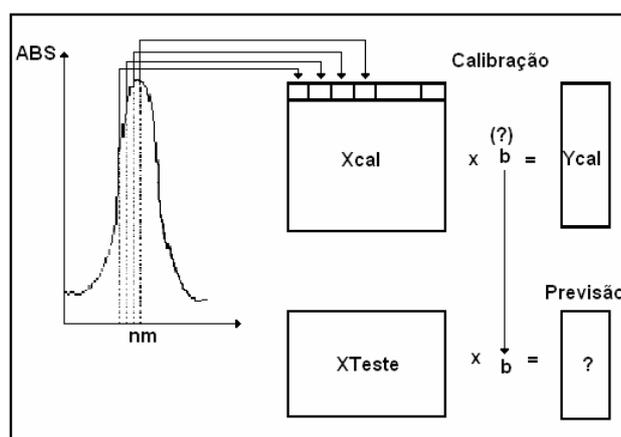


Figura 4: Organização dos dados para calibração multivariada.

Atualmente, grande parte das análises de multicomponentes simultâneas utilizando a espectroscopia de absorção molecular tem sido realizada usando

diferentes métodos de estatística multivariada. Esses métodos levam à construção de modelos matemáticos que se ajustam aos dados obtidos experimentalmente e incluem métodos de classificação (K-ésimos Vizinhos Mais Próximos - KNN), de exploração de dados (Análise por Componentes Principais - PCA, Análise Hierárquica de Agrupamentos - HCA), e também métodos de análise quantitativa (Regressão por Mínimos Quadrados Clássicos - CLS, Regressão por Componentes Principais - PCR, Regressão por Mínimos Quadrados Parciais – PLSR), sendo estes últimos de especial interesse para os químicos analíticos (SALDANHA *et al.*, 1999).

2.2.2.1 Transformação de Dados

No caso dos procedimentos de transformação de dados, os métodos matemáticos empregados são orientados às linhas da matriz de dados X . As técnicas mais comuns de transformação de dados são:

- Primeira e segunda derivada (para compensar o aumento de linha base e melhorar a separação de sinais não totalmente sobrepostos)
- Alisamento (diminuição de ruído)
- Log 10 (para enfatizar sinais com baixas intensidades)
- Normalização (diminui o efeito das diferenças amostrais) (PIROUETTE User Guide, 1990 - 2003).

2.2.2.2 Pré-Processamento de Dados

O procedimento de pré-processamento de dados, por sua vez, é orientado as colunas da matriz de dados, sendo usualmente aplicado tanto nas variáveis independentes (matriz X) quanto nas variáveis dependentes (matriz Y) (THOMAS, 1994; PIROUETTE User Guide, 1990 - 2003).

Dados centrados na média: Este é o tipo de pré-processamento de dados mais simples e comum, amplamente utilizado nos dados de espectroscopia. Basicamente, subtrai-se o valor de cada elemento da coluna (x_{ij}) pelo valor médio dos elementos dessa coluna (\bar{x}_j), obtendo-se como resultado, uma matriz onde todas as colunas têm média zero. Este procedimento facilita a visualização dos dados (translada o sistema de origem até o centro do conjunto de dados) (THOMAS, 1994).

$$\bar{x}_j = \frac{1}{n} \sum_i^n x_{ij} \quad \text{Eq. 10}$$

$$x_{ij(\text{cm})} = x_{ij} - \bar{x}_j \quad \text{Eq.11}$$

2.2.2.3 Análise por Componentes Principais (PCA)

Grande parte dos métodos multivariados modernos estão fundamentados na Análise de Componentes Principais (PCA). Trata-se de uma importante ferramenta de compressão de dados que permite a redução da dimensionalidade original, sem que haja perda de informação relevante (KATEMAN *et al.*, 1993; MARTENS; NAES, 1989; THOMAS, 1994). Para ilustrar a facilitar a visualização

dos principais aspectos envolvidos no PCA, um conjunto constituído por 35 amostras que se distribuem de maneira tridimensional será utilizado (Figura 5).

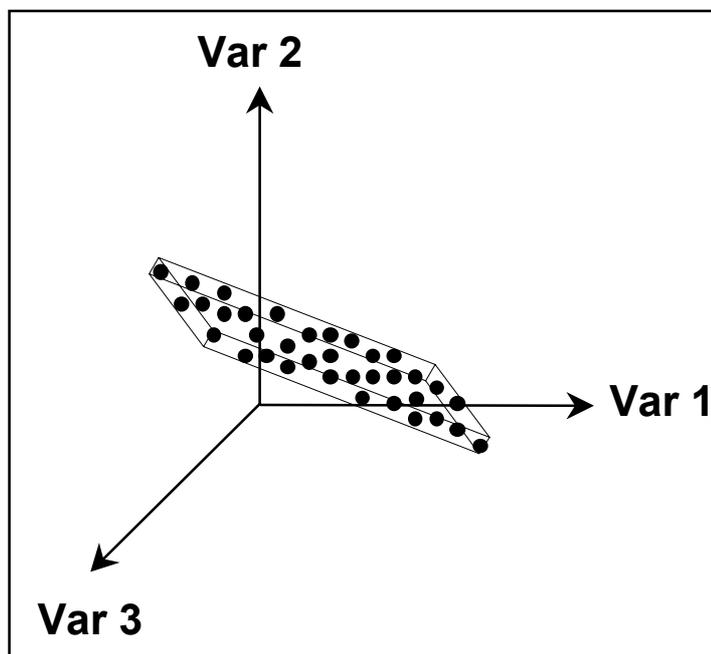


Figura 5: Gráfico tridimensional do conjunto de dados composto por 35 amostras.

Cada uma destas dimensões pode representar uma variável ou medida, no nosso caso particular, valores de absorbância registradas em três valores de comprimento de onda.

Uma análise mais minuciosa desta ilustração indica que todo o conjunto amostral pode ser delimitado por uma caixa retangular, cuja maior particularidade está representada por uma pequena altura. Em primeira análise, observa-se também que nenhuma das variáveis (Var 1, Var 2 e Var 3) descreve uma parcela importante da variância apresentada pelos dados.

Em função destes aspectos, e principalmente da característica mais fundamental do PCA (redução do espaço dimensional), uma rotação e/ou transformação dos eixos originais é realizada. Este novo sistema de eixos (mais

comumente denominados como fatores, componentes principais, ou ainda variáveis latentes) apresenta a direção da máxima variância dos dados, conforme pode ser observado na Figura 6-A (FERREIRA *et al.*, 1999).

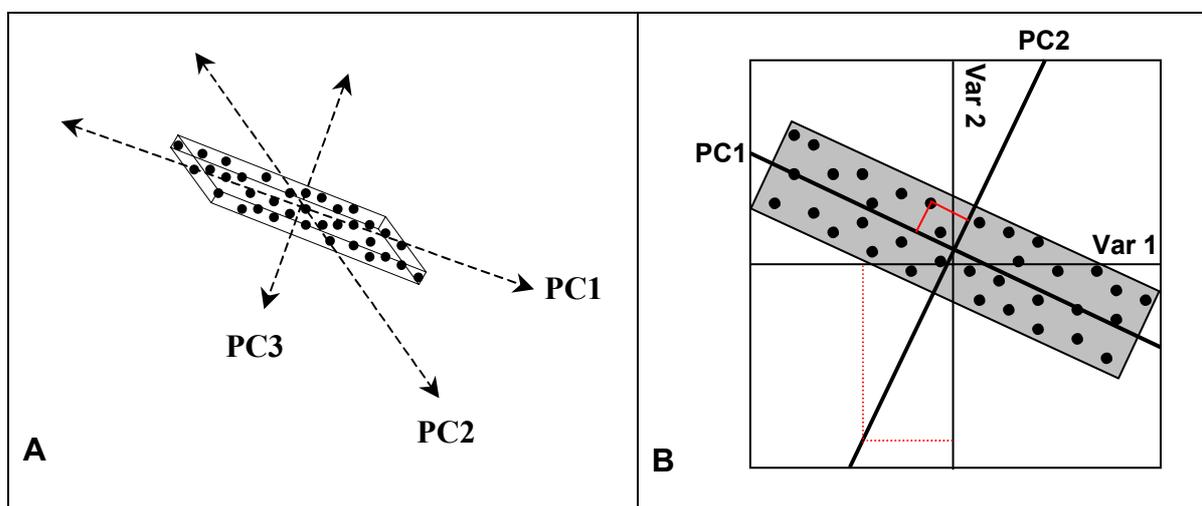


Figura 6: A. Gráfico tridimensional ilustrando os eixos das componentes principais; B. Gráfico bidimensional da PC1 vs PC2: Scores representados por (—) e Loadings por (.....)

A primeira componente principal (PC1) tem a direção que descreve a máxima dispersão das amostras, sendo responsável pela explicação de grande parte da variância apresentada pelo conjunto. No entanto, apenas esta componente principal não é suficiente para explicar o comportamento global deste conjunto de dados, sendo necessária uma segunda componente (PC2), a qual deve ser ortogonal a primeira e responsável pela explicação de uma parcela importante da variância observada. Em princípio, é possível extrair tantas componentes principais quanto o número de variáveis. No entanto, dada à baixa variabilidade dos dados em torno da terceira componente principal (PC3), é possível que esta seja descartada. Este procedimento atende às duas grandes

premissas do PCA, ou seja, a redução de variáveis, sem perda de informação relevante (FERREIRA *et al.*, 1999; KATEMAN *et al.*, 1993).

Em termos analíticos instrumentais, esta redução do espaço dimensional, conseguido através da seleção de poucas componentes principais, possibilita remover o ruído instrumental (ou variações aleatórias), bem como as informações redundantes fornecidas por variáveis altamente correlacionadas (colinearidade).

A aplicação do PCA propicia a obtenção de duas novas informações extremamente úteis: os *escores* e os *pesos* (Figura 6B). Os *escores* são as novas coordenadas das amostras, no novo sistema de eixos das componentes principais. Como cada componente principal é construída pela combinação linear das variáveis originais, os *pesos* são os coeficientes desta combinação, ou seja, trata-se da influencia que cada variável original contribui para a obtenção do novo sistema de eixos (FERREIRA *et al.*, 1999).

2.2.2.4 Regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR)

A base do método dos mínimos quadrados parciais (PLS) está na decomposição de uma matriz de dados \mathbf{X} , em termos da soma de várias matrizes \mathbf{M}_i , que não podem mais ser expandidas, mais uma matriz de erros (que corresponde à parte não modelada de \mathbf{X}). As matrizes \mathbf{M}_i constituem os chamados componentes principais e são formadas pelo produto de dois vetores, \mathbf{t} ou \mathbf{T} (os *escores*) e \mathbf{p} ou \mathbf{P} (os *pesos*):

$$\mathbf{X} = \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_2 + \dots + \mathbf{M}_a + \mathbf{E}$$

$$\mathbf{X} = t_1\mathbf{p}_1 + t_2\mathbf{p}_2 \dots + t_a\mathbf{p}_a + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 12}$$

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E}$$

A dimensionalidade do espaço original é igual ao número de colunas em \mathbf{X} , ou seja, o número de variáveis originais. No novo modelo, a dimensionalidade é descrita pelo número de matrizes \mathbf{M}_i necessárias para descrever \mathbf{X} . Assim, se for possível descrever uma matriz \mathbf{X} que tenha muitas variáveis, por um número pequeno dessas matrizes \mathbf{M}_i , haverá um decréscimo na dimensionalidade, sem perda de informação.

No caso do PCR, apenas a matriz \mathbf{X} sofre a decomposição em termos de \mathbf{T} e \mathbf{P} , sendo a matriz de *escores* relacionada diretamente com a matriz \mathbf{Y} . No PLS, tanto a matriz \mathbf{X} (das variáveis independentes) como a matriz \mathbf{Y} (das variáveis dependentes) são representadas pelos *escores* \mathbf{T} ou \mathbf{U} e *pesos* \mathbf{P} ou \mathbf{Q} : (exceção deve ser feita no caso da matriz \mathbf{Y} ser uma matriz coluna),

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 13}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{F} \quad \text{Eq. 14}$$

Uma relação entre as duas matrizes de dados \mathbf{X} e \mathbf{Y} pode ser construída correlacionando-se os *escores* de cada bloco, através de um coeficiente de proporcionalidade \mathbf{b} , utilizando um modelo linear:

$$\mathbf{U}_a = \mathbf{b}_a t_a \quad \text{Eq. 15}$$

$$\mathbf{U} = \mathbf{b}'\mathbf{T} \quad \text{Eq. 16}$$

Métodos de calibração multivariada têm sido utilizados com bastante freqüência e sucesso na resolução de problemas de interferência espectral, principalmente associados a outras técnicas analíticas (GARRIGUES *et al.*, 1995; MARTENS *et al.*, 1986; MARTÍNEZ GALERA *et al.*, 1997; PASQUINI, 2003; PERALTA-ZAMORA *et al.*, 1998; SENA *et al.*, 2000).

2.2.3 Emprego das técnicas de Calibração Multivariada

Munck *et al.* (1998) descrevem em seu trabalho a importância da quimiometria na ciência dos alimentos como uma ferramenta para a interpretação de resultados, assim como no controle de qualidade de produtos e matérias-primas. Alguns exemplos de aplicações deste tipo podem ser destacados, tais como:

- Avaliação da pureza do açúcar produzido no processo de manufatura a partir de beterraba utilizando espectrofotometria e quimiometria, empregando-se a técnica de PCA, PLSR (MUNCK *et al.*, 1998).
- Determinação quantitativa de glicose, frutose e maltose em xaropes de glicose via espectrofotometria de infravermelho (IV) médio e PLSR. (DUPUY *et al.*, 1993).
- Avaliação da correlação entre a qualidade sensorial de ervilhas e dados espectroscópicos de IV próximo via PCA (MARTENS; MARTENS, 1986).
- Classificação de amidos de milho modificado via IV médio associado a PCA (DUPUY *et al.*, 1997).

Peralta-Zamora *et al.* (1998) determinaram simultaneamente corantes orgânicos usualmente empregados na indústria têxtil (Vermelho Reativo 195, Amarelo Reativo 145 e Laranja Reativo 122) utilizando espectrofotometria UV-VIS combinada ao método de calibração multivariada PLSR. Os resultados obtidos mostraram-se significativamente melhores quando comparados à utilização do método univariado.

Na indústria cosmética também se aplica a metodologia multivariada associada à espectrofotometria para a determinação de misturas de corantes como descrito por Capitán-Vallvey *et al.* (1997). De acordo com os autores o problema de sobreposição espectral pode ser resolvido aplicando o método de análise PLSR. As metodologias PLSR1 e PLSR2 empregadas na análise dos corantes: Amarelo de Quinolina, AC, AT e Azul Brilhante em produtos cosméticos, permitiram a obtenção de resultados satisfatórios.

A aplicação destas metodologias multivariadas em corantes de interesse à indústria alimentícia também tem se mostrado propícia. Determinação espectrofotométrica de Vermelho Allura (na presença de outros corantes) em pós para sucos, utilizando o PLSR sem nenhum tratamento prévio de dados foi realizada por Lopez-de-Alba *et al.* (1996). Os resultados obtidos por PLSR foram comparados com o método espectrofotométrico oficial, confirmando a eficiência do modelo multivariado na eliminação de algumas interferências que acontecem em determinações espectrofotométricas.

Com o objetivo de comparar as diversas metodologias matemáticas multivariadas Ni e Gong, (1997) realizaram análises simultâneas por espectrofotometria de AT, AC, Vermelho de Ponceau 4R, Vermelho Amaranto e Azul Brilhante. Dezesesseis misturas contendo diferentes concentrações dos

corantes de interesse foram analisadas e seus dados espectrais (sem transformação, com primeira ou segunda derivada) foram processados empregando-se CLS, PCR, PLSR e Análise de Fator com Transformação Interativa (ITFFA). Os resultados obtidos indicam que a ITFFA propicia previsões mais precisas do que os outros métodos de calibração multivariada, sendo que nenhuma diferença significativa foi observada entre os métodos PCR e PLSR.

Dois trabalhos similares foram publicados por Berzas Nevado *et al.* (1999) e Berzas *et al.* (1999). Em ambos foi estudada a determinação simultânea de AT, Azul Patente V e Índigo Carmim em produtos comerciais via espectrofotometria UV-VIS. No primeiro, os problemas de interferência espectral foram tratados aplicando-se PLSR e PCR, e os resultados mostraram-se bem satisfatórios. A reprodutibilidade também foi investigada para cada corante, não apresentando diferença significativa ao nível de 95% de confiança (BERZAS NEVADO *et al.*, 1999). No segundo trabalho a determinação foi em amostras de produtos comerciais alimentícios (cereja em calda, gelatina e corante de confeitaria) no qual uma complementação da proposta anterior foi apresentada. Nela, os métodos de calibração multivariada PLSR e PCR foram comparados a metodologias convencionais na determinação espectrofotométrica de corantes: primeira derivada dos dados originais, e primeira derivada da razão dos espectros. Os resultados indicam que todas as metodologias podem ser empregadas para solucionar os problemas de sobreposição de sinais, e em termos de reprodutibilidade nenhuma diferença significativa ao nível de 95% de confiança foi encontrada para as quatro metodologias empregadas (BERZAS *et al.*, 1999).

Özgür *et al.* (2001) compararam dois métodos para a análise simultânea de antocianinas e Vermelho 4R em amostras de gelatina via espectrofotometria UV-VIS. Os métodos empregados foram a 2ª derivada espectrofotométrica e o método de calibração multivariada PLSR2. Ambos os métodos foram considerados adequados, no entanto o PLSR2 apresentou maior precisão quando comparado ao método da 2ª derivada.

Os métodos de calibração multivariada, (PLSR1 e PLSR2) e Análise por Componentes Principais (PCR) foram aplicados à análise simultânea de três corantes: AC, AT e Vermelho de Ponceau 4R, via espectrofotometria UV-VIS. Amostras de gelatinas (sabor abacaxi e tropical) e uma sobremesa cremosa (sabor baunilha) contendo os três corantes foram submetidas à análise sem etapa prévia de separação. Em termos gerais, resultados similares foram obtidos na análise destes corantes para todos os métodos multivariados empregados, estendendo-se esta concordância para os resultados obtidos via CLAE (BERZAS NEVADO; RODRIGUEZ FLORES; VILLASEÑOR LLERENA, 1998).

3 OBJETIVOS

Desenvolver uma nova metodologia no controle de qualidade de uma mistura binária de corantes largamente empregados na indústria alimentícia: AT e AC. Em função da forte sobreposição espectral destes corantes, aplicar-se-ão metodologias de calibração multivariada, basicamente PCR e PLSR, aos dados espectrofotométricos UV-VIS.

Dentre os objetivos pontuais é possível destacar:

- Definir a estabilidade dos corantes AT e AC no meio em que será realizada a eluição dos mesmos;
- Determinar o fator de recuperação dos corantes AT e AC no processo de adsorção em lã natural;
- Construir o conjunto de calibração e validação a partir de misturas sintéticas;
- Aplicar o princípio da aditividade espectrofotométrica e avaliar os resultados para o conjunto de validação;
- Desenvolver modelos fundamentados na primeira derivada e avaliar os resultados para o conjunto de validação;
- Desenvolver e otimizar os modelos de calibração multivariada (PCR e PLSR);
- Escolher dentre as metodologias quantitativas àquela de melhor desempenho analítico;
- Realizar o controle de qualidade dos corantes AT e AC empregados em produtos comerciais, comparando-se os dados com as quantidades

permitidas pela legislação brasileira e analisando-se diferenças entre os lotes de fabricação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados no preparo de soluções (estudo de estabilidade e recuperação dos corantes, retas analíticas, conjunto de calibração contendo misturas sintéticas binárias) e nos procedimentos de extração e eluição dos corantes em produtos alimentícios foram de grau analítico P.A. A água destilada utilizada para o preparo e diluição das soluções foi obtida através de um destilador de vidro.

Os padrões de corantes sintéticos AT e AC foram gentilmente cedidos pela Kerry do Brasil Ltda e Alimentas Engenharia & Tecnologia Ltda.

A lã natural (Pingouin) empregada para a extração dos corantes das matrizes alimentícias foi adquirida com recursos próprios.

4.2 Matéria-prima

As matrizes alimentícias foram todas adquiridas em supermercados locais. Em função da grande diversidade de produtos contendo a mistura binária AT e AC, foram escolhidos quatro diferentes produtos: gelatina em pó (sabor abacaxi), suco em pó (sabor laranja), isotônico (sabor laranja) e bebida líquida (sabor abacaxi). Para cada tipo de matriz foram analisados três lotes diferentes identificados pela data de fabricação constante na embalagem.

4.3 Instrumentação

- Balança Analítica Scientech (Modelo SA210).
- Micropipeta Eppendorf de volume variável no intervalo de 500-5000 μL .
- Micropipeta Brand de volume variável no intervalo de 100-1000 μL .
- Medidas espectrofotométricas com finalidade quantitativa foram realizadas em um espectrofotômetro UV-VIS SCINCO, modelo S1150 com resolução de 1,44 nm.
- Medidas espectrofotométricas com finalidade qualitativa foram realizadas em um espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu, modelo Multispec 1501 com resolução de 1,30 nm.
- Computador AMD Athlon™.

4.4 Programas Computacionais

- Microcal OriginPro™ (versão 6.1): Transformação dos dados espectrais em formato ASCII, leituras de absorbância para aplicação do princípio da aditividade, primeira derivada e alisamento dos espectros para obtenção de modelos fundamentados na primeira derivada.
- Matlab for Windows (versão 4.0) com a rotina PLS Toolbox (versão 1.5): Construção e validação dos modelos multivariados, com posterior previsão das concentrações dos corantes de interesse em matrizes alimentícias.

4.5 Estabilidade dos Padrões Sintéticos em meio básico tamponado

Para o preparo da solução estoque de AT uma massa de 0,0500 g do corante foi dissolvido em solução tampão pH 10 ($\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$) e diluído a um volume de 10,0 mL em balão volumétrico. Desta solução transferiu-se com o auxílio de uma pipeta volumétrica 1,0 mL para balão de 200 mL e elevou-se o volume com a solução tampão pH 10, obtendo-se uma solução de concentração igual a 25 mg L^{-1} . Alíquotas de 15,0 mL foram transferidas para frascos plásticos e submetidos às condições descritas posteriormente.

Para o corante AC adotou-se o mesmo procedimento obtendo-se uma solução estoque de 0,0530 g em 10,0 mL de solução tampão pH 10. Uma alíquota de 0,80 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 200 mL e a concentração final obtida foi igual a $21,2 \text{ mg L}^{-1}$.

Para o estudo de perfil de estabilidade dos corantes AT e AC, as soluções descritas anteriormente foram analisadas durante 28 dias.

Ambas as soluções padrão foram estudadas sob três formas diferentes de acondicionamento:

- AT1 e AC1: sob refrigeração e ausência de luz;
- AT2 e AC2: sem refrigeração e ausência de luz;
- AT3 e AC3: sem refrigeração e presença de luz.

Todas as soluções analisadas foram acondicionadas em frascos plásticos. As análises espectrofotométricas foram realizadas em triplicatas.

4.6 Recuperação dos Padrões Sintéticos

A análise de corantes em amostras de alimentos foi precedida de uma etapa prévia de separação dos corantes dos demais constituintes da matriz alimentícia. Para a separação dos analitos foi empregada a metodologia de extração e fixação em lã como utilizado por Queija *et al.* (2001), na qual um determinado volume ou massa da amostra é submetido à extração em meio ácido para fixação dos corantes na lã. Em seguida a lã contendo os corantes é levada a um meio básico para a extração dos mesmos. Para verificar a taxa de recuperação dos corantes utilizando essa metodologia, soluções de concentração conhecida do corante AT e AC foram submetidas à técnica de extração e eluição. Os detalhes do procedimento experimental serão relatados a seguir.

4.6.1 Preparo de Soluções

- Solução de AT para Recuperação e Reta de Calibração (solução estoque): Foi preparada a partir do padrão sintético do corante em água destilada. 0,2500 g do padrão sintético foi dissolvido e diluído com água destilada em balão volumétrico de 50,0 mL. Alíquotas de 0,30; 0,60; 0,90; 1,05 e 1,20 mL foram diluídas em 50,0 mL de água. Destas diluições obtiveram-se as concentrações de 1,5; 3,0; 4,5; 5,25 e 6,0 mg de AT em 50,0 mL de água para a construção da reta de calibração.
- Solução de AC para Recuperação e Reta de Calibração (solução estoque): Foi preparada a partir do padrão sintético do corante em água destilada.

0,2500 g do padrão sintético foi dissolvido e diluído com água destilada em balão volumétrico de 50,0 mL. Alíquotas de 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 e 0,50 mL foram diluídas em 50,0 mL de água. Destas diluições obtiveram-se as concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg de AC em 50,0 mL de água para a construção da reta de calibração.

- Solução Tampão pH 10: Foi preparada a partir de Cloreto de Amônio (NH_4Cl - Biotec) e Hidróxido de Amônio concentrado (NH_4OH – Biotec). Para tal, 64 g do sal (NH_4Cl) foram dissolvidos em aproximadamente 100 mL de água destilada. Em seguida adicionaram-se 570 mL de NH_4OH concentrado e elevou-se o volume para 1000 mL com água destilada.
- Solução de AT para Reta de Calibração (solução estoque): Foi preparada a partir do padrão sintético do corante em solução tampão pH 10. 0,2500 g do padrão sintético dissolvido e diluído com solução tampão em balão volumétrico de 50,0 mL. Desta solução uma alíquota de 1,60 mL foi transferida para balão volumétrico de 200 mL e elevou-se o volume com solução tampão obtendo-se uma solução de concentração 40 mg L^{-1} .
- Solução de AC para Reta de Calibração: (solução estoque): Foi preparada a partir do padrão sintético do corante em solução tampão pH 10. 0,2500 g do padrão sintético dissolvido e diluído com solução tampão em balão volumétrico de 50,0 mL. Desta solução uma alíquota de 0,40 mL foi transferida para balão volumétrico de 200 mL e elevou-se o volume com solução tampão obtendo-se uma solução de concentração 10 mg L^{-1} .

4.6.2 Procedimento Analítico

O estudo de recuperação dos corantes AT e AC foram realizados em triplicatas empregando-se o mesmo procedimento analítico, porém de forma independente.

Uma alíquota 50,0 mL da solução estoque do corante estudado preparado em água foi transferida para um béquer de 100 mL. Adicionou-se cerca 20,0 mL de água destilada, pedaços de lã e 10 gotas de ácido clorídrico concentrado (Biotec). Com o auxílio de um bastão de vidro, o conteúdo do béquer foi sendo homogeneizado, até que a lã adsorvesse todo o corante da solução, resultando em uma fase aquosa límpida. Posteriormente, com o auxílio de uma pinça a lã foi retirada deste béquer e transferida para um outro onde se lavou a lã abundantemente com água destilada para retirar todo o ácido. Em seguida esta foi transferida para outro béquer de 100 mL. Então, adicionou-se cerca de 40 mL de solução tampão pH 10 ($\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$) para eluição do corante da lã. Este passo foi repetido até que o desprendimento de corante da lã não fosse mais observado. As soluções resultantes da eluição foram sendo transferidas para balão volumétrico 100 mL e seu volume aferido com solução tampão pH 10.

Como o início do processo de extração ocorre com a solubilização do corante em água com pH próximo de 7 e o processo de eluição em meio tamponado com pH 10, a determinação da quantidade inicial e da quantidade recuperada de corante foi realizada por meio de duas retas de calibração.

Para determinar a quantidade recuperada de corante, uma reta de calibração em meio tamponado com pH 10 foi construída. Para tal, a solução estoque do corante preparada em solução tampão pH 10, foi adequadamente

diluída obtendo-se cinco soluções de concentração conhecida (1,5; 3,0; 4,5; 5,25 e 6,0 mg de AT em 50 mL), que foram utilizadas para obtenção da reta analítica. Após a eluição do corante da lã, a concentração da solução resultante foi determinada através desta reta.

No caso da determinação da concentração inicial da solução a ser levada para extração, uma reta de calibração em água destilada foi construída. Para tal, a solução estoque do corante preparada em água, foi adequadamente diluída obtendo-se soluções de concentração conhecida (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg de AC em 50 mL), que foram utilizadas para obtenção da reta analítica. Em uma alíquota da solução levada para extração foi realizada medida espectrofotométrica e, sua concentração determinada através desta reta.

Ambos os resultados (concentração inicial e final) foram comparados e possibilitaram a determinação do fator de recuperação de ambos corantes.

4.7 Metodologias para Quantificação dos Corantes AT e AC

4.7.1 Calibração Multivariada

Foram preparadas 36 misturas sintéticas em meio tamponado (pH 10), cada uma delas composta por diferentes proporções dos padrões AT e AC. Para todas as misturas, quantidades conhecidas das soluções estoque de 200 mg L⁻¹ de AT e 100 mg L⁻¹ de AC foram utilizadas. Então, alíquotas destas soluções foram transferidas para um balão volumétrico de 10,0 mL e completado até o volume final com tampão pH 10. O planejamento experimental utilizado para compor as 30 misturas sintéticas responsáveis pelo desenvolvimento dos

modelos de calibração (em preto), e as seis misturas que compõem o conjunto de validação (em vermelho) pode ser visualizado na Figura 7. A faixa de concentração estudada foi de 2,0 mg L⁻¹ a 22,0 mg L⁻¹ para o AT e de 1,0 mg L⁻¹ a 16,0 mg L⁻¹ para o AC.

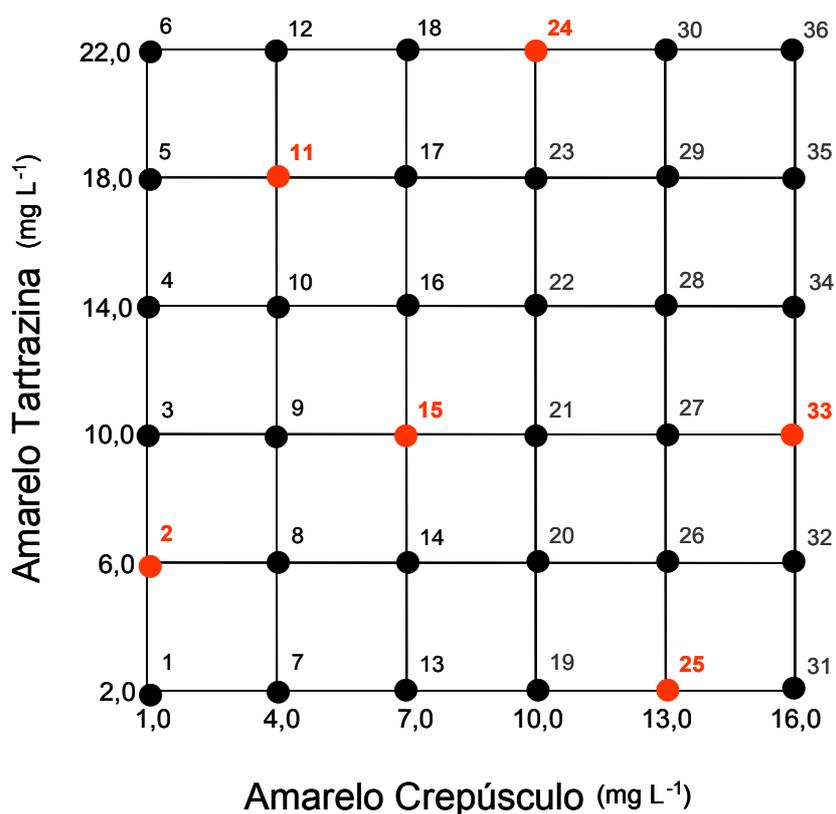


Figura 7: Composição das misturas sintéticas do conjunto de calibração e previsão.

O número de padrões de calibração foi escolhido respeitando à premissa de que o número de padrões de calibração deve ser proporcional ao número de corantes a serem analisados. Posteriormente, os espectros (UV-VIS) destas 36 misturas sintéticas foram coletados, sendo que apenas 30 destes padrões sintéticos foram utilizados para desenvolver os modelos de calibração multivariada, tipicamente PLSR e PCR.

4.7.2 Primeira Derivada

Os espectros das soluções padrões dos corantes AT (na faixa de concentração 30 mg L⁻¹ a 120 mg L⁻¹) e AC (na faixa de concentração 10 mg L⁻¹ a 50 mg L⁻¹) em tampão de NH₄OH/NH₄Cl (pH 10) foram obtidos na faixa de 200 a 800 nm. Os resultados foram transportados para o software OriginPro no qual foram obtidos os espectros alisados da 1ª derivada. No ponto de inflexão para cada um dos corantes (derivada da absorbância igual a zero) foi determinado o comprimento de onda utilizado para a construção das retas analíticas.

Posteriormente, os espectros das soluções padrões das misturas binárias (Figura 3) em tampão pH 10 foram alisados e derivados sob as mesmas condições descritas acima. A partir das absorbâncias nos comprimentos de onda já determinados, foram plotados os gráficos de calibração (derivada da absorbância vs. concentração). Com estes dados construíram-se as equações de calibração e obtiveram-se os coeficientes de regressão para ambos corantes.

4.7.3 Princípio da Aditividade

As absorptividades de cada um dos corantes (AT e AC) foram obtidas a partir dos espectros das soluções padrões dos corantes AT (na faixa de concentração 30 mg L⁻¹ a 120 mg L⁻¹) e AC (na faixa de concentração 10 mg L⁻¹ a 50 mg L⁻¹) em tampão de NH₄OH/NH₄Cl (pH 10). Os resultados foram transportados para o software OriginPro onde foram selecionados os valores de

absorbância nos comprimentos de onda 402 e 460 nm (comprimentos de onda com absorção máxima dos corantes AT e AC, respectivamente).

Os dados de absorbância e absorvidade foram utilizados para resolver o sistema de equações simultâneas apresentadas nas Eq. 03 e 04.

4.7.4 Validação dos Modelos de Quantificação

Esta etapa de validação foi realizada para as três metodologias matemáticas de quantificação propostas neste trabalho: princípio da aditividade, primeira derivada e calibração multivariada.

Após elaboração de vários modelos de calibração, a capacidade de previsão de cada um deles foi avaliada frente a seis padrões sintéticos, de concentrações diferentes daquelas adotadas na fase de calibração (Figura 7, amostras destacadas em vermelho). Com base nestes resultados, foi escolhido o modelo de melhor desempenho, que foi utilizado na determinação das espécies de interesse em produtos comerciais.

4.8 Preparo da Amostra

Para o preparo das amostras foi utilizado o método de extração em lã, no qual alíquotas das amostras foram transferidas para um béquer 100 mL e cerca de 50 mL de água destilada foram adicionadas juntamente com cinco gotas de ácido clorídrico concentrado e pedaços de lã. Por alguns minutos essa solução foi

agitada até que se obtivesse uma solução clara e desprovida de cor. Em seguida a lã colorida foi lavada abundantemente com água destilada e transferida para um béquer 100 mL juntamente com 20 mL de solução a tampão pH 10. À medida que a solução tampão eluia o corante da lã, esta solução era transferida para balões volumétricos de 50,0 ou 100 mL, de acordo com a necessidade. Esse procedimento foi repetido até que a lã não desprendesse mais cor. Por fim aferiu-se o balão com solução tampão para posterior leitura em espectrofotômetro.

É importante salientar que algumas amostras (Gelatina sabor abacaxi, Suco em pó sabor laranja e Isotônico sabor laranja) após o processo de eluição necessitaram de diluição antes da obtenção dos seus espectros.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características dos Corantes AT e AC

A literatura descreve que a máxima absorção do corante AC em água ocorre por volta de 485 nm, característica que pôde ser constatada no espectro de absorção do padrão AC utilizado neste trabalho (Figura 8).

Foi possível observar que a absorção máxima do grupo cromóforo sofre um deslocamento para comprimentos de onda menores quando se utiliza uma solução tampão pH 10 ($\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$) para solubilização deste corante.

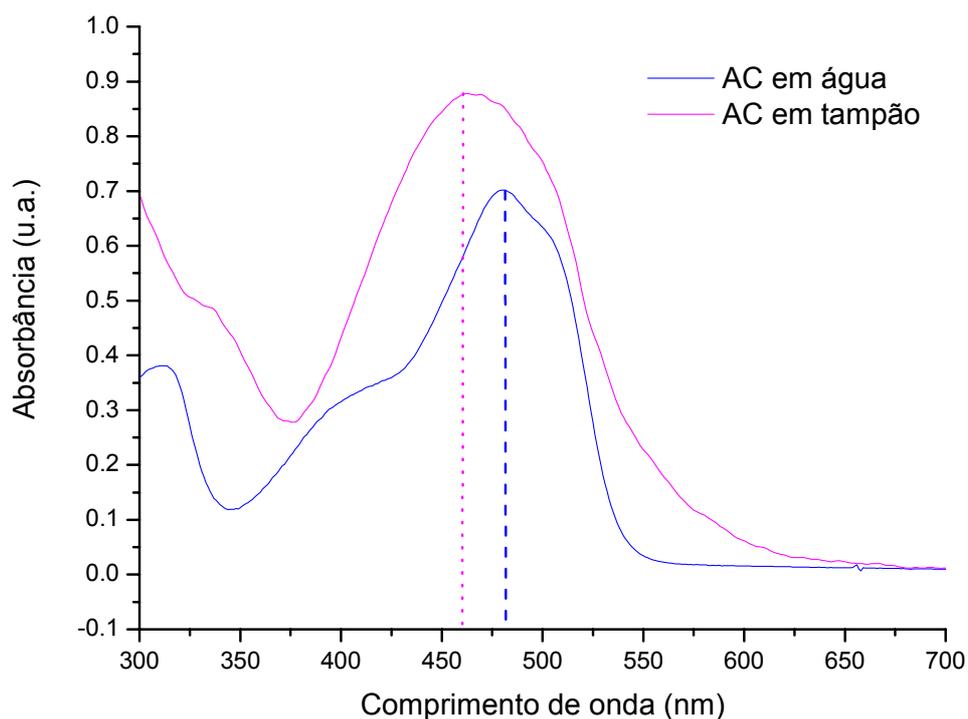


Figura 8: Espectro de absorção UV-VIS do corante AC em água e tampão pH 10.

Uma análise mais detalhada da Figura 8 evidencia que o deslocamento descrito é da ordem de 25 nm (água, $\lambda = 485$ nm e em solução tamponada, $\lambda = 460$ nm).

Esse mesmo comportamento ocorre para o corante AT (Figura 9) cuja absorção máxima do grupo cromóforo ocorre em 426 nm quando dissolvido em água e passa a ser 402 nm em meio básico tamponado pH 10.

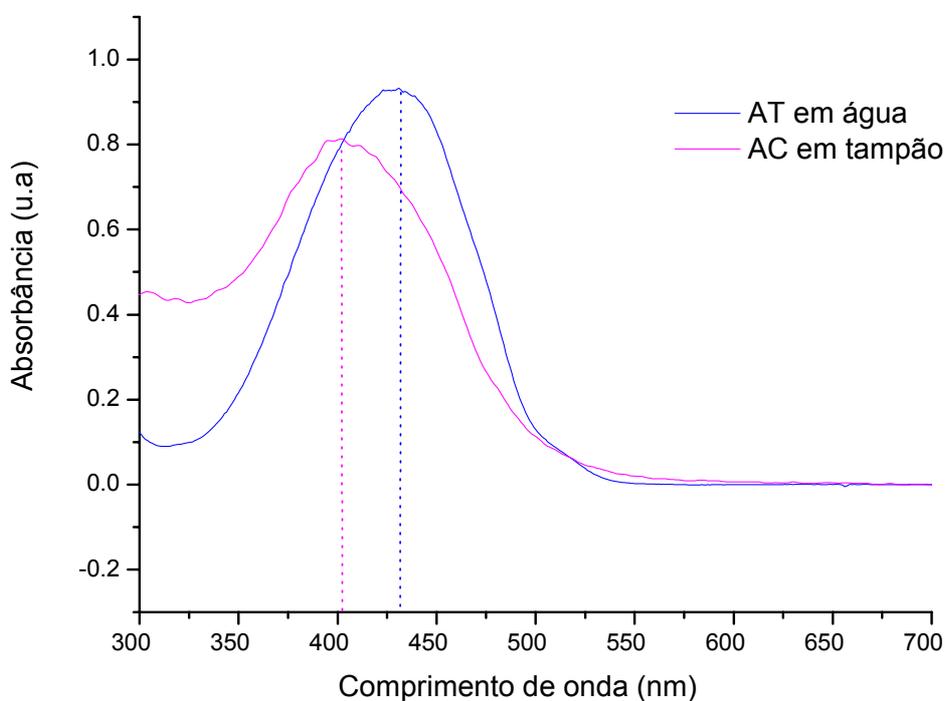


Figura 9: Espectro de absorção UV-VIS do corante AT em água e tampão pH 10.

Infelizmente, o deslocamento da banda de absorção de interesse para ambos os corantes ocorrem praticamente na mesma proporção, não beneficiando a seletividade do sinal analítico.

5.1.1 Estabilidade dos Padrões Sintéticos AT e AC

O estudo de estabilidade dos padrões dos corantes AT e AC foram realizados em meio básico tamponado pH 10 ($\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$), uma vez que a metodologia de extração dos corantes em lã requer a eluição destes analitos neste meio. Além disso, este acompanhamento permitiu identificar o período e o tipo de acondicionamento mais adequado para a estocagem dos corantes já extraídos das matrizes alimentícias.

A Figura 10 apresenta o comportamento do Corante Amarelo Tartrazina em meio tamponado analisado durante 28 dias, sob três formas diferentes de acondicionamento T1, T2 e T3.

- T1: sob refrigeração e ausência de luz;
- T2: sem refrigeração e ausência de luz;
- T3: sem refrigeração e presença de luz.

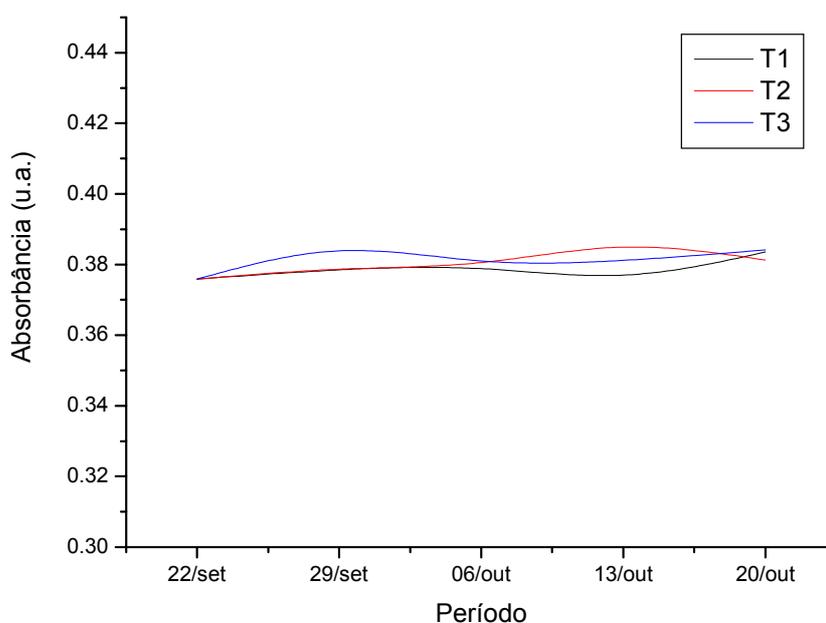


Figura 10: Perfil de Estabilidade do Corante Amarelo Tartrazina.

Os dados utilizados para a construção do gráfico de estabilidade são o resultado da média das triplicatas realizadas para cada condição estudada. É possível observar que aparentemente, as condições estudadas não apresentam diferenças de estabilidade entre si.

Em busca de resultados confiáveis, um estudo estatístico mais apurado foi realizado. Os resultados espectrofotométricos foram comparados via teste F (Snedecor), que compara precisões entre dois conjuntos de dados a partir da análise de variância entre o conjunto de referência (medida espectrofotométrica do primeiro dia de análise) (LEITE, 2002), e os demais conjuntos correspondentes ao longo do período estudado. Estas estimativas de variância são obtidas através da Eq. 18.

$$F = \frac{\text{Maior variância}}{\text{Menor variância}} \quad \text{Eq.18}$$

No caso da comparação entre as médias de dois conjuntos de dados, o teste t (Student) pode ser aplicado quando as precisões (teste F) não apresentarem diferença significativa. Esta estimativa é obtida pela Eq. 19.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_a \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Eq. 19}$$

Onde \bar{X}_1 representa a média do conjunto de referência, \bar{X}_2 a média do conjunto a ser comparado, n_1 e n_2 o número de amostras de cada um dos conjuntos e S_a a somatória das estimativas do desvio padrão (Eq. 20), dado por:

$$S_a = \frac{\sqrt{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}}{n_1 + n_2 - 2} \quad \text{Eq. 20}$$

Sendo S_1 e S_2 a estimativa do desvio padrão do conjunto de referência e do conjunto a ser comparado respectivamente.

Com o valor encontrado pelas Eq. 18 e 19 comparam-se o valor da distribuição F e t, respectivamente, com 95% de confiança e dois graus de liberdade (LEITE, 2002).

Com base nestes preceitos, os resultados obtidos para o Teste F e o Teste t são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Testes Estatísticos para Perfil de Estabilidade T1, T2 e T3.

	T1		T2		T3	
Data	Teste F	Teste t	Teste F	Teste t	Teste F	Teste t
22/09	-	-	-	-	-	-
29/09	3,05	0,905	3,50	0,511	9,407	0,981
06/10	2,19	0,661	1,62	1,139	6,890	0,726
13/10	1,89	0,261	3,72	1,636	2,395	1,762
20/10	3,26	2,626	4,19	0,940	5,947	0,138

De acordo com os valores tabelados da Distribuição F – 5% de probabilidade (F = 19,0), é possível observar que os resultados da Eq. 19 propiciam valores menores que aqueles tabelados, indicando que não há diferença significativa entre as precisões com confiança de 95% em relação ao tempo e as formas de acondicionamento estudadas. A mesma conclusão foi

obtida para a média da medida de absorção do corante AT, cujos valores da Tabela 3 são menores que os tabelados pela Distribuição t ($t = 2,920$) com o mesmo nível de confiança relatado anteriormente.

A estabilidade do grupo cromóforo (região visível) dos corantes sintéticos também pode ser visualizada na sobreposição dos espectros obtidos ao longo do período estudado (Figura 11). Em destaque, o espectro em azul se refere à medida espectrofotométrica no fim do período estudado.

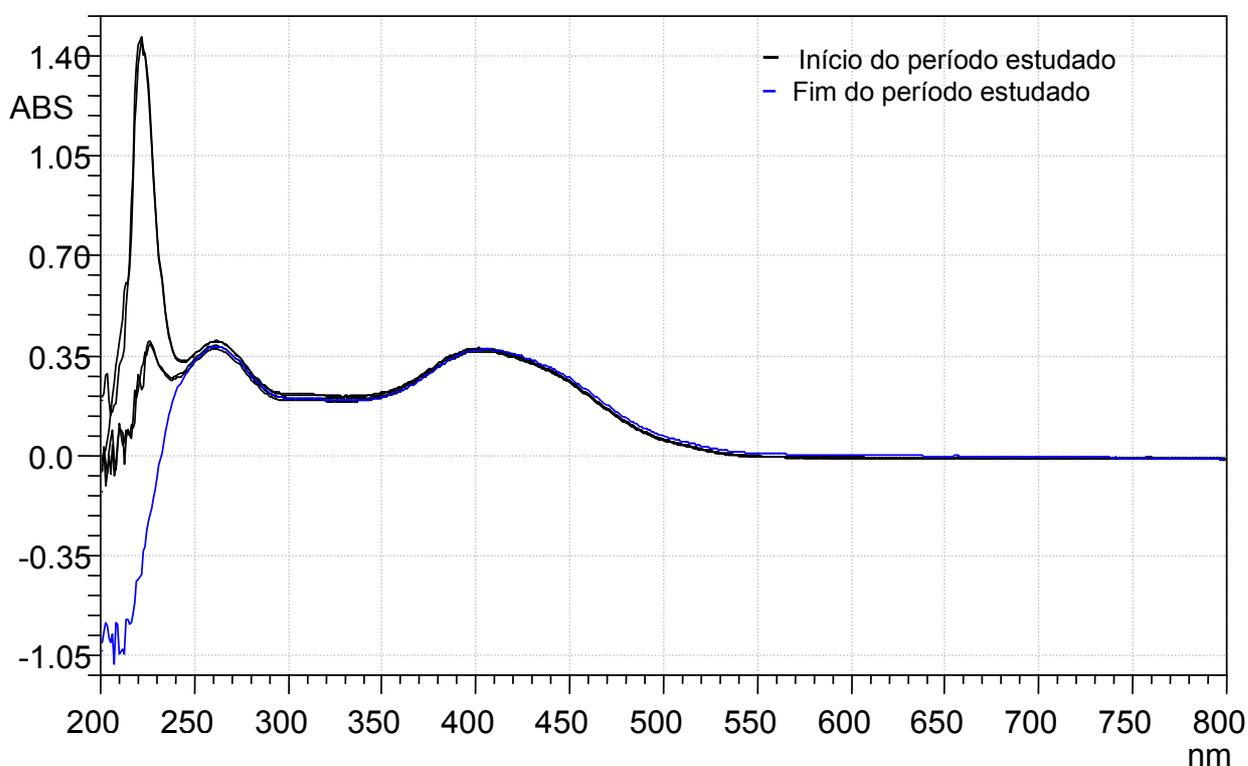


Figura 11: Espectros UV-VIS sobrepostos do corante AT na condição T1.

A sobreposição dos espectros UV-VIS obtidos durante o período de 28 dias evidencia também a presença de absorção na região ultravioleta. Tal absorção permanece inalterada por aproximadamente oito dias. No entanto, foi possível verificar que a partir da segunda semana de acompanhamento, houve alteração

significativa da absorção nesta região. Esta alteração se tornou mais evidente no fim do período estudado.

A Figura 12 apresenta o comportamento do corante AC em meio tamponado ($\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$, pH 10), analisado durante 28 dias, sob três formas diferentes de acondicionamento C1, C2, e C3:

- C1: sob refrigeração e ausência de luz;
- C2: sem refrigeração e ausência de luz;
- C3: sem refrigeração e presença de luz.

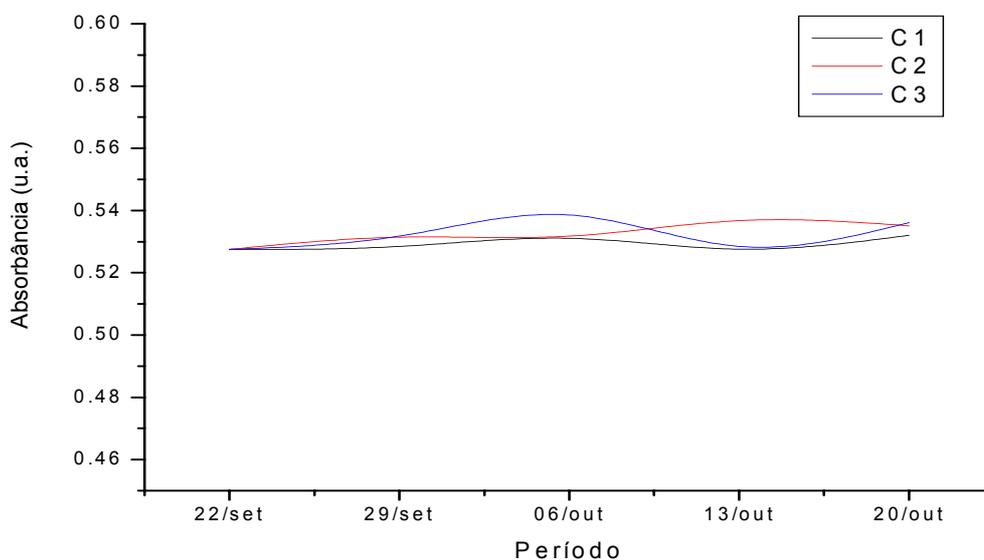


Figura 12: Perfil de Estabilidade do Corante Amarelo Crepúsculo.

É possível observar que aparentemente trata-se do mesmo comportamento aleatório observado para o corante AT. Para confirmar este aspecto um estudo estatístico levando em consideração a confiabilidade das medidas foi realizado. Os mesmos procedimentos adotados para AT foram realizados neste caso, resultando nos dados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Testes Estatísticos para Perfil de Estabilidade C1, C2 e C3.

Data	C1		C2		C3	
	Teste F	Teste t	Teste F	Teste t	Teste F	Teste t
22/09	-	-	-	-	-	-
29/09	3,68	0,344	1,19	1,218	5,63	1,655
06/10	3,75	0,685	2,27	0,993	6,43	1,708
13/10	3,56	0,010	6,46	1,432	3,39	0,191
20/10	4,84	0,797	4,31	1,383	5,65	1,405

Os resultados confirmam que não há diferença significativa ao nível de 95% de confiança na precisão dos conjuntos estudados ($F = 19,0$), e também não ocorreram alterações na medida de absorção do grupo cromóforo do corante AC ($t = 2,920$) em relação ao tempo e as formas de acondicionamento estudadas.

O mesmo comportamento do corante AT, em relação à região ultravioleta, foi observado para o corante AC. Embora a quantificação dos corantes seja realizada na região do visível, a possibilidade de trabalhar com toda a faixa espectral (calibração multivariada) reduz o tempo de estocagem dos corantes extraídos para 08 dias.

A Figura 13 mostra a estabilidade do grupo cromóforo do corante em questão que pode ser visualizada a partir da sobreposição dos espectros obtidos ao longo do período estudado.

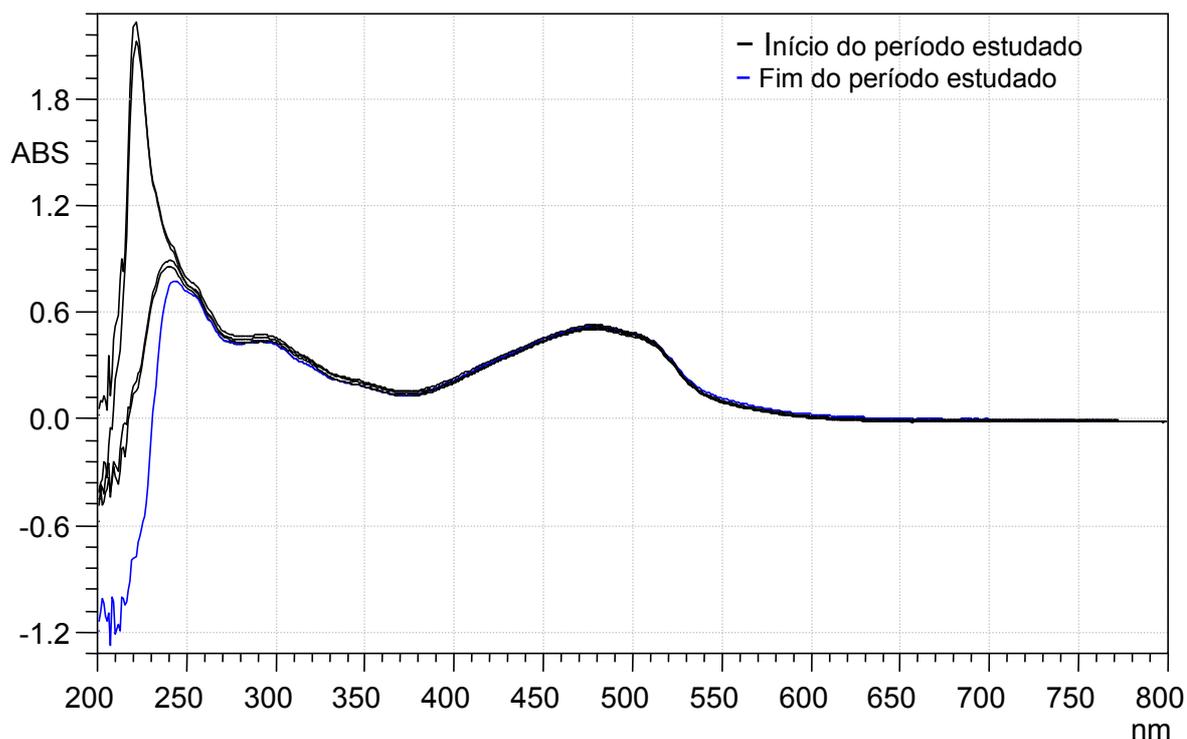


Figura 13: Espectros UV-VIS sobrepostos do corante AC na condição C1.

5.2 Recuperação dos Padrões Sintéticos

O fator de recuperação da metodologia de extração adotada foi determinado para verificar a quantidade retida dos corantes de interesse pelo agente adsorvente e assim possibilitar a correção dos valores encontrados no controle de qualidade dos produtos alimentícios.

A Tabela 5 apresenta os parâmetros estatísticos da reta de calibração obtida para cada corante estudado. A partir destas retas analíticas foi possível determinar a concentração de ambos os corantes (separadamente) antes e após a metodologia de extração.

Tabela 5: Parâmetros das retas de calibração para cada corante estudado.

Corante	Equações	Coefficientes de Regressão
AT (água)	$A_{430} = 0,1981[AT] + 0,02832$	0,9987
AC (água)	$A_{483} = 0,82627[AC] + 0,09302$	0,9994
AT (tampão)	$A_{402} = 0,82276[AT] - 0,05103$	0,9983
AC (tampão)	$A_{460} = 2,819[AC] + 0,0029$	0,9991

Para obter o fator de recuperação (FR) da metodologia empregada utilizou-se a Eq. 21.

$$FR = \frac{\text{Concentração Final}}{\text{Concentração inicial}} \times 100 \quad \text{Eq. 21}$$

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os valores médios obtidos através das equações apresentadas anteriormente estão mostrados na Tabela 6, juntamente com o FR calculado.

Tabela 6: Fator de recuperação do corantes AT e AC.

Corante	Concentração inicial (mg L⁻¹)	Concentração final (mg L⁻¹)*	Fator de Recuperação (%)
AT	2,0	1,80 ± 0,062	90
AC	2,0	1,72 ± 0,036	86

* média e estimativa do desvio padrão

Vale a pena ressaltar que foram observadas diferenças no fator de recuperação dos corantes AT e AC dependendo do lote de lã natural utilizado. Em função deste aspecto, a realização de um estudo de recuperação para cada novo lote do adsorvente mostra-se necessário.

5.3 Princípio da Aditividade

Para a utilização do princípio da aditividade na análise espectrofotométrica simultânea dos corantes, retas analíticas independentes foram construídas nos dois comprimentos de onda no qual se encontram as absorções máximas dos corantes AT e AC (402 e 460 nm, respectivamente). Estes dados são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: Retas de Calibração obtidas para os corantes AT e AC em 402 nm e 460 nm.

Corantes	Equações	Coefficientes de Regressão
Tartrazina (402 nm)	$A_{402} = 0,823[AT] - 0,051$	0,9984
Tartrazina (460 nm)	$A_{460} = 0,424[AT] + 0,027$	0,9976
Crepúsculo (402 nm)	$A_{402} = 1,449[AC] + 0,035$	0,9988
Crepúsculo (460 nm)	$A_{460} = 2,819[AC] + 0,003$	0,9991

Os coeficientes lineares de cada uma das equações foram desprezados, mantendo-se somente o coeficiente angular (representativo da absorvidade de cada um dos corantes AT e AC em seus respectivos comprimentos de onda).

Considerando-se que as únicas espécies responsáveis pela absorção na região de 402 nm e 460 nm sejam os corantes de interesse, a junção dos dados (Tabela 7) permite obter uma equação que engloba a influência do corante AT e AC no comprimento de onda 402 nm e outra em 460 nm, respectivamente.

$$A_{402} = 0,823 c_{AT} + 1,449 c_{AC}$$

$$A_{460} = 0,424 c_{AT} + 2,819 c_{AC}$$

A partir do espectro da mistura destes corantes é possível determinar A_{402} e A_{460} , e assim a resolução das equações simultâneas descritas anteriormente possibilita determinar a concentração de AT e AC na amostra analisada.

Para avaliar a capacidade de previsão do método espectrofotométrico associado ao princípio da aditividade foram utilizadas soluções padrões de concentrações conhecidas contendo a mistura dos corantes (Figura 7, item 4.7.1). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8, juntamente com os dados de RMSEP (Raiz Quadrada da Soma dos Erros de Previsão) para cada corante. Este parâmetro é obtido empregando-se a Eq. 22, descrita a seguir:

$$RMSEP = (\sum(C_{Real} - C_{Prevista})^2/n)^{1/2} \quad \text{Eq. 22}$$

Onde:

C_{Real} é a concentração real,

$C_{Previsto}$ é a concentração estimada pelo modelo e

n é o número de amostras do conjunto de validação.

O RMSEP é uma forma diferente de avaliar o erro absoluto e, portanto permite uma visualização e conclusão rápida do aumento ou diminuição na exatidão de cada uma das metodologias matemáticas empregadas.

Tabela 8: Resultados de previsão e RMSEP para o princípio da aditividade.

Tartrazina (mg L ⁻¹)		Crepúsculo (mg L ⁻¹)	
Valor real	Valor previsto	Valor real	Valor previsto
0,60	0,59	0,10	0,09
1,80	1,57	0,40	0,38
1,00	0,98	0,70	0,65
2,20	1,95	1,00	0,91
0,20	0,17	1,30	1,19
1,00	0,81	1,60	1,46
RMSEP	0,65	RMSEP	0,34

5.4 Método da Primeira Derivada

Inicialmente foram determinados os pontos de inflexão para os corantes AT e AC, separadamente. A Figura 14 mostra os espectros derivados de AT (em azul) em diversas concentrações, onde é possível evidenciar apenas um ponto de inflexão, ou seja, um comprimento de onda (406,45 nm) onde a concentração de AT não influencia no valor da derivada da absorbância resultando sempre em valor zero. Isso possibilita a determinação de AC neste comprimento de onda, “sem” interferência da concentração de AT. No caso do AC (em vermelho), dois

pontos de inflexão são passíveis de serem observados, ou seja, dois comprimentos de onda (364,76 nm e 466,92 nm) onde a concentração de AC não influencia na medida da derivada de absorção do AT.

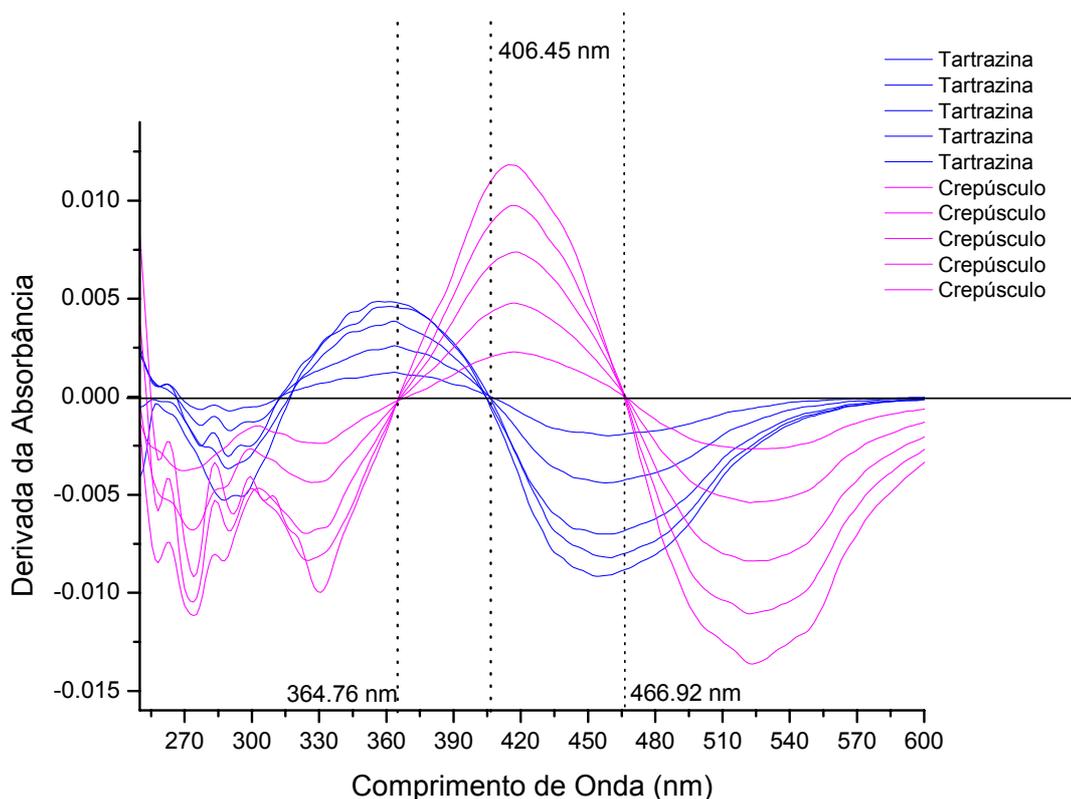


Figura 14: Espectros derivados dos corantes AT e AC em diversas concentrações.

Para aplicação desta metodologia, 30 soluções contendo a mistura binária dos padrões sintéticos de AT e AC, em diferentes proporções (Figura 7, item 4.7.1), foram preparadas para a obtenção dos parâmetros estatísticos para a determinação destes analitos. A grande quantidade de padrões sintéticos possibilitou a construção de retas de calibração contendo entre quatro a seis pontos de diferentes concentrações. Os valores de absorbância do espectro da 1ª

derivada foram medidos em 406,45 nm para o corante AC e 364,76 nm e 466,92 nm para o corante AT. O fato de o corante AT apresentar a possibilidade de leitura em dois comprimentos de onda distintos permitiu a construção de duas retas de calibração.

As Figuras 15 e 16 apresentam os gráficos da 1ª derivada dos espectros de algumas misturas binárias dos padrões sintéticos utilizados na construção das retas de calibração dos corantes AT e AC, que evidenciam a proporcionalidade da derivada da absorção de acordo com a concentração do composto de interesse.

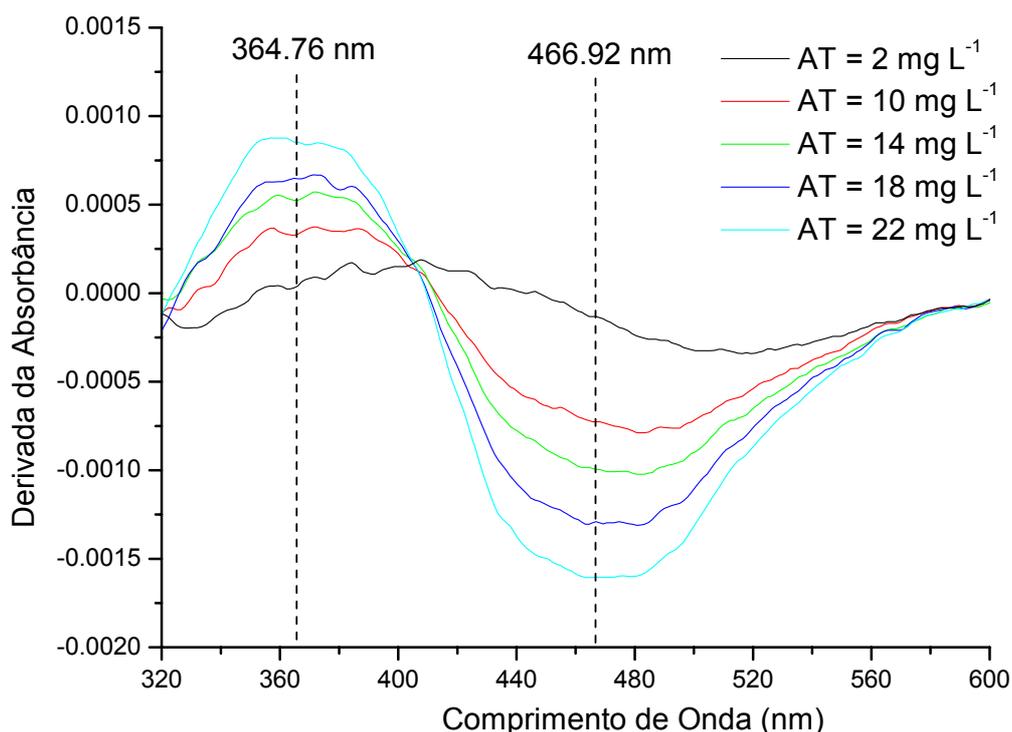


Figura 15: Primeira derivada dos espectros de alguns padrões sintéticos utilizados para a obtenção da reta de calibração do corante AT ($AC = 1 \text{ mg L}^{-1}$).

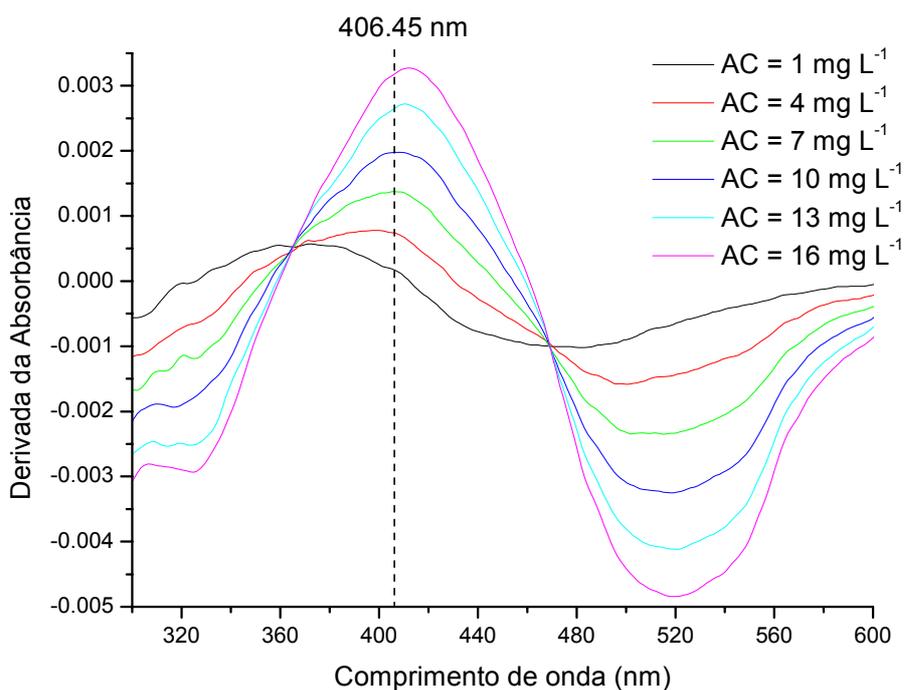


Figura 16: Primeira derivada dos espectros de alguns padrões sintéticos utilizados para a obtenção da reta de calibração do corante AC ($AT = 14 \text{ mg L}^{-1}$).

A Tabela 9 apresenta os parâmetros (retas de calibração, coeficientes de regressão e os respectivos comprimentos de onda) que possibilitam a determinação simultânea dos corantes AT e AC.

Tabela 9: Parâmetros para determinação de AT e AC via primeira derivada.

Comprimento de onda (nm)	Reta de Calibração	Coefficiente de Regressão
364,76	$dA/d[AT] = -8,774E-5 + 4,164E-5 [AT]$	0,9977
466,92	$dA/d[AT] = -8,062E-5 - 6,573E-5 [AT]$	-0,9946
406,45	$dA/d[AC] = -4,593E-5 + 2,044E-4 [AC]$	0,99993

No método da primeira derivada, o mesmo conjunto de seis misturas binárias dos padrões sintéticos de AT e AC (Figura 7, item 4.7.1), foi utilizado para verificar o potencial de previsão desta metodologia. A Figura 17 apresenta o gráfico da 1ª derivada do conjunto de validação utilizado, mostrando as diferenças de comportamento espectrofotométrico entre estas amostras.

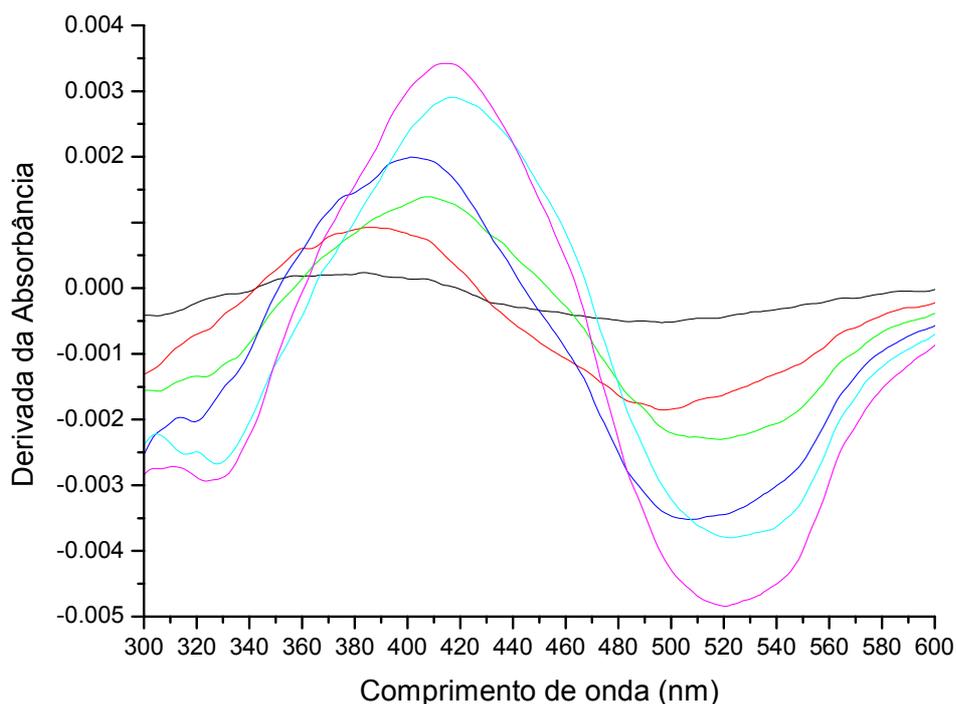


Figura 17: Primeira derivada dos espectros das amostras que compõem o conjunto de validação.

Aplicando-se o valor da derivada da absorbância (no comprimento de onda determinado) na sua respectiva equação (Tabela 9) é possível obter a concentração dos corantes de interesse.

A Tabela 10 apresenta os resultados desta previsão e de RMSEP para os Corantes: Amarelo Tartrazina e Amarelo Crepúsculo.

Tabela 10: Resultados de Previsão e RMSEP para primeira derivada.

Valores Reais de AT e AC (mg L⁻¹)	Tartrazina (364,76 nm) (Valor Previsto)	Tartrazina (466,92 nm) (Valor Previsto)	Crepúsculo (406,45 nm) (Valor Previsto)
(6,0 – 1,0)	6,56	8,98	0,93
(18,0 – 4,0)	17,96	19,88	3,97
(10,0 – 7,0)	11,30	11,50	7,12
(22,0 – 10,0)	25,13	21,74	9,96
(2,0 – 13,0)	2,19	0,88	13,34
(10,0 – 16,0)	12,30	7,80	16,37
RMSEP	1,69	1,86	0,48

5.5 Modelos de Calibração Multivariada

A metodologia de calibração multivariada foi conduzida essencialmente via processos de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) e Regressão por Componentes Principais (PCR). O modelo foi desenvolvido a partir do planejamento experimental contendo 36 misturas binárias como descrito no item 4.7.1 (Figura 7). Deste conjunto 30 padrões foram utilizados para a etapa de calibração (conjunto de calibração) e seis padrões para a fase de validação (conjunto de validação).

Os espectros foram processados na faixa compreendida entre 200 e 800 nm (denominada faixa espectral completa), incluindo a faixa ultravioleta

(provavelmente não relevante para a determinação dos corantes estudados) e a região do visível (com a presença do principal grupo cromóforo).

Durante a fase de calibração, o conjunto composto pelos espectros dos padrões foi correlacionado com as respectivas concentrações dos dois corantes estudados. Nesta etapa, além da utilização dos dados espectrais na sua forma original, foi testada a transformação dos dados utilizando a 1ª derivada do espectro concomitantemente ao procedimento de pré-processamento com dados centrados na média. A capacidade de previsão dos vários modelos desenvolvidos mostrou-se influenciada pela transformação de dados aplicada e pela faixa espectral escolhida para construção do modelo. Ao combinarem-se as várias alternativas existentes como a transformação ou não dos dados utilizando a 1ª derivada, a escolha de determinada faixa espectral e o algoritmo matemático (PCR e PLSR) a ser utilizado, foi possível obter inúmeros modelos de calibração. No entanto, somente o modelo de melhor resultado global (PLSR) será descrito a seguir.

5.5.1 PLSR

O modelo PLSR foi desenvolvido utilizando-se inicialmente a faixa espectral completa (200 a 800 nm) com transformação de dados utilizando a 1ª derivada do espectro (Figura 18), empregando-se dados centrados na média e procedimento de validação cruzada.

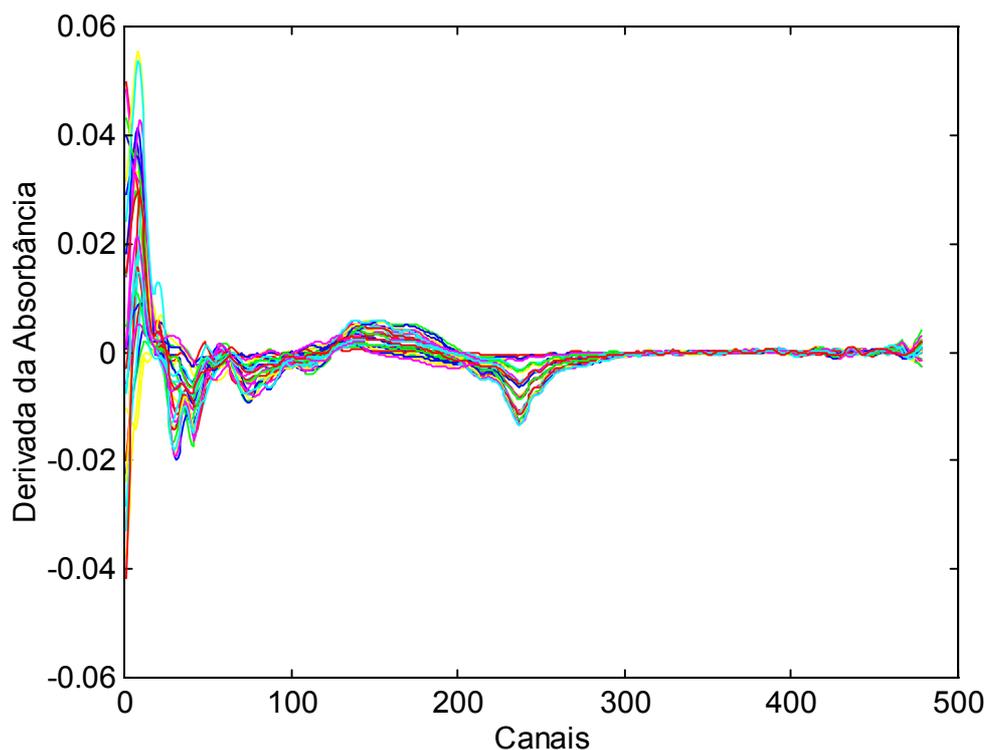


Figura 18: Primeira derivada dos espectros de absorção (200 e 800 nm).

Uma análise preliminar dos dados espectrofotométricos indica que a região após o canal 300 (equivalente a cerca de 600 nm) parece não haver qualquer tipo de informação analítica relevante. Outro fato curioso está relacionado à alta intensidade dos sinais na região do ultravioleta, que pode mascarar as regiões do visível, das quais são comprovadamente importantes para o controle analítico em questão.

O modelo PLSR inicial foi otimizado a partir do procedimento de validação cruzada, onde a calibração pode ser repetida n vezes (n = número de amostras), sendo que em cada oportunidade uma das amostras do conjunto de calibração é retirada e utilizada como amostra de previsão. Uma vez que todas as amostras tenham sido tratadas como objeto de previsão, é possível estimar a Soma dos Quadrados dos Erros de Previsão (PRESS) dada pela Eq. 22 e escolher a

quantidade de componentes principais necessárias para a obtenção do menor PRESS.

$$\text{PRESS} = \sum (\mathbf{C}_{\text{Real}} - \mathbf{C}_{\text{Prevista}})^2 \quad \text{Eq. 22}$$

A partir deste procedimento foi possível verificar que após a 4ª componente principal não existe nenhum ganho significativo em termos de minimização de PRESS (Figura 19). Além disso, estas 4 primeiras componentes são responsáveis pela explicação de cerca de 97,9% da variância dos dados.

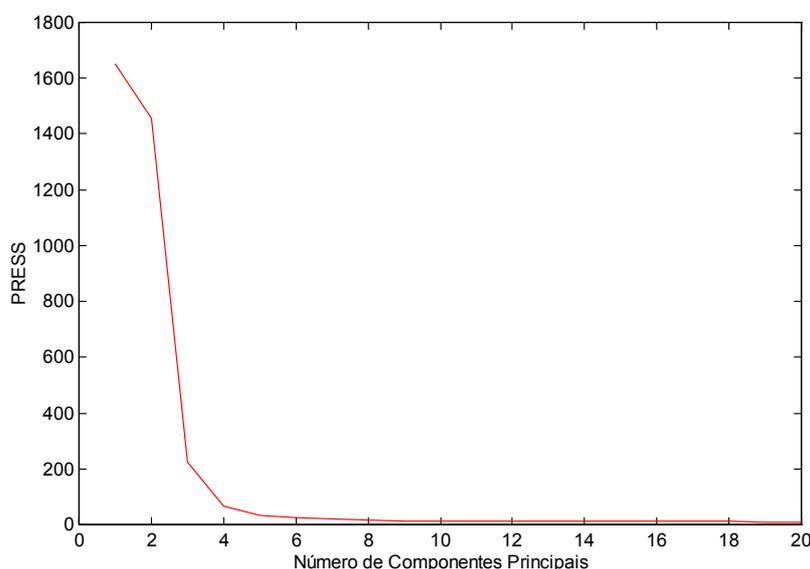


Figura 19: PRESS em função do número de componentes principais para modelo PLSR com derivada dos dados e faixa espectral completa.

Apesar do modelo envolver a quantificação de dois analitos (AT e AC), é possível verificar que um número maior de componentes principais é necessário para obter um valor mínimo de PRESS. Este fator pode ser decorrente da modelagem de não-linearidades e até mesmo da existência de regiões espectrais irrelevantes para a obtenção do modelo de calibração.

O gráfico de coeficientes de regressão (Figura 20) indica que existem regiões no Espectro UV-VIS com pouca informação analítica para o controle quantitativo em questão. Basicamente trata-se daquelas regiões que apresentam coeficientes de regressão próximos de zero, os quais podem ser descartados sem causar prejuízos para o modelo. Em função da baixa representatividade da região ultravioleta e a possibilidade destes sinais estarem mascarando as informações analíticas realmente relevantes, esta faixa espectral também foi excluída. Sendo assim, um novo modelo será construído com a faixa espectral compreendida entre 305 a 645 nm.

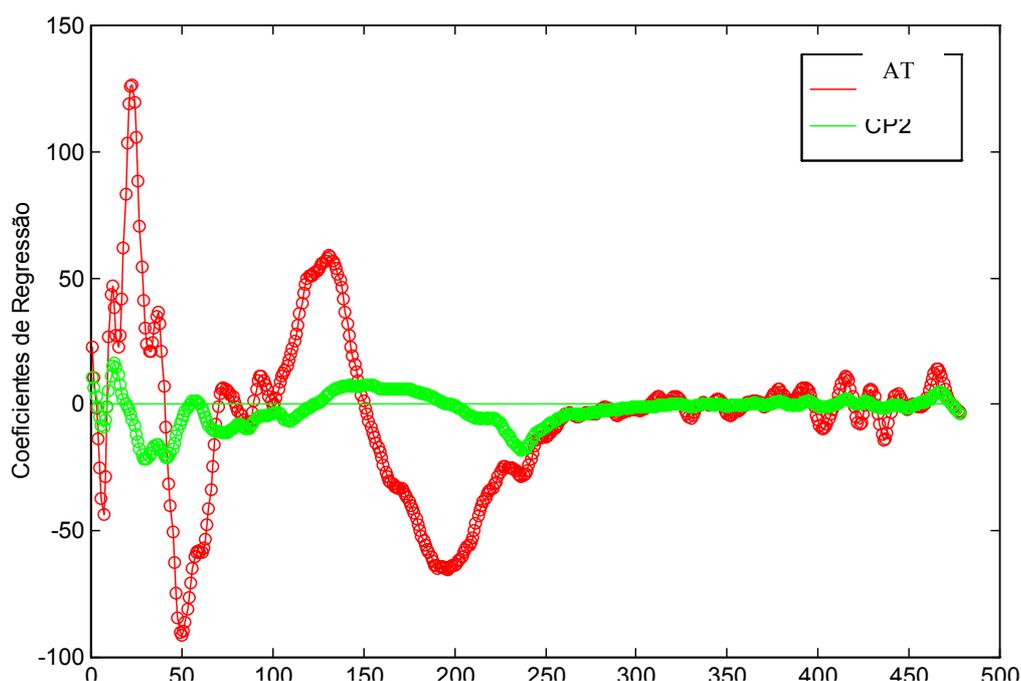


Figura 20: Coeficientes de regressão do modelo PLSR com derivada dos dados e faixa espectral completa.

As Figuras 21 e 22 apresentam os dados originais e a 1ª derivada dos espectros das amostras do conjunto de calibração com a restrição da faixa espectral a ser modelada

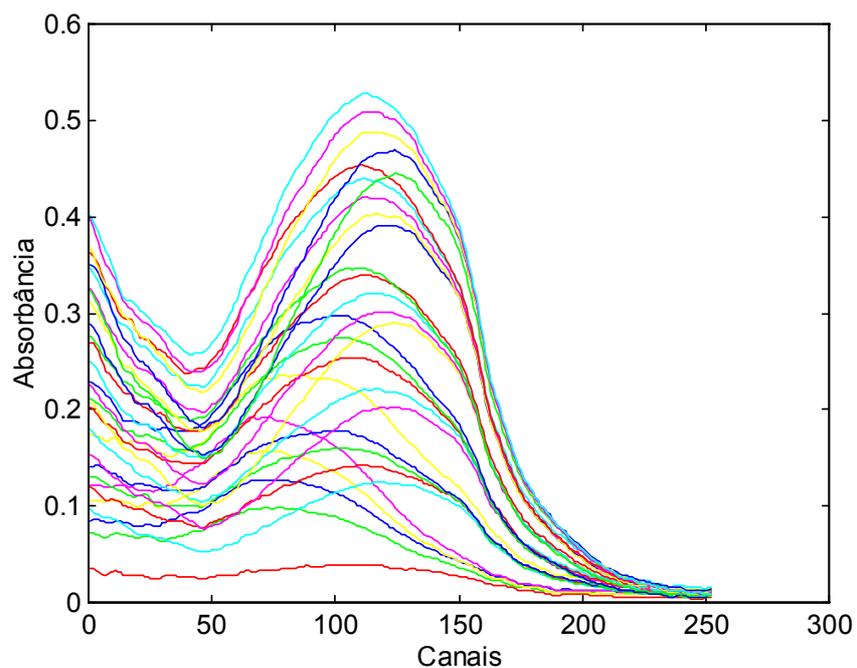


Figura 21: Espectros UV-VIS característicos da mistura de corantes AT e AC (faixa espectral: 305 – 645 nm).

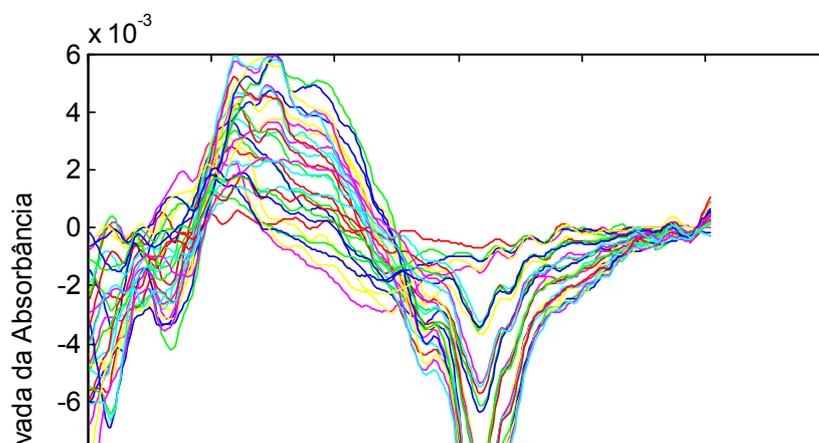


Figura 22: Primeira derivada dos espectros das amostras do conjunto de calibração (faixa espectral: 305 -645 nm).

Para o conjunto de dados deste novo intervalo espectral, o procedimento de validação cruzada também foi realizado. É possível verificar que após a segunda componente principal não existe nenhum ganho significativo em termos de minimização de PRESS (Figura 23). Além disso, estas duas primeiras componentes principais já são responsáveis pela explicação de aproximadamente 99,80% da variância dos dados (Tabela 11).

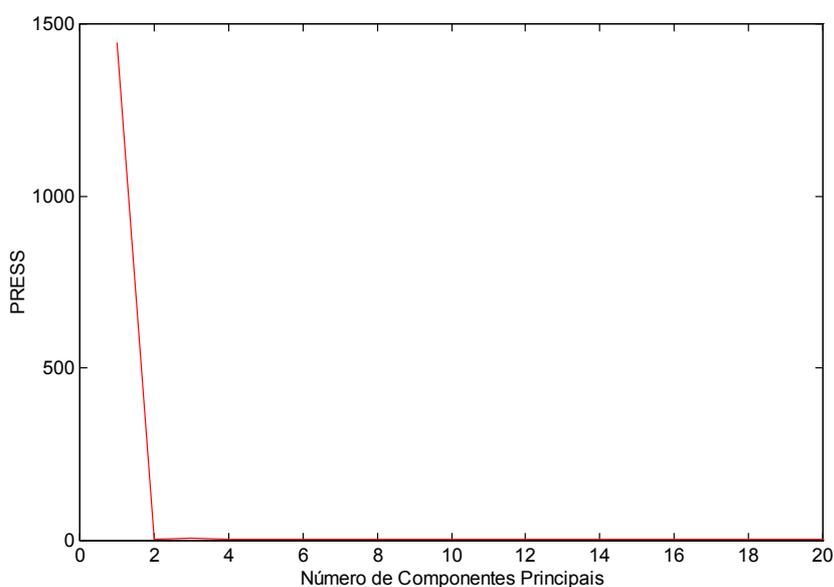


Figura 23: PRESS em função do número de componentes principais para modelo PLSR com derivada dos dados e faixa espectral reduzida.

Tabela 11: Percentual de Variância Capturada pelo Modelo PLSR.

CP	Bloco – X		Bloco - Y	
	Esta CP	Total	Esta CP	Total
1	92,60	92,60	38,20	38,20
2	6,59	99,19	61,60	99,80
3	0,64	99,83	0,03	99,84

O gráfico de coeficientes de regressão (Figura 24) indica que praticamente toda a região espectral mantida neste segundo modelo (305-645 nm) apresenta informação analítica relevante para o controle quantitativo em questão. Além disso, nos locais onde aparecem as bandas de absorção dos corantes na região do visível houve um aumento significativo no coeficiente de regressão (destacado com *), indicando que a região do ultravioleta realmente mascarava parte do sinal analítico relevante.

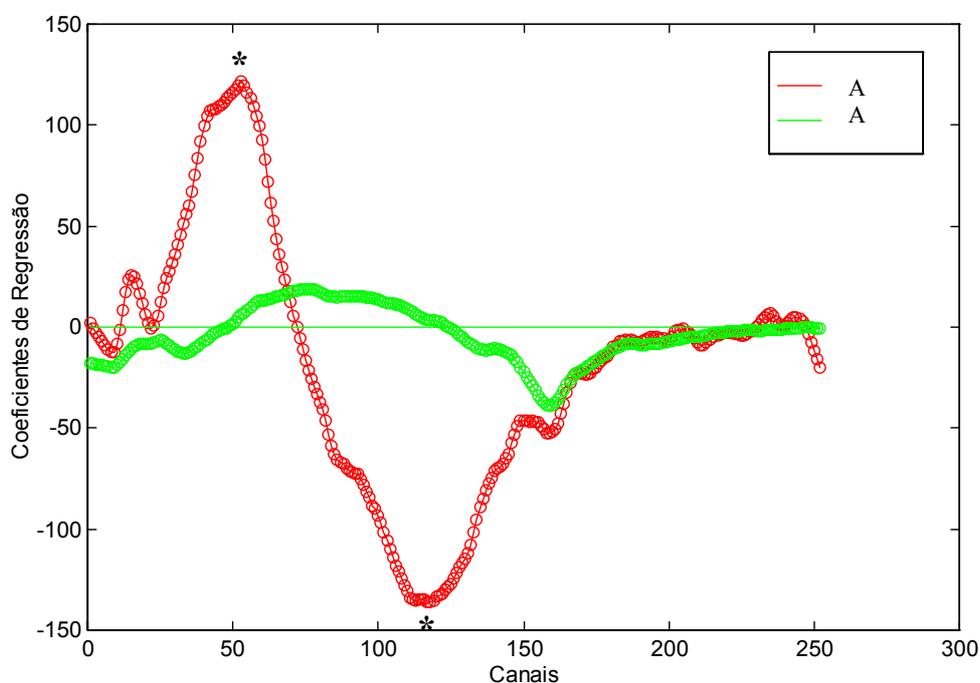


Figura 24: Coeficientes de regressão do modelo PLSR com derivada dos dados e faixa espectral reduzida.

A capacidade de previsão deste modelo pode ser visualizada na Figura 25, cujas concentrações previstas são muito próximas às concentrações dos padrões do conjunto de calibração. O modelo engloba uma ampla faixa de concentração respondendo satisfatoriamente mesmo em concentrações mais baixas.

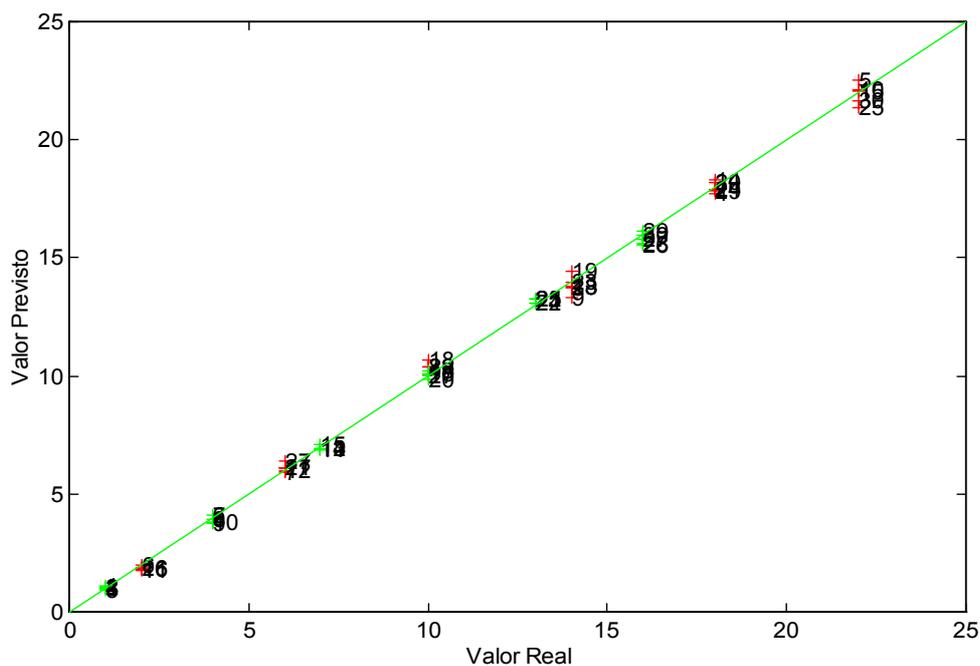


Figura 25: Valores reais vs valores previstos pelo modelo PLSR com derivada dos dados e faixa espectral reduzida.

A Figura 26 apresenta o gráfico de resíduos em função de *leverage*, que é a medida de influência de uma amostra no modelo de regressão. O valor de leverage deve ser menor que $3p/n$, onde p corresponde ao número de componentes principais consideradas para a otimização do modelo e n ao número de padrões de calibração. Para o caso estudado, o limite do valor de leverage é de 0,2 e como pode ser observado no gráfico, todas as amostras estão dentro deste limite. Não há, portanto evidências da existência de qualquer amostra anômala (*outlier*) no conjunto utilizado para construir o modelo.

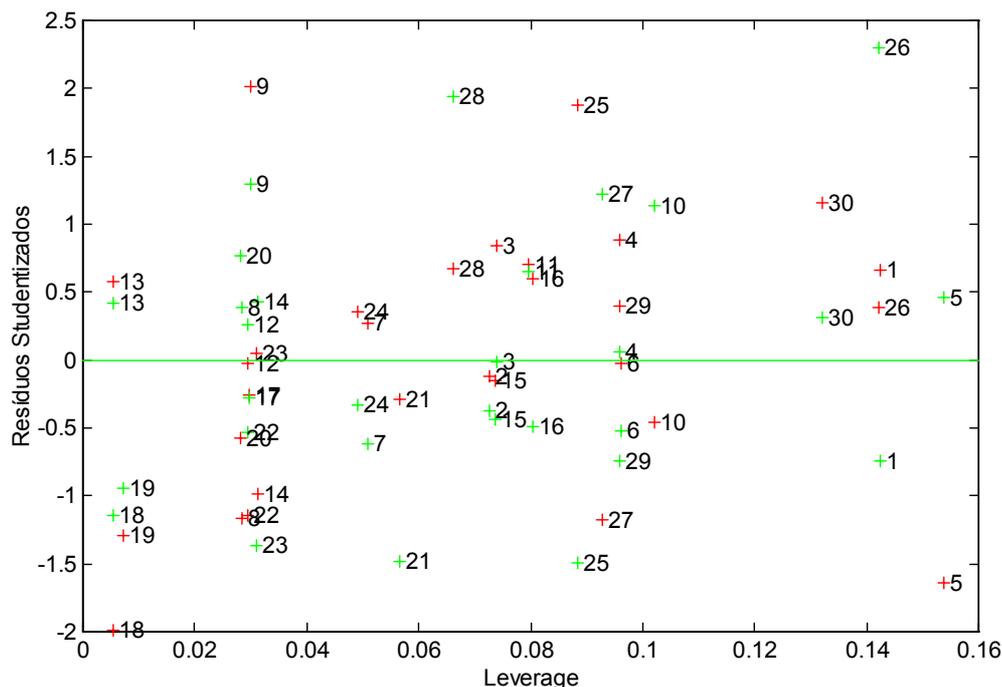


Figura 26: Resíduos *studentizados* em função da *leverage* para o modelo PLSR na análise de corantes.

Os resíduos studentizados são parâmetros que também podem ser utilizados para identificar amostras anômalas. Considerando que os resíduos de Student apresentam uma distribuição normal é possível aplicar um teste *t* para verificar se as amostras estão dentro da distribuição com um nível de confiança de 95%. Segundo Ferreira *et al.* (1999), amostras com resíduos superiores a $|2.5|$ podem corresponder a *outliers*, devendo ser cautelosamente estudadas. Neste caso, nenhuma das amostras apresenta resíduos desta ordem, sendo portanto, desnecessário o estudo da retirada de amostras para o modelo em questão.

Em função do desenvolvimento de inúmeros modelos de calibração multivariada, a escolha daquele com melhor capacidade de previsão foi realizada via análise do RMSEP obtido para o conjunto de validação. Na Tabela 12,

apresentam-se as principais informações de cada um dos modelos desenvolvidos e seus respectivos RMSEP.

Tabela 12: Características dos modelos desenvolvidos e seus respectivos RMSEP.

Modelo	Faixa Espectral	Transformação	Número de PC	RMSEP	
				AT	AC
PCR	200-800 nm	nehuma	2	2,407	0,346
PLSR	200-800 nm	nehuma	2	0,504	0,385
PCR	200-800 nm	1ª Derivada	4	2,943	0,525
PLSR	200-800 nm	1ª Derivada	4	2,146	0,394
PCR	305-645 nm	nehuma	2	0,458	0,106
PLSR	305-645 nm	nehuma	2	0,457	0,106
PCR	305-645 nm	1ª Derivada	2	0,191	0,102
PLSR	305-645 nm	1ª Derivada	2	0,191	0,102

A partir dos dados apresentados na Tabela 12, verificou-se que o modelo PLSR com derivada dos dados e faixa espectral reduzida apresentou a melhor capacidade de previsão. Em função deste aspecto, a Tabela 13 apresenta os valores de erros relativos obtidos na análise de corantes utilizando o modelo PLSR já descrito.

Tabela 13: Erros relativos (%) na análise de corantes em mg L⁻¹ por PLSR.

Valor	Valor	Erro	Valor	Valor	Erro
Real (AT)	Previsto	Relativo	Real (AC)	Previsto	Relativo
6	5,7511	-4,148	1	1,0348	3,480
18	17,8893	-0,615	4	4,0494	1,235
10	10,3512	3,512	7	7,0482	0,689
22	22,1221	0,555	10	10,0705	0,705
2	2,0481	2,405	13	13,1742	1,340
10	10,0595	0,595	16	16,1443	0,902

Os resultados indicam baixos erros relativos tanto na determinação de AC quanto de AT. Sendo que na maioria dos casos os maiores erros relativos estão associados as menores concentrações dos corantes analisados.

5.6 Comparação entre as metodologias matemáticas estudadas

A Tabela 14 apresenta os resultados de RMSEP para as quatro metodologias matemáticas estudadas: Método da aditividade, 1ª Derivada e Metodologia Multivariada (PLSR e PCR). Os resultados obtidos destacam a metodologia multivariada como a técnica de melhor performance na determinação quantitativa simultânea de AT e AC.

Tabela 14: Resultados de RMSEP para as metodologias matemáticas estudadas.

Corante	Metodologias Convencionais		Metodologias Multivariadas	
	Aditividade	1ª Derivada	PCR	PLSR
Tartrazina	1,58	1,690 (364 nm)	0,191	0,191
Crepúsculo	0,84	0,485	0,102	0,102

Vale a pena ressaltar, que o modelo PCR otimizado apresentou os mesmos resultados que o PLSR, no entanto, seguindo a tendência geral observada por outros pesquisadores o PLSR foi escolhido para realizar o controle de qualidade destes corantes em matrizes alimentícias em função de apresentar um modelo mais robusto.

5.7 Aplicação do Método de Calibração Multivariada: PLSR na determinação de AT e AC em amostras alimentícias

Tendo em vista os resultados dos modelos construídos e considerando o valor de RMSEP como parâmetro para escolha do modelo com a melhor capacidade de previsão, o modelo otimizado PLSR foi utilizado na determinação dos corantes AT e AC em amostras de alimentos.

A Tabela 15 apresenta a média (triplicatas) dos teores dos corantes AT e AC em amostras de alimentos para cada um dos três lotes analisados.

Tabela 15: Média dos teores de corantes artificiais (mg L^{-1}) em amostras de alimentos.

Amostras / Sabor	Lotes	Tartrazina*	Crepúsculo**
Gelatina Abacaxi	1	17,97 \pm 0,39	1,85 \pm 0,12
	2	17,54 \pm 1,63	1,69 \pm 0,30
	3	16,98 \pm 1,52	1,54 \pm 0,10
Suco em pó Laranja	1	12,23 \pm 0,97	2,13 \pm 0,12
	2	10,91 \pm 0,22	2,18 \pm 0,06
	3	9,80 \pm 2,04	1,95 \pm 0,24
Suco Líquido Abacaxi	1	6,14 \pm 0,57	0,33 \pm 0,02
	2	5,87 \pm 0,96	0,20 \pm 0,10
	3	5,68 \pm 0,29	0,28 \pm 0,05
Isotônico Laranja	1	16,07 \pm 0,53	1,71 \pm 0,11
	2	16,01 \pm 0,38	1,67 \pm 0,09
	3	16,06 \pm 0,19	1,54 \pm 0,08

* Corrigidos por 90% de recuperação

** Corrigidos por 86% de recuperação

Em função dos resultados obtidos para o fator de recuperação serem inferiores a 95% para ambos corantes, os resultados foram corrigidos a fim de obter resultados mais próximos da realidade.

Os resultados de todos os controles realizados estão dentro dos limites estabelecido pela legislação. Para exemplificar a DDA para o corante AT, considerando uma pessoa com massa corporal aproximada de 60 Kg seria necessário que a mesma ingerisse cerca de 26 litros (52 caixas) de gelatina em

pó sabor abacaxi para ultrapassar o limite estabelecido na JECFA. No caso da DDA para o corante AC, seria necessário que a pessoa ingerisse cerca de 69 litros (69 pacotes) de suco em pó de laranja para ultrapassar o limite estabelecido.

6 CONCLUSÃO

Em função do conjunto de resultados conseguido neste trabalho, é possível concluir que, tal como esperado e observado por outros grupos de pesquisa, a análise de corantes empregando-se espectrofotometria UV-VIS acoplada a metodologias matemáticas permite uma adequada determinação multicomponentes em matrizes alimentares.

Estudos de estabilidade e recuperação dos corantes AT e AC foram realizados em meio aquoso tamponado, para dar confiabilidade à determinação quantitativa destes corantes em produtos alimentícios. Verificou-se que ambos os corantes permanecem estáveis por pelo menos 28 dias, independente das condições de seu acondicionamento. No caso do FR, foi possível evidenciar uma dependência entre este parâmetro e o lote do adsorvente empregado, sendo que foram encontrados 90% de recuperação para AT e 86% para AC.

No processo de quantificação dos corantes de interesse, duas metodologias matemáticas convencionais (princípio da aditividade espectrofotométrica e 1ª derivada) e duas multivariadas (PLSR e PCR) foram empregadas. Os resultados foram avaliados e comparados utilizando-se um conjunto de validação externa contendo seis misturas sintéticas (concentrações conhecidas), pela determinação da exatidão (RMSEP) de cada uma das metodologias.

No caso das metodologias matemáticas convencionais, a análise de AT apresentou RMSEP de 0,485 para a primeira derivada e 1,58 para o princípio da aditividade. Enquanto para a análise de AC obteve-se um RMSEP de 1,69 para primeira derivada e 0,84 para o princípio da aditividade.

O modelo de melhor capacidade de previsão foi o PLSR cuja transformação dos dados espectrais (faixa de 305-645 nm) em primeira derivada e pré-processamento com dados centrados na média propiciou RMSEP de 0,191 e 0,102 para AT e AC, respectivamente. Resultados praticamente idênticos foram obtidos empregando-se a metodologia multivariada PCR.

Em função destes resultados, o modelo multivariado PLSR foi utilizado no controle de qualidade dos corantes de interesse em produtos alimentícios e todas as amostras analisadas apresentaram valores de AT e AC em concordância com a legislação brasileira vigente.

REFERÊNCIAS

ALTINÖZ, S.; TOPTAN, S. Determination of Tartrazine and Ponceau-4R in Various Food Samples by Vierordt's Method and Ratio Spectra First-Order Derivative UV Spectrophotometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.15, p.667-683, 2002.

ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Revista de Nutrição**, v.13, n.2, p.81-88, maio/ago., 2000.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/44_77.htm> Acesso em: 1 maio 2003.

ASHKENAZI, P.; YARNITKY, C.; CAIS, M. Determination of synthetic food colours by means of a novel sample preparation system. **Analytica Chimica Acta**, v.248 p.289-299, 1991.

BAILEY Jr., J. E.; TRAVIS, J. Synthesis and Purification of Trisulphoindigo and Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Determination of Trisulphoindigo in FD & C Blue No. 2. **Dyes and Pigments**, v.6, p.135-154, 1985.

BEEBE, K. R.; KOWALSKI, B.R. An Introduction to Multivariate Calibration and Analysis. **Analytical Chemistry**, v.59, n.17, p.1007-1017, set. 1987.

BERENTE, B.; REICHENBÄCHER, M.; DANZER, K. Improvement of the HPLC analysis of anthocyanins in red wines by use of recently developed columns. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v.371, p.68-72, 2001.

BERBERAN-SANTOS, M. N. Beer's law revisited, **J. Chem. Educ.** v.67, p.757-759, 1990.

BERZAS, J.J.; RODRÍGUES FLORES, J.; VILLASEÑOR LLERENA, M.J.; RODRÍGUEZ FARIÑAS, N. Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of Tartrazine, Patent Blue V and Indigo Carmine in commercial products. **Analytica Chimica Acta**, v.391, p.353-364, 1999.

BERZAS NEVADO, J.J.; GUIBERTEAU CABANILLAS, C.; CONTENTO SALCEDO, A.M. Method development and validation for the simultaneous determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v.378, p.63-71, 1999.

BERZAS NEVADO, J.J.; GUIBERTEAU CABANILLAS, C.; CONTENTO SALCEDO, A.M. Simultaneous spectrophotometric determination of three food dyes by using the first derivative of ratio spectra. **Talanta**, v.42, p.2043-2051, 1995.

BERZAS NEVADO, J.J.; RODRÍGUES FLORES, J.; VILLASEÑOR LLERENA, M.J. Simultaneous determination of tartrazine, riboflavine, curcumin and erythrosine

by derivative spectrophotometry. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v.350, p.610-613, 1994.

BERZAS NEVADO, J.J.; RODRÍGUES FLORES, J.; VILLASEÑOR LLERENA, M.J. Simultaneous spectrophotometric determination of tartrazine, sunset yellow and ponceau 4R in commercial products by partial least squares and principal component regression multivariate calibration methods. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v.361, p.465-472, 1998.

BERZAS NEVADO, J.J.; RODRÍGUES FLORES, J.; VILLASEÑOR LLERENA, M.J.; RODRÍGUEZ FARIÑAS, N. Simultaneous spectrophotometric determination of tartrazine, patent blue V, and indigo carmine in commercial products by partial least squares and principal component regression methods. **Talanta**, v.48, p.895-903, 1999.

CAPITÁN-VALLVEY, L. F.; NAVAS, N.; AVIDAD, R.; ORBE, I. de; BERZAS NEVADO, J.J. Simultaneous determination of colorant mixtures used in cosmetics by Partial Least-Squares Multivariate Calibration Spectrophotometry. **Analytical Sciences**, v.13, p.493-496, 1997.

COMBEAU, S.; CHATELUT, M.; VITTORI, O. Identification and simultaneous determination of Azorubin, Allura red and Ponceau 4R by differential pulse polarography: application to soft drinks. **Talanta**, v.56, p.115-122, 2002.

DEL GIOVINE, L.; BOCCA, A. P. Determination of synthetic dyes in ice-cream by capillary electrophoresis. **Food Control**, v.14, p.131-135, 2003.

DIRETIVA 95/45/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 26 de Julho de 1995. **Diário Oficial das Comunidades Européias**, p.1, L 226 de 22.9.1995.

DOMINGUEZ, F. B.; DIEGO, F. G.; MENDEZ, J. H. Determination of sunset yellow and tartrazine by differential pulse Polarography. **Talanta**, v.37, n.6, p.655-658, 1990.

DUPUY, N.; HUVENNB, J. P.; SOMBRET, B.; LEGRAND, P. Quantitative analysis by mid-infrared spectrometry in food and agro-industrial fields. **Journal of Molecular Structure**, v.294, p.223-226, 1993.

DUPUY, N.; WOJCIECHOWSKI, C. TA, C. D., HUVENNE, J. P., LEGRAND, P., Mid-infrared spectroscopy and chemometrics in corn starch classification, **Journal of Molecular Structure**, v.410-411, p.551-554, 1997.

FARHAT, R.; ABRIL, M. del C. B.; GALÁN, A.C. ANÁLISIS DE DIAZEPAM Y NORTRIPLINA EN CÁPSULAS DE ELABORACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE DERIVADA. **Tecnología Farmacéutica**. In VI Congresso SEFIG y 3ª Jornadas TF, 2003. Disponível em: <http://www.sefig.com/doc/Congreso%20Granada/TF/01_TF.pdf> Acesso em: 11 jan. 2005.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v.22, n.5, p.724-731, 1999.

FUH, M. R.; CHIA, K. J. Determination of sulphonated azo dyes in food by ion-pair liquid chromatography with photodiode array and electrospray mass spectrometry detection. **Talanta**, v.56, p.663-671, 2002.

GARRIGUES, S.; ANDRADE, J. M.; de la GUARDIA, M.; PRADA, D.; Multivariate Calibration in Fourier Transform Infrared Spectrometry for Prediction of Kerosene properties. **Analytica Chimica Acta**, v.317, p.95-105, 1995.

GENNARO, M.C.; ABRIGO, A.; CIPOLLA, G. High-performance liquid chromatography of food colours and its relevance in forensic chemistry. **Journal of Chromatography A**, v.674, p.281-299, 1997.

GENNARO, M.C.; GIOANNINI, E.; ANGELINO, S.; AIGOTTI, R.; GIACOSA, D. Identification and determination of red dyes in confectionery by ion-interaction high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.767, p.87-92, ago. 1997.

GONZÁLEZ, M.; GALLEGO, M.; VALCÁRCEL, M. Determination of natural and synthetic colorants in prescreening dairy samples using liquid chromatography diode array detection. **Analytical Chemistry**, v.75, p.685-693, 2003.

GONZÁLEZ, M.; GALLEGO, M.; VALCÁRCEL, M. Liquid chromatography determination of natural and synthetic colorants in lyophilized foods using an automatic solid-phase extraction system. **J. Agric. Food Chem.** v.51, p.2121-2129, 2003.

HOFER, K. ; JENEWEIN, D.; Quick spectrophotometric identification of synthetic food colorants by linear regression analysis; **European Food Research and Technology**, v.204, n. 1, p.32-38.,1997.

HUANG, H. Y.; CHIU, C. W.; SUE, S. L.; CHENG, C. F. Analysis of food colorants by capillary electrophoresis with large-volume sample stacking. **Journal of Chromatography A**, v.995, p.29-36, 2003.

KAPOR, M. A.; YAMANAKA, H.; CARNEIRO, P. A.; ZANONI, M. V. B. Eletroanálise de corantes alimentícios: determinação de índigo carmim e tartrazina. **Eclética Química**, v.26, p.53-68, 2001.

KATEMAN, G.; BUYDENS, L.; **Quality Control in Analytical Chemistry**. 2 ed., New York: Wiley-Interscience publication, 1993. (A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications, v.60).

LANGHALS, H. ANAL. The rapid identification of organic colorants by UV-Vis spectroscopy. **Bioanal.Chem.** v.374, p.573-578, 2002.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 4 ed. Campinas: Átomo, 2002. p.73-75,

LYKOS, P. The Beer-Lambert law revisited - a development without calculus. **J. Chem. Educ.**, v.69, p.730-732, 1992.

LOPEZ-DE-ALBA, P. L.; WRÓBEL-KACZMARCZYK, K.; WRÓBEL, K.; LÓPEZ-MARTINEZ, L.; AMADOR HERNÁNDEZ, J. Spectrophotometric determination of Vermelho Allura (R40) in soft drink powders using the universal calibration matrix for partial least squares multivariate method. **Analytica Chimica Acta**, v.330, p.19-29, 1996.

MARTENS, H. NAES, T.; **Multivariate Calibration**; Grã Bretanha: John Wiley & Sons, 1989.

MARTENS, M.; MARTENS, H; Near-Infrared Reflectance Determination of Sensory Quality of Peas. **Appl. Spectrosc.** v.40, p.303-310, 1986.

MARTINEZ GALERA, M.; MARTÍNEZ VIDAL, J. L.; GARRIDO FRENICH, A.; GIL GARCÍA, M. D.; Evaluation of Multiwavelength Chromatograms for the Quantification of Mixtures of Pesticides by High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array detection with Multivariate Calibration. **J. Chromatogr**, v.778A, p.139-149, 1997.

MASCRENHAS, J. M. O.; STRINGHETA, P. C.; LARA, J. L.; PINHEIRO, F. R. Preferência de cor nos alimentos entre os alunos da pós-graduação, professores funcionários da Universidade Federal de Viçosa – MG. Disponível em: <<http://www.viax.com.br/sbcn/preferencia.htm>> Acesso em: 1 maio 2003.

MATLAB USER'S GUIDE – Statistic Toolbox; version 3.0; The Mathworks. Disponível em: <<http://www.mathworks.com/products>> Acesso em: 1 ago. 2003.

MUNCK, L.; NORGAARD, L.; ENGELSEN, S.B.; BRO, R.; ANDERSSON, C.A. Chemometrics in food science – a demonstration of the feasibility of a highly exploratory, inductive evaluation strategy of fundamental scientific significance. **Chemometrics Intelligent Laboratory Systems**, v.44, p.31-60, 1998.

NAGATA, N.; BUENO, M.A.M.S.; PERALTA-ZAMORA, P.G. Métodos matemáticos para correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raios-x. **Química Nova**, v.24, n.4, p.531-539, 2001.

NAGATA, N. **Uso de métodos de calibração multivariada na análise de amostras de interesse industrial e espécies de importância ambiental por fluorescência de raios-x**. 2001, 174f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

NI, Y.; GONG, X. Simultaneous spectrophotometric determination of mixtures of food colorants. **Analytica Chimica Acta**, v.354, p.163-171, 1997.

NI, Y.; QI, M.; KOKOT, S. Simultaneous spectrophotometric determination of ternary mixtures of tartrazine, sunset yellow, and Ponceau 4R by H-POINT Standard Addition Method. **Analytical Letters**, v.34, p.2585-2596, 2001.

OKA, H.; SUSUKI, M.; HARADA, K. I.; IWAYA, M.; FUJII, K.; GOTO, T.; ITO, Y.; MATSUMOTO, H.; ITO, Y. Purification of Food Color Red N° 106 (acid red) using pH-zone-refining counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.946, p.157-162, 2002.

ÖZGÜR, M.Ü.; ALPDOGAN, G.; KOYUNCU, I. Zero-Crossing derivative spectrophotometry determination of mixtures of sunset yellow and erythrosine in pure form and in tablets. **Analytical Letters**, v.35, p.721-732, 2002.

ÖZGÜR, M.Ü.; BOZDOGAN, A.; ERÇAG, A.; KOYUNCU, I. Simultaneous determination of anthocyanin and ponceau 4r in drink powders by derivative spectrophotometry and partial Least-Squares Multivariate Spectrophotometric Calibration. **Monatshefte für Chemie**, v.132, p.669-673, 2001.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. **Journal Brazilian Chemical Society**. v.14, p.198-219, març./abr. 2003.

PERALTA-ZAMORA, P.; KUNZ, A.; NAGATA, N.; POPPI, R. J. Spectrophotometric determination of organic dye mixtures by using multivariate calibration. **Talanta**, v.47, p.77-84, 1998.

PÉREZ-URQUIZA, M.; BELTRÁN, J.L. Determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.898, p.271-275, ago. 2000.

PIROUETTE USER GUIDE; version 3.11, Ambiente operacional. Infometrix: Woodinville WA; © 1990-2003.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Determinação de corantes artificiais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em pó para gelatina. **Química Nova**, v.27, p.22-26, 2004.

QUEIJA, C. da; QUEIRÓS, M. A.; RODRIGUES, L. M. A cor dos alimentos. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v.80, p.6-11, 2001.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria uv-vis. **Química Nova**, v.27, n. 5, p.807-812, 2004.

SALDANHA, T.C.B; ARAÚJO, M.C.U. de; BARROS NETO, B. de. Análise multicomponente simultânea por espectroscopia de absorção molecular UV-VIS. **Química Nova**, v.22, n.6, p.847-853, nov./dez. 1999.

SCARMINIO, I. S.; ISHIKAWA, D. N.; BARRETO, W. J.; PACZKOWSKI, É. L.; ARRUDA, I. C. Calibração multivariada para sistemas com bandas sobrepostas

através da análise de fatores do tipo Q. **Química Nova**, v.21, n.5, p.590-596, set./out. 1998.

SENA, M. M.; FERNANDES, J. C. B.; ROVER Jr.; POPPI, R. J.; KUBOTA, L. T.; Application of Two- and Three-way Chemometric Methods in the Study of Acetylsalicylic Acid and Ascorbic Acid Mixtures Using Ultraviolet Spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v.409, p.159-170, 2000.

THOMAS, E. V. A Primer on Multivariate Calibration. **Analytical Chemistry**, v.66, n.15, p.795-804, ago. 1994.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação, por clae, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.3, p.310-313, set./dez. 2001.

ZEIGER, E. Mutagenicity of chemicals added to foods. **Mutation Research**, v.290, p.53-61, 1993.

ZENG, W.; WANG, P.; ZHANG, H.; TONG, S. Qualitative and quantitative analyses of synthetic pigments in foods by using the branch and bound algorithm. **Analytica Chimica Acta**, v.284, p.445-451, 1993.

GLOSSÁRIO

AC: Amarelo Crepúsculo

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AT: Amarelo Tartrazina

CCC: Cromatografia de Contra Corrente

CNNPA: Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLS: Regressão por Mínimos Quadrados Clássicos

CP: Componente Principal

ECZ: Eletroforese Capilar por Zona

DC-SPE: Coluna Dinâmica de Extração em Fase Sólida

DDA ou IDA: Dose Diária Admitida DDA

E: Sistema de Identificação dos Aditivos pela ESCF

ESCF: Comunidade Científica Européia para Alimentos

EC: Eletroforese Capilar

EUA: Estados Unidos

FAO: Food and Agricultural Organization

FD&C: Federal Food, Drug and Cosmetic Act

FIA: Análise por Injeção de Fluxo

FR: Fator de Recuperação

GP: Grau de Pureza

HCA: Análise Hierárquica de Agrupamentos

HPSAM: Método de Adição de Padrão no Ponto-H

INS: Sistema de Numeração Internacional

ITFFA: Análise de Fator com Transformação Interativa

IV: Infravermelho

JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

MM: Massa Molar

PC: Componentes Principais

PCA: Análise por Componentes Principais

PCR: Regressão por Componentes Principais

PLSR: Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

PRESS: Soma dos Quadrados dos Erros de Previsão (validação cruzada)

PVP: Polivinilpirrolidina

RMSEP: Raiz Quadrada da Soma dos Erros de Previsão (validação externa)

UV-VIS: Ultravioleta-Visível

WHO: World Health Organization

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)