

DETERMINAÇÃO DO CORANTE ALIMENTÍCIO AMARELO CREPÚCULO VIA ESPECTROFOTOMETRIA DE UV/VIS: IDENTIFICAÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA CARACTERÍSTICOS E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA

Naiana S. C. S. Neves¹, Ingrid L. S. Santana¹, Fernanda S. Silva¹, Marina G. Silva¹, Cecília G. S. da Silva², Vanessa O. M. Cavalcanti¹, Daniella C. Napoleão¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Engenharia Química, Recife-PE.

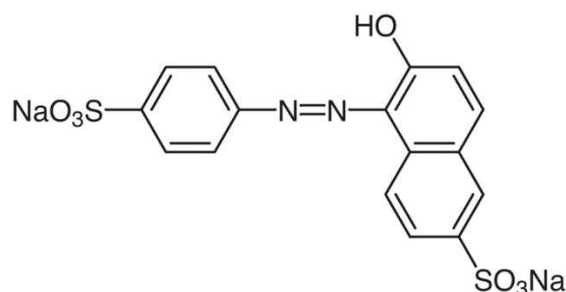
² Instituto Federal de Pernambuco, Campus Recife, Recife-PE.

Palavras-Chave: Corante, poluente, UV/VIS.

Introdução

O corante alimentício amarelo crepúsculo (massa molecular igual a $452,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), cuja fórmula estrutural está apresentada na Figura 1 é amplamente empregado em bebidas, doces e outros alimentos processados, mas especialmente, pode estar presente em produtos farmacêuticos conferindo cor, estabilidade. Sua presença ajuda a aumentar a aceitação dos consumidores (Balram et al. 2023).

Figura 1- Estrutura química do corante amarelo crepúsculo.



O corante apresentado na Figura 1, assim como diversos corantes alimentícios são classificados como sintéticos. Eles apresentam como vantagens uma maior estabilidade, cor mais brilhante e menor preço quando comparado aos corantes naturais. Isso garante uma maior aceitação dos produtos no mercado, dado que eles apresentam um visual mais atraente para o consumidor (Basu, Kumar, 2015; Rovina *et al.*, 2016; Carcho *et al.*, 2014).

Dadas as características desses compostos, tem sido observada resistência aos tratamentos convencionais aplicados em estações de tratamento de efluentes (ETE). Isto porque a presença dos corantes alimentícios em água causa efeitos adversos aos corpos hídricos, uma vez que dificultam a penetração de luz, impactando de modo negativo na quantidade de oxigênio dissolvido do meio (Chekira *et al.*, 2017; Tikhomirova *et al.*, 2018). Além disso, é importante ressaltar que este contaminante tem potencial de desenvolver alergia, asma, potencial xenoestrogênico, efeitos carcinogênicos e genotóxicos, hiperatividade e déficit de atenção em crianças, efeitos adversos no timo e na contagem de monócitos quando em contato com organismo humano (Kaya *et al.*, 2021; Tajik; Beitollahi, 2022). Deste modo, justifica-se estudos direcionados a proposição de tratamentos para este contaminante.

Neste sentido, é necessário dispor de técnicas analíticas capazes de identificar e quantificar a presença de corantes em meio aquoso. A cor característica dos corantes se deve à presença de ligações duplas e simples referentes às suas moléculas. Sendo, os grupamentos nitro, nitroso, azo, arilmetano, carbonila, dentre outros, os responsáveis pela coloração em si, recebendo assim o nome de cromóforos. Estes grupamentos podem ser observados através da absorção nas regiões do ultravioleta e do visível do espectro (Silva *et al.*, 2017). Por este motivo, a técnica de espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta/visível (UV/Vis) tem sido empregada para determinação de concentração de corantes (Nascimento *et al.*, 2020).

Contudo, para que se possa garantir a confiabilidade expressa por um método analítico a respeito de um dado analito é necessário realizar uma etapa de validação de metodologia. A validação de uma metodologia garante através da determinação de vários parâmetros que ela pode ser utilizada para o uso pretendido (NBR ISO/IEC 17025, 2001).

Dentre os parâmetros de validação comumente empregados encontram-se linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). A linearidade pode ser avaliada através do valor do coeficiente de correlação e do gráfico de resíduos, ela indica a faixa de trabalho para a qual a curva analítica pode ser utilizada. A precisão indica que os resultados obtidos através de um método analítico apresentam valores muito próximos a um valor central. Este parâmetro pode ser expresso com base na determinação da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade (Brasil, 2017).

Por outro lado, a exatidão indica o quão próximo os dados obtidos estão próximos a um valor de referência. A determinação desse parâmetro pode ser feita com base na análise de um material de referência certificado (MRC), ensaios interlaboratoriais, ou ainda através de ensaios de recuperação (Veterin, 2011). Os limites de detecção e quantificação expressam a menor quantidade do analito capaz de ser detectada e quantificada com segurança. Estes parâmetros podem ser expressos com base em dados da curva analítica, em especial o seu coeficiente angular (Brasil, 2017).

Assim, o presente estudo teve como objetivo validar uma metodologia de determinação do corante alimentício amarelo crepúsculo utilizando espectrofotometria de ultravioleta/visível (UV/Vis).

Materiais e Métodos

Inicialmente, foram determinados os comprimentos de onda (λ) característicos do corante amarelo crepúsculo (AC) através de varredura espectral de 200 a 800 nm, utilizando espectrofotômetro de UV/Vis (Metash UV-5100). Para cada λ identificado foi construída uma curva analítica com faixa linear de trabalho de 1 a 20 mg·L⁻¹.

A confirmação da confiabilidade do método de quantificação foi dada pela determinação da linearidade, precisão, exatidão, bem como limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), conforme determinações previstas no documento DOQ-CGCRE-008 do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2020) e na Resolução da diretoria colegiada (RDC) nº166 de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2017).

A precisão foi obtida através da determinação da repetibilidade e cálculo do coeficiente de variância (CV) para as diferentes concentrações da curva analítica que é dado pela razão entre o desvio padrão absoluto das 9 (nove) replicatas pela média das absorvâncias para cada concentração, apresentando valor menor ou igual a 5% para estar em conformidade com o INMETRO (2020). Outro parâmetro investigado foi a exatidão, expressa através da razão percentual entre a concentração teórica e a média das triplicatas da concentração obtida experimentalmente.

O limite de quantificação foi expresso por 10 vezes a relação entre o desvio padrão absoluto (σ) das replicatas do menor ponto das curvas e o coeficiente angular (α) da curva analítica. Já o limite de detecção foi dado pela terça parte do valor obtido para LQ. Ainda em conformidade com o previsto pela ANVISA, determinou-se a linearidade a partir do coeficiente de correlação (r). Para garantir a obtenção de uma equação da curva linear também foi realizada uma análise estatística aplicando o teste de Grubbs utilizando intervalo de confiança de 95% (Grubbs, Beck, 1972).

Resultados e discussão

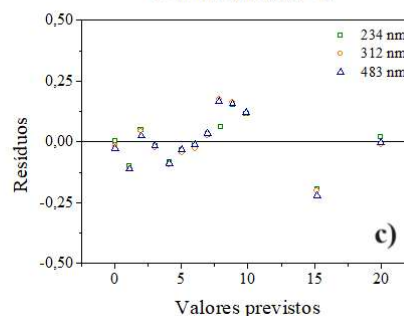
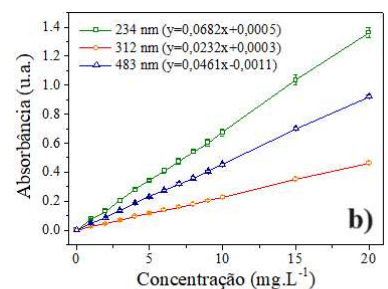
A detecção e quantificação do corante AC foi realizada a partir da análise de varredura espectral de uma solução aquosa com concentração de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ do corante. Os comprimentos de onda (λ) característicos selecionados foram 234, 312 e 483 nm. Para cada um dos λ foi construída uma curva analítica com 12 pontos, considerando o valor médio obtido para leitura das 9 (nove) replicatas. Para garantir que os dados obtidos apresentam confiabilidade estatística, o INMETRO propõe que seja realizada uma análise através de um teste estatístico, sendo o teste de Grubbs escolhido neste estudo. Na Figura 2 a) estão dispostos os valores obtidos para $G<$ e $G>$.

Figura 2- a) Valores de $G<$ e $G>$ para cada uma das concentrações das curvas analíticas, b) Curvas analíticas para os λ 234, 312 e 483 nm; c) Gráfico dos resíduos das curvas analíticas

Concentração (mg/L)	234 nm		312 nm		483 nm	
	$G<$	$G>$	$G<$	$G>$	$G<$	$G>$
1	0,83	1,40	1,42	1,33	1,20	1,34
2	2,08	1,25	0,98	1,35	1,59	1,31
3	1,63	1,70	1,40	2,20	1,68	1,14
4	0,92	1,29	0,88	1,98	1,06	1,55
5	0,99	2,11	1,15	2,18	1,47	0,84
6	1,05	1,81	0,97	2,02	1,07	1,30
7	1,16	1,81	0,99	2,19	1,31	1,91
8	1,99	1,59	0,90	1,38	0,91	0,81
9	1,70	1,03	1,51	0,43	1,54	1,31
10	1,30	1,58	1,40	1,30	1,60	1,34
15	1,17	1,69	1,38	1,74	1,26	1,49
20	1,29	1,61	1,17	1,43	1,33	1,44

* G (tabelado (9)) = 2,21.

a)



Os dados apresentados na Figura 2 a), demonstram que os valores obtidos para cada concentração estão em conformidade o valor tabelado para o teste de Grubbs, considerando

uma amostra de tamanho 9. Verifica-se que todos os resultados de $G<$ e $G>$ são inferiores ao valor tabelado, garantindo que as replicatas concordam entre si.

De posse dos dados da média da absorvância de cada ponto (valores não apresentados de modo a garantir a confidencialidade) foram construídas as curvas analíticas, cujos resultados estão apresentados na Figura 2 b) e c). Nesta figura também estão dispostos os gráficos dos resíduos de cada curva.

Conforme pode ser observado na Figura 2 b), a linearidade das curvas construídas para o corante amarelo crepúsculo apresentaram valores de coeficientes de correlação iguais a 0,9997, 0,9996 e 0,9996 para 234, 312 e 483 nm, respectivamente. Estes valores atendem à exigência da ANVISA. Analisando os resíduos referentes as curvas construídas (Figura 2 c)), nota-se que estes apresentaram comportamento aleatório para os 3 comprimentos de onda avaliados, com valores próximos a zero e com baixa amplitude (entre -0,25 e 0,25). Desta maneira, pode-se afirmar que o método proposto é linear.

Uma vez verificada a linearidade do método, passou-se a avaliação da precisão. Para isso, foram definidos os valores de CV para cada um dos pontos das curvas, sendo obtidos valores entre 1,99 e 4,94 para 234 nm; 2,57 e 4,99 para 312 nm e 1,87 e 4,61 para 483 nm. Desse modo, constatou-se que em todos os casos os valores foram inferiores a 5%, indicando que o método é preciso.

Em seguida, a exatidão foi avaliada pelo método da fortificação, utilizando três níveis de concentrações diferentes dentro da faixa linear da curva analítica como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados obtidos para o teste de exatidão expresso através da recuperação (%)

Concentração teórica ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recuperação (%)		
	234 nm	312 nm	483 nm
3,0	104,7	104,4	101,5
7,5	103,8	103,1	100,2
12,5	99,8	99,2	99,3

Observa-se que os percentuais de recuperação variaram entre 99,2% e 104,7%, apresentando-se dentro da faixa de 80 a 110% estabelecida pelo INMETRO (2020), para concentrações de analito entre 1 e 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Desta forma, pode-se afirmar que o método analítico proposto é exato, indicando a proximidade dos dados obtidos aos valores de referência.

Em seguida, foi realizada a determinação dos limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), estando os valores obtidos dispostos na Tabela 2.

Tabela 2- Limites de quantificação e detecção do método proposto para determinação do corante amarelo crepúsculo.

Comprimento de onda (nm)	Limite de quantificação ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Limite de detecção ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
234	0,66	0,22
312	0,87	0,29
483	0,72	0,24

Conforme apresentado na Tabela 2, verifica-se que os limites de detecção referente ao método aplicado variaram de 0,22 a 0,29 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto para os limites de quantificação a variação obtida foi de 0,66 a 0,87 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Desse modo, pode-se afirmar que os limites obtidos atendem às necessidades de análise requeridas pelo grupo de pesquisa.

Conclusões

Através deste estudo foi possível disponibilizar um método através da técnica de espectrofotometria de ultravioleta/visível capaz de monitorar o corante alimentício amarelo crepúsculo em 3 comprimentos de onda característicos, sendo eles: 234, 312 e 483 nm. Para garantir a confiabilidade foram analisados diferentes parâmetros de validação que atenderam às exigências do INMETRO. Assim, é possível afirmar que o método proposto é linear, preciso e exato, apresentando limites de detecção e quantificação inferiores a 0,30 e 0,88 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Agradecimentos

À FACEPE (projeto APQ 0947-3.06/22) e pela concessão da bolsa da primeira autora do trabalho.

Referências

- Balram, D., Lian, K. Y., Sebastian, N., Alharthi, S. S., Al-Saidi, H. M., Yadav, V. K., Kumar, D., Kumar, V. A novel ternary nanocomposite based electrochemical sensor coupled with regularized neural network for nanomolar detection of sunset yellow FCF. *Journal of Alloys and Compounds*, 968, 171934, 2023.
- Basu, A., Kumar, G. S. Interaction of toxic azo dyes with heme protein: biophysical insights into the binding aspect of the food additive amaranth with human hemoglobin. *Journal of Hazardous Materials*, 289, 204–209, 2015.
- Brasil, Ministério da Saúde. Resolução RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – (ANVISA). Brasília, DF, 2017.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., Ferreira, I. C. F. R. Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 377–399, 2014.
- Chekira, N., Tassalit, D., Benhabiles, O., Merzouk, N. K., Ghenna, M., Abdessemed, A., Issaadi, R. A comparative study of tartrazine degradation using UV and solar fixed bed reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 8948–8954, 2017.
- Grubbs, F. E., Beck, G. Extension of sample sizes and percentage points for significance tests of outlying observations. *Technometrics*, 14 (4), 847-854, 1972.



Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – (INMETRO). DOC-CGCRE-008 Orientação sobre validação de métodos analíticos. Revisão 09, 2020.

Kaya, S. I.; Cetinkaya, A.; Ozkan, S. A. Latest advances on the nanomaterials-based electrochemical analysis of azo toxic dyes Sunset Yellow and Tartrazine in food samples. **Food and Chemical Toxicology**, 156, 112524, 2021.

Nascimento, G. E., Cavalcanti, V. O. M., Santana, R. M. R., Sales, D. C. S., Rodríguez-Díaz, J. M., Napoleão, D. C., Duarte, M. M. M. B. Degradation of a sunset yellow and tartrazine dye mixture: optimization using statistical design and empirical mathematical modeling. **Water, Air, & Soil Pollution**, 231, 1-17, 2020.

NBR ISO/IEC 17025. Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Calibração e de Ensaios. 2001 ABNT. RJ. Brasil.

Rovina, K., Prabakaran, P. P., Siddiquee, S., Shaarani, S. M. Methods for the analysis of sunset yellow FCF (E110) in food and beverage products- a review. **Trends in Analytical Chemistry**, 85, 47–56, 2016.

Silva, L. R. C.; Silva, T. L.; Araújo, F. P.; Silva Filho, E. C.; Osajima, J. A. Uso de fotólise direta e H₂O₂/UV em solução aquosa contendo o corante violeta cristal. **Holos Environment**, 17, 138-148, 2017.

Tajik, S.; Beitollahi, H. Hydrothermal synthesis of CuFe₂O₄ nanoparticles for highly sensitive electrochemical detection of sunset yellow. **Food and Chemical Toxicology**, v. 165, p. 113048, 2022.

Tikhomirova, T. I., Ramazanova, G. R., Apyari, V. V. Effect of nature and structure of synthetic anionic food dyes on their sorption onto different sorbents: Peculiarities and prospects. **Microchemical Journal**, 143, 305-311, 2018.

Veterin, M. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Brasília. 2011.