



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Luana Floriano

DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS
ISOTÔNICAS EMPREGANDO EXTRAÇÃO
EM FASE SÓLIDA DISPERSIVA E HPLC-UV/Vis

Santa Maria, RS

2016

Luana Floriano

**DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS ISOTÔNICAS
EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DISPERSIVA E HPLC-UV/Vis**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS

2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Floriano, Luana
Determinação de corantes sintéticos em bebidas isotônicas empregando extração em fase sólida dispersiva e HPLC-UV/Vis / Luana Floriano.- 2016.
79 p.; 30 cm

Orientador: Renato Zanella
Coorientadora: Martha Bohrer Adaime
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2016

1. Corantes sintéticos 2. Bebidas isotônicas 3. d-SPE
4. HPLC-UV/Vis I. Zanella, Renato II. Bohrer Adaime, Martha III. Título.

Luana Floriano

**DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS ISOTÔNICAS
EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DISPERSIVA E HPLC-UV/Vis**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**

Aprovada em 05 de agosto de 2016:



Renato Zanella, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Sandra Cadore Peixoto, Dra. (UNIFRA)



Osmar Damian Prestes, Dr. (UFSM)

AGRADECIMENTOS

Aos professores Renato Zanella, Osmar Damian Prestes e Martha Bohrer Adaime, pela orientação, pela confiança depositada em mim durante o desenvolvimento deste trabalho e por contribuírem para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Agradeço também pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP).

Aos membros da banca, Prof. Dr. Renato Zanella, Prof. Dr. Osmar Damian Prestes e o Prof^a. Dra. Sandra Cadore Peixoto pela disponibilidade, dedicação e por suas excelentes contribuições, as quais ajudaram a engrandecer este trabalho.

Aos amigos e colegas do LARP! Impossível citar todos, mas cada um de vocês contribuiu de alguma forma para a realização deste trabalho. Não foi fácil, mas saber que podia contar com vocês fez toda a diferença. Agradeço especialmente à Mariela Viera pelas valiosas sugestões no exame de qualificação, pelos conselhos e pelos momentos de descontração. À Nathália Saibt, pela parceria e por toda ajuda com equipamento. À Lucila Ribeiro pela amizade e cumplicidade desde a graduação, sempre se dispondo a ajudar incondicionalmente. Ao Nelson Bandeira, pela amizade, paciência (e quanta paciência!), por me tranquilizar quando tudo parecia dar errado e pelos conhecimentos compartilhados. Vocês são incríveis, obrigada por tudo!

Agradeço aos professores do Departamento de Química (DQ) e do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFSM, pelos conhecimentos transmitidos durante toda a minha formação acadêmica.

Ao Ademir e Valéria, funcionários do PPGQ, sempre prestativos e atenciosos no atendimento de suas tarefas. À CAPES pelo auxílio financeiro fornecido.

A todos os meus amigos, pelo apoio e torcida para que tudo desse certo. Agradeço de forma especial às queridas amigas Natalia Muñoz, Mariele Mazuim, Danieli Bandeira, Débora Orso e Maiara Souza por tornarem estes dois anos de mestrado mais leves e divertidos, vocês vão estar sempre em meu coração! Obrigada pela amizade, pelo companheirismo e pelo carinho.

Aos meus pais Fátima e Ivar, que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada pela educação e pelos valores transmitidos, essa conquista também é vocês! Aos meus irmãos Júnior e Manuela, por estarem sempre comigo. Amo vocês!

Ao Jáder Villanova, agradeço pela paciência, compreensão e apoio em todos os momentos. Obrigada por me incentivar e por sempre acreditar em mim, te amo!

A Deus, por sempre guiar o meu caminho.

Oração a Nossa Senhora Desatadora de Nós

Santa Maria, Mãe de Deus, virgem cheia de graça,
vós sois a nossa desatadora de nós.

Com as Vossas mãos cheias do amor de Deus, vós desatais os obstáculos do
nosso caminho como um nó que, sob as vossas mãos,
perde todos os obstáculos e se torna uma fita reta do amor de Deus!

Desatai, Virgem Mãe, Santa e Admirável, todos os nós que nós mesmos
nos causamos por nossa vontade própria e todos os nós que,
diante de nós, impedem o nosso caminho.

Iluminai com os vossos olhos sobre eles, para que todos os nós tornem-se
transparentes e nós, cheios de gratidão, possamos com as vossas mãos
desatar aquilo que parece impossível.

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS ISOTÔNICAS EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DISPERSIVA E HPLC-UV/Vis

Autora: Luana Floriano
Orientador: Renato Zanella

As bebidas isotônicas são especialmente formuladas para pessoas que praticam atividade física, sendo compostas principalmente por carboidratos, eletrólitos e vitaminas. Os corantes sintéticos são aditivos alimentares comumente utilizados em bebidas isotônicas para aprimorar suas características de consumo e aparência. Além do menor custo de produção em relação aos corantes de origem natural, os corantes sintéticos apresentam diversas vantagens, tais como alta estabilidade à luz, oxigênio e pH, uniformidade de cor e baixa contaminação microbiológica. No entanto, alguns destes compostos podem causar efeitos adversos à saúde (alergia, asma, hiperatividade, tumores de tireoide, etc.), especialmente quando consumidos em excesso. Assim, seu uso é estritamente controlado em todo o mundo. O presente estudo teve como objetivo desenvolver um método simples, rápido e eficiente para a determinação dos corantes sintéticos tartrazina, amarelo crepúsculo, amarantho, ponceau 4R, azul de indigotina e azul brilhante em bebidas isotônicas empregando extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta/visível (HPLC-UV/Vis). Na etapa de extração utilizou-se 25 mg do sorvente polimérico Oasis[®] HLB e a etapa de eluição foi realizada com seringa, empregando uma solução de metanol:hidróxido de amônio (95:5, v/v). Os resultados dos ensaios de recuperação, avaliados nos níveis 2,0, 4,0 e 6,0 mg L⁻¹, foram entre 76 e 108% com desvio padrão relativo (RSD) <18%. Os limites de detecção e de quantificação do método foram 0,6 e 2 mg L⁻¹, respectivamente. O método foi aplicado em 8 amostras de bebidas isotônicas comerciais e os resultados indicaram que todas as amostras estudadas apresentaram corantes dentro dos limites máximos permitidos pela legislação brasileira. O método d-SPE proposto para a determinação de 6 corantes sintéticos em bebidas isotônicas empregando HPLC-UV/Vis demonstrou ser rápido, barato e eficaz, podendo ser aplicado em análises de rotina.

Palavras-chave: Corantes sintéticos; Bebidas isotônicas; d-SPE; HPLC-UV/Vis.

ABSTRACT

DETERMINATION OF SYNTHETIC DYES IN SPORTS DRINKS BY DISPERSIVE SOLID-PHASE EXTRACTION AND HPLC-UV/Vis

Author: Luana Floriano
Advisor: Renato Zanella

Sports drinks are specially formulated for people who are undertaking physical activity, being mainly composed by carbohydrates, electrolytes and vitamins. Synthetic dyes are food additives commonly used in sports drinks to improve their consumer characteristics and appearance. Besides the lower cost of production in relation to dyes of natural origin, synthetic colorants have several advantages such as high stability to light, oxygen and pH, color uniformity and low microbiological contamination. However some of these compounds cause adverse health effects (allergy, asthma, hyperactivity, thyroid tumors, etc.), especially when consumed in excess. Thus, their use is strictly controlled around the world. The present study aimed to develop a simple, fast and efficient method for the determination of the synthetic dyes tartrazine, sunset yellow, amaranth, ponceau 4R, indigo carmine and brilliant blue in sports drinks employing dispersive solid-phase extraction (d-SPE) and high efficiency liquid chromatography with ultraviolet/visible detection (HPLC-UV/Vis). In the extraction step, it was used 25 mg of the polymeric sorbent Oasis[®] HLB and the elution step was performed with methanol:ammonium hydroxide (95:5, v/v). Recovery results, evaluated at 2.0; 4.0 and 6.0 mg L⁻¹, were between 76 and 108% with relative standard deviation (RSD) <18%. Method limits of detection and quantification were 0.6 and 2 mg L⁻¹, respectively. The method was applied on 8 commercial samples of sports drinks and the results indicated that all studied samples presented dye levels in conformity with the Brazilian legislation. The proposed d-SPE method for the determination of 6 synthetic dyes in sports drinks using HPLC-UV/Vis shown to be rapid, effective and cheap, and can be applied in routine analysis.

Keywords: Synthetic dyes; Sports drinks; d-SPE; HPLC-UV/Vis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição nutricional de três marcas distintas de bebidas isotônicas .	16
Tabela 2 – Corantes sintéticos permitidos em alimentos e bebidas no Brasil	25
Tabela 3 – Limites máximos dos corantes sintéticos permitidos em bebidas de acordo com União Europeia, <i>Codex Alimentarius</i> e ANVISA	26
Tabela 4 – Parâmetros de métodos analíticos normalmente avaliados na validação	39
Tabela 5 – Compostos avaliados neste trabalho com seus respectivos códigos INS/E, fórmula molecular, massa molar, solubilidade em água, pKa e pureza.	42
Tabela 6 – Gradiente da fase móvel utilizado no sistema HPLC-UV/Vis	43
Tabela 7 – Condições cromatográficas empregadas no sistema HPLC-UV/Vis para a validação do método proposto	48
Tabela 8 – Comprimentos de onda ($\lambda_{m\acute{a}x}$) selecionados para a determinação de corantes sintéticos em bebidas isotônicas e tempos de retenção (t_R) de cada composto analisado.	49
Tabela 9 – Equações das curvas analíticas, r^2 , e limites de detecção e de quantificação do instrumento e do método.....	61
Tabela 10 – Resultados de exatidão (R) e precisão (RSD) para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.....	61
Tabela 11 – Resultados da análise das amostras comerciais de bebidas isotônicas empregando o método proposto	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Bebidas isotônicas de diferentes sabores	15
Figura 2 – Consumo per capita de bebidas isotônicas no Brasil no período de 2010 a 2014	17
Figura 3 – Volume de produção do mercado brasileiro de bebidas isotônicas no período de 2010 a 2014	18
Figura 4 – Esquema de um detector espectrofotométrico com comprimento de onda variável.....	28
Figura 5 – Procedimento típico de extração em fase sólida (SPE)	31
Figura 6 – Carboidratos normalmente encontrados nos alimentos	35
Figura 7 – Método de preparo de amostra proposto para determinação de corantes sintéticos em bebidas isotônicas	44
Figura 8 – Cromatograma de uma solução preparada em água ultrapura na concentração 0,5 mg L ⁻¹ obtido por HPLC-UV/Vis em 4 comprimentos de onda, onde: (1) tartrazina, (2) amarantho (3) azul de indigotina, (4) ponceau 4R, (5) amarelo crepúsculo e (6) azul brilhante.	50
Figura 9 – Modificações químicas nas estruturas dos sorventes Oasis [®] HLB e Oasis [®] WAX em condições ácidas (abaixo de seus respectivos pKa).....	52
Figura 10 – Testes de extração com Oasis [®] HLB e Oasis [®] WAX: (a) amostra branco fortificada em 4 mg L ⁻¹ ; (b) extração com Oasis [®] HLB em pH 1; (c) extração com Oasis [®] WAX em pH 1 e (d) extração com Oasis [®] HLB em pH 3.....	52
Figura 11 – Resultados dos ensaios de recuperação dos testes com Oasis [®] WAX e Oasis [®] HLB, no nível de fortificação 4 mg L ⁻¹	53
Figura 12 – Resultados dos ensaios de recuperação para escolha da melhor forma de eluição.....	54
Figura 13 – Representação do método d-SPE desenvolvido para a extração de corantes sintéticos em bebidas isotônicas	55
Figura 14 – Teste de Benedict aplicado ao método desenvolvido: (a) amostra branco; (b) filtrado obtido após percolação da amostra; (c) extrato obtido após eluição.....	56
Figura 15 – Teste de Seliwanoff aplicado ao método desenvolvido: (a) água ultrapura; (b) amostra branco; (c) filtrado obtido após percolação da amostra e (d) extrato obtido após eluição.....	57

Figura 16 – Demonstração da ausência de picos cromatográficos de interferentes na (a) amostra branco e (b) branco reagente; e (c) amostra branco fortificada no nível 2 mg L ⁻¹	58
Figura 17 – Curva analítica (solvente) obtida por HPLC-UV/Vis para os corantes avaliados	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

CID – dissociação induzida por colisão, do inglês *collision induced dissociation*;

CNS – Conselho Nacional da Saúde;

DAD – detecção por arranjo de diodos, do inglês *diode array detection*;

d-SPE – extração em fase sólida dispersiva, do inglês *dispersive solid-phase extraction*;

FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*;

FDA – *Food and Drug Administration*;

HLB – equilíbrio hidrofílico-lipofílico, do inglês *hydrophilic-lipophilic-balanced*;

HPLC-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, do inglês *high-performance liquid chromatography with diode array detection*;

HPLC-UV/Vis – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta/visível, do inglês *high-performance liquid chromatography with ultraviolet/visible detection*;

IDA – Ingestão diária aceitável;

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial;

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*;

INS – Sistema numérico internacional, do inglês *International Numbering System*;

JECFA – Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/WHO, do inglês *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*;

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*;

LOD – limite de detecção, do inglês *limit of detection*;

LOQ – limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*;

MAE – extração assistida por micro-ondas, do inglês *microwave-assisted extraction*;

m/v – massa/volume;

Mercosul – Mercado Comum do Sul;

p.c. – peso corpóreo;

mOsm kg⁻¹ – miliosmoles por quilo de água;

MS – Ministério da Saúde;

MSPE – extração em fase sólida magnética, do inglês *magnetic solid-phase extraction*;

pH – potencial hidrogeniônico;

pKa – constante de dissociação ácida;

PSA – amina primária-secundária, do inglês *primary secondary amine*;

RASFF – Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações, do inglês *Rapid Alert System for Food and Feed*;

r² – coeficiente de determinação;

RSD – desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*;

SPE – extração em fase sólida, do inglês *solid-phase extraction*;

t_R – tempo de retenção;

TDAH – Transtorno de *déficit* de atenção e hiperatividade;

UE – União Europeia, do inglês *European Union*;

UAE – extração assistida por ultrassom, do inglês *ultrasound-assited extraction*;

UHPLC-DAD – cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, do inglês *ultra-high-eficiência liquid chromatographic–diode array detection*;

v/v – volume por volume;

WAX – troca aniônica fraca, do inglês *Weak Anionic eXchange*;

WHO – Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 BEBIDAS ISOTÔNICAS.....	15
2.1.1 Produção e consumo de bebidas isotônicas no Brasil	17
2.2 CORANTES EM ALIMENTOS E BEBIDAS.....	19
2.2.1 Histórico	19
2.2.2 Definição e classificação	20
2.2.3 Corantes sintéticos – legislações	22
2.2.4 Corantes sintéticos – legislação brasileira	24
2.3 CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS ISOTÔNICAS	25
2.4 A CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA NA DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM ALIMENTOS E BEBIDAS	27
2.5.1 Extração em fase sólida	30
2.5.2 Extração em fase sólida dispersiva	33
2.5.3 Outros métodos de preparo de amostra	34
2.6 ANÁLISE QUALITATIVA DE AÇÚCARES	35
2.6.1 Teste de Benedict	36
2.6.2 Teste de Seliwanoff	37
2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	40
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS	40
3.3 ESCOLHA DOS COMPOSTOS	41
3.5 AMOSTRAS DE BEBIDAS ISOTÔNICAS.....	42
3.6 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC-UV/Vis PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS ISOTÔNICAS	43
3.6.1 Escolha da fase móvel	43
3.7 OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS ISOTÔNICAS	44
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS ISOTÔNICAS	45
3.8.1 Seletividade	45

3.8.2 Curva analítica e faixa linear	45
3.8.3 Limite de detecção e limite de quantificação	46
3.8.4 Exatidão	46
3.8.5 Precisão (repetibilidade) e precisão intermediária	46
3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC-UV/Vis PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS ISOTÔNICAS	48
4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS ISOTÔNICAS	51
4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DE AÇÚCARES	55
4.3.1 Teste de Benedict	55
4.3.2 Teste de Seliwanoff	56
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO	57
4.4.1 Seletividade	57
4.4.2 Curva analítica e faixa linear	59
4.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação	60
4.4.4 Exatidão e precisão	61
4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO.....	62
5 CONCLUSÕES	63
6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS	65
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE A – FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS 14 CORANTES SINTÉTICOS PERMITIDOS PARA USO EM ALIMENTOS NO BRASIL	77
APÊNDICE B – ESTRUTURAS DOS SORVENTES CITADOS NO TRABALHO	79

1 INTRODUÇÃO

As bebidas esportivas são formuladas especialmente para pessoas que praticam atividades físicas prolongadas e intensas, sendo compostas principalmente por carboidratos, eletrólitos e vitaminas (NAVARRO-PASCUAL-AHUIR *et al.*, 2016). Tradicionalmente, os diferentes sabores de bebidas isotônicas têm sido preparados utilizando-se corantes sintéticos. Esses aditivos proporcionam uma ampla gama de cores, tornando os produtos mais atrativos aos consumidores (MARCHI *et al.*, 2003).

Além do menor custo de produção em relação aos corantes de origem natural, corantes sintéticos apresentam várias vantagens, tais como alta estabilidade à luz, oxigênio e pH, uniformidade de cor e baixa contaminação microbiológica (BENTO *et al.*, 2015). Porém, alguns destes compostos causam efeitos adversos à saúde (alergia, asma, hiperatividade, tumores da tireoide, entre outros), especialmente quando consumidos em excesso. Assim, seu uso é estritamente controlado em todo o mundo (SUN *et al.*, 2013).

A lista dos corantes sintéticos permitidos nos alimentos varia substancialmente em cada país ou região, principalmente devido às opiniões divergentes a cerca da inocuidade destas substâncias e também devido ao maior/menor consumo de produtos coloridos artificialmente (PRADO & GODOY, 2003). No Brasil, os limites máximos de corantes admitidos em produtos alimentícios, incluindo bebidas esportivas, são estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), baseado em regulamentações internacionais.

Com o aumento do consumo de bebidas isotônicas, bem como de diversos produtos industrializados contendo corantes sintéticos, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais rápidos, confiáveis e eficientes, a fim de garantir a qualidade e segurança dos alimentos. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography with diode array detection*) com detecção espectrofotométrica no ultravioleta/visível (UV/Vis, do inglês *ultraviolet/visible*) ou por arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode array detection*) tem se destacado como técnica preferencial, visto que os corantes absorvem fortemente nos comprimentos de onda do ultravioleta e do visível (CHEN *et al.*, 2014; FENG *et al.*, 2011).

Em relação ao preparo de amostra, a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*) é o método mais comumente empregado na limpeza de

extratos provenientes de amostras de alimentos antes da análise instrumental (MAZDEH *et al.*, 2016). Alguns exemplos de sorventes utilizados na determinação de corantes são: resina de poliamida, Strata[®]-X-AW, sílica modificada com aminopropil, Oasis[®] WAX e Oasis[®] HLB.

Apesar da grande variedade de sorventes comercialmente disponíveis, as etapas envolvidas na SPE frequentemente são trabalhosas, morosas e requerem a utilização de dispositivos comerciais multivias (*manifolds*) e vácuo para executar a extração (ANDRADE-EIROA *et al.*, 2016; JARDIM, 2010). Outros métodos baseados na SPE tradicional tais como a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid-phase extraction*) e a extração em fase sólida magnética (MSPE, do inglês *magnetic solid-phase extraction*), têm sido empregados com sucesso na limpeza de extratos (CHEN *et al.*, 2014). Particularmente, a d-SPE é utilizada na etapa de limpeza do método QuEChERS, permitindo simplificar a execução do preparo de amostra. No entanto, o emprego da d-SPE na análise de corantes sintéticos não foi relatado na literatura até o momento.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método de preparo de amostra simples, rápido e eficaz para a determinação de 6 corantes sintéticos em bebidas esportivas utilizando d-SPE e HPLC-UV/Vis. Posteriormente, o método foi aplicado em amostras comerciais de bebidas isotônicas de diferentes sabores.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BEBIDAS ISOTÔNICAS

Atividades físicas prolongadas e intensas, principalmente quando realizadas sob temperaturas elevadas, podem causar fadiga muscular e desidratação, devido à perda de água e de eletrólitos durante a transpiração. A ingestão de líquidos, tais como água, água de coco e bebidas isotônicas, auxilia na reidratação e no funcionamento normal do organismo (MAUGHAN & SHIRREFFS, 2004).

Bebidas isotônicas ou bebidas esportivas (Figura 1) são suplementos hidroeletrólíticos, ou seja, produtos formulados especialmente com o objetivo de repor a água e os sais minerais eliminados durante a prática de esportes, além de atuarem como fonte de energia. Para atender a finalidade a que se propõem, os isotônicos devem apresentar concentrações variadas de sódio, cloreto e carboidratos. Opcionalmente, podem conter potássio, vitaminas e/ou minerais (ex: magnésio, cálcio e fósforo) em concentrações semelhantes àsquelas encontradas nos fluidos orgânicos (CASTRO, 2006).

Figura 1 – Bebidas isotônicas de diferentes sabores



No Brasil, as bebidas isotônicas estão incluídas na resolução RDC nº 18/2010 e devem atender aos seguintes requisitos (ANVISA, 2010):

- A osmolalidade do produto pronto para consumo deve ser inferior a 330 mOsm kg⁻¹ água;

- A concentração de sódio no produto pronto para consumo deve estar entre 460 e 1150 mg L⁻¹, devendo ser utilizados sais inorgânicos para fins alimentícios como fonte de sódio;
- Os carboidratos podem constituir até 8% (m/v) do produto pronto para consumo;
- O produto pode ser adicionado de potássio em até 700 mg L⁻¹;
- O produto não pode ser adicionado de fibras alimentares, mas pode conter vitaminas e minerais, conforme regulamento técnico específico sobre adição de nutrientes essenciais;
- É permitida a utilização de aditivos e coadjuvantes de tecnologia, desde que não venham alterar a finalidade a que o alimento se propõe.

A Tabela 1 apresenta um comparativo da composição nutricional de três diferentes marcas (A, B e C) de bebidas isotônicas comercializadas no Brasil. Pode-se verificar que os carboidratos (açúcares) e os sais minerais são os principais componentes presentes neste tipo de produto.

Tabela 1 – Composição nutricional de três marcas distintas de bebidas isotônicas

Componentes	Valor (por litro)		
	A	B	C
Carboidratos	42 g	37 g	60 g
Sódio	285 mg	500 mg	520 mg
Cloreto	245 mg	810 mg	-
Potássio	230 mg	125 mg	140 mg
Vitamina B3	-	12 mg	-
Vitamina B6	-	0,95 mg	-
Vitamina B12	-	1,8 µg	-

Fonte: www.cocacolabrasil.com.br; www.pepsico.com.br

Os isotônicos são muitas vezes confundidos com os energéticos, porém o termo “bebida energética” refere-se a bebidas que contêm, além de carboidratos, cafeína em combinação com alguma outra substância de ação estimulante, como, por exemplo, taurina, extratos de ervas e vitaminas (NAVARRO-PASCUAL-AHUIR, 2016). Esses produtos não podem ser indicados para atletas ou para a prática de

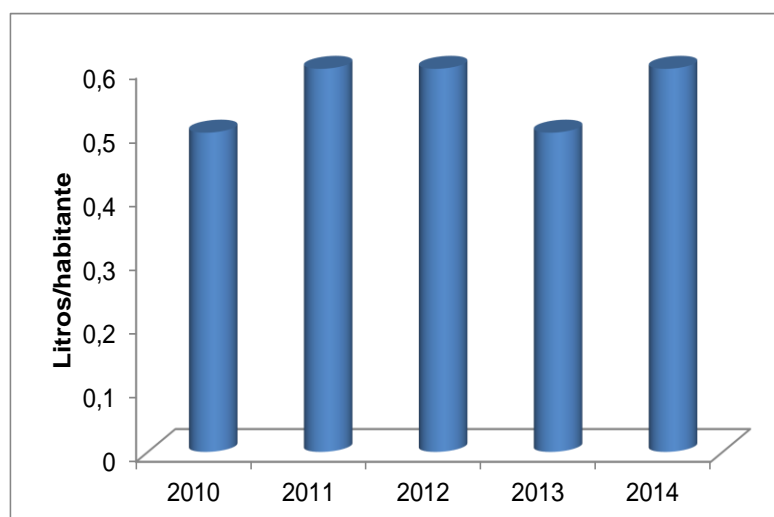
atividade física e não devem ser misturados com bebidas alcoólicas (ANVISA, 2016).

2.1.1 Produção e consumo de bebidas isotônicas no Brasil

O consumo de bebidas isotônicas, assim como o de bebidas energéticas, atingiu dimensões significativas ao longo das últimas duas décadas, estando constantemente presentes na dieta de diferentes classes sociais e faixas etárias (NAVARRO-PASCUAL-AHUIR *et al.*, 2016). A rápida expansão deste setor está principalmente relacionada a mudanças no estilo de vida dos consumidores e também à preferência pela ingestão de produtos que proporcionem outros benefícios, além de apenas saciar a sede (MARCHI *et al.*, 2003).

O Brasil consumiu 75,4 mil litros de bebidas isotônicas em 2011: um crescimento de 29% em relação a 2009 e de 9% em relação a 2010, segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas (ABIR, 2015). A Figura 2 mostra que o consumo de isotônicos no país foi em média 0,56 litros/habitante no período de 2010 a 2014.

Figura 2 – Consumo per capita de bebidas isotônicas no Brasil no período de 2010 a 2014

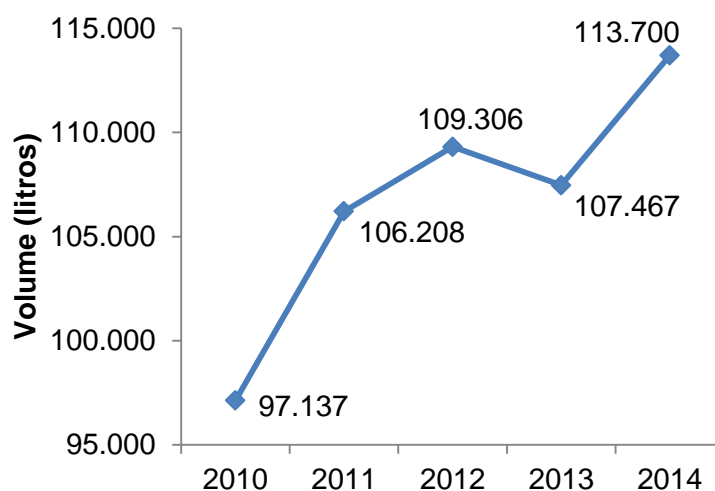


Fonte: (Adaptado de ABIR, 2015).

Para atender à demanda crescente por novos produtos, o segmento de suplementos hidroeletrólitos vem ampliando seu mercado e introduzindo novos

sabores (MARCHI *et al.*, 2003). A Figura 3 ilustra o aumento na produção do mercado brasileiro de bebidas isotônicas nos anos de 2010 a 2014, sendo que apenas em 2013 houve uma queda na quantidade produzida.

Figura 3 – Volume de produção do mercado brasileiro de bebidas isotônicas no período de 2010 a 2014



Fonte: (Adaptado de ABIR, 2015).

Tradicionalmente, os diferentes sabores de bebidas isotônicas têm sido preparados utilizando-se corantes sintéticos. Esses aditivos proporcionam uma ampla gama de cores, tornando os produtos mais atrativos aos consumidores, conforme pode ser observado na Figura 1 (MARCHI *et al.*, 2003). No entanto, alguns corantes sintéticos apresentam potencial risco à saúde humana, principalmente quando consumidos em quantidades excessivas (MINIOTI *et al.*, 2007).

Deste modo, o emprego de polpas e sucos de frutas na produção de isotônicos aponta para uma tendência, pois além de agregar valor nutricional à bebida, responde ao forte apelo dos consumidores por produtos naturais (MARCHI *et al.*, 2003).

2.2 CORANTES EM ALIMENTOS E BEBIDAS

2.2.1 Histórico

A aceitação de um alimento pelo consumidor está intrinsecamente relacionada à sua cor. Embora seja uma característica sensorial subjetiva, a cor é essencial na indução da sensação global resultante das outras características, como aroma, sabor e textura. Desta forma, os corantes têm sido adicionados aos alimentos e bebidas durante séculos, a fim de conferir, intensificar ou restaurar a cor destes (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2009).

Acredita-se que o emprego de corantes em alimentos tenha ocorrido inicialmente por volta de 1500 a.C. no Egito, onde fabricantes de doces acrescentavam extratos naturais e vinho para conferir sabor e melhorar a aparência dos produtos (DOWNHAM & COLLINS, 2000).

Até a metade do século XIX, os corantes utilizados em alimentos e bebidas eram de origem natural: vegetal, animal e mineral. Na Inglaterra, substâncias altamente tóxicas foram empregadas para colorir alimentos, como, por exemplo, Pb_3O_4 em queijos, HgS em doces e $CuSO_4$ em conservas de picles (DOWNHAM & COLLINS, 2000; PRADO & GODOY, 2003).

A partir de 1856, com desenvolvimento do primeiro corante sintético (mauveína) pelo químico inglês Sir William Henry Perkin, centenas de corantes foram produzidos nos EUA e na Europa. Assim, diversos produtos, incluindo geleias, condimentos e vinhos, passaram a ser coloridos com aditivos sintéticos, muitos dos quais nunca haviam sido testados a fim de verificar sua toxicidade ou outros efeitos nocivos à população (PRADO & GODOY, 2003).

Um exemplo são os corantes Sudan, amplamente utilizados na indústria de plásticos, combustíveis e ceras para polimento de pisos e sapatos. Devido ao seu baixo custo e grande disponibilidade, estes compostos também passaram a ser aplicados em alimentos, especialmente em produtos à base de pimenta. No entanto, foram classificados como carcinogênicos e, atualmente, seu uso em alimentos é proibido na maioria dos países, incluindo União Europeia, Brasil e China (REBANE *et al.*, 2010; KHALIKOVA *et al.*, 2015).

2.2.2 Definição e classificação

Os corantes são uma classe de aditivos alimentares, sem valor nutritivo, definidos como “substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de um alimento ou bebida”, e podem ser classificados em (BRASIL, 1977a):

1. Corante orgânico natural: obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego tecnológico adequado.
2. Corante orgânico sintético: obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado. Essa classe pode ser subdividida em:
 - 2.1. Corante artificial: é o corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais.
 - 2.2. Corante orgânico sintético idêntico ao natural: é o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural.
3. Corante inorgânico: obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento.
4. Caramelo: corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão.
5. Caramelo (processo amônia): é o corante orgânico sintético idêntico ao natural, obtido pelo processo amônia, cujo teor de 4-metil-imidazol não exceda 200 mg kg^{-1} .

A adição de corantes orgânicos sintéticos é uma das práticas mais eficazes e econômicas para intensificar, manter ou restaurar a cor de um produto processado (WU *et al.*, 2013). Além do menor custo de produção em relação aos corantes naturais, os aditivos sintéticos apresentam: maior capacidade tintorial e uniformidade da cor, alta estabilidade à luz, temperatura, agentes redox e ao pH; e baixa contaminação microbiológica (ALVES *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2015).

No entanto, a maioria dessas substâncias artificiais possui anéis aromáticos e grupos azo (-N=N-) em sua estrutura química principal, o que pode representar

potencial risco à saúde humana, sobretudo quando consumidas em excesso. Reações alérgicas, asma e transtorno de *déficit* de atenção e hiperatividade (TDAH) são apenas alguns dos efeitos associados à ingestão de corantes sintéticos (SHEN *et al.*, 2014; QI *et al.*, 2015).

Os corantes azóicos, caracterizados pela presença de um ou mais grupos azo entre dois anéis aromáticos, representam mais da metade da produção mundial de corantes (LI *et al.*, 2015). Alguns representantes dessa classe são: tartrazina, amarelo crepúsculo, azorrubina, amarantho, ponceau 4R, negro brilhante BN, marrom HT e vermelho 40.

Esses aditivos são resistentes a condições aeróbias, mas podem ser facilmente reduzidos a aminas aromáticas pela flora intestinal, causando dores de cabeça frequentes em adultos e hiperatividade em crianças. Além disso, podem apresentar efeitos neurotóxicos e/ou genotóxicos, e alguns são considerados carcinogênicos em determinados países (TANG *et al.*, 2014; YAMJALA *et al.*, 2016).

Dentre os azocorantes, a tartrazina tem recebido uma maior atenção dos toxicologistas e alergistas. Estima-se que uma em cada 10 mil pessoas apresenta reações a esse aditivo, desde urticária até asma (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2009). Embora a incidência de sensibilidade à tartrazina na população em geral seja baixa, esta é frequentemente observada em pessoas que também possuem hipersensibilidade à aspirina (ANVISA, 2007a).

Outras classes de corantes sintéticos amplamente empregados pela indústria alimentícia são os derivados do trifenilmetano, os indigoides e os xantenos. Os trifenilmetanos apresentam três radicais arila ligados a um átomo de carbono central e, também, grupos sulfônicos que lhes conferem elevada solubilidade em água. Verde rápido, azul brilhante e azul patente V são exemplos de derivados do trifenilmetano (PRADO & GODOY, 2003).

Recentemente, Lucová *et al.* (2013) demonstraram que os aditivos azul brilhante e azul patente V apresentam a capacidade de entrar na corrente sanguínea através da saliva. Esta constatação é preocupante, particularmente com relação às crianças, devido à diversidade de doces coloridos artificialmente com estas substâncias (por exemplo, pirulitos, balas e gomas).

Os principais representantes das classes xanteno e indigoide permitidos para uso em alimentos e bebidas são a eritrosina e o azul de indigotina, respectivamente. Estudos relatam que a eritrosina influencia no comportamento infantil e interfere no

funcionamento da glândula tireoide, devido ao alto teor de iodo em sua estrutura química (CHEQUER *et al.*, 2012). O corante azul de indigotina pode causar náuseas, vômito, hipertensão e, ocasionalmente, alergias com prurido e problemas respiratórios (FIB, 2009).

2.2.3 Corantes sintéticos – legislações

Com o aumento no número de aditivos com poder corante e sua crescente utilização em alimentos e bebidas, tornou-se necessário estabelecer legislações para controlar seu uso. A lista de corantes sintéticos permitidos é diferente em cada país ou região, devido principalmente às opiniões divergentes quanto à inocuidade dessas substâncias e ao maior ou menor consumo de produtos coloridos artificialmente (PRADO & GODOY, 2003).

Nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprova o emprego de apenas sete corantes sintéticos, sendo eles: amarelo crepúsculo, azul brilhante, eritrosina, azul de indigotina, tartrazina, vermelho 40 e verde rápido (FDA, 2014). Diversos países, como Canadá, México, Austrália, China e Japão, também têm suas próprias regulamentações (MCAVOY, 2014).

A União Europeia (UE) tem um dos padrões de segurança alimentar mais elevados no mundo, devido principalmente ao sólido conjunto de legislações em vigor (UE, 2016). Através da Diretiva 1994/36/EC, a União Europeia autoriza os mesmos corantes que os EUA, com exceção do verde rápido, além dos aditivos amarelo de quinoleína, amaranto, azul patente V, azorrubina, negro brilhante BN, ponceau 4R e verde S (UE, 1994).

O Sistema de Alerta Rápido da UE para Alimentos e Rações (RASFF, do inglês *Rapid Alert System for Food and Feed*), criado em 1979, permite o acompanhamento transfronteiriço de informações, reagindo rapidamente quando riscos à saúde pública são detectados na cadeia alimentar (UE, 2016). O RASFF denuncia o uso ilegal de diversas substâncias, incluindo elevados teores de corantes sintéticos, sua presença não declarada ou o uso ilegal em certos tipos de alimentos (BONAN *et al.*, 2013).

O *Codex Alimentarius*, organismo internacional subsidiário da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e da Organização Mundial da Saúde

(WHO, do inglês *World Health Organization*), estabelece especificações para a utilização de diversas substâncias, incluindo corantes (FAO, 2016).

Um dos critérios instituídos pelo *Codex Alimentarius* é o sistema numérico internacional de identificação de aditivos alimentares (INS, do inglês *International Numbering System*), que funciona como uma alternativa à declaração do nome específico da substância. Na União Europeia, cada aditivo possui um código “E”, o qual corresponde ao INS listado no *Codex* (MACVOY, 2014). Assim, o corante tartrazina, por exemplo, pode ser identificado como INS102 ou E102.

Com base em estudos toxicológicos, o Comitê de Especialistas da FAO/WHO em Aditivos Alimentares (JECFA, do inglês *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) assessora o *Codex Alimentarius* em suas decisões, e estabelece, quando possível, a ingestão diária aceitável (IDA) dos aditivos.

A IDA é quantidade estimada do aditivo alimentar, expressa em miligrama por quilograma de peso corpóreo (mg kg^{-1} p.c.), que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem provocar danos à saúde, levando em consideração os conhecimentos científicos disponíveis na época da avaliação. A IDA pode ser (ANVISA, 2016):

- IDA não especificada ou não limitada - atribuída quando o estabelecimento de um valor numérico para a IDA é considerado desnecessário face às informações disponíveis sobre o mesmo e ao seu emprego de acordo com as Boas Práticas de Fabricação, ou seja, quando a substância não representa risco à saúde nas quantidades necessárias para obter o efeito tecnológico desejado;
- IDA não alocada - atribuída a um aditivo quando os dados toxicológicos disponíveis não são suficientes para se estabelecer a segurança de uso do mesmo;
- IDA temporária - atribuída a um aditivo quando os dados são suficientes apenas para concluir que seu emprego é seguro por um período limitado de tempo, até que os estudos toxicológicos sejam concluídos e avaliados. Caso as informações adicionais solicitadas não sejam apresentadas no prazo estipulado a IDA temporária é retirada.
- IDA numérica - atribuída a um aditivo quando seu uso é aceitável para certos propósitos, seu emprego não representa preocupação toxicológica ou quando a ingestão é autolimitante por razões tecnológicas ou organolépticas. Nesses

casos, o aditivo em questão deve ser somente autorizado de acordo com as condições especificadas.

O JECFA recomenda que os países verifiquem sistematicamente o consumo total de aditivos permitidos, através de estudos da dieta de sua população, para assegurar que a ingestão total não ultrapasse os valores determinados na IDA (PRADO & GODOY, 2007).

2.2.4 Corantes sintéticos – legislação brasileira

No Brasil, o órgão responsável por controlar o uso e estabelecer os limites máximos de corantes em alimentos e bebidas é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Para utilização destes aditivos, a legislação específica do produto deve ser consultada, visto que não há uma legislação atualizada que liste todos os corantes permitidos para uso nos alimentos (MARTINS, 2015).

O limite máximo é definido como a concentração máxima de substância permitida no ou sobre o alimento, e em matérias-primas utilizadas em sua composição, expressa em mg kg^{-1} de alimento. É tolerada a adição nos alimentos de, no máximo três corantes, desde que a quantidade total não ultrapasse o limite máximo autorizado para cada um, nem cada aditivo, isoladamente, ultrapasse o seu próprio limite (BRASIL, 1977b).

Conforme a Resolução nº 04, emitida em 1988 pelo Conselho Nacional da Saúde (CNS) do Ministério da Saúde (MS), apenas 8 corantes sintéticos eram permitidos, sendo eles: amaranço, amarelo crepúsculo, azul brilhante, eritrosina, azul de indigotina, ponceau 4R, tartrazina e vermelho 40 (BRASIL, 1988).

Em 1999, com a harmonização da legislação brasileira entre os países do Mercosul, foram aprovados os corantes azul patente V, azorrubina e verde rápido. A partir de 2005, também passaram a ser admitidos o amarelo de quinoleína, o negro brilhante BN e o marrom HT (MARTINS, 2015). A Tabela 2 lista os 14 corantes sintéticos permitidos para uso em alimentos e bebidas no Brasil, a classe a qual pertencem e a respectiva ingestão diária aceitável (IDA). No Apêndice A estão representadas as fórmulas estruturais destes aditivos.

Quanto à rotulagem nos alimentos, a Resolução RDC nº 259/2002 da ANVISA/MS (ANVISA, 2002a) determina que os aditivos alimentares, incluindo os

corantes, devem ser declarados com seu nome completo, seu número de INS, ou ambos, com exceção do corante tartrazina, que deve obrigatoriamente ter o nome declarado por extenso, segundo a Resolução nº 340/2002 da ANVISA/MS (ANVISA, 2002b) Além disso, nos rótulos dos alimentos contendo corantes sintéticos é obrigatória a declaração: “Colorido artificialmente” (Decreto-Lei nº 986/1969) (MARTINS, 2015).

Tabela 2 – Corantes sintéticos permitidos em alimentos e bebidas no Brasil

Corante	Código (INS/E)	Classe	IDA (mg kg ⁻¹ p.c.)
Amaranto	123	Monoazo	0,5
Amarelo crepúsculo	110	Monoazo	4
Amarelo de quinoleína	104	mistura de sulfonatos	5
Azorrubina	122	Monoazo	4
Azul brilhante	133	Trifenilmetano	12,5
Azul de indigotina	132	Indigoide	5
Azul patente V	131	Trifenilmetano	n.a.
Eritrosina	127	Xanteno	0,1
Marrom HT	155	Diazo	1,5
Negro brilhante BN	151	Diazo	1
Ponceau 4R	124	Monoazo	4
Tartrazina	102	Monoazo	7,5
Verde rápido	143	Trifenilmetano	25
Vermelho 40	129	Monoazo	7

INS/E: sistema numérico internacional do *Codex Alimentarius* e código da União Europeia;
 IDA (mg kg⁻¹ p.c.): Ingestão diária aceitável, em mg kg⁻¹ de peso corpóreo; n.a.: não alocada.
 Fonte: (Adaptado de PRADO & GODOY, 2003);

2.3 CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS ISOTÔNICAS

Na União Europeia, conforme o regulamento nº 380/2012, as bebidas isotônicas estão incluídas na categoria 14.1.4 referente às bebidas aromatizadas (do inglês, *flavoured drinks*). Os corantes tartrazina, vermelho 40, azul patente V, azul de indigotina, azul brilhante, verde S, negro brilhante BN possuem limite máximo de 100 mg L⁻¹. Os demais corantes (azorrubina, marrom HT, amarelo de quinoleína, amarelo crepúsculo e ponceau 4R) apresentam limites mais restritivos (UE, 2012).

De acordo com o Guia Geral para Aditivos Alimentares do *Codex Alimentarius*, apenas seis corantes podem ser utilizados em bebidas isotônicas, sendo eles: amarelo crepúsculo, ponceau 4R, vermelho 40, azul de indigotina, azul brilhante e verde rápido. Conforme este guia, os isotônicos também pertencem à categoria 14.1.4 referente às bebidas aromatizadas à base de água (CODEX ALIMENTARIUS, 2015).

Para verificar quais os limites máximos dos 14 corantes sintéticos permitidos para uso em bebidas isotônicas no Brasil deve-se consultar a Resolução RDC nº 5/2007 da ANVISA/MS, referente às bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas, seus preparados líquidos e pós (ANVISA, 2007b). A Tabela 3 lista os limites máximos dos corantes sintéticos permitidos em bebidas isotônicas segundo as três legislações citadas.

Tabela 3 – Limites máximos dos corantes sintéticos permitidos em bebidas de acordo com União Europeia, *Codex Alimentarius* e ANVISA

Corante	Limite máximo (mg L ⁻¹)		
	União Europeia	Codex Alimentarius	ANVISA
Amaranto	n.p.	n.p.	50
Amarelo crepúsculo	20	100	100
Amarelo de quinoleína	10	n.p.	100
Azorrubina	50	n.p.	50
Azul brilhante	100	100	100
Azul de indigotina	100	100	100
Azul patente V	100	n.p.	50
Eritrosina	n.p.	n.p.	10
Marrom HT	50	n.p.	50
Negro brilhante BN	100	n.p.	100
Ponceau 4R	10	50	50
Tartrazina	100	n.p.	100
Verde rápido	n.p.	100	50
Verde S	100	n.p.	n.p.
Vermelho 40	100	300	100

n.p.: não permitido

Fonte: UE (2012), *Codex Alimentarius* (2015) e ANVISA (2007)

Diante dos inúmeros efeitos nocivos à saúde associados ao consumo de produtos coloridos artificialmente, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos

analíticos cada vez mais rápidos, confiáveis e eficientes, a fim de garantir a qualidade e segurança dos alimentos. Diversos métodos envolvendo cromatografia têm sido reportados na literatura visando à determinação de corantes sintéticos em alimentos e bebidas (QI *et al.*, 2015).

2.4 A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA NA DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM ALIMENTOS E BEBIDAS

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*) com detecção espectrofotométrica no ultravioleta/visível (UV/Vis, do inglês *ultraviolet/visible*) ou por arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode array detector*) tem sido a técnica preferencial na determinação de corantes sintéticos em alimentos e bebidas, uma vez que os corantes absorvem fortemente na região do UV/Vis (FENG *et al.*, 2011). Além disso, esta técnica proporciona excelente robustez, resolução, sensibilidade e seletividade (KARANIKOLOPOULOS *et al.*, 2015).

A detecção espectrofotométrica é baseada na absorbância da luz por parte da amostra, ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética. Este processo geralmente ocorre desde a região do ultravioleta até o infravermelho, em um dado comprimento de onda (COLLINS *et al.*, 2007). O grau de absorção depende da molécula presente na amostra, da sua concentração, do comprimento do percurso da luz na amostra (caminho óptico) e do comprimento de onda de medição (DIONEX, 2013).

Existem três tipos de detectores de absorbância: o fotômetro (comprimento de onda fixo), o espectrofotômetro de comprimento de onda variável e o espectrofotômetro por arranjo de diodos (COLLINS *et al.*, 2007).

Os fotômetros oferecidos comercialmente operam geralmente em comprimentos de onda de 254 nm (emissão da lâmpada de mercúrio de baixa pressão). Os raios da radiação UV a 254 nm são colimados e focalizados por meio de uma lente na cela da amostra e na cela da referência. A diferença de quantidade de luz transmitida pelas duas celas alimenta um amplificador, que gera um sinal de saída, linear com a concentração do soluto, para registro (COLLINS *et al.*, 2007).

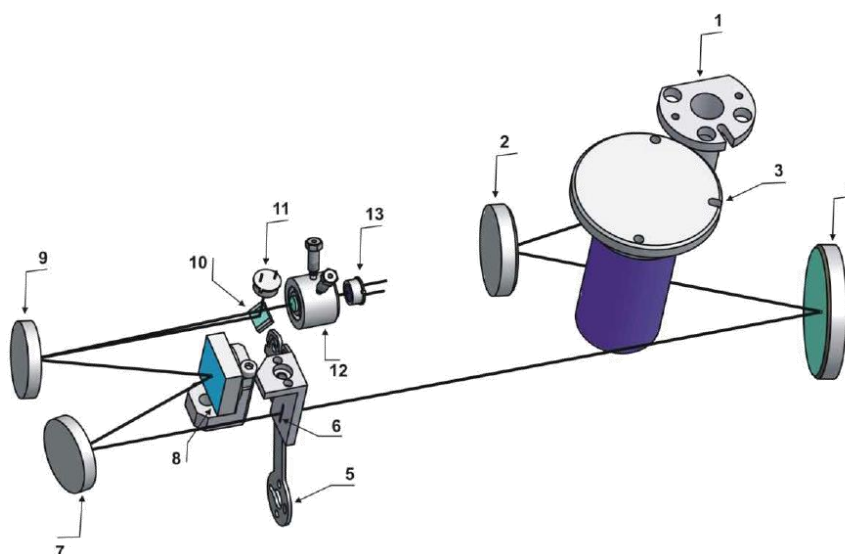
O espectrofotômetro de comprimento de onda variável cobre a faixa de 190 a 900 nm através de um monocromador, que seleciona o comprimento de onda

desejado do feixe de luz emitido pelas lâmpadas de deutério (UV) ou tungstênio (Vis). Este detector apresenta uma série de vantagens em relação ao detector fotométrico (comprimento de onda fixo), dentre as quais podemos citar:

- a) apresenta altas absorbâncias para vários compostos devido à escolha de comprimento de onda e, conseqüentemente, tem maior detectabilidade;
- b) permite obter o espectro de absorbância de cada composto em separado. Neste caso, necessita-se interromper a vazão da fase móvel e deter a substância na cela do detector;
- c) permite maior seletividade, desde que um determinado comprimento de onda possa ser escolhido no qual o composto de interesse absorva intensamente e os demais não absorvam;
- d) promove eficiência em eluição por gradiente através da habilidade de selecionar um comprimento no qual os componentes da fase móvel não apresentem uma variação de absorbância para diferentes concentrações.

A Figura 4 apresenta um esquema de um detector UV/Vis de comprimento de onda variável, destacando seus principais componentes.

Figura 4 – Esquema de um detector espectrofotométrico com comprimento de onda variável.



Primeiramente o espelho côncavo (2) concentra a luz da lâmpada de tungstênio (1) na abertura da lâmpada de deutério (3). Outro espelho (4) recebe a luz combinada de ambas as fontes de luz que se concentra na entrada da fenda (6). A luz passa através da fenda para o espelho (7) refletindo no monocromador (8), onde o feixe de luz é difratado nos diferentes comprimentos de onda. A posição angular da grade determina qual comprimento de onda é dirigido para o espelho referência (10). O espelho de referência (10) direciona parte do feixe de luz para o detector de referência (11). O restante da luz passa através da cela de fluxo (12) contendo a amostra e chega ao detector (13), onde a absorbância do soluto é medida e processada (DIONEX, 2013).

O espectrofotômetro por arranjo de diodos também permite a análise em vários comprimentos de onda. Neste caso, toda a luz da fonte passa pela cela do detector. A luz emergente é dispersa por uma grade holográfica, sendo os comprimentos de onda resultantes focalizados sobre uma fila de fotodiodos, de 256 até 1024. Uma das principais vantagens deste detector é a possibilidade de armazenar todo o espectro, eliminando-se a necessidade de deter a vazão da fase móvel para registrar o espectro de um determinado composto (COLLINS *et al.*, 2007).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS, do inglês *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*) também tem sido utilizada na separação e determinação de diversos corantes sintéticos em alimentos (WANG *et al.*, 2013). O princípio básico da espectrometria de massas é gerar íons de compostos orgânicos ou inorgânicos, separar esses íons de acordo com suas razões massa/carga (m/z) e detectá-los qualitativa e quantitativamente (GROSS, 2004). Devido aos padrões de ionização e fragmentação obtidos, esta técnica fornece uma grande quantidade de informação estrutural acerca do analito, além de um significativo aumento na seletividade e detectabilidade (YAMJALA *et al.*, 2016). No entanto, a LC-MS/MS apresenta como desvantagem um alto custo de aquisição e manutenção quando comparada às técnicas tradicionais (ZOU *et al.*, 2013)

2.5 PREPARO DE AMOSTRA NA DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM ALIMENTOS E BEBIDAS

De um modo geral, a etapa de preparo de amostra tem como objetivo a conversão dos analitos em uma forma purificada, concentrada e compatível com o sistema analítico, sendo essencial para obtenção de resultados exatos e confiáveis (BAZREGAR *et al.*, 2015).

A escolha do método de preparo de amostra adequado depende de fatores relacionados à complexidade da amostra, tais como o seu caráter ácido, neutro ou básico; quantidade de componentes; estruturas químicas semelhantes; presença de isômeros; vasto intervalo de polaridade e ampla gama de concentração de analitos, os quais dificultam a eliminação de interferentes presentes na matriz (BORGES *et al.*, 2015). Assim, procedimentos empregados em matrizes líquidas ou solúveis em água, tais como bebidas e geleias, normalmente são diferentes daqueles aplicados em matrizes sólidas com elevados teores de proteína e/ou gordura, como, por exemplo, produtos de origem animal (KARANIKOLOPOULOS *et al.*, 2015).

A extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*) desempenha um papel importante no preparo/purificação dos extratos antes da análise por cromatografia líquida ou por técnicas relacionadas (BROUSMICHE *et al.*, 2008), sendo um dos métodos mais relatados na literatura para a determinação de corantes sintéticos em alimentos e bebidas (MAZDEH *et al.*, 2016).

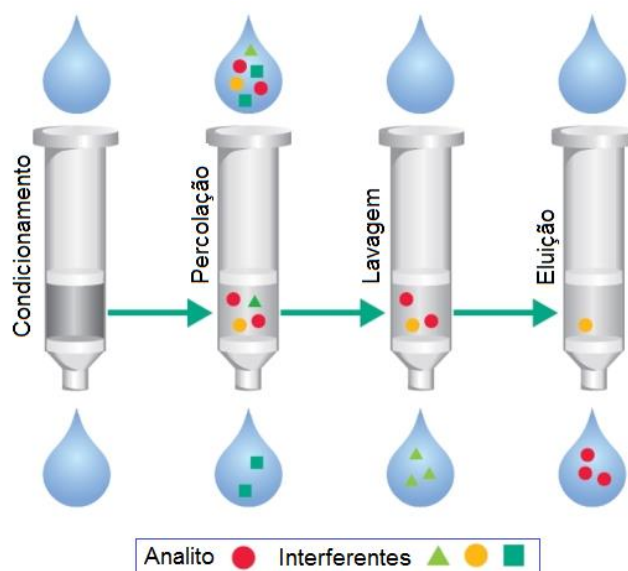
2.5.1 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida é um método de separação líquido-sólido amplamente empregado para extrair compostos semivoláteis e não voláteis de amostras líquidas, que também pode ser aplicado para amostras sólidas previamente extraídas com solvente. Na maioria das aplicações, a fase sólida (sorvente) está contida em um cartucho na forma de seringa ou de barril (JARDIM, 2010).

Em geral, os procedimentos de SPE consistem em quatro etapas, conforme Figura 5: (1) condicionamento do sorvente com um solvente adequado, a fim de aumentar a área superficial efetiva; (2) percolação da amostra - quando ocorre a retenção dos analitos e às vezes de alguns interferentes; (3) lavagem para remoção

dos interferentes e (4) eluição dos analitos com um solvente apropriado. Para realizar o preparo de amostra são utilizados dispositivos multivias acoplados a uma bomba de vácuo, denominados *manifolds* (BORGES *et al.*, 2015).

Figura 5 – Procedimento típico de extração em fase sólida (SPE)



Fonte: (Adaptado de ANDRADE-EIROA *et al.*, 2016)

A escolha da fase sólida é um fator crítico em SPE, pois ela pode controlar parâmetros como: seletividade, afinidade e capacidade de amostra (VIDAL *et al.*, 2012). Para facilitar esta escolha deve-se levar em consideração a estrutura química e as propriedades físico-químicas do analito e do sorvente, a natureza da matriz e os interferentes a serem eliminados. O solvente empregado no condicionamento, na lavagem e na eluição dos analitos é outro parâmetro que deve ser avaliado (BORGES *et al.*, 2015).

A maioria dos corantes sintéticos permitidos em alimentos são ácidos fortes, pois possuem um ou mais grupamentos sulfônicos ou acetato em sua estrutura. Esta característica permite sua retenção em cartuchos contendo: poliamida, sílica modificada com aminopropil (NH₂), Strata[®]-X-AW, Oasis[®] HLB e Oasis[®] WAX. Para uma melhor compreensão, as fórmulas estruturais de todos os corantes e sorventes citados neste trabalho estão representadas nos Apêndices A e B, respectivamente.

Yoshioka *et al.* (2008) empregaram resina de poliamida para a extração de 40 corantes sintéticos em caldas, bebidas e doces por HPLC-DAD. Os corantes são retidos na poliamida em condições ácidas, através de interações de van der Waals. Então, o pH da amostra foi ajustado para um valor de aproximadamente 2 antes da etapa de percolação e, posteriormente, os corantes foram eluídos com uma solução etanol:amônia. O método mostrou-se adequado para o objetivo proposto, com recuperações entre 76,6 e 115%. De modo similar, Bonan *et al.* (2013) e Karanikolopoulos *et al.* (2015) propuseram métodos de SPE com cartuchos de poliamida para determinar corantes em diversos tipos de matrizes, tanto líquidas quanto sólidas.

Mazdeh *et al.* (2016) empregaram NH₂ para a extração de 8 corantes em goma, gelatina bebidas e confeitos por HPLC-UV/Vis. Conforme descrito pelos autores, o pH da amostra deve ser menor que o pKa do sorvente (2 unidades abaixo de 9,8) para que este funcione como trocador aniônico. Na etapa de eluição é necessário neutralizar a superfície do grupo amino (pH 2 unidades acima de 9,8). O método desenvolvido demonstrou ser eficaz para a extração dos corantes, alcançando recuperações entre 94,2 e 106,7%.

Qi *et al.* (2015) aplicaram o cartucho Strata™-X-AW para a determinação de 11 corantes em produtos cárneos e de panificação por HPLC-DAD. Primeiramente, o conteúdo de gordura das amostras foi removido através da extração com n-hexano. Os corantes foram extraídos com solução metanol:amônia:água em ultrassom e, após procedimentos de evaporação e reconstituição, a limpeza dos extratos foi realizada por SPE. Para fins de confirmação, os extratos também foram analisados por LC-MS/MS. Os resultados de recuperação variaram de 75,2 a 113,8%, demonstrando a aplicabilidade do método para as análises requeridas.

O sorvente polimérico Oasis® HLB (do inglês, *hydrophilic-lipophilic-balanced*) foi escolhido por Feng *et al.* (2011) para determinar 40 corantes sintéticos em refrigerantes por LC-MS/MS. Este sorvente apresenta a superfície modificada com divinilbenzeno (lipofílico) e N-vinilpirrolidona (hidrofílica), proporcionando uma extração eficaz para corantes de média a alta polaridade. Os autores obtiveram recuperações entre 91,1 e 105% para os compostos avaliados.

O Oasis® WAX (do inglês, *weak anionic exchange*) apresenta estrutura similar ao HLB, porém com um grupo hidrofílico adicional, a piperazina. Yang *et al.* (2011) determinaram 5 corantes sintéticos em goma de mascar empregando WAX e HPLC-

DAD. Após extrações com EDTA/NaOH em ultrassom e extração líquido-líquido com diclorometano, os extratos aquosos foram submetidos à SPE. O pH dos extratos foi ajustado antes da etapa de percolação e, posteriormente, efetuou-se a eluição com metanol contendo 5% de hidróxido de amônio. Foram obtidas recuperações satisfatórias entre 72,5 e 116,4%.

Apesar da grande variedade de sorventes comercialmente disponíveis, a extração em fase sólida apresenta como desvantagens o tempo elevado de análise e as diversas etapas envolvidas, que frequentemente são trabalhosas e requerem a utilização de dispositivos comerciais multivias (*manifolds*) e vácuo para executar a extração (ANDRADE-EIROA *et al.*, 2016; JARDIM, 2010). A versão automatizada deste método, SPE *on-line*, implica em manutenções frequentes, além dos sistemas comerciais disponíveis apresentarem um custo considerável (PRESTES *et al.*, 2009).

2.5.2 Extração em fase sólida dispersiva

Um método baseado na SPE denominado extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid-phase extraction*) foi desenvolvido por Anastassiades *et al.* (2003), juntamente com o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). A d-SPE é um procedimento simples, usualmente empregado na limpeza de extratos destinados à análise cromatográfica de resíduos e contaminantes em alimentos (CABRERA *et al.*, 2012).

Conforme a proposta original, agita-se 1 mL do extrato proveniente de amostra de alimento com 25 mg do sorvente amina primária-secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*). A estrutura bidentada do PSA possibilita a forte retenção de ácidos graxos livres, açúcares e de outros coextrativos polares presentes na matriz. A agitação tem por objetivo a interação uniforme do sorvente com a matriz, facilitando assim o processo de limpeza do extrato. Após uma etapa de centrifugação, o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (BORGES *et al.*, 2015; PRESTES *et al.*, 2009).

Além da facilidade, do menor número de etapas e do uso de uma menor quantidade de sorvente quando comparado a SPE convencional, uma das principais vantagens da d-SPE é a versatilidade no desenvolvimento de novos métodos, visto que diferentes combinações de sorventes são possíveis, dependendo do tipo de

matriz e dos analitos de interesse (BORGES *et al.*, 2015). Recentemente, Munõz *et al.* (2016) empregaram o método QuEChERS para a extração de 42 resíduos de agrotóxicos em fisalis. A etapa de limpeza consistiu de d-SPE com os sorventes PSA, C18 e carbono grafitizado (GCB, do inglês *graphitized carbon black*) visando a remoção de açúcares, ácidos graxos, lipídeos e pigmentos.

A d-SPE tem sido amplamente utilizada em análises multirresíduo, porém ainda não existem estudos na literatura demonstrando a aplicação deste método na determinação de corantes sintéticos em alimentos ou bebidas (CHEN *et al.*, 2014). Possivelmente porque, ao contrário dos agrotóxicos e demais contaminantes, os corantes são fortemente retidos na superfície dos sorventes comumente utilizados em d-SPE.

2.5.3 Outros métodos de preparo de amostra

Embora a extração em fase sólida seja o método de preparo de amostra mais empregado na análise de corantes em alimentos e bebidas, métodos como a extração em fase sólida magnética (MSPE, do inglês *magnetic solid-phase extraction*), a extração assistida por micro-ondas (MAE, do inglês *microwave-assisted extraction*) e a extração assistida por ultrassom (UAE, do inglês *ultrassound-assisted extraction*) também têm sido utilizados (YAMJALA *et al.*, 2016).

Chen *et al.* (2014) desenvolveram e otimizaram um método para a determinação de 7 corantes artificiais em vinho e refrigerante empregando MSPE. Primeiramente, os autores sintetizaram nanopartículas de um polímero magnético funcionalizado com grupamentos amino. Em seguida, as amostras foram evaporadas e o resíduo foi reconstituído com água. Sob condições adequadas de pH somente os interferentes (açúcares, ácidos orgânicos e pigmentos naturais) são retidos no sorvente, então aplica-se um campo magnético para isolar a partícula magnética (sorvente + interferentes) e os extratos podem ser analisados. Os resultados de recuperação (84-116%) demonstraram a elevada capacidade de extração do método, porém foi necessário um moroso processo de síntese do sorvente e a aplicação de um campo magnético para o isolamento dos coextrativos.

Sun *et al.* (2013) determinaram 21 corantes sintéticos em salsichas utilizando MAE e cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detector por arranjo de diodos (UHPLC-DAD, do inglês *ultra-high-eficiência liquid chromatography-diode*

array detection). No entanto, uma etapa adicional de SPE foi necessária para a limpeza dos extratos e remoção dos interferentes.

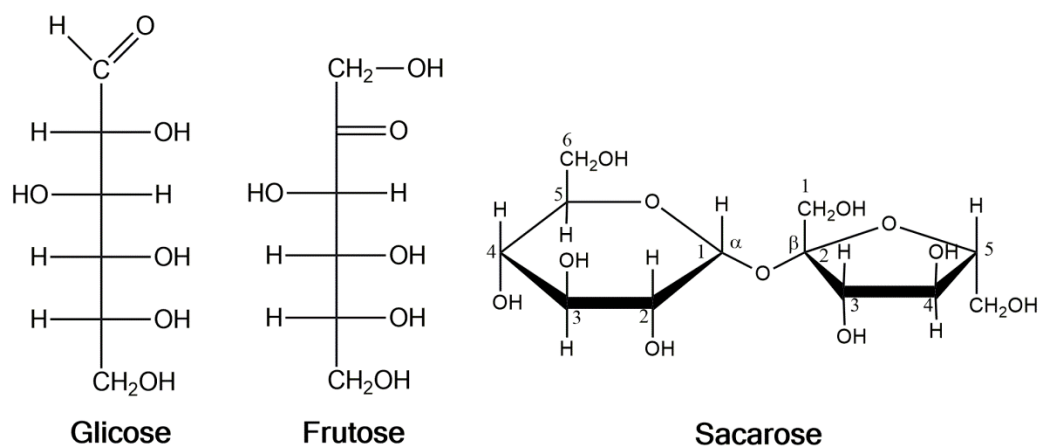
Shen *et al.* (2014) empregaram UAE e LC-DAD para a determinação simultânea de corantes sintéticos e carotenoides em diferentes tipos de alimentos, tais como bebidas, pastas e enlatados. Ainda que recuperações satisfatórias tenham sido obtidas, 80,5-97,2% para os corantes e 80,1-98,4% para os carotenoides, apenas os azocorantes amaranço, amarelo crepúsculo, tartrazina e vermelho 40 foram avaliados.

2.6 ANÁLISE QUALITATIVA DE AÇÚCARES

Os corantes sintéticos são adicionados geralmente em produtos como geleias, sorvetes, biscoitos, doces e bebidas (refrigerantes, energéticos, isotônicos, entre outros), os quais contêm uma grande quantidade de carboidratos, dentre outros coextrativos. A presença desses interferentes nos extratos finais pode danificar as colunas cromatográficas, além de afetar a quantificação dos corantes. Assim, o preparo de amostra deve remover a maior quantidade possível destes compostos antes da análise.

Os carboidratos, popularmente conhecidos como açúcares, são poliidroxialdeídos (aldoses), poliidroxicetonas (cetoses) ou substâncias que liberam tais compostos por hidrólise (JUNIOR, 2008). Na Figura 6 estão representadas as estruturas químicas de carboidratos normalmente presentes nos alimentos e bebidas: glicose, frutose e sacarose.

Figura 6 – Carboidratos normalmente encontrados nos alimentos



A glicose e a frutose são monossacarídeos, isto é, são constituídas por apenas uma unidade de poliidroxialdeído e poliidroxicetona, respectivamente. A sacarose é um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e outra de frutose, unidas covalentemente entre si por uma ligação glicosídica (JUNIOR, 2008).

Uma característica importante de monossacarídeos e de alguns dissacarídeos é a capacidade de serem oxidados por íons férricos (Fe^{3+}) e cúpricos (Cu^{2+}), sendo que o carbono da carbonila é oxidado a carboxila e o íon metálico é reduzido. Os açúcares que apresentam essa propriedade são denominados açúcares redutores (NELSON & COX 2014). A sacarose é um açúcar não redutor, pois sua extremidade redutora encontra-se comprometida com a ligação glicosídica. No entanto, essa ligação pode ser facilmente hidrolisada por ácido diluído a quente, liberando os monossacarídeos redutores glicose e frutose (NELSON & COX, 2014).

Diferentes testes qualitativos podem ser realizados para verificar a presença de açúcares em alimentos e bebidas. O teste de Benedict é utilizado para detectar açúcares redutores, tais como glicose e frutose, enquanto o teste de Seliwanoff fornece resultados positivos para cetoses.

2.6.1 Teste de Benedict

O reagente de Benedict foi utilizado por muitos anos para identificar portadores de diabetes através da presença de açúcares redutores, especialmente glicose, em sua urina (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Este reagente consiste basicamente de uma solução azul de sulfato cúprico (CuSO_4). Em presença de um agente redutor, em meio alcalino e após aquecimento, tem-se o aparecimento de coloração castanha/vermelha devido à formação de óxido cuproso (Cu_2O). O Cu^{2+} do reagente de Benedict é reduzido a Cu^+ e o grupo funcional carbonila da glicose/ frutose é oxidado a ácido carboxílico, conforme a seguinte reação (FIGUEIRA *et al.*, 2012):



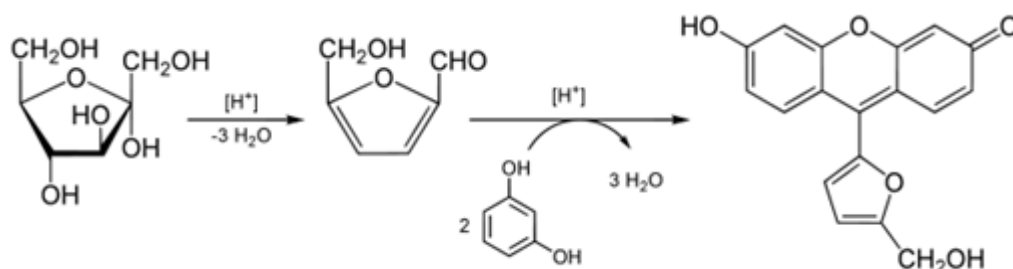
Para o preparo do reagente de Benedict deve-se dissolver 173 g de citrato de sódio e 100 g de carbonato de sódio anidro em aproximadamente 800 mL de água a quente. Filtra-se, caso necessário, e dilui-se com água até 850 mL de volume total.

Adiciona-se gradativamente uma solução de sulfato de cobre (17,3 g dissolvidas em 100 mL de água) agitando continuamente, e completa-se o volume para 1 litro (MORITA & ASSUMPÇÃO, 1981).

O teste de Benedict pode ser realizado em um tubo de ensaio contendo 2 mL do reagente de Benedict e aproximadamente 1 mL da amostra. O tubo de ensaio deve ser aquecido em banho-maria fervente por cinco minutos. O aparecimento de um precipitado vermelho-tijolo indica a redução do cobre e, conseqüentemente, a presença de açúcares redutores na amostra (JUNIOR, 2008).

2.6.2 Teste de Seliwanoff

O teste empregando o reagente de Seliwanoff permite detectar a presença de cetoses. Este reagente é preparado dissolvendo-se 0,05 g de resorcinol em 100 mL de HCl diluído 1:2 (MORITA & ASSUMPÇÃO, 1981). Sob a ação desidratante do ácido, as cetoses são transformadas em derivados de furfural que se condensam com o resorcinol, resultando rapidamente em um produto vermelho, conforme a seguinte reação (JUNIOR, 2008):



O ensaio é realizado com aproximadamente 0,8 mL do reagente de Seliwanoff (incolor) e 0,2 mL de amostra. O tubo de ensaio deve ser aquecido em banho-maria fervente por três minutos. A presença de cetoses, tais como a frutose, leva ao aparecimento de coloração vermelha. Este teste também dá resultado positivo para a sacarose, pois ela sofre hidrólise em meio ácido diluído, liberando seus monossacarídeos frutose e glicose (JUNIOR, 2008).

2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Atualmente, os resultados obtidos a partir de métodos analíticos têm um impacto significativo na sociedade, sendo indispensáveis para a tomada de decisões em diversas áreas, como, por exemplo, no controle de qualidade de bens de consumo e no monitoramento de alimentos (RAMBLA-ALEGRE *et al.*, 2012).

Para assegurar que um método analítico forneça dados confiáveis e interpretáveis sobre determinada amostra, ele deve sofrer um processo de avaliação denominado validação (RIBANI *et al.*, 2004). A validação estabelece, através de estudos sistemáticos de laboratório, que o método é adequado à finalidade, isto é, suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes às necessidades do problema analítico (ANVISA, 2003).

No Brasil, a ANVISA (2003) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2011) estabelecem guias para a validação de métodos analíticos. Diversos órgãos internacionais, tais como a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) e a SANTE (2015), também disponibilizam suas recomendações.

Os parâmetros analíticos usualmente determinados em um processo de validação são: seletividade/especificidade, linearidade, faixa linear de trabalho, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (ZANELLA *et al.*, 2015). A Tabela 4 apresenta a definição e a aplicação destes parâmetros.

Tabela 4 – Parâmetros de métodos analíticos normalmente avaliados na validação

Parâmetro	Definição	Aplicação	Referência
Seletividade	Distinção de resposta entre substâncias distintas.	Extração de matriz branco <i>versus</i> matriz fortificada	INMETRO, 2011
Especificidade	Distinção da resposta do analito na presença de interferentes.	Extração de matriz branco <i>versus</i> matriz fortificada	SANTE, 2015
Linearidade	Correlação entre resposta analítica e concentração	Curva analítica ($y = ax + b$)	ANVISA, 2003
Faixa Linear de trabalho	Intervalo de concentrações em que y e x correlacionam-se linearmente	Curva analítica ($y = ax + b$)	INMETRO
LOD e LOQ	Concentração limite de distinção entre analito e ruído	S/R = 3 e S/R=10, respectivamente	INMETRO; ANVISA
Precisão	Proximidade de resultados obtidos por diferentes amostragens	Repetibilidade e Reprodutibilidade	INMETRO; ANVISA
Exatidão	Proximidade de resultado em relação a uma referência	Ensaio de fortificação	INMETRO; ANVISA
Robustez	Capacidade do método em resistir a pequenas variações	Variações nas condições analíticas	INMETRO

matriz branco: matriz isenta dos analitos em estudo;
S/R: razão sinal ruído;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho proposto consistiu no desenvolvimento e validação de um método de preparo de amostra e determinação de corantes sintéticos em bebidas isotônicas por HPLC-UV/Vis. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos a seguir:

- Agitador vortex - Biomixer QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- Balança analítica de precisão APX-200 (Denver Instruments, Brasil);
- Balança analítica de precisão AUW 220D (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct 3UV[®] (Millipore, França);
- Sistema HPLC, modelo ICS-400 DA (Dionex, EUA) equipado com:
 - Detector UV/Vis de comprimento de onda variável, modelo UltiMate VWD-3400RS (Thermo Scientific, EUA);
 - Bomba ternária, modelo 9010 (Varian, EUA);
 - Coluna analítica Microsorb 100-5 C18, com 250 x 4,6 mm e 5 µm de diâmetro de partícula;
 - Software para aquisição de dados Chromeleon 6.8;
- Ultrassom USC-1400 (Unique, Brasil).

3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS

- Acetato de amônio p.a. (Merck, Alemanha);
- Acetonitrila grau HPLC (Sigma-Aldrich, China);
- Ácido cítrico p.a. (Synth, Brasil);
- Ácido clorídrico concentrado p.a. (Synth, Brasil);
- Ácido fórmico p.a. 98% (Sigma-Aldrich, Alemanha);

- Ácido fosfórico p.a. 85% (Merck, Alemanha);
- Carbonato de sódio anidro p.a. (Synth, Brasil);
- Hidróxido de amônio p.a. 28-30% (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- Metanol grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Resorcinol p.a. (Merck, Alemanha);
- Sulfato de cobre p.a. (Synth, Brasil);
- Água purificada em sistema Milli-Q Direct 3UV[®] com resistividade de 18,2 MΩ cm (Millipore, França);
- Cartuchos para SPE Oasis[®] HLB 200 mg/6 mL (Waters, Irlanda);
- Filtros de seringa de celulose regenerada de 0,45 µm e 25 mm d.i. (Agilent, China);
- Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2 mL (Agilent, EUA);
- Microtubos de centrífuga de 2 mL (Labcon, EUA);
- Seringas de 3 mL HSW Norm-Ject[®] (Henk Sass Wolf, Alemanha);
- Detergente Extran[®] neutro (Merck, Brasil);
- Vidraria comum de laboratório.

3.3 ESCOLHA DOS COMPOSTOS

Os corantes sintéticos avaliados no método desenvolvido foram selecionados com base na Resolução RDC nº 5/2007 da ANVISA/MS, referente a bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas, seus preparados líquidos e pós (ANVISA, 2007b), categoria onde estão incluídas as bebidas isotônicas. Foram escolhidos alguns dos corantes mais utilizados em isotônicos, verificando-se previamente a disponibilidade destes compostos no laboratório.

Os corantes estudados estão na listados na Tabela 5, juntamente com as seguintes informações: código INS/E, fórmula molecular, massa molar, solubilidade em água, pKa e suas respectivas purezas. As fórmulas estruturais destes compostos estão representadas no Apêndice A.

3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Foram preparadas soluções analíticas estoque individuais na concentração 1000 mg L⁻¹ levando em consideração a pureza dos padrões sólidos (Tabela 5). A

massa de cada padrão sólido pesado foi dissolvida em água ultrapura e as soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura de 5 °C. A partir destas soluções, preparou-se uma mistura contendo todos os corantes em estudo, na concentração 10 mg L⁻¹, em água. Para injeção no sistema HPLC-UV/Vis foram preparadas soluções nas concentrações 0,5; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹.

Tabela 5 – Compostos avaliados neste trabalho com seus respectivos códigos INS/E, fórmula molecular, massa molar, solubilidade em água, pKa e pureza.

Composto (Código INS/E)	Fórmula molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	Solubilidade em água*	pKa	Pureza (%)
Amaranto (123)	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	604,47	8	10,36	93,3
Amarelo crepúsculo (110)	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	452,37	19	10,36	90,0
Azul brilhante (133)	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	792,85	20	n.e.	93,4
Azul de indigotina (132)	C ₃₇ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₉ S ₃	466,35	1,6	n.e.	92,0
Ponceau 4R (124)	C ₁₆ H ₈ N ₂ Na ₂ O ₈ S ₂	604,47	25	11,24	92,8
Tartrazina (102)	C ₁₆ H ₉ N ₄ Na ₃ O ₉ S ₂	534,36	20	9,40	90,0

INS/E: sistema numérico internacional do *Codex Alimentarius* e código da União Europeia;
*(g/100 mL) a 25 °C; n.e.: não encontrado;

3.5 AMOSTRAS DE BEBIDAS ISOTÔNICAS

Conforme descrito no rótulo, as bebidas isotônicas sabor limão/limonada não contém corantes sintéticos em sua composição. Após esta informação ter sido confirmada através de injeções no HPLC-UV/Vis, uma amostra sabor limão foi utilizada como amostra “branco” para otimização e validação do método. Para a etapa de aplicabilidade do método foram adquiridas 8 amostras comerciais de isotônicos de diferentes marcas e sabores, a fim de contemplar a maioria dos corantes sintéticos em estudo.

3.6 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC-UV/Vis PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS ISOTÔNICAS

A separação e a quantificação de corantes sintéticos em alimentos e bebidas são usualmente realizadas por HPLC, sendo que os detectores mais empregados na determinação destes compostos são: UV/Vis (MAZDEH *et al.*, 2016), DAD (YOSHIOKA *et al.*, 2008) e MS (FENG *et al.*, 2011).

Neste trabalho, empregou-se um sistema HPLC-UV/Vis com detecção em quatro em cada análise cromatográfica. Foram utilizados os mesmos comprimentos de onda propostos por Miniti *et al.* (2007).

3.6.1 Escolha da fase móvel

Segundo estudos anteriores, a adição de acetato de amônio na fase móvel aquosa (A), bem como a combinação de metanol e acetonitrila na fase móvel orgânica (B), fornecem melhores resultados na determinação de corantes sintéticos empregando HPLC-UV/Vis (MINIOTI *et al.*, 2007; BENTO *et al.*, 2015; MAZDEH *et al.*, 2016). Sendo assim, a fase móvel empregada neste trabalho consistiu em: (A) solução aquosa de acetato de amônio 0,13 mol L⁻¹ e (B) metanol:acetonitrila (80:20, v/v), conforme o gradiente descrito na Tabela 6. A vazão foi mantida constante em 1,2 mL min⁻¹, com volume de injeção de 20 µL e tempo total de corrida de 19 min.

Tabela 6 – Gradiente da fase móvel utilizado no sistema HPLC-UV/Vis

Tempo (min)	%A	%B
0	80	20
1	80	20
10	50	50
15	20	80
16	80	20
19	80	20

A – acetato de amônio 0,13 mol L⁻¹
 B – metanol:acetonitrila (80:20, v/v)

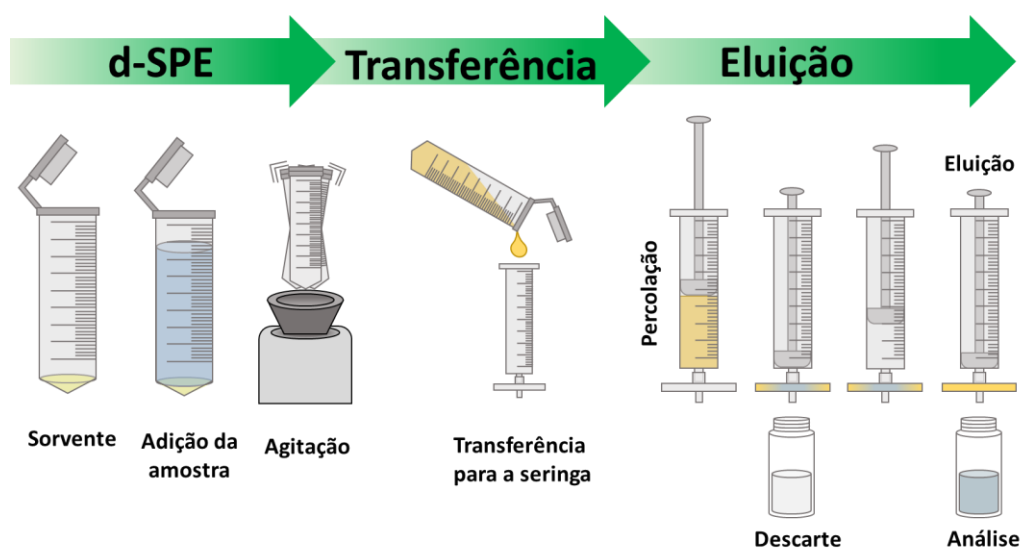
3.7 OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS ISOTÔNICAS

A extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) foi empregada como método de preparo de amostra na determinação de corantes sintéticos em bebidas isotônicas, pois até o momento não existem estudos na literatura demonstrando sua aplicação neste âmbito.

Para os testes de extração foram pesados 50 mg dos sorventes poliméricos Oasis[®] HLB (teste 1) e Oasis[®] WAX (teste 2) em microtubos de centrífuga. Após, adicionou-se 1 mL da amostra branco fortificada no nível 4 mg L⁻¹ (n=3), acidificada com ácido fosfórico 0,1 mol L⁻¹ até pH em torno de 1, e agitou-se em vortex por 20 s. Todo o conteúdo do microtubo de centrífuga foi transferido para uma seringa de 3 mL acoplada a um filtro de seringa de 0,45 µm. A amostra foi percolada através do filtro, sendo que o filtrado foi descartado.

O filtro, contendo o sorvente e todos os corantes em estudo, foi acoplado novamente à seringa e realizou-se a eluição com metanol:hidróxido de amônio (95:5, v/v) (2 x 1 mL). As alíquotas de 0,5 mL do extrato foram diluídas a 1 mL com água ultrapura, sendo que à uma delas ajustou-se o pH para 7 com uma solução aquosa de ácido fórmico 50% (v/v). Em seguida foi realizada a análise por HPLC-UV/Vis. A Figura 7 representa o método de preparo de amostra proposto para a determinação de corantes sintéticos em bebidas isotônicas.

Figura 7 – Método de preparo de amostra proposto para determinação de corantes sintéticos em bebidas isotônicas



A partir da seleção do sorvente foram realizados testes a fim de otimizar a quantidade de sorvente (25 e 50 mg), bem como a forma de eluição dos analitos, eluindo-se com uma alíquota única de 2 mL ou com duas alíquotas de 1 mL. Além disso, com o objetivo de verificar a eficiência do método de preparo de amostra proposto na remoção de carboidratos, foram realizados os testes qualitativos de Benedict (para açúcares redutores) e de Seliwanoff (para cetoses), descritos nos itens 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS ISOTÔNICAS

O método de preparo de amostra desenvolvido neste trabalho visando à determinação de corantes sintéticos em bebidas isotônicas foi validado avaliando-se os seguintes parâmetros: seletividade; curva analítica e faixa linear; limites de detecção e quantificação; exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária).

3.8.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos por injeções no sistema HPLC-UV/Vis de extratos da amostra branco, isenta dos compostos em estudo, e da amostra branco fortificada com os compostos selecionados.

Os solventes e reagentes também foram avaliados para assegurar a inexistência de contaminantes que pudessem interferir na análise. Para isto realizou-se o procedimento de extração na ausência da amostra (branco reagente).

3.8.2 Curva analítica e faixa linear

Avaliou-se a linearidade das curvas analíticas preparadas partir das soluções analíticas descritas no item 3.4, nas concentrações de 0,5; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹. As curvas analíticas foram injetadas em triplicata para posteriormente realizar os cálculos das médias das áreas e obtenção do coeficiente de determinação (r^2). Os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do *software Chromeleon 6.8.* do equipamento.

3.8.3 Limite de detecção e limite de quantificação

A partir da faixa linear das curvas analíticas, determinou-se o limite de detecção e o limite de quantificação do instrumento (LOD_i e LOQ_i) para cada composto, levando em consideração a relação sinal ruído calculada pelo *software Chromeleon 6.8*. Considerou-se o LOQ_i o menor nível da curva de calibração que apresentou relação sinal/ruído > 10 , e o LOD_i foi calculado dividindo-se o valor de LOQ_i por 3,33.

O LOD_m e LOQ_m referem-se aos limites do método, isto é, a concentração real na amostra, e são obtidos multiplicando-se o valor de LOD_i e LOQ_i , respectivamente, pelo fator de diluição obtido no método de extração.

3.8.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação, sendo realizadas fortificações das amostras branco em 3 níveis de concentração (2,0; 4,0 e 6,0 mg L⁻¹), com 6 réplicas de extração para cada nível de fortificação, as quais foram injetadas apenas uma vez cada.

A exatidão, expressa em percentagem de recuperação, foi calculada com o auxílio do *software (Chromeleon 6.8)* do equipamento. O cálculo de recuperação pode ser realizado de acordo com a Equação 2:

$$Recuperação (\%) = \left(\frac{C_1}{C_2} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração usada para fortificação.

3.8.5 Precisão (repetibilidade) e precisão intermediária

A precisão pode ser calculada através da fórmula do desvio padrão relativo (RSD), conforme a Equação 3:

$$RSD (\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto = $\{\sum(x_i - x_m)^2/n-1\}^{1/2}$;

x_i = valores individuais;

\bar{X} = média das medidas em replicatas;

n = número de medidas.

A precisão do método, em termos de repetibilidade, foi avaliada procedendo-se a extração e a análise das amostras fortificadas. Foram realizadas seis extrações cada nível de concentração, sendo que o extrato foi injetado uma única vez ($n=6$).

A precisão intermediária do método foi avaliada efetuando-se o procedimento analítico em dias e com analistas diferentes, através da injeção da curva analítica e das amostras branco fortificadas no menor nível, $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, correspondente ao LOQ_m .

3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método desenvolvido e validado foi aplicado para a determinação de corantes sintéticos em amostras de bebidas isotônicas adquiridas em supermercados de Santa Maria (RS), no período de maio a junho de 2016. Foram avaliadas três marcas diferentes, nos sabores: tangerina, laranja, maracujá, uva, uva verde e mix de frutas, a fim de contemplar a maioria dos corantes estudados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC-UV/Vis PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS ISOTÔNICAS

As condições cromatográficas empregadas na separação e quantificação dos corantes sintéticos avaliados neste estudo estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 – Condições cromatográficas empregadas no sistema HPLC-UV/Vis para a validação do método proposto

Parâmetros	Condições cromatográficas otimizadas
Coluna analítica	Microsorb 100-5 C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m)
Fase móvel	A) solução aquosa de acetato de amônio 0,13 mol L ⁻¹ , pH=7 B) metanol:acetonitrila (80:20, v/v)
Gradiente	20% (B) de 0 a 1 min, aumentando até atingir 50% (B) em 10 min; atinge-se 80% (B) em 15 min (permanecendo por 1 min); retorno para 20% (B) em 16 min (permanecendo por 3 min)
Vazão	1,2 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 μ L
Detector	UV/Vis com 4 comprimentos de onda (430, 480, 510 e 610 nm)

Cada corante possui um comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{m\acute{a}x}$) específico. O detector UV/Vis utilizado neste trabalho permite utilizar até quatro comprimentos de onda diferentes em uma mesma corrida cromatográfica, possibilitando a análise de todos os corantes em estudo.

Baseado no estudo de Miniotti *et al.* (2007) foram selecionados os seguintes comprimentos de onda: 430 nm e 480 nm para os corantes amarelos, 510 nm para os corantes vermelhos e 610 nm para os corantes azuis (Tabela 8). Os corantes foram identificados pelos tempos de retenção em comparação com os tempos de retenção obtidos para os padrões analisados nas mesmas condições e pela resposta obtida nos quatro comprimentos de onda.

Tabela 8 – Comprimentos de onda ($\lambda_{m\acute{a}x}$) selecionados para a determinação de corantes sintéticos em bebidas isotônicas e tempos de retenção (t_R) de cada composto analisado.

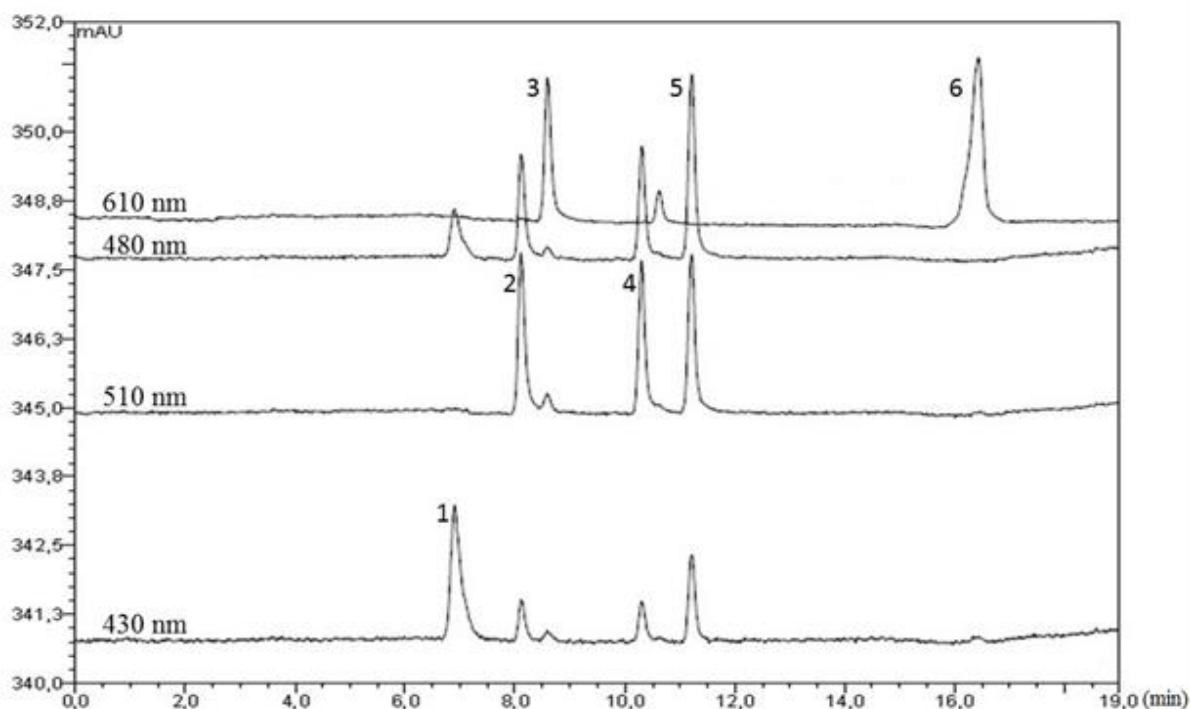
Composto	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	t_R (min)
Amaranto	510	8,1
Amarelo crepúsculo	480	11,2
Azul brilhante	610	16,4
Azul de indigotina	610	8,6
Ponceau 4R	510	10,3
Tartrazina	430	6,9

Segundo Vidotti *et al.* (2006) os corantes normalmente eluem de colunas de fase reversa de acordo com a sua hidrofobicidade. Os corantes da classe azo são mais hidrofóbicos do que os não-azo e, em geral eluem primeiro. Além disso, a hidrofobicidade dos corantes contendo anéis naftalnicos é mais forte em comparação àqueles constituídos apenas por anéis benznicos. No entanto, como a análise cromatográfica destes compostos geralmente é realizada em valores de pH próximos a 7, a presença de grupos ácidos e alcalinos na estrutura dos corantes também interfere na ordem de eluição (MINIOTI *et al.*, 2007)

Neste trabalho, os azocorantes tartrazina, amaranto, ponceau 4R e amarelo crepúsculo foram os primeiros a eluir, com exceção do azul de indigotina (classe indigide) que foi o terceiro corante a eluir. Este comportamento foi evidenciado por diversos autores e pode ser explicado pela presença de grupos cetona e amina na estrutura do composto, o que lhe confere maior polaridade (YOSHIOKA *et al.*, 2008). Conforme a Figura 8, o último composto a eluir foi o azul brilhante devido  sua característica menos polar (classe trifenilmetano).

Pode-se observar que o sistema HPLC-UV/Vis proporcionou alta seletividade e eficiência de separação, sendo possível identificar e quantificar todos os corantes em estudo.

Figura 8 – Cromatograma de uma solução preparada em água ultrapura na concentração $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ obtido por HPLC-UV/Vis em 4 comprimentos de onda, onde: (1) tartrazina, (2) amaranto (3) azul de indigotina, (4) ponceau 4R, (5) amarelo crepúsculo e (6) azul brilhante.



Na análise de corantes sintéticos, a resolução é fortemente afetada pelo pH da fase móvel. Segundo Yoshioka *et al.* (2008), valores de pH em torno de 7 favorecem a seletividade e, conseqüentemente, a separação cromatográfica dos corantes em fase reversa. Diante disso, não foram avaliados outros valores de pH para a fase móvel.

A fase móvel (A) empregada neste trabalho consistiu de uma solução aquosa de acetato de amônio $0,13 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7. Este aditivo tem sido amplamente reportado na literatura para a determinação de corantes sintéticos por cromatografia líquida visando separações adequadas e tempos de corrida menores. No entanto, é importante ressaltar que em altas concentrações pode ocorrer o efeito *salting-out*, o qual leva a um aumento da interação dos corantes com a coluna C18, resultando em tempos de retenção maiores (KUCHARSKA *et al.*, 2010).

O metanol foi utilizado como fase móvel orgânica (B) resultando em baixa força de eluição e resolução. A adição de acetonitrila melhora significativamente a assimetria dos picos, fornecendo boa resolução quando utilizada em combinação

com metanol (Minioti *et al.*, 2007; Mazdeh *et al.*, 2016). Sendo assim, a fase móvel (B) empregada neste trabalho foi metanol:acetonitrila (80:20, v/v).

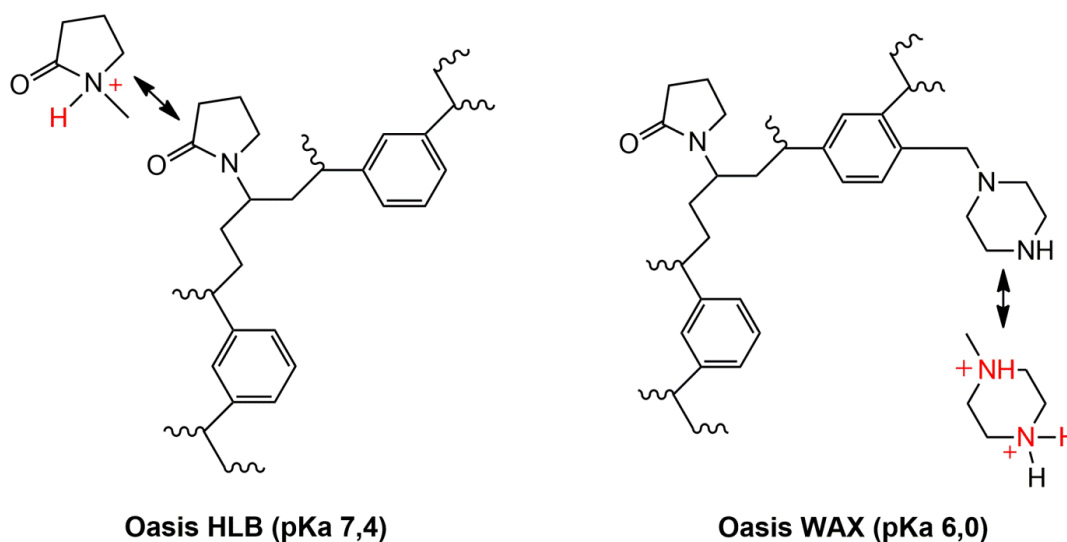
Para a obtenção de uma boa resolução também foi necessário o ajuste do pH do extrato. Primeiramente, foram avaliados os extratos diluídos somente em água, isto é, em condições alcalinas (pH 11) devido ao NH_4OH presente na solução de eluição. A intensidade dos picos nesta condição alcalina era baixa e os picos eram largos. Portanto, o ajuste para pH 7 com solução aquosa de ácido fórmico (50%, v/v) foi essencial para aumentar a relação sinal/ruído da resposta.

4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS EM BEBIDAS ISOTÔNICAS

Foram realizados ensaios preliminares com 50 mg dos sorventes poliméricos Oasis[®] HLB (teste 1) e Oasis[®] WAX (teste 2), de modo a avaliar as melhores condições para o procedimento de extração dos corantes sintéticos em bebidas isotônicas. Estes sorventes foram selecionados devido à sua dupla funcionalidade: a parte hidrofílica (N-vinilpirrolidona) permite uma extração eficaz para corantes altamente polares, enquanto a parte lipofílica (divinilbenzeno) fornece as propriedades de fase reversa para retenção de corantes menos polares. O sorvente WAX possui ainda outro grupamento hidrofílico, a piperazina (FENG *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2011).

De acordo com a literatura, os sorventes Oasis[®] HLB e Oasis[®] WAX encontram-se em suas formas protonadas em condições ácidas, isto é, em valores de pH pelo menos duas unidades abaixo de seus respectivos pKa (Figura 9). Isto permite a retenção dos analitos através de interações iônicas entre os corantes carregados negativamente e os nitrogênios carregados positivamente dos sorventes. A retenção dos corantes também pode ocorrer através de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas dos grupos sulfônicos dos corantes e o oxigênio da carbonila do grupo N-vinilpirrolidona dos sorventes, além de interações hidrofóbicas entre o grupo divinilbenzeno dos sorventes e os grupamentos aromáticos dos corantes.

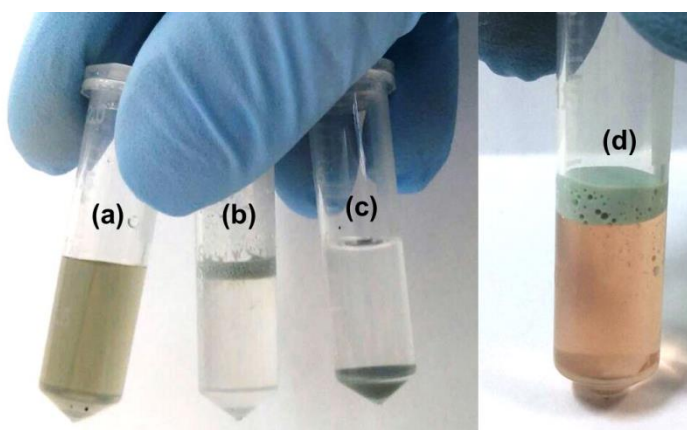
Figura 9 – Modificações químicas nas estruturas dos sorventes Oasis[®] HLB e Oasis[®] WAX em condições ácidas (abaixo de seus respectivos pKa)



Fonte: (Adaptado de MANZO *et al.*, 2014).

Ao ajustar o pH da amostra branco fortificada para aproximadamente 1, verificou-se que todos os corantes foram retidos em ambos os sorventes, visto que o extrato, anteriormente de coloração cinza devido à mistura de cores, tornou-se límpido e transparente. O mesmo não ocorreu quando o pH da amostra foi mantido em torno de 3, pH natural da bebida isotônica (Figura 10). Assim, ajustou-se o pH da amostra para 1 com solução aquosa de ácido fosfórico 0,1 mol L⁻¹, seguido de agitação em vortex por 20 s.

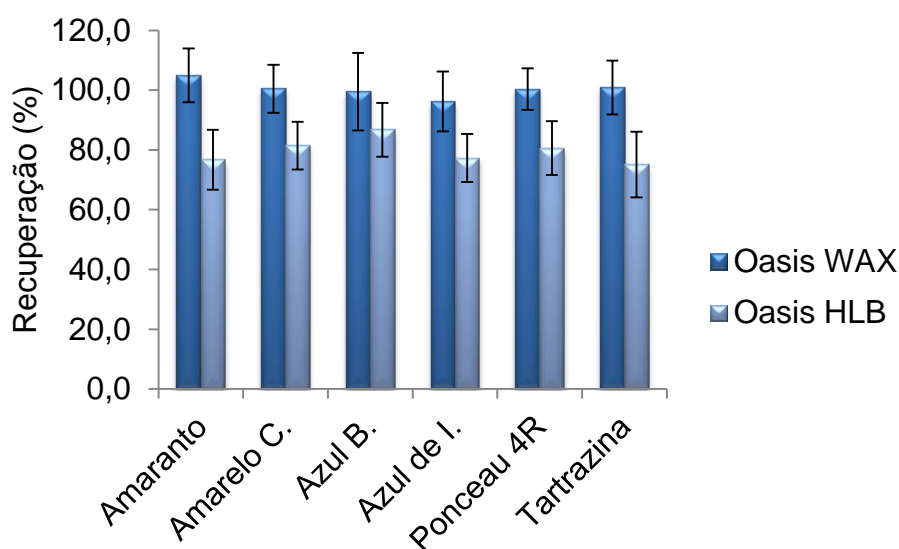
Figura 10 – Testes de extração com Oasis[®] HLB e Oasis[®] WAX: (a) amostra branco fortificada em 4 mg L⁻¹; (b) extração com Oasis[®] HLB em pH 1; (c) extração com Oasis[®] WAX em pH 1 e (d) extração com Oasis[®] HLB em pH 3



Todo o conteúdo do microtubo de centrífuga foi transferido para a seringa de 3 mL acoplada ao filtro de 0,45 μm . Após a percolação, os corantes sintéticos avaliados permaneceram retidos nos sorventes e o filtrado foi descartado. A eluição dos analitos foi realizada com metanol:hidróxido de amônio (95:5, v/v), empregando duas alíquotas de 1 mL. De acordo Yang *et al.* (2011), metanol é um solvente adequado para a eluição e a injeção em sistemas de HPLC. O pH alcalino (~11) proporcionado pelo hidróxido de amônio é fundamental para promover a dessorção dos corantes, por meio da diminuição das interações de hidrogênio e interação iônicas que ocorrem entre os sorventes e os corantes. O extrato foi diluído duas vezes com água ultrapura e analisado por HPLC-UV/Vis.

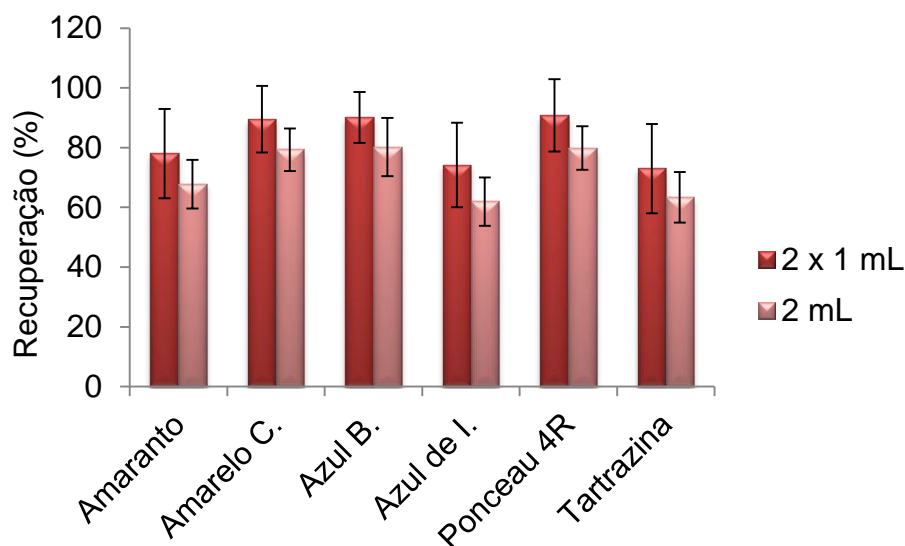
Verificou-se que nesta condição alcalina a intensidade dos picos era baixa e os picos eram largos. Portanto, o pH do extrato foi ajustado para 7 com solução aquosa de ácido fórmico 50% (v/v) e diluído com água ultrapura, de modo a manter a mesmas condições da fase móvel. Após a neutralização do extrato, ambos os sorventes forneceram recuperações adequadas para todos os corantes sintéticos em estudo (Figura 11), porém devido ao menor custo de aquisição e maior disponibilidade no laboratório selecionou-se o sorvente Oasis[®] HLB para dar continuidade aos testes.

Figura 11 – Resultados dos ensaios de recuperação dos testes com Oasis[®] WAX e Oasis[®] HLB, no nível de fortificação 4 mg L⁻¹



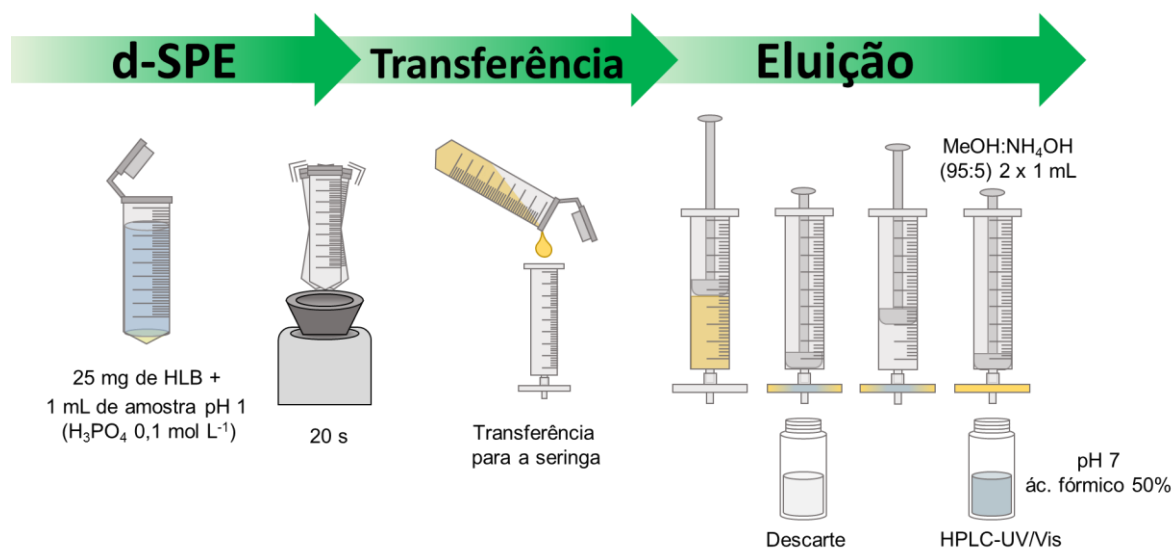
A partir da seleção do Oasis[®] HLB foram realizados testes a fim de otimizar a quantidade de sorvente (25 e 50 mg). Os resultados mostraram que com apenas 25 mg de sorvente foram obtidas recuperações equivalentes às aquelas obtidas com o método empregando 50 mg, assim foi selecionada a menor quantidade de sorvente. Com relação à forma de eluição, duas alíquotas de 1 mL demonstraram ser mais eficientes do que a eluição com uma alíquota única de 2 mL, conforme representado na Figura 12.

Figura 12 – Resultados dos ensaios de recuperação para escolha da melhor forma de eluição



O procedimento otimizado para determinação dos corantes amarantho, amarelo crepúsculo, azul brilhante, azul de indigotina, ponceau 4R e tartrazina em bebidas isotônicas está representado na Figura 13.

Figura 13 – Representação do método d-SPE desenvolvido para a extração de corantes sintéticos em bebidas isotônicas



4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DE AÇÚCARES

Os testes qualitativos de Benedict e Seliwanoff foram empregados para verificar a eficiência do método de d-SPE desenvolvido neste trabalho em relação à remoção dos carboidratos (glicose, frutose e sacarose) presentes na matriz bebida isotônica. Estes testes foram realizados seguindo os procedimentos descritos nos itens 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.

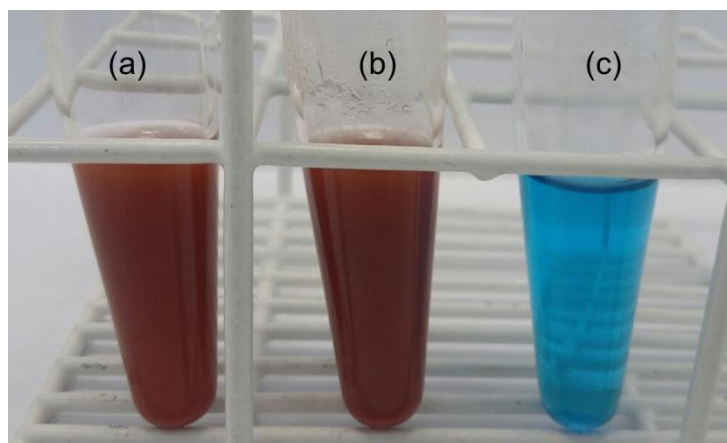
4.3.1 Teste de Benedict

O reagente de Benedict foi utilizado para identificar a presença dos açúcares redutores glicose e frutose na amostra branco, antes e depois do procedimento de preparo de amostra. Conforme a Figura 14 verificou-se o aparecimento de um precipitado vermelho-tijolo somente na amostra branco e no filtrado obtido após a etapa percolação da amostra no filtro. O extrato obtido após a etapa de eluição do método permaneceu azul, mesma coloração do reagente de Benedict, demonstrando a remoção destes interferentes na etapa de preparo de amostra.

O precipitado vermelho de óxido cuproso (Cu_2O) indica a presença de açúcares redutores tanto na amostra quanto no filtrado, mostrando que os açúcares são removidos na etapa de percolação da amostra, isto é, não são retidos no Oasis[®]

HLB. O extrato obtido após a etapa de eluição não apresentou mudança de coloração, estando apto para ser injetado no sistema cromatográfico.

Figura 14 – Teste de Benedict aplicado ao método desenvolvido: (a) amostra branco; (b) filtrado obtido após percolação da amostra; (c) extrato obtido após eluição

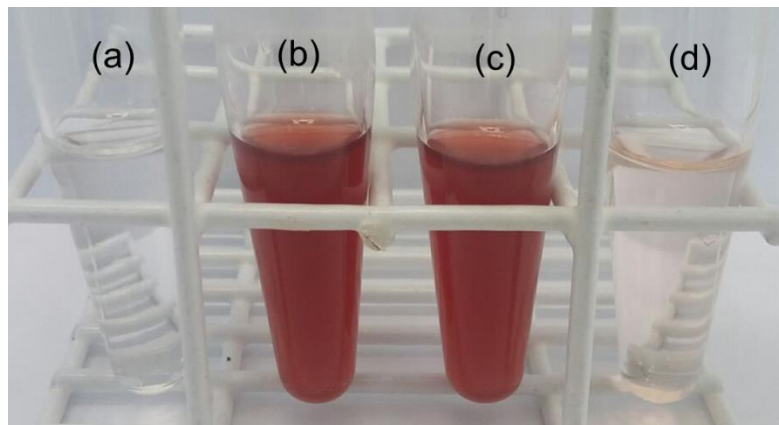


4.3.2 Teste de Seliwanoff

O teste de Seliwanoff é empregado para detectar a presença de cetoses, tais como a frutose. De acordo com Junior (2008), a sacarose também pode ser identificada através deste ensaio, pois em meio ácido ela se hidrolisa liberando seus monossacarídeos glicose e frutose.

A Figura 15 mostra que, assim como no teste de Benedict, somente a amostra branco e o filtrado forneceram resultado positivo. A coloração vermelha indica que as cetoses presentes foram inicialmente transformadas em derivados de furfural e depois condensaram com o resorcinol formando o produto descrito no item 2.6.2. O extrato obtido após a eluição com metanol:hidróxido de amônio (95:5, v/v) ficou levemente rosado quando comparado à água ultrapura (controle). É possível que uma quantidade mínima da sacarose tenha permanecido no filtro contendo o sorvente ou que talvez outra cetose estivesse presente na amostra.

Figura 15 – Teste de Seliwanoff aplicado ao método desenvolvido: (a) água ultrapura; (b) amostra branco; (c) filtrado obtido após percolação da amostra e (d) extrato obtido após eluição



4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO

A validação do método de d-SPE para determinação dos corantes amarantho, amarelo crepúsculo, azul brilhante, azul de indigotina, ponceau 4R e tartrazina em bebidas isotônicas foi realizada seguindo o procedimento representado na Figura 13.

Foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária), sendo que todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em água ultrapura.

4.4.1 Seletividade

O método foi considerado seletivo, uma vez que não foram detectados picos de interferência na faixa cromatográfica de interesse, ou seja, nos mesmos tempos de retenção e nos mesmos comprimentos de onda dos corantes estudados (Figura 16). Diante disso, a amostra branco (bebida isotônica sabor limão) foi utilizada para os ensaios de fortificação. Os solventes e reagentes foram avaliados através do procedimento de extração na ausência da amostra (branco reagente), sendo que nessa avaliação também foi observada a ausência de interferentes.

Figura 16 – Demonstração da ausência de picos cromatográficos de interferentes na (a) amostra branco e (b) branco reagente; e (c) amostra branco fortificada no nível 2 mg L⁻¹.

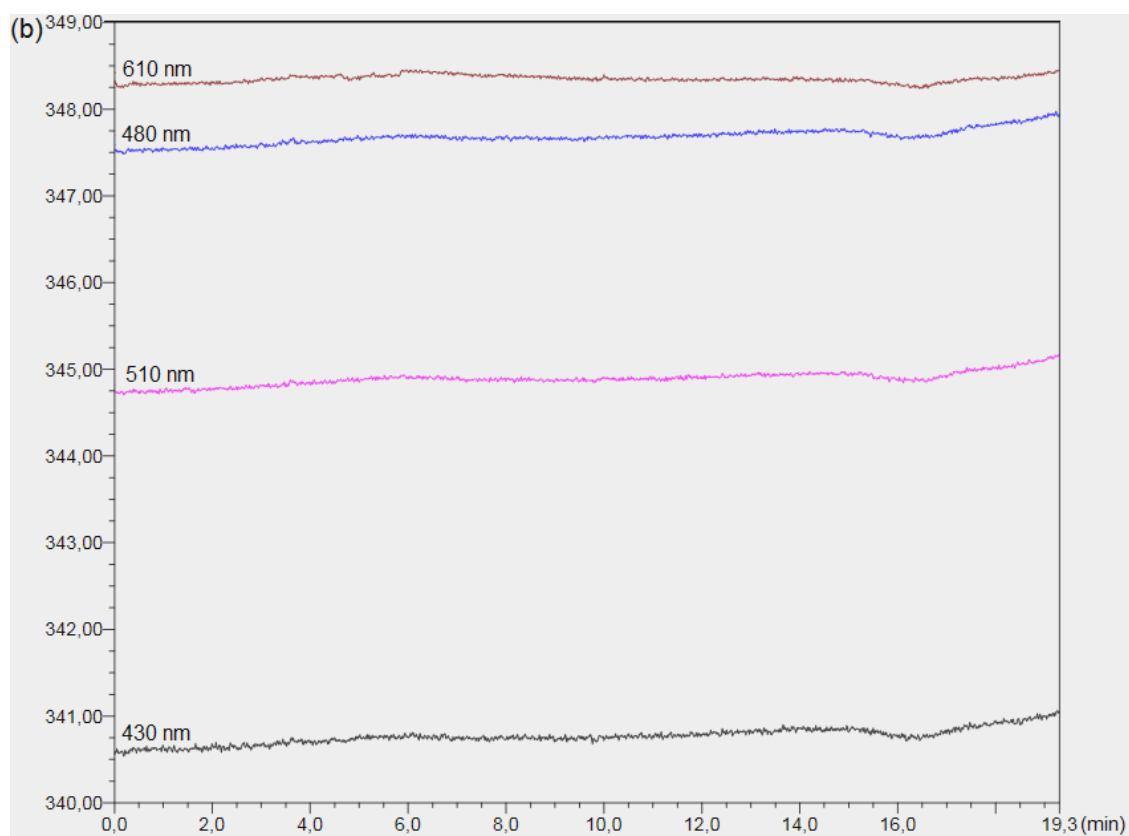
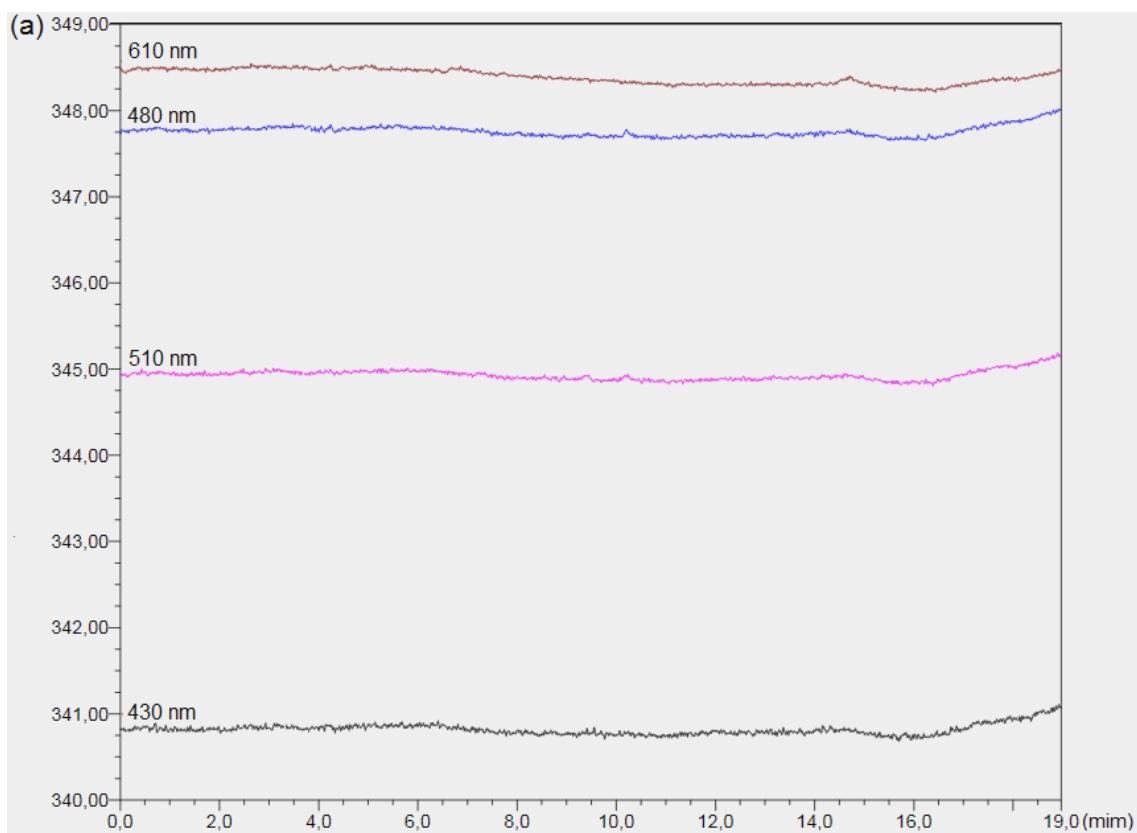
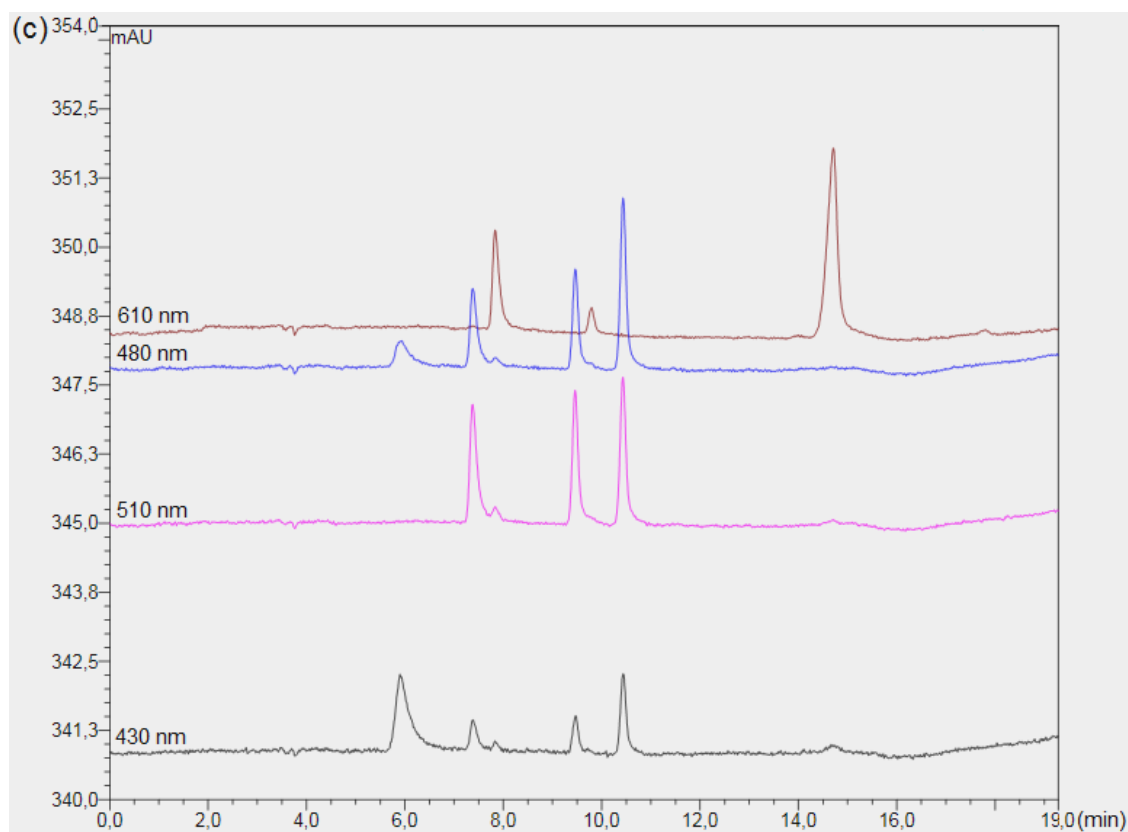


Figura 16 (continuação)

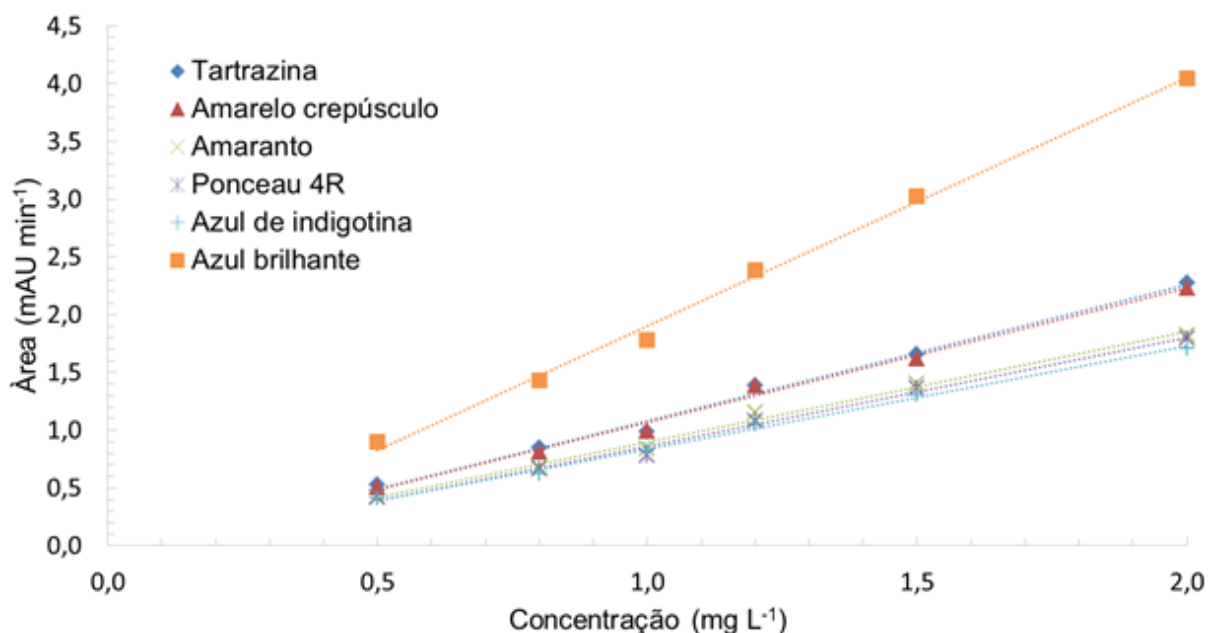


4.4.2 Curva analítica e faixa linear

A linearidade do método proposto foi assegurada pela aplicação da regressão linear aos pontos da curva analítica nos níveis de concentração 0,5; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹, preparada em água ultrapura. Todos os compostos apresentaram coeficiente de determinação (r^2) maior que 0,99.

A Figura 17 representa a curva analítica para os 6 corantes sintéticos analisados, indicando que o corante azul brilhante é o mais sensível de todos; a tartrazina e o amarelo crepúsculo apresentam uma resposta similar, com inclinação maior que o amaranço; e os corantes ponceau 4R e azul de indigotina apresentam menor sensibilidade. Estes resultados estão de acordo com Miniotti *et al.* (2007), que descreveram comportamento semelhante ao observado nesse trabalho.

Figura 17 – Curva analítica (solvente) obtida por HPLC-UV/Vis para os corantes avaliados



4.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Todos os corantes apresentaram resposta linear na faixa de 0,5 a 2,0 mg L⁻¹. A Tabela 9 apresenta as equações das curvas analíticas e os respectivos coeficientes de determinação (r^2). O LOQ do instrumento foi estabelecido em relação ao menor ponto da curva analítica com sinal ruído > 10, sendo que para todos os compostos o LOQ_i foi 0,5 mg L⁻¹. O LOD_i foi obtido através da divisão do LOQ_i por 3,33, resultando num valor de 0,15 mg L⁻¹ (Tabela 9). Estes limites são similares àqueles frequentemente reportados na literatura (MA *et al.*, 2006; BONAN *et al.*, 2013; MAZDEH *et al.*, 2016;).

O LOQ do método foi obtido multiplicando-se os valores pelo fator de diluição, sendo que a etapa de eluição foi realizada com 2 mL de metanol:hidróxido de amônio (95:5, v/v) e o extrato final, após ajuste do pH, foi diluído 2 vezes em água ultrapura, resultando em um fator de 4 vezes. Portanto, o LOD_m foi 0,6 mg L⁻¹ e o LOQ_m foi 2 mg L⁻¹ para todos os compostos (Tabela 9).

Tabela 9 – Equações das curvas analíticas, r^2 , e limites de detecção e de quantificação do instrumento e do método

Composto	Equação	r^2	LOD _i	LOQ _i	LOD _m	LOQ _m
Amaranto	$y = 0,9552x - 0,0598$	0,9917				
Amarelo crepúsculo	$y = 1,1651x - 0,0995$	0,9919				
Azul brilhante	$y = 2,1494x - 0,2461$	0,9918	0,15	0,5	0,6	2,0
Azul de indigotina	$y = 0,8893x - 0,2461$	0,9932				
Ponceau 4R	$y = 0,9412x - 0,0801$	0,9964				
Tartrazina	$y = 1,1781x - 0,0944$	0,9960				

4.4.4 Exatidão e precisão

Para avaliar a exatidão do método, foram realizados ensaios de fortificação conforme descrito no item 3.8.4, utilizando os níveis de 2,0, 4,0 e 6,0 mg L⁻¹. A precisão em termos repetibilidade foi avaliada através da análise das réplicas das fortificações da matriz branco, com n=6 para cada nível de concentração. O nível 2,0 mg L⁻¹ foi utilizado também para a determinação da precisão intermediária, a qual foi realizada em dias e com analistas diferentes.

Todos os compostos apresentaram resultados satisfatórios com recuperações entre 76 e 108% e RSD ≤ 18%, conforme pode ser observado na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados de exatidão (R) e precisão (RSD) para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária

Composto	2,0 mg L ⁻¹				4,0 mg L ⁻¹		6,0 mg L ⁻¹	
	Repetib.		Precisão inter.		Repetib.		Repetib.	
	R%	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%
Amaranto	84	10	79	14	77	10	90	15
Amarelo crepúsculo	89	15	86	11	87	8	97	11
Azul brilhante	95	14	96	11	90	8	108	18
Azul de indigotina	82	16	81	16	78	8	86	18
Ponceau 4R	87	14	87	13	84	8	92	18
Tartrazina	85	15	91	14	76	10	90	11

Yoshioka *et al.* (2008) obtiveram resultados semelhantes para a determinação de corantes sintéticos em doces e bebidas por HPLC-DAD, empregando SPE com

cartuchos de poliamida. Os valores de recuperação reportados foram entre 86,3 e 92,2% com RSD \leq 15%. Bonan *et al.* (2013) também utilizaram SPE com sorvente poliamida para a determinação de corantes sintéticos em matrizes sólidas e líquidas. Entretanto, foram obtidas menores recuperações para amaranço em bebidas (60,4%) e para azul brilhante em amostras sólidas (66,3%). Segundo os autores, substâncias hidrofílicas presentes na matriz podem mascarar os sítios de interação de SPE, reduzindo o seu poder de retenção para os corantes e, conseqüentemente, reduzindo a capacidade dos cartuchos. Além disso, compostos como o amaranço, são fortemente adsorvidos em cartuchos de SPE e a solução de amônia pode ser insuficiente para sua eluição.

4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

O método desenvolvido foi aplicado na análise de 8 amostras comerciais de bebidas isotônicas, adquiridas em supermercados na cidade de Santa Maria, RS, Brasil. Foram avaliadas três marcas diferentes de bebidas isotônicas nos sabores tangerina, laranja, maracujá, uva, uva verde e mix de frutas, e os resultados são apresentados na Tabela 11.

Todos os corantes descritos no rótulo de cada isotônico avaliado foram encontrados abaixo do limite máximo (50-100 mg L⁻¹) estabelecido pela ANVISA (2007), com exceção da tartrazina na amostra A6 que não foi detectada. Não são fornecidas informações sobre a concentração dos corantes nos rótulos dos produtos, portanto é possível que a concentração de tartrazina na amostra A6 estivesse abaixo do limite de detecção do método desenvolvido.

Tabela 11 – Resultados da análise das amostras comerciais de bebidas isotônicas empregando o método proposto

Amostra	Sabor	Rótulo	Concentração encontrada (mg L ⁻¹)
A1	tangerina	tartrazina	10,61
		amarelo crepúsculo	11,49
A2	uva	azul brilhante	2,00
A3	mix de frutas	azul brilhante	<LOQ
A4	laranja	tartrazina	11,12
		amarelo crepúsculo	9,06
A5	uva verde	tartrazina	<LOQ
		azul brilhante	<LOQ
A6	tangerina	tartrazina	n.d.
		amarelo crepúsculo	11,84
A7	maracujá	tartrazina	2,07
		amarelo crepúsculo	3,79
A8	uva	amaranto	34,81
		tartrazina	4,38
		azul brilhante	<LOQ

n.d.: não detectado

5 CONCLUSÕES

Este estudo descreve a aplicação da extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) como um método alternativo ao preparo de amostra para a determinação de corantes sintéticos em bebidas isotônicas. O procedimento desenvolvido apresenta como vantagens a redução de etapas e a facilidade de execução quando comparado à SPE, geralmente empregada, sendo que o uso da seringa tornou a etapa de eluição dos analitos mais simples, sem a necessidade de usar *manifold* ou vácuo. Cabe ressaltar que o pH dos extratos deve ser ajustado antes de realizar a análise, de forma semelhante à adotada em SPE.

Nas condições otimizadas, o sorvente polimérico comercial Oasis[®] HLB mostrou-se eficaz para a extração de todos os corantes sintéticos avaliados. Além disso, os resultados obtidos nos testes qualitativos de Benedict e Seliwanoff

demonstraram que o sorvente promoveu a remoção dos carboidratos glicose, frutose e sacarose presentes em altas concentrações na matriz.

O sistema HPLC-UV/Vis com quatro comprimentos de onda simultâneos proporcionou adequada detectabilidade, seletividade e precisão. Foram obtidos resultados satisfatórios de recuperação (76 e 108%) e precisão (RSD <18%) para todos os analitos. O método foi aplicado com sucesso em amostras de bebidas isotônicas de diferentes marcas e sabores e os resultados das análises cromatográficas demonstraram que todas as amostras apresentaram corantes abaixo dos limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira.

Diante disso, conclui-se que o método de d-SPE proposto para a determinação dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo, amaranço, ponceau 4R, azul de indigotina e azul brilhante em bebidas isotônicas, empregando HPLC-UV/Vis é rápido, eficaz e de baixo custo, podendo ser aplicado em análises de rotina.

6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados durante a realização de atividades laboratoriais devem ser adequadamente tratados ou descartados, visto que podem apresentar riscos à saúde pública e ao meio ambiente.

Os resíduos sólidos e líquidos produzidos no decorrer do desenvolvimento deste trabalho foram armazenados em recipientes apropriados e encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química (DQ) da Universidade Federal de Santa Maria. A destinação final destes resíduos é realizada por uma empresa terceirizada, especializada nessa área.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliar o escopo de corantes sintéticos a serem analisados em bebidas isotônicas por HPLC-UV/Vis;
- Desenvolver um método cromatográfico empregando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS), para fins de confirmação dos corantes sintéticos avaliados;
- Avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido em outros tipos de alimentos, tais como: sucos, refrigerantes e gelatinas;

REFERÊNCIAS

ABIR (Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas), 2015. Disponível em <<http://abir.org.br/o-setor/bebidas/isotonicos/>>. Acesso em: 19 mar. 2016.

ADITIVOS & INGREDIENTES, 2009. Os corantes alimentícios. **Revista Aditivos & Ingredientes**, n° 62, maio/junho de 2009. Disponível em <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/119.pdf>. Acesso em: 09 dez. 2015.

ALVES, S. P.; BRUM, D. M.; ANDRADE, E. C. B.; NETTO, A. D. P. Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high efficiency liquid chromatography with UV-DAD detection. **Food Chemistry**, v. 107, p. 489-496, 2008.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENK, F. J.; Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction” for determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANDRADE-EIROA, A.; CANLE, M.; LEROY-CANCELLIERI, V.; CERDÀ, V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **Trends in Analytical Chemistry**. doi:10.1016/j.trac.2015.08.015. (2016)

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2002a. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2002b. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 340, de 13 de dezembro de 2002.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bionalíticos**. Resolução RE nº 889, de 29 de maio de 2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2007a. Considerações sobre o corante amarelo tartrazina. Informe Técnico nº 30, de 24 de julho de 2007.

Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/30_240707.htm>. Acesso em: 21 abr. 2016.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2007b. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 5, de 15 de janeiro de 2007.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2010. Alimentos para atletas. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 18/2010.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2016. Aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Aditivos+Alimentares+e+Coadjuvantes+de+Tecnologia>>. Acesso em: 05 fev. 2016.

BAZREGAR, M.; RAJABI, M.; YAMINI, Y.; ASGHARI, A.; ABDOSSALAMI, Y. In-tube electro-membrane extraction with a sub-microliter organic solvent consumption as an efficient technique for synthetic food dyes determination in foodstuff samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1410, p. 35-43, 2015.

BENTO, W. A. S.; LIMA, B. P.; PAIM, A. P. S. Simultaneous determination of synthetic colorants in yogurt by HPLC. **Food Chemistry**, v. 183, p. 154-160, 2015.

BONAN, S.; FEDRIZZI, G.; MENOTTA, S.; ELISABETTA, C. Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-eficiência liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Dyes and Pigments*, v. 99, p. 36-40, 2013.

BORGES, K. B; FIGUEIREDO, E. C; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015. 263 p.

BRASIL. 1977a. Resolução CNNPA nº 44 de 1977. Publicada no Diário Oficial da União de 01 de fevereiro de 1978.

BRASIL, 1977b. Resolução CNNPA nº 17 de 9 de maio de 1977.

BRASIL, 1988. Resolução CNS/MS nº 04 de 24 de novembro de 1988. Publicada no Diário Oficial da União de 19 de dezembro de 1988.

BROUSMICHE, D. W.; O'GARA, J. E.; WALS, D. P.; LEE, P. J.; IRANETA, P. C.; TRAMMELL, B. C.; XU, Y.; MALLET, C. R. Functionalization of divinylbenzene/N-vinylpyrrolidone copolymer particles: Ion exchangers for solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1191, p. 108-117, 2008.

CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 227-240, 2012.

CASTRO, F.J.; SCHERER, R.; GODOY, H. T. Avaliação do teor e da estabilidade de vitaminas do complexo b e vitamina c em bebidas isotônicas e energéticas. **Química Nova**, v. 29, p. 719-723, 2006.

CHEN, X.; ZHAO, Y.; SHEN, H.; ZHOU, L.; PAN, S.; JIN, M. Fast determination of seven synthetic pigments from wine and soft drinks using magnetic dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1346, p. 123-128, 2014.

CHEQUER, F. M. D.; VENÂNCIO, V. P.; BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Genotoxic and mutagenic effects of erythrosine B, a xanthene food dye, on HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3447-345, 2012.

CODEX ALIMENTARIUS, 2015. **General Standard for Food Additives**. CODEX STAN 192-1995, rev. 2015. Disponível em <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/gsfa/en/>>. Acesso em: 26 nov. 2015.

DIONEX OPERATING INSTRUCTIONS, Dionex UltiMate 3000 Series Variable Wavelength Detectors VWD-3100 and VWD-3400RS – Thermo Scientific, 2013.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1ª ed., São Paulo:Ed. da UNICAMP, 2007.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 5-22, 2000.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United States), 2016. Chemical risks and JECFA. Disponível em <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/en/>>. Acesso em 23 jan. 2016.

FDA (Food and Drug Administration), 2014. Color Additives: FDA's Regulatory Process and Historical Perspectives. Disponível em <<http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/RegulatoryProcessHistoricalPerspectives/>>. Acesso em: 26 nov. 2015.

FENG, F.; ZHAO, Y.; YONG, W.; SUN, L.; JIANG, G.; CHU, X. Highly sensitive and accurate screening of 40 dyes in soft drinks by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1813-1818, 2011.

FIB, 2009. Dossiê Corantes. **Revista Food Ingredients Brasil**, nº 09, agosto/setembro de 2009. Disponível em <http://www.revista-fi.com/edicoes_materiais.php?id_edicao=19>. Acesso em: 02 mai. 2015.

FIGUEIRA, A. C. M.; ROCHA, J. B. T. Açúcares redutores no ensino superior: atividades baseadas na resolução de problemas. **Experiências em Ensino de Ciências**, v. 3, p. 79-85, 2012.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry. A textbook**. 1ª ed. Alemanha:Springer, 2004. 753 p.

HARP, B. P.; MIRANDA-BERMUDEZ, E.; BARROWS, J. N. Determination of seven certified color additives in food products using liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 3726-3736, 2013.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), 2011. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, rev. 04, julho de 2011.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 13-25, 2010.

JUNIOR, W. E. F. Carboidratos: estrutura, propriedades e funções. **Química Nova na Escola**, nº 29, p. 8-13, 2008.

KHALIKOVA, M. A.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P.; NOVÁKOVÁ, L. Development and validation of ultra-high efficiency supercritical fluid chromatography method for determination of illegal dyes and comparison to ultra-high efficiency liquid chromatography method. **Analytica Chimica Acta**, v. 874, p. 84–96, 2015.

KARANIKOLOPOULOS, G.; GERAKIS, A.; PAPADOPOULOU, K.; MASTRANTONI, I. Determination of synthetic food colorants in fish products by an HPLC-DAD method. **Food Chemistry**, v. 177, p. 197–203, 2015.

KUCHARSKA, M.; GRABKA, J. A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. **Talanta**, v. 80, p. 1045–1051, 2010.

LI, X. Q.; ZHANG, Q. H.; MA, K.; LI, H. M.; GUO, Z. Identification and determination of 34 water-soluble synthetic dyes in foodstuff by high efficiency liquid chromatography–diode array detection–ion trap time-of-flight tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 182, p. 316-326, 2015.

LUCOVÁ, M.; HOJEROVÁ, J.; PAŽOURECOVÁ, S.; KLIMOVÁ, Z. Absorption of triphenylmethane dyes Brilliant Blue and Patent Blue through intact skin, shaven skin and lingual mucosa from daily life products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 19-27, 2013.

MA, M.; LUO, X.; CHEN, B.; SU, S.; YAO, S. Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-efficiency liquid chromatography–diode array detection–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, p. 170-176, 2006.

MANZO, V.; HONDA, L.; NAVARRO, O.; ASCAR, L.; RITCHER, P. Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction. **Talanta**, v. 128, p. 486-492, 2014.

MARCHI, R.; MONTEIRO, M.; CARDELLO, H. M. A. B. Avaliação da vida-de-prateleira de um isotônico natural de maracujá (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, p. 291-300, 2003.

MARTINS, M. S. Uso de corantes artificiais em alimentos: legislação brasileira. **Revista Aditivos & Ingredientes**, nº 122, setembro de 2015. Disponível em <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/819.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2016.

MAUGHAN, R. J.; SHIRREFFS, S. M. Rehydration and recovery after exercise. **Science & Sports**, v. 19, p. 234–238, 2004.

MAZDEH, F. Z.; KHORRAMI, A. R.; MORADI-KHATOONABADI, Z.; ESMAEILIAFTABDARI, F.; ARDEKANI, M. R. S.; MOGHADDAM, G.; HAJIMAHMOODI, M. Determination of 8 synthetic food dyes by solid-phase extraction and reversed-phase high efficiency liquid chromatography. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 173-181, 2016.

MCAVOY, S. A. Global regulations of food colors. **The Manufacturing Confectioner**, v. 94, nº 9, setembro de 2014.

MINIOTI, K. S.; SAKELLARIOU, C. F.; THOMAIDIS, N. S. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-efficiency liquid chromatography coupled with diode-array detector. **Analytica Chimica Acta**, v. 583, p. 103–110, 2007.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagente & solventes. Padronização, preparação e purificação**. 2ª ed. São Paulo:Ed. Edgard Blucher Ltda., 1987. 627 p.

MUÑOZ, N. C.; FLORIANO, L.; SOUZA, M. P.; BANDEIRA, N. M. G.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R. Determination of pesticide residues in goldenberry (*Physalis peruviana* L.) by modified QuEChERS method and ultra-high-efficiency liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. **Food Analytical Methods**. doi:10.1007/s12161-016-0582-7. (2016)

NAVARRO-PASCUAL-AHUIR, M.; LERMA-GARCIA, M. J.; SIMÓ-ALFONSO, E. F.; HERRERO-MARTÍNEZ, J. M. Determination of water-soluble vitamins in energy and sport drinks by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Food Control**, v. 63, p. 110-116, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6ª ed. São Paulo:Ed. Artmed., 2014. 1336 p.

OLIVEIRA, R. O.; SANTA MARIA, L. C.; MERÇON, F.; AGUIAR, M. R. M. P. Preparo e emprego do reagente de Benedict na análise de açúcares: uma proposta para o ensino de química orgânica, **Química Nova na Escola**, nº 23, p. 41-42, 2006.

PRADO, A. M.; GODOY, H. T. Teores de corantes artificiais em alimentos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 30, p. 268-273, 2007.

PRADO, A. M.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, p. 237-250, 2003.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

QI, P.; LIN, Z.; CHEN, G.; XIAO, J.; LIANG, Z.; LUO, L.; ZHOU, J.; ZHANG, X. Fast and simultaneous determination of eleven synthetic color additives in flour and meat products by liquid chromatography coupled with diode-array detector and tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 181, p. 101–110, 2015.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 101– 109, 2012.

REBANE, R.; LEITO, I.; YURCHENKO, S.; HERODES, K. A review of analytical techniques for determination of Sudan I–IV dyes in food matrixes. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2747–2757, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

SANTE, EUROPEAN COMMISSION, 2015. **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Document nº SANTE/11945/2015.

SHEN, Y.; ZHANG, X.; PRINYAWIWATKUL, W.; XU, Z. Simultaneous determination of red and yellow artificial food colourants and carotenoid pigments in food products. **Food Chemistry**, v. 157, p. 553–558, 2014.

SUN, H.; SUN, N.; ZHANG, J.; YANG, Y. Development of multiresidue analysis for 21 synthetic colorants in meat by microwave-assisted extraction–solid-phase extraction–reversed-phase ultrahigh efficiency liquid chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 1291–1299, 2013.

TANG, B.; XI, C.; ZOU, Y.; WANG, G.; LI, X.; ZHANG, L.; CHEN, D.; ZHANG, J. Simultaneous determination of 16 synthetic colorants in hotpot condiment by high efficiency liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 960, p. 87–91, 2014.

UE, 1994. European Parliament and Council Directive 94/36/EC of 30 June 1994 on colours for use in foodstuffs. Disponível em <https://webgate.ec.europa.eu/sanco_foods/main/?event=legislations.search&legislations.pagination=3>. Acesso em: 18 abr. 2016.

UE, 2012. Commission Regulation (EU) Nº 380/2012 of 3 May 2012. Disponível em <<http://www.eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:119:0014:0038:EN:PDF>>. Acesso em: 18 abr. 2016.

UE, 2016. RASFF - Food and Feed Safety Alerts. Disponível em <http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm>. Acesso em: 18 mar. 2016.

VIDAL, L.; RIEKKOLAA, M.; CANALS, A. Ionic liquid-modified materials for solid-phase extraction and separation: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 715, p. 19–41, 2012.

VIDOTTI, E. C.; COSTA, W. F.; OLIVEIRA, C. C. Development of a green chromatographic method for determination of colorants in food samples. *Talanta*, v. 68, p. 516-521, 2006.

WANG, X.; WANG, S.; CAI, Z. The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 170–185, 2013.

WU, H.; GUO, J.; DU, L.; TIAN, H.; HAO, C.; WANG, Z.; WANG, J. A rapid shaking-based ionic liquid dispersive liquid phase microextraction for the simultaneous determination of six synthetic food colourants in soft drinks, sugar- and gelatin-based confectionery by high-eficiência liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 141, p. 182–186, 2013.

YAMJALA, K.; NAINAR, M. S.; RAMISETTI, N. R. Methods for the analysis of azo dyes employed in food industry – A review. **Food Chemistry**, v. 192, p. 813-824, 2016.

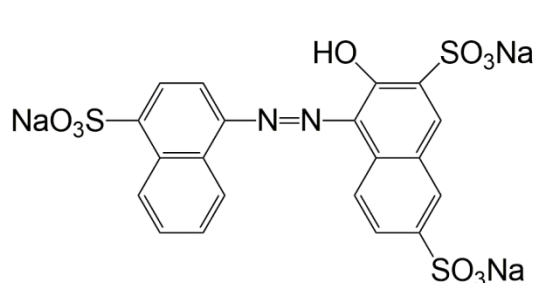
YANG, Y.; YIN, J.; SHAO, B.; Simultaneous determination of five aluminum lake dyes in chewing gum by HPLC with photodiode array detection. **Food Additives & Contaminants**, v. 28, p. 1159-1167, 2011.

YOSHIOKA, N.; ICHIHASHI, K. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-eficiência liquid chromatography using a short column with photodiode array detection. **Talanta**, v. 74, p. 1408-1413, 2008.

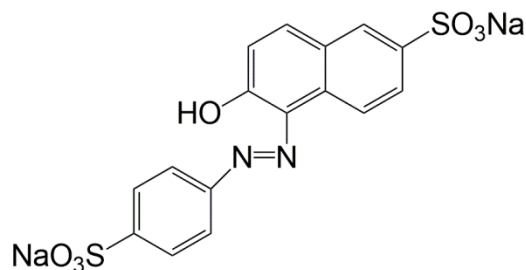
ZANELLA, R.; PRESTES, O.; MARTINS, M.; ADAIME, M. **Quantitative Analysis and Method Validation** In: Chromatographic Science Series. 1a ed. Boca Raton, FL, USA. CRC Press, 2015, p 303-324.

ZOU, T.; HE, P.; YASEN, A.; LI, Z. Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high efficiency liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1742-1748, 2013.

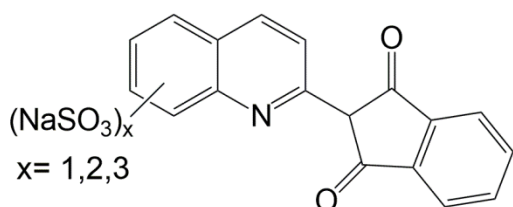
APÊNDICE A – FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS 14 CORANTES SINTÉTICOS PERMITIDOS PARA USO EM ALIMENTOS NO BRASIL



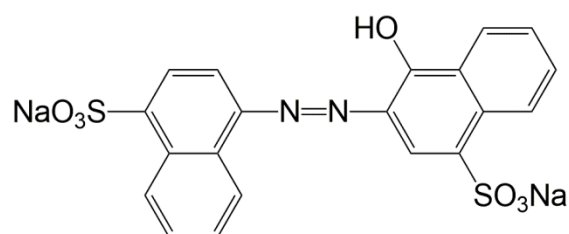
Amaranto (E 123)



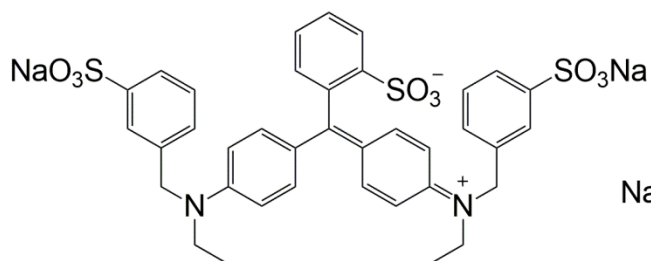
Amarelo crepúsculo (E 110)



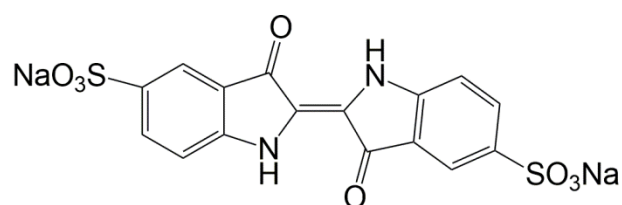
Amarelo de quinoleína (E 104)



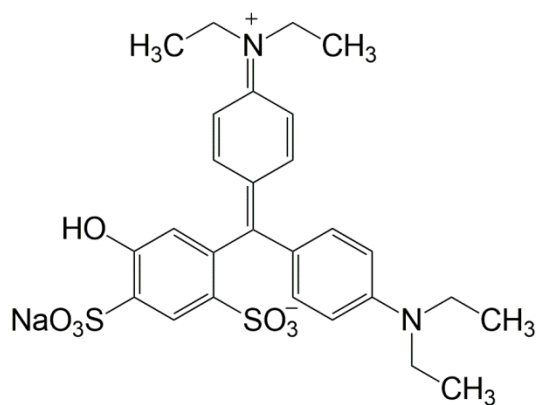
Azorrubina (E 122)



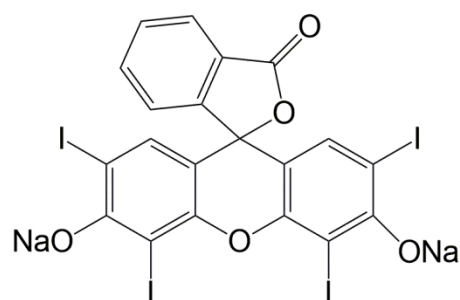
Azul brilhante (E 133)



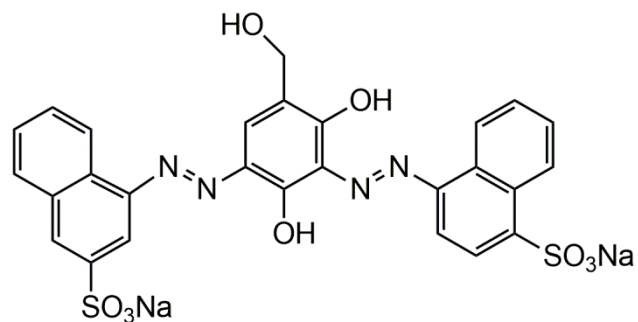
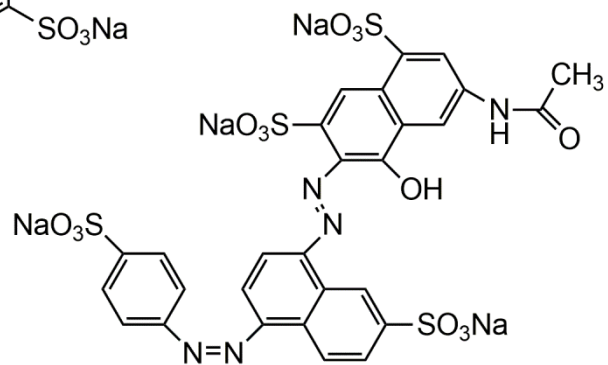
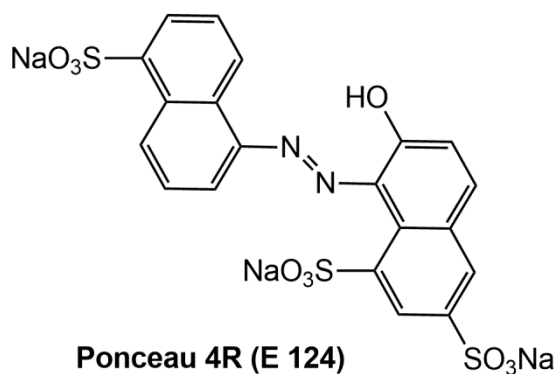
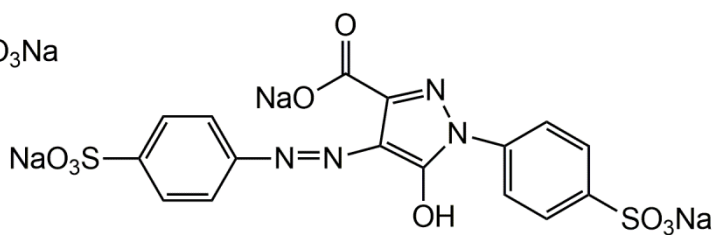
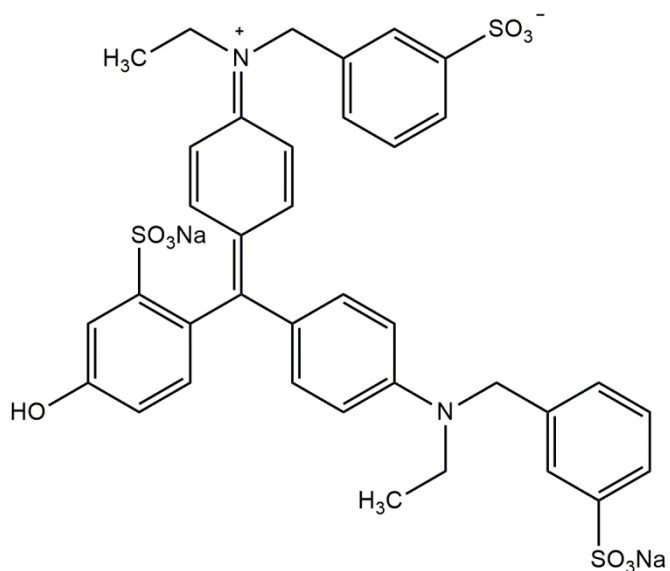
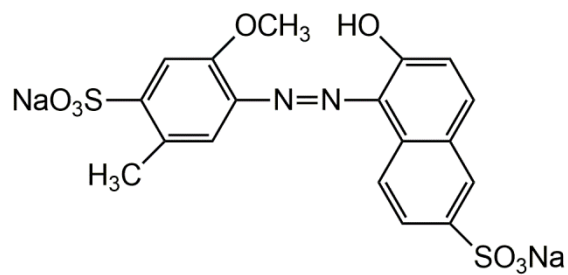
Azul de indigotina (E 132)



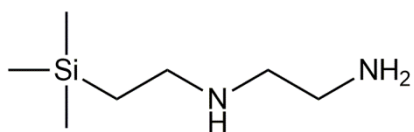
Azul patente V (E 131)



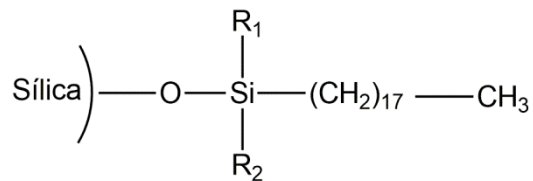
Eritrosina (E 127)

**Marrom HT (E 155)****Negro brilhante BN (E 151)****Ponceau 4R (E 124)****Tartrazina (E 102)****Verde rápido (E 143)****Vermelho 40 (E 129)**

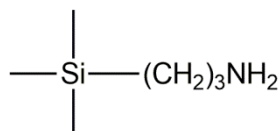
APÊNDICE B – ESTRUTURAS DOS SORVENTES CITADOS NO TRABALHO



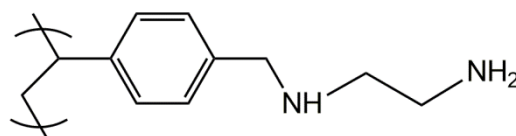
Etilenodiamino-N-propil (PSA)



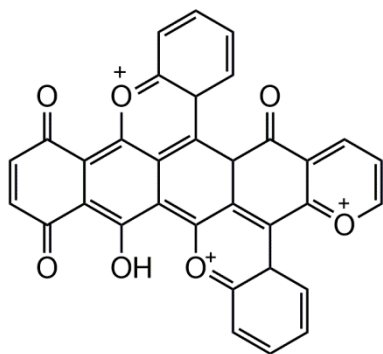
Octadecilsilano (C18)



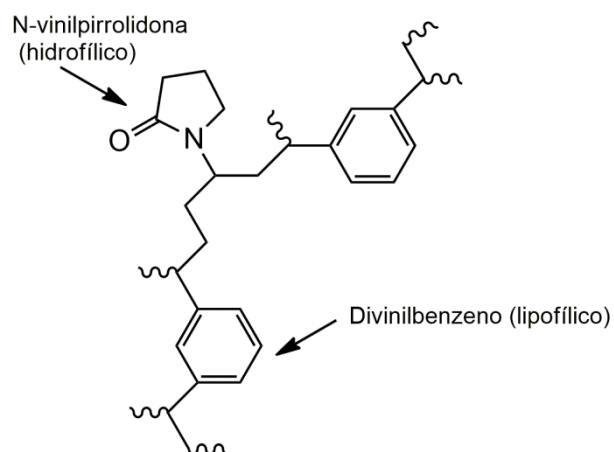
**Sílica modificada
com aminopropil (NH₂)**



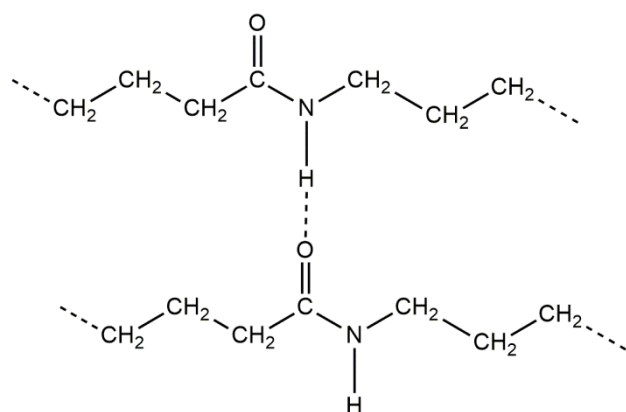
Strata™-X-AW



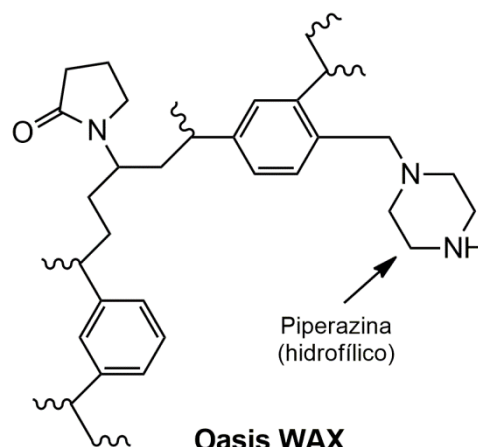
Carbono grafetizado (GCB)



Oasis HLB



Resina de poliamida



Oasis WAX