

# DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA SUSTENTÁVEL PARA QUANTIFICAÇÃO DO CORANTE ARTIFICIAL VERMELHO ALLURA AC EM BALAS ALIMENTÍCIAS

Maria E. B. Coutinho<sup>1</sup>; Bruna R. S. Gomes<sup>1</sup>; Jandyson M. Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, 52171-900

**Palavras-Chave:** Quantificação, Química Analítica Verde, UV-Vis

## Introdução

Os corantes artificiais são frequentemente empregados em alimentos industrializados para conferir cor ao produto final, visando aumentar sua atratividade para os consumidores. Contudo, esses corantes não possuem valor nutricional e podem acarretar riscos de toxicidade para a saúde humana, dependendo da concentração ingerida (Kraemer *et al.*, 2022). Atualmente, os principais corantes artificiais utilizados em alimentos são: Amaranço, Vermelho de Eritrosina, Ponceau 4R, Amarelo Crepúsculo, Amarelo Tartrazina, Azul Brilhante FCF e especialmente o Vermelho allura AC, de fórmula molecular  $C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$ , devido a sua estabilidade à luz, temperatura e acidez. Estes corantes proporcionam colorações diversas, cuja produção é de baixo custo, tornando-os economicamente viáveis para as indústrias alimentícias (Dey; Nagababu., 2022).

Um estudo indicou a possibilidade do corante Vermelho allura AC ocasionar doenças inflamatórias no intestino (Kwon, *et al.*, 2022). Ainda, em pessoas alérgicas a esse corante, os sintomas podem variar, desde coceira em todo o corpo até em casos mais intensos, como choque anafilático, representando riscos mais significativos à saúde (Feketea; Tsbouri., 2017), especialmente para crianças, as quais são as maiores consumidoras de doces em geral, principalmente as balas alimentícias (ENANI., 2019).

Devido a esses potenciais riscos adversos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), atualizou uma regulamentação técnica, definindo o Limite Máximo Permitido (LMP) de  $0,30 \text{ mg mL}^{-1}$  do corante Vermelho allura AC em balas alimentícias, considerando a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de  $7 \text{ mg kg}^{-1}$  conforme a Instrução Normativa 211/2023, nos termos da Resolução de Diretoria Colegiada – RDC N° 778, de 1º de março de 2023 (ANVISA., 2023). Ainda, a lei N° 6.437, de 20 de agosto de 1977, indica entre outras sanções, que as indústrias alimentícias devem seguir as normas de segurança vigentes à legislação sanitária federal, sob risco de infrações sanitárias e/ou multas por meio da reincidência de fraudar, falsificar ou adulterar alimentos/bebidas, fora da regulamentação exigida (Lei N° 6.437/1977).

Desse modo, a literatura científica, traz diversos métodos e técnicas analíticas visando a determinação e quantificação de corantes artificiais em produtos alimentícios, de modo a avaliar o controle de qualidade. As principais técnicas usadas são: Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Espectrofotometria de absorção eletrônica na região do UV-Vis (Lyrio *et al.*, 2023). No entanto, essas técnicas estão associadas a preparo de amostras que não atendem aos critérios da Química Analítica Verde (GAC), tendo em vista principalmente a utilização de solventes tóxicos, como também processos demorados de extração da amostra (Shi *et al.*, 2023).

Como exemplo, temos o método descrito na revista do Instituto Adolfo Lutz que utiliza metanol amoniacal como solvente extrator de amostras, para a quantificação de corantes artificiais em balas alimentícias, em análises por UV-Vis (Instituto Adolfo Lutz., 2008). Nesse método, é necessária uma extração prévia no preparo de amostra, um procedimento demorado, com geração de resíduos tóxicos devido ao uso de metanol, o qual pode causar efeitos adversos

à saúde humana, como intoxicação (Kaewput *et al.*, 2021), além do hidróxido de amônio, que pode causar queimadura severa e dificuldades respiratórias (Moneró; Santos., 2014).

Dessa forma, surge a necessidade de desenvolver metodologias analíticas mais sustentáveis, que sejam caracterizadas pela simplicidade, redução do uso de solventes, menor tempo de análise e minimização na geração de resíduos. Essas metodologias visam atender os princípios da GAC, sendo uma alternativa de substituição de métodos analíticos clássicos, visando a utilização de práticas mais sustentáveis, com o objetivo de contornar a problemática da falta de sustentabilidade (Sajid; Plotka-Wasyłka., 2022).

Sendo assim, se faz necessário a avaliação dos Parâmetros do Índice de Procedimento Analítico Verde (GAPI), que tem como objetivo avaliar qualitativamente os procedimentos analíticos, para promover práticas mais sustentáveis e eficientes, otimizando consumo de energia, custo-benefício, segurança e tempo (Plotka-Wasyłka., 2018). De forma quantitativa, foi utilizado um sistema métrico a partir da ferramenta *Analytical Greenness Calculator* considerando os 12 princípios da GAC, com o uso do *software* gratuito AGREE<sup>®</sup>, indicando o método mais ecológico (Pena-Pereira; Wojnowski; Tobiszewski., 2020).

Nesse contexto, a proposta deste trabalho é a substituição de solventes tóxicos por um solvente mais sustentável, neste caso a água, no procedimento de preparo de amostras de balas alimentícias. Essa troca não apenas reduz o emprego de solventes prejudiciais, como também resulta em uma diminuição de resíduos, custo econômico e tempo de análise.

## Material e Métodos

Os reagentes utilizados para o método de referência apresentavam grau analítico. A solução de metanol amoniacal 5% (v/v) foi preparada mediante a adição de metanol em hidróxido de amônio. As soluções estoques do padrão foram realizadas dissolvendo o corante Vermelho allura AC (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) em ambos os solventes: metanol amoniacal e água ultrapura (resistividade > 18.0 MΩ cm).

Foram adquiridas 10 amostras de balas em um estabelecimento da cidade do Recife (PE, Brasil), e foram nomeadas de A1 até A10. Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Medicamentos, Energias e Soluções Ambientais (LaMTESA) do departamento de Química da UFRPE, em Recife, PE, Brasil.

As curvas analíticas padrão foram definidas no intervalo de  $2 \times 10^{-4}$  a  $2 \times 10^{-2}$  mg mL<sup>-1</sup> em ambos os solventes: metanol amoniacal, conforme definido pelo método de referência do Instituto Adolfo Lutz (Instituto Adolfo Lutz., 2008) e água (método proposto). Posteriormente, as soluções foram analisadas no espectrofotômetro de absorção eletrônica na região do UV-Vis (modelo UV-1280, Shimadzu<sup>®</sup>) no comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) = 504 nm, respectivo do corante.

Os métodos conduzidos nesse estudo foram divididos em três protocolos analíticos: Primeiramente, para a realização do método de referência [I], foi utilizada a solução de metanol amoniacal 5% (v/v) como solvente extrator. Foi preparada uma solução de 0,07 mol L<sup>-1</sup> da amostra. A solução foi, então, centrifugada e posteriormente filtrada em papel de filtro 80 g, sendo em seguida analisada no equipamento, no  $\lambda_{\text{máx}}$  = 504 nm.

Posteriormente, foi realizado uma adaptação desse método [II], de forma a avaliar qual o melhor sistema de filtração. Para isso foram avaliados: papel de filtro qualitativo 80 g, filtro de seringa de 0,45 µm e fibra de vidro de 2,7 µm no solvente metanol amoniacal. Para o método proposto [III], foi preparada uma solução de 0,07 mol L<sup>-1</sup> da amostra em água, sob aquecimento de 45 °C durante 3 min. Em seguida, as soluções foram filtradas, avaliando também os três sistemas de filtrações citados anteriormente. Todas as soluções foram analisadas no equipamento no  $\lambda_{\text{máx}}$  = 504 nm.

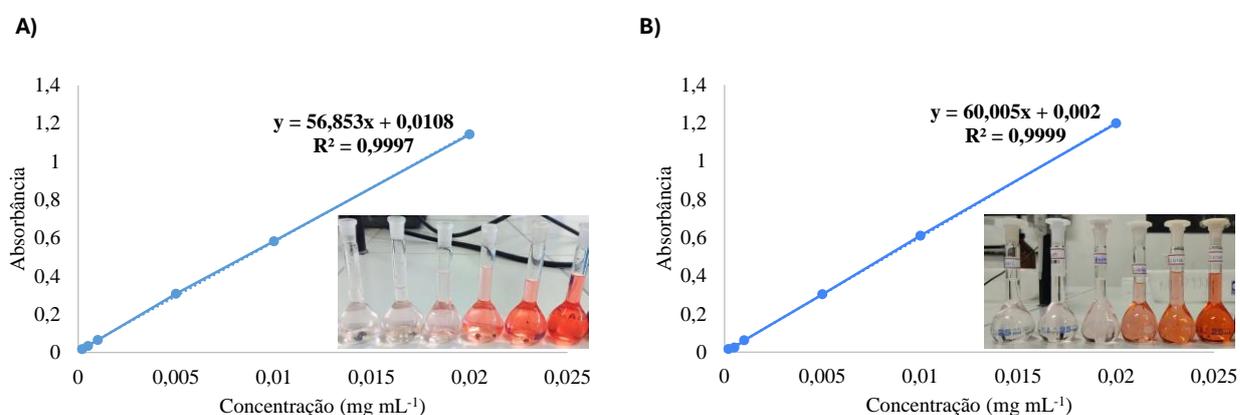
O método proposto foi validado, a partir do cálculo do limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), assim como os testes de recuperação, nos quais as amostras foram fortificadas com alíquotas do padrão analítico do corante Vermelho allura AC para avaliação dos níveis: baixo ( $5 \times 10^{-4}$  mg mL<sup>-1</sup>) e alto ( $1 \times 10^{-2}$  mg mL<sup>-1</sup>). Além disso, foram conduzidas

análises de interferência, adicionando concentrações conhecidas dos corantes: Azul Brillhante FCF e Amarelo Tartrazina. Finalmente, foram avaliados o GAPI indicado pelas cores: verde (método mais sustentável), amarelo (intermediário) e vermelho (menos sustentável), como também o sistema métrico do *software* gratuito AGREE®, indicando o método mais ecológico com pontuações gerais próximos a 1.

## Resultados e Discussão

Foram construídas curvas analíticas, na faixa de  $2 \times 10^{-4}$  a  $2 \times 10^{-2}$  mg mL<sup>-1</sup> em ambos os métodos (referência e proposto). Ao observar as soluções dos seis níveis das curvas analíticas, foi observado um aumento na intensidade da coloração vermelha/rosa com o incremento na concentração do corante Vermelho allura AC. Essa tendência indicou uma relação proporcional entre a concentração e a intensidade de cor.

As absorvâncias referentes as soluções da curva analítica para o método de referência e método proposto foram plotadas (**Figura 1**), gerando uma curva com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) acima de 0,999 para ambas, apresentando linearidade adequada.



**Figura 1.** Curva analítica e gráfico da curva analítica do corante Vermelho allura AC em metanol amoniacal, conforme o método de referência (A) e água, conforme o método proposto (B) no UV-Vis.

Primeiramente, foi realizado o preparo de amostra conforme o método de referência [I], na qual o corante Vermelho allura AC presente na bala, foi extraído utilizando o metanol amoniacal previamente preparado. Para uma extração completa do corante, foi necessário realizar o processo de extração em três etapas, utilizando um volume final de 50 mL desse solvente. Devido ao longo tempo de análise, ao alto volume e à geração de resíduos tóxicos, foi essencial minimizar o impacto ambiental, incluindo o descarte adequado e o uso de capela, a fim de reduzir a emissão de vapores tóxicos no procedimento experimental.

Para a adaptação desse método [II], a utilização do filtro de seringa de 0,45 µm mostrou ser eficaz na filtração do corante na amostra, uma vez que não houve retenção do corante e a solução apresentou maior intensidade de coloração, com maior volume e um tempo de preparação menor, confirmando a eficácia desse método. Em contrapartida, a utilização de papel de filtro de 80 g e fibra de vidro de 2,7 µm, devido à maior exposição ao ar, ocasionou perdas do solvente volátil, o que causou uma redução na concentração do solvente durante os longos processos de extração. Diferentes gramaturas de papel de filtro foram testadas, porém, nenhuma delas proporcionaram uma filtração adequada.

Ao substituir o solvente metanol amoniacal por água [III], na tentativa de tornar o método mais sustentável, foi notado que ao utilizar papel de filtro e fibra de vidro de 2,7 µm, as soluções resultantes ficaram turvas, com perdas do analito retido nas fibras do papel/vidro, o que culminou na falta de repetibilidade das análises. Dessa forma, dentre as filtrações realizadas, o filtro de seringa de 0,45 µm novamente produziu uma solução mais límpida, com

maior intensidade de coloração em segundos no solvente água, sendo mais eficaz para a finalidade em questão.

Por fim, o método proposto apresentou uma solução satisfatória para a quantificação do corante em balas, com resíduos reduzidos, tempo de análise mais rápido e maior eficiência analítica, visando o princípio da GAC. Ao comparar os valores obtidos das concentrações para os métodos testados com os distintos sistemas de filtração, foi observado um melhor resultado no método proposto com uso de filtração com filtro de seringa 0,45 µm em água (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Resultados dos ensaios experimentais de filtração para os métodos (referência do Instituto Adolfo Lutz [I], adaptado [II] e proposto [III]) com base na média de suas concentrações e respectivos desvios-padrão na quantificação de Vermelho allura AC em amostra de bala alimentícia (Nível de confiança = 95%).

Métodos experimentais	Concentração (mg mL <sup>-1</sup> ) ± DP
I - (papel de filtro)	$1,3 \times 10^{-3} \pm 5,0 \times 10^{-4}$
II - (filtro de seringa)	$1,6 \times 10^{-3} \pm 5,0 \times 10^{-4}$
II - (fibra de vidro)	$1,9 \times 10^{-3} \pm 1,1 \times 10^{-2}$
III - (papel de filtro)	-
III - (filtro de seringa)	$3,3 \times 10^{-3} \pm 4,0 \times 10^{-3}$
III - (fibra de vidro)	$1,2 \times 10^{-2} \pm 2,1 \times 10^{-2}$

-: Não foi possível quantificar devido à turbidez da solução.

Com a avaliação do método mais adequado para quantificação do corante Vermelho allura AC, foi possível monitorar os LMP estabelecidos pela ANVISA nas demais amostras de balas alimentícias, usando o método proposto com água. Todas as amostras estavam em conformidade com a legislação vigente, apresentando concentrações inferiores à 0,30 mg mL<sup>-1</sup>, conforme descrito na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Quantificação de dez amostras reais de balas comercializados no Brasil.

Método proposto	Concentração (mg mL <sup>-1</sup> ) ± DP
A1	$3,2 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-3}$
A2	$5,2 \times 10^{-3} \pm 4 \times 10^{-3}$
A3	$1,4 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}$
A4	$8,0 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-3}$
A5	$1,5 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}$
A6	$4,0 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-3}$
A7	$1,3 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-3}$
A8	$7,0 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-3}$
A9	$4,5 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-3}$
A10	$2,5 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-3}$

A validação do método proposto a partir dos ensaios de recuperação apresentou efetividade para a determinação e quantificação do corante Vermelho allura AC, apresentando LOQ de  $2,26 \times 10^{-6}$  mg mL<sup>-1</sup> e LOD de  $7,47 \times 10^{-7}$  mg mL<sup>-1</sup>, conforme a orientação sobre validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-008) do INMETRO, com baixos erros relativos em comparação com o método de referência por UV-Vis (**Tabela 3**). O método apresentou valores de recuperação de 77,33 a 98,35%, de valor mínimo a valor máximo, respectivamente.

**Tabela 3.** Valores de recuperação para níveis: baixo ( $5 \times 10^{-4}$  mg mL<sup>-1</sup>) e alto ( $1 \times 10^{-2}$  mg mL<sup>-1</sup>) pelo método proposto.

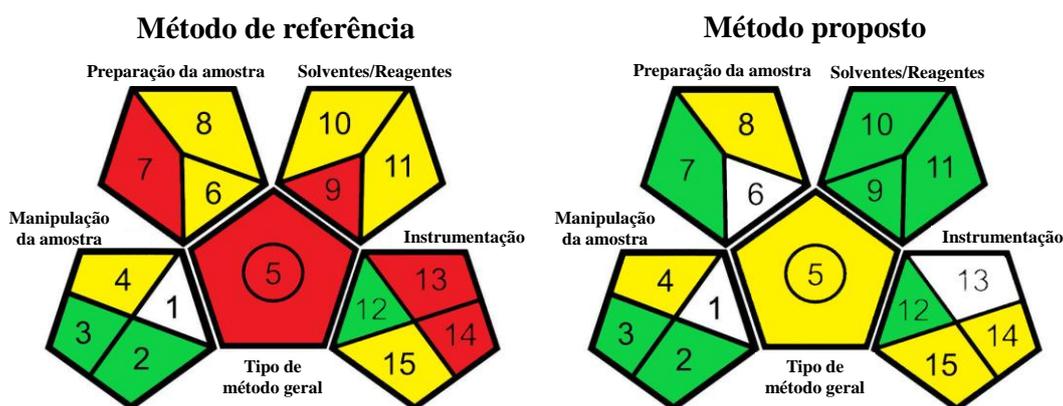
Amostras	Concentração (UV-Vis)	Recuperação (%)
1	$5 \times 10^{-4}$ mg mL <sup>-1</sup>	78,93 ± 1,96
	$1 \times 10^{-2}$ mg mL <sup>-1</sup>	98,35 ± 0,07
2	$5 \times 10^{-4}$ mg mL <sup>-1</sup>	78,51 ± 0,79
	$1 \times 10^{-2}$ mg mL <sup>-1</sup>	98,19 ± 0,26
3	$5 \times 10^{-4}$ mg mL <sup>-1</sup>	77,33 ± 1,53
	$1 \times 10^{-2}$ mg mL <sup>-1</sup>	98,32 ± 0,01

Além disso, a avaliação dos estudos de interferência na presença de misturas de diferentes corantes alimentícios, indicou que a identificação do corante Vermelho allura AC na mistura com a adição de: Azul Brillhante FCF [AB] e Amarelo Tartrazina [AT], em comparação com a amostra sem adição desses padrões, foi efetiva (**Tabela 4**), apresentando erros relativos toleráveis de inferior à 20% (INMETRO., 2006). Dessa forma, foi analisado o comportamento do analito na presença de diferentes componentes da matriz.

**Tabela 4.** Avaliação de testes de interferências pelo método proposto em água.

Amostras	Erro relativo (%)
AB	8,31 ± 1,83
AT	10,15 ± 1,66

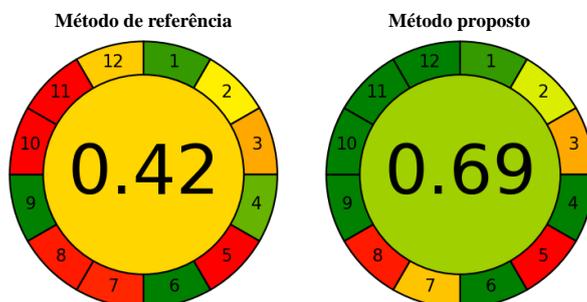
Finalmente, a utilização do GAPI demonstrou que o método proposto possui um grau de sustentabilidade superior em comparação ao método de referência (**Figura 2**). Esse resultado é evidenciado pela redução no tempo de análise, o uso de um solvente sustentável e a ausência de geração de resíduos tóxicos. Esses aspectos contribuem para uma instrumentação mais segura e automatizada. Além disso, o método inovador substitui a tradicional extração com metanol amoniacal, por uma simples diluição em água.



**Figura 2.** Avaliação GAPI dos métodos: referência e proposto para determinação do corante Vermelho allura AC em balas. (Categorias: manipulação da amostra, preparação da amostra, solventes/reagentes, instrumentação e tipo de método geral).

Em complemento a esse estudo, foi utilizado a ferramenta *Analytical Greenness Calculator*, utilizando o *software* gratuito AGREE®, corroborando com a afirmativa de que o método proposto apresentou uma maior compatibilidade com os princípios da GAC, em comparação com o método de referência, apresentando valor próximo a 1 e cores intensas

majoritariamente verdes em seu pictograma, indicando o grau de sustentabilidade adequado das metodologias empregadas neste trabalho científico (**Figura 3**).



**Figura 3.** Avaliação métrica dos métodos: referência e proposto para determinação do corante Vermelho allura AC em balas. (Princípios: 1: Pré tratamento, 2: Quantidade de amostra, 3: Análises, 4: Etapas de preparação da amostra, 5: Automação/Miniaturização, 6: Derivatização, 7: Resíduos, 8: Rendimento, 9: Energia, 10: Reagentes, 11: Toxicidade, 12: Segurança).

## Conclusões

Foi possível desenvolver uma nova metodologia analítica rápida, simples e eficiente, baseada em testes colorimétricos. O método proposto demonstrou ser uma alternativa mais viável, com a eliminação de resíduos tóxicos, menor tempo de análise, com maior segurança operacional, substituindo metodologias que não são sustentáveis. Além disso, foram obtidas maiores concentrações do corante Vermelho allura AC nas amostras de balas analisadas com o método proposto, em comparação com a referência.

Além disso, foi observado que, em ambos os métodos, a intensidade da cor da solução do corante era diretamente proporcional à concentração do analito. Essa relação linear foi crucial para a determinação e quantificação do corante Vermelho allura AC em amostras reais, utilizando curvas analíticas. As amostras apresentaram conformidade com os valores estabelecidos pela ANVISA.

As amostras A1, A2 e A9 apresentaram as maiores concentrações do analito (corante Vermelho allura AC), com valores de  $3,2 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $5,2 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$  e  $4,5 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente. No entanto, todas as amostras analisadas apresentaram conformidade com os LMP estabelecidos pela ANVISA. Os resultados da validação do método demonstraram a efetividade e confiabilidade do método proposto, evidenciando recuperações adequadas e baixos desvios-padrões. (INMETRO., 2006).

Assim, o método sustentável desenvolvido demonstrou um elevado potencial de eficácia para a quantificação do corante Vermelho allura AC em balas comercializadas no Brasil, alinhando-se aos princípios da Química Analítica Verde (GAC). Esses resultados ressaltam a importância dessa nova metodologia como uma alternativa eficaz para o controle de qualidade desse corante artificial em balas alimentícias.

## Agradecimentos

Ao orientador do projeto, prof. Dr. Jandyson Machado Santos, ao Grupo de Pesquisa PEM, em especial a doutoranda Bruna Ramos de Souza Gomes. Agradecimento à FACEPE pela bolsa de fomento.

## Referências

ANVISA. Resolução RDC Nº 778, de 1º de março de 2023. Ministério da Saúde – MS. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** – ANVISA. Acesso em: jan./2024.



Dey, S.; Nagababu, B. H. Applications of food colour and bio-preservatives in the food and its effect on the human health. **Food Chemistry Advances**, v. 1, n. 100019, p. 100019, fev. 2022.

Documento Orientativo da Qualidade – (DOQ-CGCRE-008). Orientação sobre validação de métodos analíticos. Disponível em: <https://www.gov.br/cdtm/pt-br/assuntos/documentos-cgcre-abnt-nbr-iso-iec-17025/doq-cgcre-008/view>. Acesso em set. de 2024.

ENANI. Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil. Federal University of Rio de Janeiro. Prevalence of feeding indicators for children under 5 years of age. **Brazilian National Survey on Child Nutrition** (Enani-2019).

Feketea, G.; Tsaouri, S. Common food colorants and allergic reactions in children: Myth or reality? **Food Chemistry**, v. 230, p. 578–588, set. 2017. Feketea, G.; Tsaouri, S. Common food colorants and allergic reactions in children: Myth or reality? **Food Chemistry**, v. 230, p. 578–588, set. 2017.

INMETRO. Norma brasileira ISO/IEC 17.025. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibrações. 2006. Acesso em set. de 2024.

Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos. 1ed. Online. São Paulo: IAL, 2008.

Kaewput, W. et al. Inpatient Burden and Mortality of Methanol Intoxication in the United States. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 361, n. 1, p. 69–74, 1 jan. 2021.

Kraemer MVS, Fernandes AC, Chaddad MCC, Uggioni PL, Rodrigues VM, Bernardo GL, et al. Aditivos alimentares na infância: uma revisão sobre consumo e consequências à saúde. **Revista Saúde Pública**. 2022;56:32.

Kwon, Y. H. et al. Chronic exposure to synthetic food colorant Allura Red AC promotes susceptibility to experimental colitis via intestinal serotonin in mice. **Nature Communications**, v. 13, no. 1, p. 7617, 20 Dec. 2022.

Lyrío, V. V. M, et al. Comparando a eficiência analítica das técnicas FTIR, UV-VIS, CLAEDAD E ESI(+)MS no estudo de corantes alimentares. **Química Nova**, v. 46, n. 5, p. 435-449, 2023.

Moneró, T. O; Santos, C. E. M. Aspectos Toxicológicos da Exposição ao Hidróxido de Amônio. **Rev. Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 1, p. 62-84, fev. 2014.

Pena-Pereira, F.; Wojnowski, W.; Tobiszewski, M. AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 14, p. 10076–10082, 15 jun. 2020.

Plotka-Wasyłka, J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. **Talanta**, v. 181, p. 204–209, maio 2018.

Sajid, M.; Plotka-Wasyłka, J. Green analytical chemistry metrics: A review. **Talanta**, v. 238, p. 123046, fev. 2022.

Shi, M. et al. Overview of sixteen green analytical chemistry metrics for evaluation of the greenness of analytical methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 166, p. 117211, 1 set. 2023.