

UTILIZAÇÃO DE BROMETO DE CETILTRIMETILAMÔNIO NA EXTRAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS EMPREGADOS EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS

Pierina Sueli Bonato, Roberto Santana da Silva, Tadao Shuhama, Luiz Fernando Lopes Guimarães, José Roberto Jabor
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP - Av. do Café, s/nº - 14.040-903 - Ribeirão Preto - SP

Recebido em 16/3/92; cópia revisada em 23/12/92

The analysis of artificial food dyes requires more or less complex extraction and purification stages, depending on the technique utilized, which usually is thin layer chromatography or high performance liquid chromatography. Cationic detergents such as cetyltrimethylammonium bromide have been used for this purpose because they permit the formation of ion-pairs that may be extracted with an appropriate organic solvent. This study was performed to determine the effects of acidity, organic solvent and detergent concentration during the extraction of artificial food dyes. An increase in extraction rate was observed with increasing concentrations of acetic acid or detergent. The best results were obtained when chloroform and n-butanol were used as solvents.

Keywords: artificial food dyes, ion-pair extraction, cetyltrimethylammonium bromide.

1. INTRODUÇÃO

Substâncias apresentando carga positiva ou negativa podem ser convenientemente extraídas com solventes orgânicos através da formação de pares iônicos com contra-íons¹. Esta técnica tem sido usada com frequência para a extração de corantes artificiais de alimentos industrializados²⁻⁸.

Os corantes artificiais empregados na indústria alimentícia apresentam um ou mais grupos sulfônicos ou carboxílicos que lhes conferem carga negativa (Figura 1). A utilização de contra-íons tais como tri-n-octilamina²⁻⁶, fosfato de tetrabutilamônio⁴, brometo de cetiltrimetilamônio⁷ e cloreto de cetilpiridina⁸ possibilita a formação de pares iônicos, que podem ser extraídos com solventes orgânicos de baixa polaridade. Após extração, os corantes podem ser identificados e/ou quantificados empregando a cromatografia em camada delgada^{3,7} ou a cromatografia líquida de alta eficiência³⁻⁶. Nenhum dos estudos relacionados avalia a eficiência destes detergentes na extração dos oito corantes artificiais de uso permitido pela legislação brasileira na indústria alimentícia⁹.

Neste trabalho foi verificada a influência da acidez, solvente orgânico e da concentração do detergente brometo de cetiltrimetilamônio na extração dos oito corantes artificiais empregados no Brasil.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Todos os reagentes (grau P.A.) foram empregados sem qualquer purificação prévia. Os oito corantes produzidos por SAN EI e HILTON DAVIS (vermelho 40) foram gentilmente cedidos pela importadora Brastokio Ltda. (São Paulo).

As determinações espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Micronal, mod.B 342 II e espectrofotômetro Beckman, mod.DU 70. Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer, mod.1420.

2.1. Fatores que Afetam a Extração dos Corantes na Forma de Pares Iônicos

Para verificar a influência da acidez na extração dos corantes, seis frações de 1 mL de cada corante, na concentra-

ção de 0,5 mg/mL foram extraídas com 2 mL de clorofórmio, após a adição de 50 uL de brometo de cetiltrimetilamônio 0,1 mol/L e 1 mL de ácido acético nas concentrações de 0,1 mol/L a 5,0 mol/L. Após agitação vigorosa durante 1 min e centrifugação a 2000 g durante 5 min, 0,5 mL das fases orgânicas foram transferidos para tubos de ensaio. A seguir, o solvente orgânico foi evaporado sob fluxo de ar, à temperatura ambiente e os resíduos foram reconstituídos em 5 mL de metanol para determinação espectrofotométrica no comprimento de onda de absorção máxima de cada corante (Tabela 1). A porcentagem de extração foi calculada com base em uma solução preparada com 1 mL da solução do corante 0,5 mg/mL, 50 uL de brometo de cetiltrimetilamônio 0,1 mol/L e diluído para 5 mL com metanol.

A influência da concentração do contra-íon foi verificada de maneira similar adicionando 50 uL de brometo de cetiltrimetilamônio nas concentrações de 0,001 mol/L a 0,1 mol/L. Neste caso, 1 mL da solução de cada corante na concentração de 0,5 mg/mL foi acidificada com 1 mL de ácido acético 2,0 mol/L e extraída com 2 mL de clorofórmio.

Outros solventes como éter etílico, n-hexano, n-butanol e acetato de etila também foram avaliados em relação a eficiência na extração. Nestes experimentos, 1 mL da solução de cada corante foi acidificado com 1 mL de ácido acético 2,0 mol/L, adicionado de 50 uL do contra-íon 0,1 mol/L e extraído com 2 mL de cada solvente, de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

2.2. Recuperação após Extração Exaustiva

Nestes experimentos a recuperação foi verificada na faixa de concentração de 0,01 a 1,00 mg/mL. A 1 mL de cada uma das soluções dos corantes foi adicionado 1 mL de ácido acético 2,0 mol/L, 20 uL de brometo de cetiltrimetilamônio 0,1 mol/L e 2 mL de clorofórmio. Após agitação vigorosa durante 1 minuto e centrifugação, a fase orgânica foi transferida para tubo de ensaio e, a fase aquosa foi submetida a nova etapa de extração, com a adição de mais contra-íon e clorofórmio, até apresentar-se incolor. Para a extração de indigotina e eritrosina, os solventes usados foram n-butanol:clorofórmio (1:3, v/v) e n-butanol:clorofórmio (1:1, v/v), respectivamente. As fases orgânicas obtidas em todas as etapas de extração foram

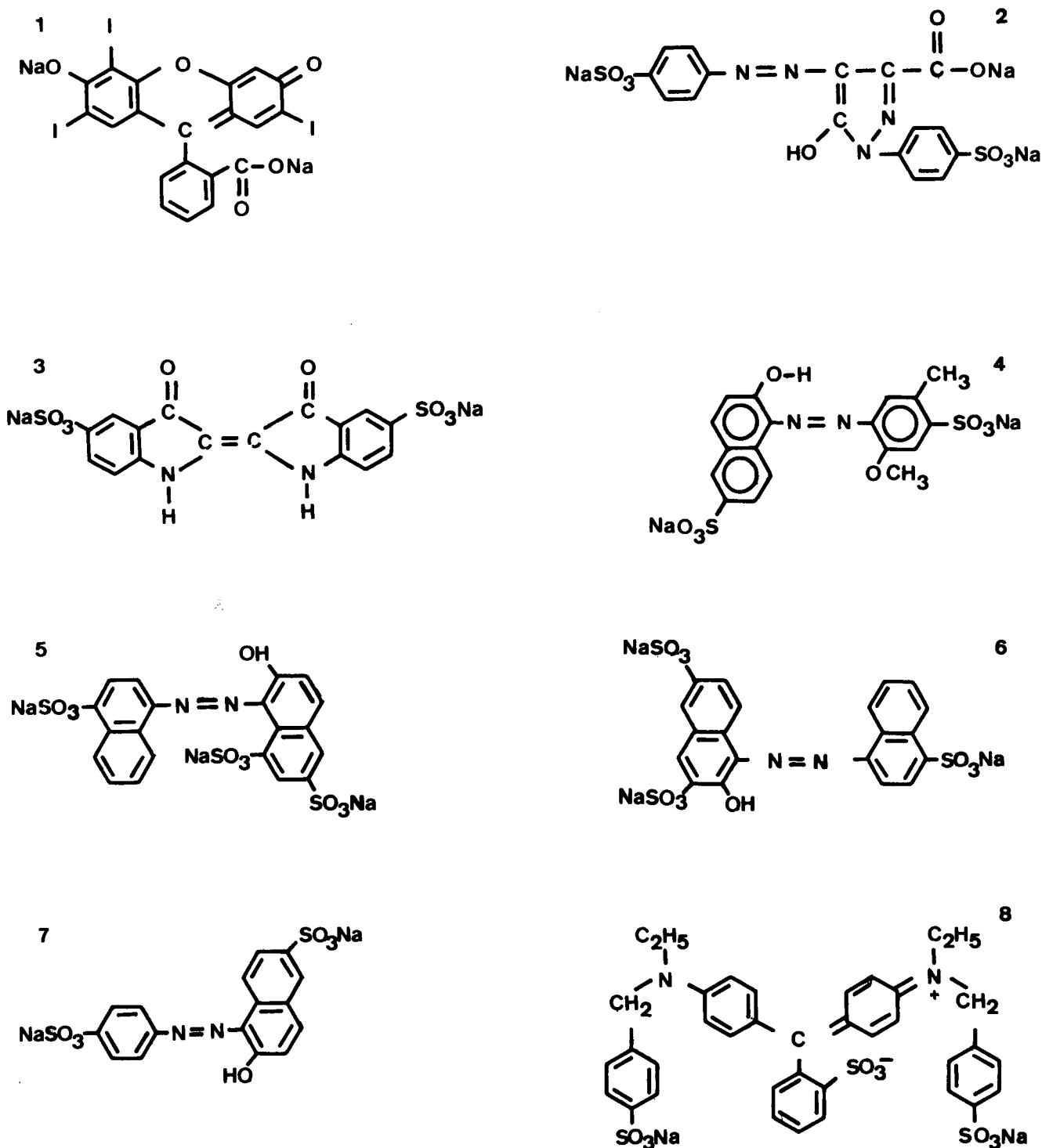


Figura 1. Estrutura dos oito corantes artificiais de uso permitido no Brasil: 1- eritrosina (CI 45430), 2- tartrazina (CI 19140), 3- indigotina (CI 73015), 4- vermelho 40 (CI 16035), 5- ponceau 4R (CI 16255), 6- amaranto (CI 16185), 7- amarelo crepúsculo FCF (CI 15985), 8- azul brilhante FCF (CI 42090).

reunidas, evaporadas à secura sob fluxo de ar, à temperatura ambiente e reconstituídas em 5 mL de metanol para leitura no comprimento de onda de absorção máxima de cada corante.

As concentrações desses extratos foram calculadas com base em curvas de calibração obtidas pela adição de igual volume do contra-íon usado na extração a 1 mL das soluções dos corantes nas concentrações de 0,01 a 1,00 mg/mL, e quantidade suficiente de metanol para 5 mL.

3. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO

A formação de pares iônicos entre corantes carregados negativamente e brometo de cetiltrimetilamônio foi evidenciada através da espectroscopia no infravermelho em pastilha de KBr. A Figura 2 mostra o espectro de absorção da tartrazina (a), do brometo de cetiltrimetilamônio (b) e do par iônico (c),

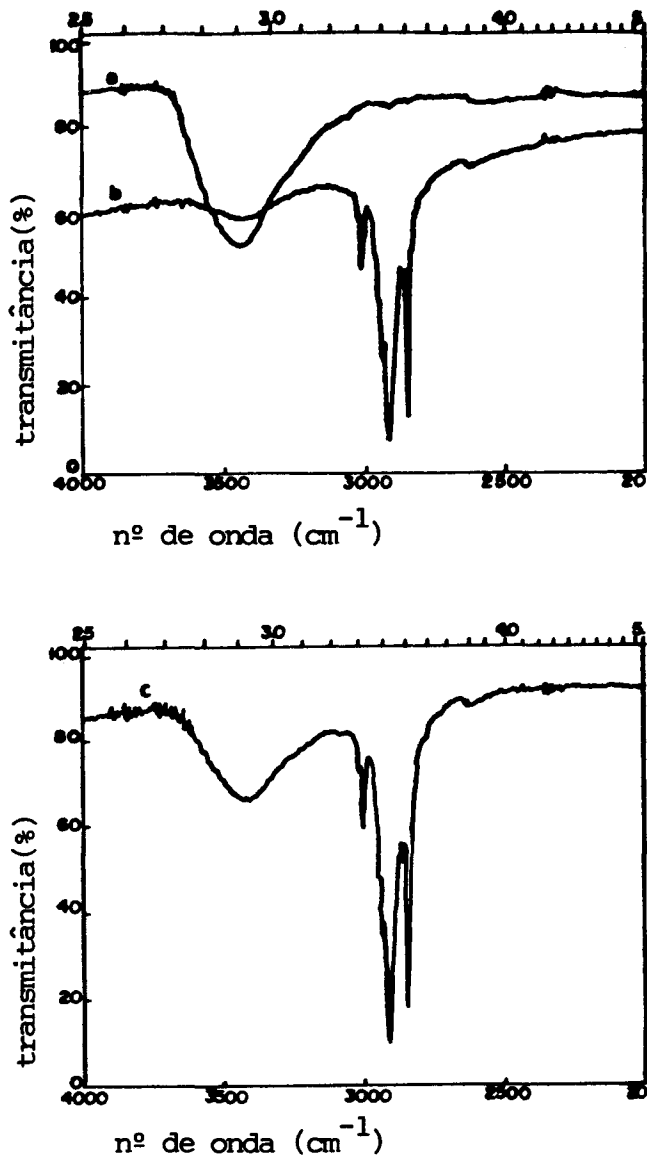


Figura 2. Espectro de absorção no infravermelho (pastilha de KBr) do corante tartrazina (a), brometo de cetiltrimetilamônio (b) e par iônico obtido após extração (c).

obtido após extração com clorofórmio. A análise se fixou na região de 2900 cm^{-1} relativa a absorção proveniente da deformação axial do C-H da cadeia saturada do contra íon brometo de cetiltrimetilamônio¹⁰. No espectro observa-se bandas de alta intensidade em 2850 e 2920 cm^{-1} e de média intensidade em 3020 cm^{-1} . O corante, conforme pode ser visto na Figura 1a, não apresenta bandas nesta região.

3.1. Fatores que Afetam a Extração dos Corantes na Forma de Pares Iônicos

A Figura 3 mostra a influência da concentração do ácido acético na extração dos oito corantes. Os valores especificados no eixo das abcissas desta figura representam a concentração de ácido acético após diluição com 1 mL das soluções dos corantes. A recuperação é baixa em concentrações reduzidas de ácido acético, aumentando gradativamente até 100% com ácido acético 1,0 mol/L para amaranço, vermelho 40 e amarelo crepúsculo FCF. As recuperações de tartrazina,

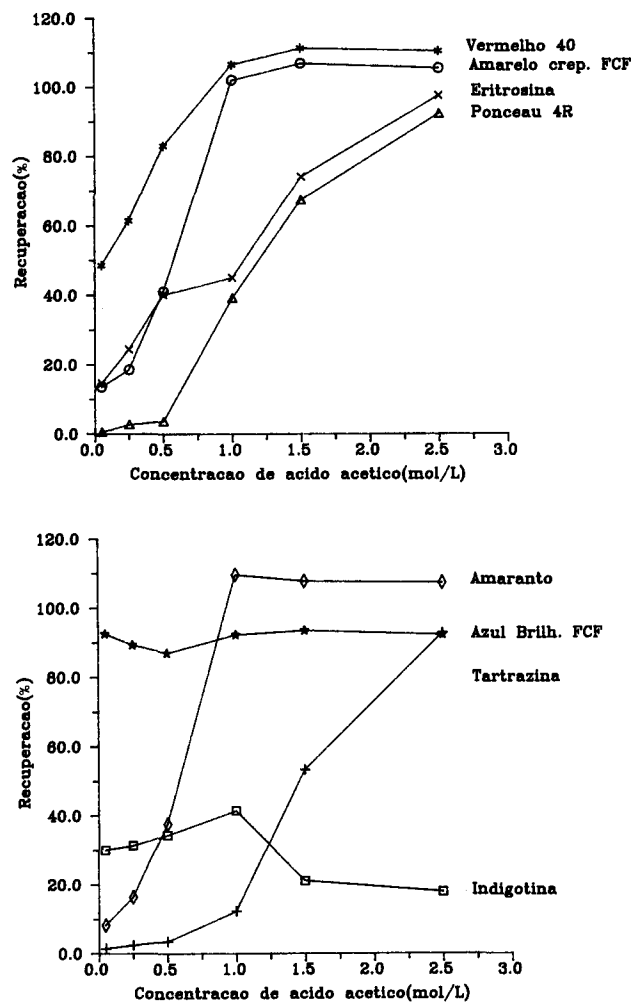


Figura 3. Influência da concentração de ácido acético na extração dos corantes.

ponceau 4R e eritrosina continuam aumentando até aproximadamente 90% com o incremento da concentração de ácido acético. A extração do azul brilhante aparentemente não é afetada pela concentração do ácido, enquanto que concentrações de ácido acético superiores a 1,0 mol/L provocam uma pequena redução na recuperação da indigotina.

A protonação dos grupos SO_3 ou carboxílicos presentes nos corantes, que pode ser avaliada pelo deslocamento do λ_{max} das bandas de transferência de carga¹¹, poderia afetar a formação do par iônico e desta forma influenciar a sua extração com o solvente orgânico. Para avaliar tal suposição foram obtidos espectros de absorção na região do visível (320-700 nm) dos oito corantes em H_2O e em ácido acético na faixa de concentração de 0,05 a 2,5 mol/L. Com exceção da eritrosina, onde a adição do ácido acético resultou em diminuição na intensidade da cor e deslocamento do λ_{max} para maiores comprimentos de onda, nenhuma outra alteração significativa foi observada, evidenciando portanto, que a protonação dos corantes não explica o comportamento observado.

Estudos com a tartrazina mostraram que outros ácidos, como por exemplo, ácido clorídrico, ácido nítrico ou ácido sulfúrico, nas concentrações de 0,05 mol/L a 1,0 mol/L resultaram em baixa extração, que não pode ser explicada como sendo devido a protonação visto que o espectro de absorção no visível deste corante em HCl 1,0 mol/L não difere daquele

obtido em água. Provavelmente, os ânions desses ácidos devem estar competindo com o corante pelo sítio carregado do contra-íon. Quando o ácido acético foi substituído por acetato de sódio nas concentrações de 0,05 mol/L a 2,5 mol/L a porcentagem de recuperação também foi extremamente baixa; o acetato de sódio sofre hidrólise deixando o meio básico, consequentemente a hidroxila compete com o corante pelo sítio de ligação do contra-íon. Além disso, o próprio acetato pode estar competindo com o corante pelo sítio carregado do detergente. Por outro lado, quando a concentração de acetato foi mantida constante em 1,0 mol/L e o pH foi modificado na faixa de 3,0 a 6,0, observou-se maiores recuperações para menores valores de pH.

Observando a Figura 1 verifica-se que a maioria dos corantes possui um grupo fenólico. Com o aumento da acidez este grupo encontra-se na forma não dissociada que favorece a solubilidade do par iônico no solvente orgânico. A extração do corante azul brilhante FCF e indigotina, que não possuem este grupo não é afetada pela acidez. A menor extração da indigotina em concentrações de ácido acético acima de 1,0 mol/L pode estar relacionada com a decomposição deste corante em meio ácido¹².

Para a maioria dos corantes a recuperação aumentou com o incremento de brometo de cetiltrimetilamônio até 12,5 a 25,0 x 10⁻⁴ mol/L (Figura 4). Estas concentrações, obtidas pela

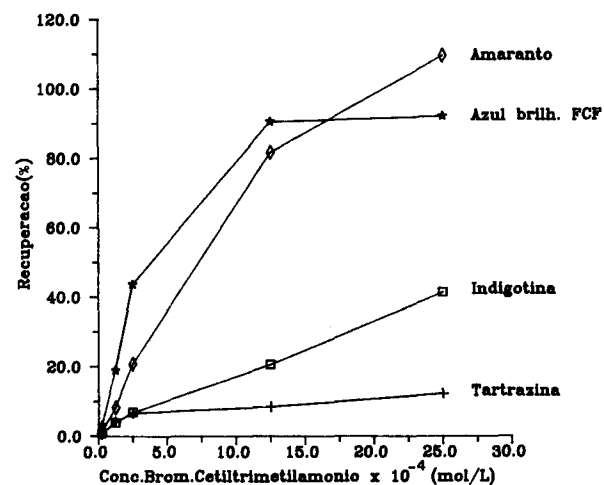
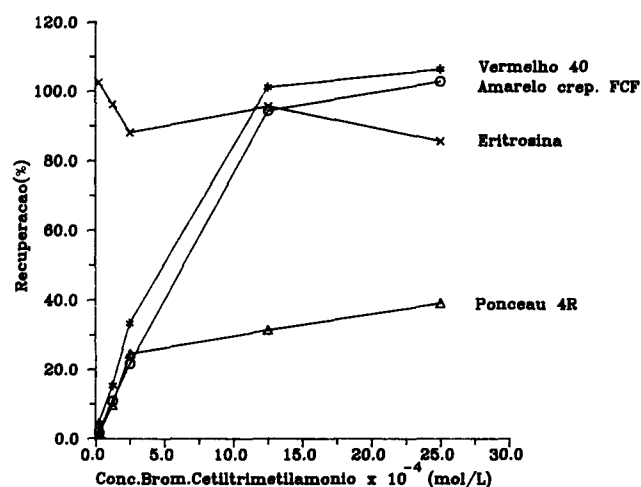


Figura 4. Influência da concentração de brometo de cetiltrimetilamônio na extração dos corantes.

diluição de 50 uL das soluções do contra-íon em 2 mL da solução do corante acidificada, estão acima da concentração micelar crítica deste detergente em água, que é de $9,2 \times 10^{-4}$ mol/L¹. Portanto, os corantes podem estar sendo extraídos na forma de pares iônicos ou em micelas. Vale lembrar que concentrações altas do contra-íon favorecem a formação de emulsões que prejudicam o processo de extração. As menores recuperações foram obtidas com ponceau 4R, tartrazina e indigotina. A baixa recuperação para os dois primeiros corantes pode ser função da concentração de ácido acético, uma vez que recuperações próximas a 100% somente foram obtidas com ácido acético 2,5 mol/L. No caso da indigotina a baixa solubilidade do par iônico formado em clorofórmio também explica a baixa recuperação obtida.

Entre os solventes orgânicos estudados, o clorofórmio e n-butanol apresentaram resultados satisfatórios (Tabela 1), provavelmente devido à maior solubilidade do par iônico formado.

Tabela 1. Eficiência de vários solventes orgânicos na extração de par iônico corante-brometo de cetiltrimetilamônio.

Corante	λ max (nm)	Recuperação (%)		
		clorofórmio	acetato de etila	n-butanol
Amaranto	520	109,5	56,6	81,4
Amarelo crepúsculo FCF	480	102,9	79,6	82,8
Azul brilhante FCF	626	92,2	54,2	83,4
Eritrosina	530	37,6	43,8	56,4
Indigotina	598	41,4	1,2	108,2
Ponceau 4R	510	38,1	25,2	73,2
Tartrazina	426	13,1	36,1	60,9
Vermelho 40	506	106,4	93,2	86,6

λ max: comprimento de onda de absorção máxima dos corantes em metanol.

Apesar do n-butanol ter sido o solvente de extração mais eficiente para todos os corantes, verificou-se que o mesmo extrai uma grande quantidade de água, que além de tornar o processo de evaporação mais prolongado, possibilita a dissolução de grande quantidade de açúcar e outros compostos solúveis quando o método é empregado na preparação de amostras de produtos alimentícios. Outros solventes como éter etílico e hexano também foram avaliados devido a sua volatilidade, que minimiza o tempo de secagem após extração. No entanto, os resultados não foram satisfatórios, pois estes solventes não são capazes de solubilizar o par iônico formado com brometo de cetiltrimetilamônio, com exceção daquele formado com a eritrosina, facilmente extraído com éter etílico.

Dos oito corantes estudados, o vermelho 40, amaranato, amarelo crepúsculo FCF e ponceau 4R possuem estruturas similares (Figura 1), sendo que os três primeiros apresentam comportamento muito próximo em todos os experimentos realizados. Por outro lado, o ponceau 4R apresenta um comportamento diverso, principalmente no que se refere a eficiência de extração dos vários solventes estudados. Observando a Figura 1 nota-se que um dos grupos SO_3^- está em uma posição tal, que o acesso do detergente é dificultado pelo impedimento estérico. A polaridade da molécula resultante explica o fato da sua maior solubilidade em n-butanol.

A indigotina e a tartrazina são bastante polares devido à maior possibilidade de formação de pontes de hidrogênio com a água, o que explica a maior solubilidade do par iônico em n-butanol.

O azul brilhante forma um par iônico bastante solúvel

em solventes orgânicos. Vale ressaltar que este corante, mesmo na forma livre apresenta solubilidade parcial em clorofórmio.

A recuperação da eritrosina é similar para todos os solventes estudados e deve estar relacionada principalmente com a acidez do meio devido à facilidade de protonação do grupo carboxílico presente na molécula.

3.2. Recuperação Após Extração Exaustiva

Como os resultados anteriores mostraram que os corantes apresentaram comportamentos diversos frente às condições em que a extração foi efetuada, optou-se pelo desenvolvimento de um método baseado na extração exaustiva, visando à aplicação do método na extração quantitativa dos corantes de produtos alimentícios.

A Tabela 2 mostra que o método resultou na extração de todos os corantes com recuperações próximas a 100%, independente da concentração do corante na faixa estudada (0,01 a 1,00 mg/mL), que inclui as concentrações normalmente encontradas nos alimentos.

Tabela 2. Recuperação após extração exaustiva.

Corante	Recuperação (%)	CV (%) n=3
Amaranto	95,0	3,1
Amarelo crepúsculo FCF	93,7	3,8
Azul brilhante FCF	92,4	6,8
Eritrosina	91,6	8,4
Indigotina	95,2	6,0
Ponceau 4R	95,6	2,9
Tartrazina	97,6	1,8
Vermelho 40	95,8	9,4

CV = coeficiente de variação
n = número de determinações

4. CONCLUSÃO

A extração de corantes artificiais através da formação de pares iônicos com brometo de cetiltrimetilamônio aumenta à medida que as concentrações de ácido acético e detergente são aumentadas. Os melhores resultados foram obtidos quando as extrações foram efetuadas com clorofórmio ou n-butanol. O método baseado na extração exaustiva apresentou-se bastante adequado para ser empregado na extração desses corantes de produtos alimentícios.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, ao Prof. Zeki Naal e à Profa. Dra. Diones Aparecida Dias pelas sugestões.

REFERÊNCIAS

1. Tadros, Th. F.; "Surfactants", Academic Press, Londres, (1984).
2. Puttemans, M. L.; Dryon, L.; Massart, D. L.; *Anal. Chim. Acta.* (1980) **113**, 307.
3. Puttemans, M. L.; Dryon, L.; Massart, D. L.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* (1982) **65**, 730.
4. Puttemans, M. L.; Dryon, L.; Massart, D. L.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* (1982) **65**, 737.
5. Puttemans, M. L.; Dryon, L.; Massart, D. L.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* (1983) **66**, 1039.
6. Puttemans, M. L.; Dryon, L.; Massart, D. L.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* (1984) **67**, 880.
7. Van Petechen, C.; Bijl, J.; *J. Chromatogr.* (1981) **210**, 113.
8. Lehmann, G.; Binkle, B.; Scheller, A.; *Z. Anal. Chem.* (1986) **323**, 355.
9. ABIA.; "Compêndio da Legislação de Alimentos", vol. I, Atos do Ministério da Saúde, São Paulo, 1989.
10. Silverstein, R. M.; Brassler, G. C.; Morrill, T. C.; "Identificação espectrométrica de compostos orgânicos", 3ª ed., Editora Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1979, pp.75.
11. Ireland, J. F.; Wyatt, P. A. H.; *Adv. Phys. Org. Chem.* (1976) **12**, 131.
12. Boley, N. P.; Bunton, N. G.; Crosby, N. T.; Johnson, A. E.; Roper, P.; Somers, L.; *Analyst.* (1980) **105**, 589.

Publicação financiada pela FAPESP