

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE CORANTES ALIMENTÍCIOS VIA ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRAVIOLETA/VISÍVEL

Vanessa O M Cavalcanti¹; Évanne R. S. Santos¹; Ingrid L. S. Santana¹; Rayany M. R. Santana¹; Maurício A. M. Sobrinho¹; Daniella C. Napoleão¹

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

Palavras-Chave: Fotoperoxidação, corantes alimentícios, lâmpadas UV-C.

Introdução

Uma crescente demanda, principalmente do mercado consumidor, por produtos que sejam visualmente mais atraentes tem tomado proporções cada vez maiores. Desta forma, diferentes corantes alimentícios sintéticos estão sendo desenvolvidos com intuito de melhorar as características visuais e organolépticas dos alimentos (Ntrallou, Gika e Historia, 2020). No entanto, durante o processo produtivo os corantes remanescentes são eliminados no efluente industrial.

Tais compostos orgânicos, apresentam potencial poluidor e tóxico tanto aos ecossistemas como aos seres humanos, dado que são contaminantes com baixa biodegradabilidade e com potencial mutagênico. Logo, faz-se necessário empregar tratamentos eficientes para os efluentes industriais antes do seu despejo (Brahim *et al.*, 2021). Dentre as alternativas, os processos oxidativos avançados (POA) despertam especial atenção por ser um processo que envolve a produção de espécies reativas de oxigênio, como radical hidroxila, que são capazes de quebrar as moléculas de poluentes recalcitrantes (Belver *et al.*, 2020).

Neste cenário, a limitação das estações de tratamento de efluentes (ETE) convencionais (que fazem uso de processos físicos, químicos e biológicos), no que tange a eficiência de degradação, é preocupante. Estas unidades são projetadas para reduzir a carga de poluentes orgânicos, não tendo especificidade para a remoção de compostos persistentes como os fármacos (Mínale *et al.*, 2020). Diante disso, identificar e validar a existência de corantes alimentícios no ambiente aquático é de grande relevância para compreender o impacto do contaminante no meio ambiente e na saúde pública.

Desta forma, o presente trabalho visou desenvolver e validar um método analítico através da determinação de alguns parâmetros, tais como limite de detecção e quantificação, linearidade, precisão e exatidão. Assim, este estudo teve como objetivo disponibilizar uma metodologia confiável utilizando a técnica analítica de espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta/visível para análise dos corantes alimentícios amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina. Após validação do método analítico realizou-se a quantificação de amostras contendo a mistura dos corantes citados antes e após submissão ao processo de fotoperoxidação.

Material e Métodos

Preparação da solução trabalho

A preparação da mistura aquosa dos contaminantes se deu através dos corantes alimentícios: amarelo crepúsculo (F. TRAJANO) e amarelo tartrazina (F. TRAJANO), com concentração de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para cada.

Identificação e quantificação dos corantes

A identificação e quantificação da mistura dos corantes foi realizada empregando espectrofotômetro de absorção molecular na região ultravioleta/visível (UV/Vis) (Thermo Scientific, modelo Genesys 10S). Para a determinação dos comprimentos de onda (λ) de máxima absorbância foi realizada uma varredura espectral de 200 a 700 nm, no pH natural da solução. Feito isto, com objetivo de verificar a eficácia da metodologia por meio da validação, oito curvas analíticas foram construídas, em uma faixa de trabalho de $0,5$ a $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Validação do método analítico de espectrometria de absorção molecular na região UV/Vis

A validação do método foi realizada através das orientações descritas pela Resolução da diretoria colegiado (RDC) nº166 de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017) e do documento DOQ-CGCRE-008 do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2020). Desta forma, inicialmente foram determinados os seguintes parâmetros: limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD); precisão, através do coeficiente de variância (CV) e a linearidade da curva analítica, através da obtenção do valor do coeficiente de correlação (r). A fim de verificar se havia presença de outliers nos dados obtidos das replicatas de cada concentração da curva analítica, utilizou-se teste de Grubbs, com intervalo de confiança de 95% (Grubbs e Beck, 1972). Os valores de $G_{<}$ e $G_{>}$ foram determinados através das Equações 1 e 2.

$$G_{<} = \frac{(C_m - G_{<})}{\sigma} \quad (1)$$

$$G_{>} = \frac{(G_{>} - C_m)}{\sigma} \quad (2)$$

Onde, $G_{<}$ e $G_{>}$ se referem ao menor e ao maior valor de absorbância medida, respectivamente, enquanto C_m é o valor médio das absorbâncias e σ o desvio padrão absoluto replicatas.

Por fim, foi verificada a exatidão do método, que expressa a relação percentual entre a concentração teórica e a média das concentrações obtidas experimentalmente. Sendo assim, este parâmetro foi determinado em três níveis de concentração, de modo a considerar regiões distintas das curvas analíticas, utilizando para tal o método de adição de padrão ou fortificação da amostra.

Quantificação pelo método analítico validado

Após a validação da metodologia, realizou-se um estudo de degradação dos contaminantes utilizando processo de fotoperoxidação. Os testes foram realizados utilizando 50 mL da solução trabalho, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de H_2O_2 , em reator de bancada equipado com três lâmpadas (OSRAM) UV-C dispostas em paralelo com potência de 30 W e 90 cm de comprimento, por 120 min. Ressalta-se que o desenho do reator pode ser visualizado no trabalho desenvolvido por Lucena *et al.* (2022). A eficiência do tratamento foi avaliada a partir do percentual de degradação calculado através da Equação 3.

$$\% \text{ deg} = \left(\frac{C_0 - C_f}{C_0} \right) * 100 \quad (3)$$

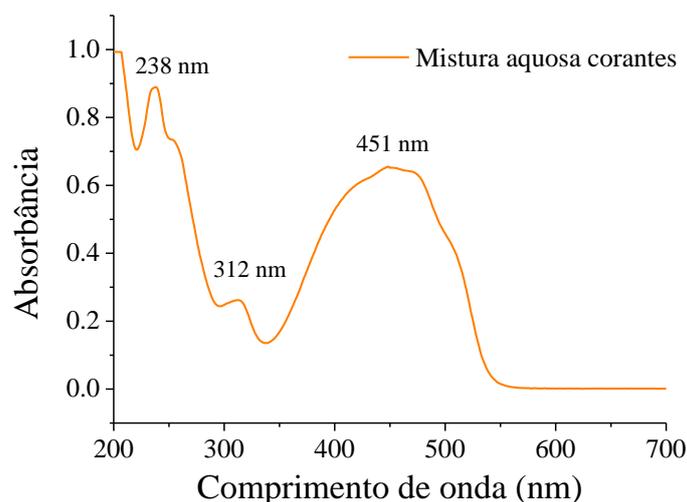
Onde, %deg é o percentual de degradação dos corantes amarelo crepúsculo e amarelo tartariza, C_0 e C_f as concentrações iniciais e finais dos corantes, respectivamente.

Resultados e Discussão

Identificação dos corantes

A identificação dos comprimentos de onda característicos da mistura dos corantes alimentícios, realizada entre 200 e 700 nm, pode ser observada na Figura 1.

Figura 1- Espectro da mistura dos corantes amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina com concentração de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

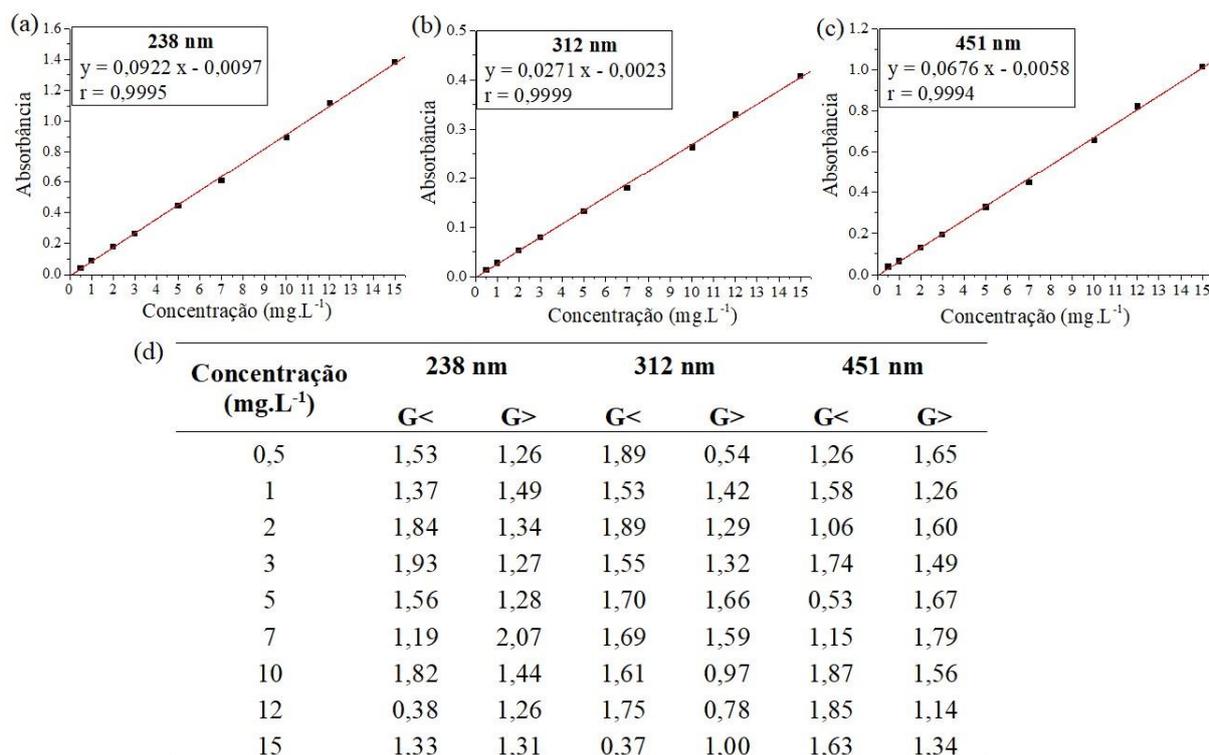


Através da Figura 1, é possível observar que a mistura dos corantes apresentou três picos característicos dos contaminantes. Desta forma, os λ selecionados para construção das nove curvas analíticas e quantificação das amostras antes e após tratamento foram: 238, 312 e 451 nm. O primeiro deles refere-se a presença dos auxocromos, enquanto os dois últimos referem-se aos grupamentos cromóforos dos analitos em estudo.

Validação do método analítico de espectrometria de absorção molecular na região UV/Vis

Inicialmente, foram construídas curvas analíticas para cada um dos λ selecionado para determinação da linearidade do método pelos coeficientes de correlação e teste de Grubbs. Para tal, foram selecionadas nove concentrações diferentes, sendo elas: 0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 10; 12 e 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. As curvas analíticas obtidas para os comprimentos de onda selecionados, assim como os valores de $G_{<}$ e $G_{>}$ estão expostos na Figura 2.

Figura 2 - Curvas analíticas da mistura dos corantes alimentícios amarelo (a) 238 nm, (b) 312 nm e (c) 451 nm e (d) valores de $G_{<}$ e $G_{>}$ para as concentrações das curvas analíticas



Conforme mostrado na Figura 2 (a), (b) e (c), percebe-se que os coeficientes de correlação (r) obtidos para as curvas analíticas, nos três λ selecionados, foram superiores aos valores exigidos pela ANVISA ($> 0,99$), sendo eles 0,9995, 0,9999 e 0,9994 para os λ 238, 312 e 451 nm, respectivamente. Feito isto, o teste de Grubbs (Grubbs e Beck, 1972) foi aplicado para um intervalo de confiança de 95%. Para as replicatas de cada um dos pontos foram obtidos valores de $G_{<}$ e $G_{>}$ inferiores ao valor tabelado, que é igual a 2,11. Este dado em conjunto com o coeficiente de correlação (r), indicam linearidade do método aplicado. Uma vez verificada a linearidade do método, foi realizada a determinação dos limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) os valores obtidos podem ser verificados na Tabela 1.

Tabela 1 – Limites de quantificação e detecção do método analítico

Comprimento de onda (nm)	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)
238	0,0630	0,1909
312	0,0452	0,1368
451	0,0336	0,1017
Fórmula utilizada	(3,3 x σ)/a	(10 x σ)/a

Desta maneira, é possível observar que os valores relacionados às concentrações limites no qual as amostras estudadas podem ser quantificadas (LQ) variaram entre 0,1017 e 0,1909

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e a menor quantidade de analito na qual o método aplicado pode ser detectado (LD) ficou entre de 0,0336 e 0,0630 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Em seguida, a precisão e exatidão do método foram avaliadas. Para tal, foram calculados os coeficientes de variação (CV) para cada concentração estudada e os percentuais de recuperações conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Coeficiente de variação (CV) e resultados obtidos para o teste de exatidão através da recuperação (%)

Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	CV (%)		
	238 nm	312 nm	451 nm
0,5	3,90	2,77	2,11
1	4,15	3,17	2,98
2	2,14	2,37	1,24
3	4,05	4,95	2,57
5	1,13	1,64	1,03
7	1,36	1,06	1,09
10	1,29	1,17	1,18
12	3,00	2,73	3,46
15	2,35	2,48	2,63

Concentração Teórico ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recuperação (%)		
	238 nm	312 nm	451 nm
3	104	103	104
6	104	103	104
10	102	102	102

A partir da Tabela 2, observa-se que todos os coeficientes de variação estão abaixo de 5%, valor estabelecido pelo INMETRO, indicando que a metodologia aplicada é precisa. Em relação a exatidão, parâmetro avaliado pelo método de fortificação, também apresentaram resultados satisfatórios como observado na Tabela 2. Os percentuais de recuperação variaram entre 102 e 104%, indicando a proximidade entre os valores experimentais e os de referência, tendo em vista que estão dentro da faixa estabelecida pelo INMETRO (2020), entre 80 e 110%. Desta forma, conforme os parâmetros obtidos a partir dos testes realizados, pode-se afirmar que a metodologia para identificação e quantificação da mistura dos corantes via espectrometria de absorção molecular na região ultravioleta/visível é adequada e leva a geração de resultados confiáveis.

Quantificação pelo método analítico validado

Nesta etapa, a degradação dos corantes alimentícios em solução aquosa foi estudada através do processo de fotoperoxidação. As leituras das amostras antes e após tratamento podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3 – Leitura das absorbâncias dos corantes alimentícios via espectrometria de absorção molecular na região UV/Vis

Absorbância	Comprimento de onda (nm)		
	238	312	451
Inicial	0,9133	0,26813	0,6591
Final	0,1709	0,0256	0,0008

Através dos valores das absorbâncias observados na Tabela 3, foi possível calcular as concentrações dos corantes em cada comprimento de onda. Para tal, utilizou-se as equações das curvas analíticas previamente encontradas na etapa inicial de validação da metodologia. Desta forma, os percentuais de degradação obtidos (calculados a partir da Equação 3) foram iguais a 82, 91, 99% para os λ 238, 312 e 451 nm, respectivamente. Na literatura é possível encontrar trabalhos que também verificaram a degradação de contaminantes através da espectrometria de absorção molecular na região UV/Vis, podendo destacar Nascimento *et al.* (2020), que estudaram a degradação de corantes alimentícios.

Conclusões

Através dos parâmetros analisados, para validação da metodologia analítica, foi possível concluir que a quantificação dos corantes alimentícios amarelo Crepúsculo e amarelo Tartrazina é segura e viável, uma vez que os indicadores analisados se apresentaram em conformidade com as condições impostas pelos órgãos ANVISA e INMETRO. Além disso, os altos percentuais de degradações dos corantes analisados, sendo eles 82, 91, 99% para os λ 238, 312 e 451 nm, respectivamente, obtidos através processo de fotoperoxidação são confiáveis.

Agradecimentos

À FACEPE pela concessão da bolsa e pela disponibilidade de recursos através do projeto APQ 0947-3.06/22.

Referências

- Belver, C.; Bedia, J.; Peñas-Garzón, M.; Muelas-Ramos, V.; Gómez-Avilés, A.; Rodriguez, J. J. Structured photocatalysts for the removal of emerging 68 contaminants under visible or solar light. **In Visible light active structured photocatalysts for the removal of emerging contaminants.** p. 41-98, 2020.
- Brahim, I.O.; Belmedani, M.; Hadoun, H.; Belgacem, A. The photocatalytic degradation kinetics of food dye in aqueous solution under UV/ZnO system. **Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis**, 133, 1075-1095, 2021.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Resolução RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária – (ANVISA)**. Brasília, DF, 2017.
- INMETRO, I. N. D. M. T. E. Q. Orientação sobre validação de métodos analíticos. **INMETRO**, p.30, 2020.
- Lucena, A. L. A.; Rocha, R. M.; Oliveira, M. A. S.; Almeida, L. C.; Duarte, M. M. M. B.; Napoleão, C. N. Evolution of combined radiation for the treatment of lamivudine and zidovudine via AOP. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, v. 28 p. 179 – 190, 2022.



Minale, M.; Gu, Z.; Guadie, A.; Kabtamu, D. M.; Li, Y.; Wang, X. Application of graphene-based materials for removal of tetracyclines using adsorption and photocatalytic degradation: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 276, p. 111310, 2020.

Nascimento, G. E. D.; Oliveira, M. A. S.; Santana, R. M. R.; Ribeiro, B. G.; Sales, D. C. S.; Rodríguez-Díaz, J. M.; Napoleão, D. C.; Sobrinho, M. A. M.; Duarte, M. M. M. B. Investigation of paracetamol degradation using LED and UV-C photo-reactors. **Water Science and Technology**, v. 81(12), p. 2545-2558, 2020.

Ntrallou, K.; Gika, H.; Tsochatzis, E. Analytical and sample preparation techniques for the determination of food colorants in food matrices. **Foods**, 9(1), 58, 2020.