



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Waleska de Araújo Siqueira Bento

**Técnicas de separação e preparo de  
amostras aplicadas para análise de  
iogurtes e proteínas**

Recife

2016

Waleska de Araújo Siqueira Bento

**Técnicas de separação e preparo de amostras aplicadas para análise de iogurtes e proteínas**

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em química como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Pernambuco

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Paula Silveira Paim

Recife

2016

**WALESKA DE ARAÚJO SIQUEIRA BENTO**  
**"TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO E PREPARO DE AMOSTRAS APLICADAS PARA**  
**ANÁLISE DE ALIMENTOS E PROTEÍNAS"**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em: 11.03.2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula Silveira Paim (Orientadora)**

Departamento de Química Fundamental  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira**

Departamento de Química  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Fernanda de Araújo Honorato**

Departamento de Engenharia Química  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Sueny Kêlia Barbosa Freitas**

Unidade Acadêmica de Serra Talhada  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr. Ricardo Oliveira da Silva**

Departamento de Química Fundamental  
Universidade Federal de Pernambuco

# Agradecimentos

Agradeço a Deus em primeiro lugar por me ajudar, auxiliar e guiar em todos os momentos da minha vida e é a quem devo tudo que sou hoje.

Em segundo lugar gostaria de agradecer a minha família, em especial o meu esposo Walter e meus pais Maria José e Emilson, que me apoiaram desde o início da minha carreira científica.

Agradeço a minha orientadora Ana Paula Paim, por me orientar durante todos esses anos. Assim como também agradeço a professora Karen Waldron por me orientar durante o meu estágio sanduíche na Universidade de Montreal-Canadá.

Gostaria de agradecer ao professor Benício de Barros Neto (*in memoriam*) por ter me ensinado tudo o que sei sobre quimiometria.

Agradeço também ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), na pessoa do Bruno Parente Lima, por ter nos dado a oportunidade de desenvolver o primeiro capítulo deste trabalho. Assim como agradeço ao Centro Regional de Espectrometria da Universidade de Montreal pelas análises realizadas necessárias para a realização do segundo capítulo deste trabalho.

Agradeço aos funcionários da secretaria da pós-graduação em química, Patrícia e Maurílio por todo o apoio.

Agradeço a Capes pela concessão da bolsa de doutorado e pela bolsa de doutorado sanduíche.

E por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer aos membros da banca avaliadora, por aceitar participar e fazer parte desta etapa da minha vida.

õSer amigo não é coisa de um dia, são atos, palavras e atitudes que se solidificam no tempo e não se apagam jamais. Que ficam para sempre como tudo que é feito com o coração aberto.õ

*Autor Desconhecido*

# RESUMO

O desenvolvimento de métodos de preparo de amostras é de suma importância para a análise química. Ao longo dos anos, cada vez mais os cientistas buscam técnicas para aprimorar metodologias e ferramentas matemáticas para a validação dos métodos desenvolvidos. No presente trabalho foram desenvolvidos dois diferentes métodos de preparo de amostras: um para a análise de corantes artificiais em iogurtes e posterior análise por HPLC-PAD e outro método utilizando a técnica de CE-UV/Vis para separar e fracionar amostras padrões de misturas de proteínas, seguido de um método para digestão destas e análise por LC-ESI-MS para posterior mapeamento dos peptídeos. O primeiro trabalho foi realizado para determinar a concentração de corantes artificiais em iogurtes e bebidas lácteas que são alimentos produzidos a partir da fermentação do leite sendo um alimento importante e indispensável a dieta de adultos e crianças. Para tanto foi desenvolvido um método de extração e determinação de corantes artificiais em iogurtes e bebidas lácteas por HPLC-PAD. O método foi devidamente validado e as amostras comerciais analisadas estavam de acordo com a legislação. Já o segundo trabalho visa o estudo da proteômica através do mapeamento de peptídeos. A eletroforese capilar (CE) por ser uma técnica de separação muito eficiente para a análise de proteínas e peptídeos foi utilizada na etapa inicial de preparo da amostra. A separação inicial foi seguida do fracionamento da amostra que é uma etapa muito importante e que a CE pode proporcionar, minimizando a complexidade da amostra. Posteriormente foi desenvolvido um método para a digestão das proteínas contidas em cada fração e o mapeamento dos peptídeos foi realizado com auxílio do LC-ESI-MS. Os resultados obtidos são animadores, visto que foi possível digerir as proteínas com quimotripsina em até duas horas. O que é um tempo curto se comparado a trabalhos da literatura que necessitaram de 12 a 24 horas para digestão de proteínas quando utilizadas enzimas livres em solução.

*Palavras chave: HPLC-PAD. Corantes artificiais. Iogurtes. Preparo de amostras. CE-UV. Proteômica. LC-ESI-MS.*

# ABSTRACT

The development of sample preparation methods is of paramount importance for analytical chemistry. Over the years, more and more scientists are seeking techniques to improve methodologies and mathematical tools for the validation of the methods they have developed. In this study two different methods of sample preparation were developed: one for analysis of artificial colorants in yogurts and subsequent analysis by HPLC-PAD; and another method using the CE-UV/Vis technique to separate and fractionate standard samples of protein mixtures, followed by a digestion method for these and analysis by LC-ESI-MS for subsequent peptides mapping. The first study was conducted to determine the concentration of artificial colorant in yoghurts and milk drinks, foods produced from the fermentation of milk that are an important and indispensable part of the food diet for adults and children. To this end, a method was developed for the extraction and determination of artificial colorant in HPLC-PAD yoghurts and milk drinks. The method was validated and commercial samples were analyzed according to the legislation. The second work is aimed at the study of proteomics by peptide mapping. Capillary electrophoresis (CE) as an effective separation technique was used in the initial stage of sample preparation for the analysis of proteins and peptides. The initial separation was followed by fractionation of the sample which is a very important step enabled by CE, thus minimizing sample complexity. Then, a method was developed to digest the proteins contained in each fraction and the mapping of the peptides was carried out with the aid of LC-ESI-MS. The results obtained are encouraging, since the study showed that it was possible to digest proteins with free chymotrypsin within two hours. This is a short time compared to that found in the published papers requiring 12 to 24 hours for protein digestion when free enzymes in solution are used.

*Keywords: HPLC-PAD. Artificial colors. Yogurts. Sample preparation. CE-UV. Proteomics. LC-ESI-MS.*

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.1:** Fluxograma básico do processo de produção de iogurte e bebidas lácteas.

**Figura 1.2:** Estruturas químicas dos corantes artificiais permitidos no Brasil e seus códigos de identificação. Continua...

**Figura 1.2:** Estruturas químicas dos corantes artificiais permitidos no Brasil utilizados neste trabalho e seus códigos de identificação.

**Figura 1.3:** Representação da separação de uma mistura de compostos por eluição em uma coluna cromatográfica e o registro do sinal, gerando o cromatograma.

**Figura 1.4:** Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de fotodiodos.

**Figura 1.5:** Gradiente de eluição dos solventes em HPLC para o 1º teste. A: tampão fosfato pH 6,0 e B: metanol.

**Figura 1.6:** Gradiente de eluição dos solventes em HPLC para o 2º teste. A: acetato de amônio 30 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,5 e B: metanol.

**Figura 1.7:** Gradiente de eluição dos solventes em HPLC para o 4º teste. A: acetato de amônio 129 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e B: metanol:acetonitrila (80:20).

**Figura 1.8:** Gradiente de eluição dos solventes em HPLC para o 5º teste. A: acetato de amônio 129 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e B: metanol: acetonitrila (80:20).

**Figura 1.9:** Esquema do procedimento realizado para o preparo da amostra de iogurte/bebida láctea para posterior análise por cromatografia líquida.

**Figura 1.10:** Em a) Cromatograma obtido com o gradiente de eluição do 1º TESTE e em b) ampliação da região de co-eluição

**Figura 1.11:** Em a) Cromatograma obtido com o gradiente de eluição do 2º TESTE e em b) ampliação da região de co-eluição

**Figura 1.12:** Em a) Cromatograma obtido com o gradiente de eluição do 3º TESTE e em b) ampliação da região de co-eluição

**Figura 1.13:** Em a) Cromatograma obtido com o gradiente de eluição do 4° TESTE e em b) ampliação da região de co-eluição

**Figura 1.14:** Cromatograma obtido a partir do gradiente de eluição do 5° TESTE e uma ampliação da região de 20 ó 23,5 min.

**Figura 1.15:** Em a) Precipitado da amostra que apresentava apenas corante artificial e em b) Precipitado da amostra que apresentava corante natural.

**Figura 1.16:** Curva analítica referente ao corante E102

**Figura 1.17:** Curva analítica referente ao corante E110

**Figura 1.18:** Curva analítica referente ao corante E122

**Figura 1.19:** Curva analítica referente ao corante E123

**Figura 1.20:** Curva analítica referente ao corante E124

**Figura 1.21:** Curva analítica referente ao corante E127

**Figura 1.22:** Curva analítica referente ao corante E129

**Figura 1.23:** Curva analítica referente ao corante E132

**Figura 1.24:** Curva analítica referente ao corante E133

**Figura 1.25:** Curva analítica referente ao corante E143

**Figura 2.1:** Estrutura (a) geral e (b) Zwitteriônica dos -amoniácidos. A forma Zwitteriônica ocorre em pH fisiológico.

**Figura 2.2:** Estruturas básicas das proteínas em: a) pH abaixo do pI, b) pH igual a c) pH acima do valor do pI.

**Figura 2.3:** Estruturas das proteínas (a) primária, (b) secundária, (c) terciária e (d) quaternária. (Voet & Voet, 2013)

**Figura 2.4:** Efeito do pH no fluxo eletrosmótico. Adaptado de (Schwartz & Pritchett, [s.d.]-a)

**Figura 2.5:** Composição dos vetores da velocidade eletroosmótica ( $v_{eo}$ ) e da velocidade eletroforética ( $v_{ef}$ ). a) Soma vetorial da velocidade total do cátion, b) soma vetorial da velocidade total do ânion e c) velocidade do nêutron.

**Figura 2.6:** Perfil do FEO e do fluxo laminar em um capilar e suas consequências na distribuição do sinal. (Spudeit et al., 2012)

**Figura 2.7:** Representação esquemática básica de um equipamento de eletroforese capilar. (Spudeit et al., 2012)

**Figura 2.8:** Eletroferograma do aminoácido H-Trp-OMe-H  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  sob as condições do método 2b. Em (a) é apresentado o espectro UV a 220 nm do aminoácido analisado.

**Figura 2.9:** Diferença no tempo de migração da mioglobina  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  quando se utilizou um eletrólito ácido (a) e um básico (b) para análise de proteínas por CE-UV.

**Figura 2.10:** Eletroferograma gerado a partir da análise da mistura das cinco proteínas. Sendo na sequência: mioglobina 3,42 min., -caseína 3,80 min., dois sinais referentes a - lactoglobulina A e B 4,43 min. e 4,54 min. e a hemoglobina 4,75 min.

**Figura 2.11:** Espectros de UV da proteína (a) BSA e (b) Mioglobina.

**Figura 2.12:** Eletroferograma obtido usando (a) solução tampão fosfato  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 11,3 e (b) solução tampão borato  $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 10,2.

**Figura 2.13:** Superposição dos gráficos referentes ao eletroferograma (a) e a corrente elétrica (b) da coleta das frações da mistura padrão simulada.

**Figura 2.14:** Eletroferograma da mistura de quimiotripsina e mioglobina nas condições do método 2b utilizando solução tampão fosfato,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 2,5.

**Figura 2.15:** Eletroferograma resultante da digestão por quimiotripsina livre da mioglobina desnaturada (1:10, E:S) durante (a) 15 min., (b) 30 min., (c) 60 min. Sob as condições do método 2b utilizando solução tampão fosfato,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 2,5 e um tempo total de análise de 20 minutos.

**Figura 2.16:** Espectros de massa obtidos por LC-ESI-MS dos peptídeos resultantes da digestão das proteínas contidas nas frações (a) F2, (b) F3, (c) F4. O (d) branco é referente a quimiotripsina.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.1:** Corantes artificiais sintéticos, alimentos em que são utilizados e seus efeitos adversos. Adaptado de Veloso e colaboradores.<sup>21</sup>

**Tabela 1.2:** Valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) e os limites máximos dos corantes artificiais permitidos no Brasil.

**Tabela 1.3:** Descrição das amostras analisadas quanto ao tipo de corante utilizado segundo o fabricante.

**Tabela 1.4:** Planejamento fatorial  $2^2$  tendo como variáveis a proporção de RK/RZn e os tipos de solventes.

**Tabela 1.5:** Comprimento de onda, absorvidade, percentual de pureza calculado e concentração real de cada solução estoque.

**Tabela 1.6:** Valores da resolução dos picos adjacentes calculados a partir da largura a meia altura.

**Tabela 1.7:** Ordem de eluição e o tempo de retenção de cada corante analisado.

**Tabela 1.8:** Resultados obtidos pela realização do planejamento fatorial  $2^2$  para a etapa de extração dos corantes no preparo das amostras.

**Tabela 1.9:** Valores da média das concentrações, desvios-padrão de 2 e 10 mg L<sup>-1</sup> e os valores de F e t calculado.

**Tabela 1.10:** Valores dos coeficientes de determinação e das equações lineares da curva analítica A (3, 5, 10, 25 e 50 mg L<sup>-1</sup>), para cada corante analisado.

**Tabela 1.11:** Valores dos coeficientes de determinação e das equações lineares da curva analítica B (0,5; 1; 3; 10 e 25 mg L<sup>-1</sup>) e valores referentes aos testes de falta de ajuste e de significância para cada corante analisado.

**Tabela 1.12:** Valores das concentrações médias, dos desvios-padrão de repetitividade ( $s_r$ ) e dos Coeficientes de Variação (CV) para cada nível de concentração dos corantes analisados.

**Tabela 1.13:** Valores dos LD e LQ dos corantes artificiais analisados.

**Tabela 1.14:** Valores do percentual médio de recuperação por nível de concentração de cada corante artificial analisado.

**Tabela 1.15:** Resultados obtidos para a extração de corantes em iogurtes e bebidas lácteas e os desvios-padrão de cada extração.

**Tabela 1.16:** Valores das absorbâncias e da percentagem de pureza de cada solução de referência dos corantes medidos em três meses consecutivos.

**Tabela 1.17:** Corantes artificiais identificados e quantificados nas amostras reais de iogurtes e bebidas lácteas.

**Tabela 1.18:** Dados da ANOVA do método desenvolvido para cada corante analisado.

**Tabela 2.1:** Tipos de detectores usados em CE e seus limites de detecção.

**Tabela 2.2:** Parâmetros de condicionamento do capilar para o desenvolvimento do método de separação das proteínas e dos peptídeos por CE-UV.

**Tabela 2.3:** Programação do método de coleta de frações em CE.

**Tabela 2.4:** Gradiente de eluição das proteínas analisadas por LC-TOF/MS.

**Tabela 2.5:** Soluções utilizadas para a dessalinização da amostra, segundo protocolo da Zip Tip<sup>®</sup> para resina C18.

**Tabela 2.6:** Tempos de migração das proteínas analisadas pelo método 2a utilizando as soluções tampões fosfato, borato e Tris, nas condições apresentadas.

**Tabela 2.7:** Valores do tempo de migração, do desvio padrão de repetitividade e do coeficiente de variação para expressar a precisão do método de separação das proteínas.

**Tabela 2.8:** Relação massa/carga das proteínas analisadas por LC-ESI-MS.

**Tabela 2.9:** Proteínas coletadas na frações por CE-UV/VIS e analisadas por LC-ESI-MS.

# SIGLAS E ABREVIATURAS

ABRE	Associação Brasileira de Embalagens
ANOVA	Análise da Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	Albumina de soro bovino
C18	Octadecilsilano
CE	Eletroforese Capilar
CE-LIF	Eletroforese capilar acoplada ao detector de fluorescência induzida por laser
CE-MS	Eletroforese capilar acoplada ao espectrômetro de massas
CGE	Electroforese capilar em gel
CI	Ionização química
CIEF	Eletroforese capilar com focagem isoelétrica
CITP	Isotacoforese capilar
CL	Cromatografia Líquida
CMD	Concentração Média Determinada
CT	-quimotripsina
CV	Coefficiente de Variação
CZE	Eletroforese capilar em zona (Capillary Zone Electrophoresis)
CZE-ESI-MS	Eletroforese capilar em zona com ionização por eletrospray e detecção por espectrometria de massas
CZE-UV	Eletroforese capilar acoplada ao detector de absorção ultravioleta
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPR	Desvio Padrão Relativo
EI	Ionização por impacto de elétrons
ELL	Extração Líquido-Líquido
ESI	Ionização por <i>eletrospray</i>
FE	Fase Estacionária

FEO	Fluxo eletroosmótico
FM	Fase Móvel
GL	Grau de Liberdade
Glu 6	Ácido glutâmico
Hemo	Hemoglobina humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IDA	Valores de Ingestão Diária Aceitável
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas
LC-TOF/MS	Cromatografia líquida com ionização por tempo de voo acoplada ao espectrômetro de massas
LD	Limite de Detecção
LGB	-lactoglobulina A e B
LPA	Poliacrilamida
LQ	Limite de Quantificação
MALDI	Ionização/dessorção da matriz assistida por laser
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MECC	Cromatografia capilar eletrocinética micelar
Mio	Mioglobina
MQ	Média Quadrática
MS	Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
m/z	Relação massa/carga
PAD	Detector com arranjo de fotodiodos, do inglês, <i>Photodiode Array Detector</i>
Phe	Fenilalanina
PLS	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais, do inglês, <i>Partial Least Squares</i>
PTFE	Politetrafluoretileno

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RK	Ferrocianeto de Potássio tri-hidratado.
RNA	Ácido ribonucleico
RZn	Sulfato de Zinco hepta-hidratado
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida acoplado ao gel de dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida
SELDI-MS	Espectrometria de massas com ionização/dessorção a laser em superfície ionizada
SPE	Extração em Fase Sólida, do inglês, <i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	Micro Extração em Fase sólida, do inglês, <i>Solid Phase Micro Extraction</i>
SQ	Soma Quadrática
Tampão Tris	Trizma base (tris [hidroximetil] amino-metano)
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UV-VIS	Ultravioleta ó Visível
Val	Valina
1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões

## Organização da tese

- Esta tese é organizada em dois capítulos principais e um anexo:

- Capítulo 1: Este capítulo consta o trabalho desenvolvido em colaboração com o Ministério da Agricultura, cujo título é: *Determinação simultânea de corantes sintéticos em iogurte por HPLC-PAD*.
- Capítulo 2: Neste capítulo é apresentado um trabalho que foi desenvolvido em colaboração com o laboratório de eletroforese capilar da Universidade de Montreal no Canadá, sob supervisão da professora Dra. Karen Waldron, no período de Maio/2014 a Abril/2015. E tem como título: *Eletroforese capilar como método de preparação de amostras para caracterização de proteínas em aplicações proteômicas*.
- Anexo: Cópia do trabalho publicado sobre o capítulo I desta tese, que foi inserido como material auxiliar.

# SUMÁRIO

Capítulo I.....	25
1- INTRODUÇÃO.....	26
1.1 . Fundamentação Teórica.....	28
1.1.1. Iogurte, bebida láctea e seus corantes.....	28
1.1.2- Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica na região do UV/VIS.....	35
1.1.2.1- Mecanismos de separação em HPLC.....	35
1.1.2.2- Fases móveis utilizadas em HPLC.....	37
1.1.2.3- Detector espectrofotométrico na região do UV/VIS.....	40
1.1.3- Preparo de amostras.....	42
1.1.4 - Planejamento fatorial.....	43
1.1.5 . Validação de método em cromatografia líquida.....	44
1.1.5.1- Seletividade.....	44
1.1.5.2- Linearidade.....	46
1.1.5.3- Precisão.....	47
1.1.5.4- Limite de detecção.....	48
1.1.5.5- Limite de quantificação.....	49
1.1.5.6- Adição e recuperação do analito.....	49
1.1.5.7- Estabilidade do analito na solução de referência.....	49
1.1.5.8- Percentual de extração.....	50

1.2- Revisão bibliográfica .....	50
1.2.1- Técnicas de análise de corantes alimentícios artificiais.....	50
1.3- Objetivos.....	56
1.3.1. Objetivos Gerais.....	56
1.3.2. Objetivos Específicos.....	56
2- EXPERIMENTAL.....	57
2.1- Reagentes, materiais e amostras.....	57
2.2- Equipamentos.....	59
2.3- Determinação da pureza dos corantes.....	60
2.4- Condições cromatográficas.....	60
2.5- Preparo das amostras.....	63
2.6- Validação do método.....	67
2.6.1- Seletividade.....	67
2.6.2- Linearidade.....	67
2.6.3- Precisão.....	68
2.6.4- Limite de detecção.....	68
2.6.5- Limite de quantificação.....	68
2.6.6- Adição de analito e recuperação.....	68
2.6.7- Percentual de extração.....	69
2.6.8- Estabilidade dos analitos nas soluções de referência.....	69
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
3.1- Determinação da pureza dos corantes.....	70
3.2- Condições cromatográficas.....	71

3.3- Preparo das amostras.....	76
3.4- Validação do método.....	79
3.4.1- Seletividade.....	79
3.4.2- Linearidade.....	80
3.4.3- Precisão.....	82
3.4.4- Limite de Detecção e de Quantificação.....	83
3.4.5- Adição e recuperação do analito.....	84
3.4.6- Percentual de extração.....	85
3.4.7- Estabilidade dos analitos nas soluções de referência.....	86
3.4.8- Análise das amostras reais.....	87
4- CONCLUSÕES.....	91
5- PERSPECTIVAS.....	92
6- APÊNDICE.....	93
7- Referências .....	101
Capítulo II.....	108
1- INTRODUÇÃO.....	109
1.1-Fundamentação Teórica.....	110
1.1.1. Proteínas, proteômica e mapeamento de peptídeos.....	110
1.1.1.1. Proteínas.....	110
1.1.1.2. Proteômica.....	113

1.1.1.3. Mapeamento de peptídeos.....	116
1.1.2. Princípios básicos da técnica de eletroforese capilar.....	117
1.1.2.1- Instrumentação geral.....	121
1.1.2.2- Modos de detecção.....	124
1.2. Revisão bibliográfica.....	127
1.3. Objetivos.....	131
1.3.1. Objetivos Gerais.....	131
1.3.2. Objetivos Específicos.....	131
2- EXPERIMENTAL.....	132
2.1- Materiais e Reagentes.....	132
2.2- Equipamentos.....	132
2.3- Soluções.....	133
2.4- Separação de proteínas e peptídeos por CE.....	133
2.4.1- Condicionamento do capilar.....	133
2.4.1.1- Capilar novo.....	133
2.4.1.2- Capilar usado (condicionamento diário).....	134
2.4.2- Avaliação do método de separação dos analitos.....	134

2.5- Método de coleta de frações em CE.....	136
2.6- Análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.....	137
2.6.1- Separação por cromatografia líquida.....	137
2.6.2- Análise por LC-ESI-MS de proteínas e peptídeos.....	138
2.7- Digestão das proteínas.....	138
2.7.1- Desnaturação das proteínas induzida por aquecimento.....	138
2.7.2- Digestão das proteínas em solução por quimiotripsina livre.....	139
2.7.3- Dessalinização e extração dos peptídeos usando resina C18.....	139
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	141
3.1. Separação de proteínas e peptídeos por CE.....	141
3.1.1. Condicionamento do capilar.....	141
3.1.2. Avaliação do método de separação dos analitos.....	141
3.2. Coleta das frações por CE-UV/Vis.....	149
3.3. Repetitividade.....	150
3.4. Desnaturação e digestão das proteínas.....	151
3.5. Análise por MS, identificação das proteínas e dos peptídeos na mistura e nas frações .....	153
4. CONCLUSÃO.....	156

5- PERSPECTIVAS.....	157
6- Referências .....	158
ANEXO 1	162

# Capítulo I

## *Determinação simultânea de corantes sintéticos em iogurte por HPLC-PAD*

- 1- Introdução, fundamentação teórica,  
revisão bibliográfica &  
objetivos*

## 1- INTRODUÇÃO

Na atualidade, é crescente a procura por alimentos de alta qualidade, tendo em vista o interesse da população pela boa forma e melhor qualidade de vida e para isso é fundamental que se consuma alimentos saudáveis e o mais natural possível.

O consumo de iogurtes cresceu de 90 para 90,4 % entre os lares brasileiros, o que corresponde a um aumento de 1,1 milhão de novos lares que passaram a comprar e consumir os iogurtes e bebidas lácteas em geral. Segundo dados da Associação Brasileira de Embalagens (ABRE), o mercado de alimentos refrigerados como iogurtes, *petit suisse*, leites fermentados e sobremesas vêm crescendo continuamente nos últimos anos <sup>1</sup>.

Esta crescente produção das indústrias de laticínios aliada ao desenvolvimento tecnológico, leva a uma incessante procura por tecnologias que prolonguem a validade e a aparência dos alimentos. E isso faz com que as indústrias usem diversos aditivos químicos na a preparação destes alimentos. Dentre esses aditivos estão os corantes, que tem a função única de conferir ou intensificar a cor dos alimentos. O uso de corantes em alimentos, sejam eles artificiais ou naturais, é permitido pela legislação brasileira, mas seu uso é controlado e limitado para cada tipo de alimento <sup>2,3</sup>.

Os corantes alimentícios artificiais têm vantagens frente aos naturais, pois são mais estáveis, menos sensíveis a mudanças de temperatura, de luminosidade e até a variações moderadas de pH. Por serem sintéticos, possuem estrutura química conhecida, são menos propícios à contaminação microbiológica e apresentam baixo custo de produção <sup>4,5</sup>. Entretanto, os corantes artificiais são compostos orgânicos que possuem em sua estrutura química duplas ligações conjugadas, anéis benzênicos simples ou conjugados e compostos nitrogenados que são responsáveis por causarem vários males à saúde, entre eles o câncer <sup>5</sup>. Sendo assim, a determinação destes aditivos nos alimentos em especial nos iogurtes e bebidas lácteas é essencial.

As técnicas mais utilizadas para a determinação de corantes artificiais em alimentos são a cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid*

*Chromatography* - HPLC) <sup>6,7</sup>, a espectrofotometria de absorção molecular na região do Ultravioleta ó Visível (UV-VIS) <sup>8,9</sup> e a eletroforese capilar (CE) <sup>10,11</sup>.

No Brasil, os métodos de determinação de corantes artificiais apresentados pelo Instituto Adolfo Lutz expressam que estes devem ser determinados qualitativamente por cromatografia em papel e quantitativamente por espectrofotometria UV/VIS <sup>12</sup>. Porém, esta técnica quantitativa é limitada à determinação de apenas um ou dois corantes simultaneamente. Apresentando uma desvantagem frente à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência que pode determinar vários corantes em uma única análise para uma mesma amostra.

O uso da cromatografia líquida para determinar corantes artificiais requer um prévio preparo das amostras, pois estas não devem ser inseridas diretamente no cromatógrafo, pois podem obstruir a coluna cromatográfica e danificar o equipamento, visto que são amostras complexas, ricas em proteínas, lipídios e outros constituintes.

Na literatura existem trabalhos que usam a cromatografia líquida para determinar corantes artificiais em sucos, geleias, refrigerantes, guloseimas entre outros tipos de amostras que necessitam de um preparo de amostra relativamente simples, bastando apenas dissolver em água e filtrar <sup>7,13</sup>. Entretanto, não foi encontrado trabalho que envolvesse a determinação de corantes artificiais em iogurtes e bebidas lácteas por cromatografia líquida. Acredita-se que um dos motivos seja a dificuldade do preparo das amostras.

Os métodos de preparo de amostras para a extração de corantes artificiais recomendados pelo Instituto Adolfo Lutz <sup>12</sup> e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) <sup>2</sup> são bastante laboriosos e pouco eficientes, o que impulsiona a busca por novos métodos de extração eficientes, rápidos e de baixo custo.

Sendo assim, no presente trabalho foi desenvolvida uma metodologia analítica para a determinação de corantes artificiais em iogurtes e bebidas lácteas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos. Para tanto, desenvolveu-se um método de extração dos corantes para posterior análise cromatográfica. O método foi devidamente validado e foram analisadas amostras reais para confirmar a eficiência do método.

## 1.2 Ë Fundamentação Teórica

### 1.1.1 Ë Iogurte, bebida láctea e seus corantes.

O iogurte é definido como um produto obtido a partir da fermentação do leite pela ação dos cultivos protossimbióticos de *Streptococcus salivarius spp thermophilus* e *Lactobacillus delbruckii spp bulgaricus*. Durante a fermentação do leite também podem ser adicionados outros tipos de bactérias ácido-lácticas que, dependendo do tipo utilizado, influenciará nas características do alimento na etapa final do seu processo de produção. O iogurte pode conter no máximo 30 % (m/m) de ingredientes não lácteos <sup>14,15,16</sup>.

Os iogurtes e as bebidas lácteas são alimentos muito consumidos, atualmente, pela população. As crianças, geralmente, são os maiores consumidores, pois se trata de um alimento de fácil ingestão e que serve como complementação ao consumo diário de leite e seus derivados. Eles também são consumidos por pessoas que buscam a perda de massa corpórea, incluindo este alimento na sua rotina diária, pois estes são ricos em proteínas e carboidratos, entre outros componentes que complementam a alimentação, servindo como uma alternativa para um lanche saudável e nutritivo. Esses alimentos também podem ser utilizados para regularizar o funcionamento da flora intestinal, pois as bactérias lácteas ajudam a combater as bactérias causadoras de desconfortos intestinais <sup>16</sup>.

A bebida láctea segundo a legislação brasileira possui no mínimo 51 % de leite (m/m), soro de leite ou derivados de leite reconstituído ou não, fermentado ou não, podendo ter aditivos ou cultivo de micro-organismos <sup>17</sup>.

O processo de produção de iogurtes e bebidas lácteas envolve diversas etapas como mostrada na Figura 1.1.



**Figura 1.1:** Fluxograma básico do processo de produção de iogurte e bebidas lácteas. <sup>18,19</sup>

Na etapa 1 do processo ocorre a mistura, filtração e a separação do leite com gordura para a produção do iogurte cremoso ou líquido. O leite sem gordura será utilizado para a fabricação do iogurte *light*. Até então só faz sentido falar da produção de iogurte já que a bebida láctea é preparada geralmente a partir de leite modificado acrescido de soro ou puramente do soro do leite.

O leite com gordura é transferido para um homogeneizador para ocorrer a quebra das partículas de gordura, inferindo ao produto uma consistência mais cremosa.

No processo de pasteurização ocorre a eliminação das bactérias indesejáveis ao produto, as quais degradam a matéria-prima.

A etapa da fermentação é extremamente importante, pois nela ocorre a transformação da lactose em ácido lático que é um agente coagulante. Para a produção de iogurte, a fermentação ocorre obrigatoriamente por ação de leveduras e bactérias ácido-láticas específicas como citado anteriormente. Já a fermentação da bebida láctea pode ser conduzida por fermentos lácteos sem nenhuma restrição <sup>14</sup>.

Na sexta etapa é efetuada a quebra da coalhada oriunda da fermentação. Esse processo ocorre com agitação lenta e constante, seguida do resfriamento do produto.

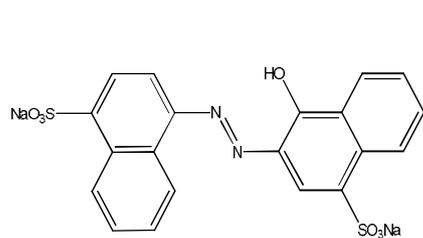
A sétima etapa consiste na adição dos ingredientes permitidos a cada produto seja ele iogurte ou bebida láctea, podendo ser adicionado polpa de frutas, aditivos e/ou vitaminas e minerais. Em seguida, o produto é homogeneizado, envasado e armazenado para distribuição.

Os aditivos alimentares são ingredientes que são adicionados aos alimentos, com o intuito de modificar as propriedades físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante o processo de fabricação dos alimentos. São considerados aditivos alimentares os aromatizantes, estabilizantes, edulcorantes (adoçantes), geleificantes, umectantes, acidulantes, corantes, entre outros <sup>20</sup>.

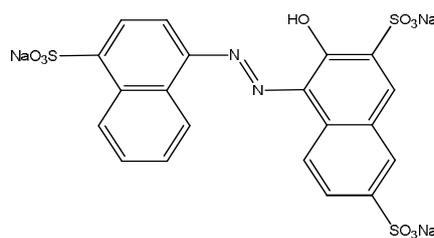
O uso de aditivos alimentares é prática comum e é permitido no Brasil assim como em todo o mundo. Dentre os aditivos alimentares estão os corantes, que por definição são responsáveis por realçar ou atribuir cor aos alimentos <sup>21</sup>. O fato da utilização dos corantes alimentícios ser permitida não significa dizer que não seja controlada. No Brasil, o órgão fiscalizador é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que com suas resoluções (RDC 387/03 <sup>2</sup>, RDC 386/99 <sup>3</sup>) estabelece quais corantes são permitidos e qual o limite máximo que os fabricantes podem adicionar aos alimentos.

Os corantes alimentícios são classificados como: corantes naturais, corante caramelo e corantes artificiais. Sendo este último o objeto de estudo deste trabalho.

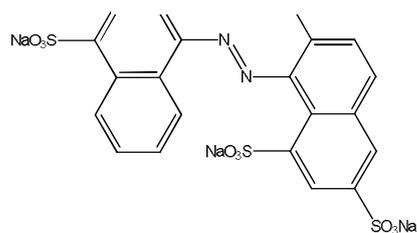
Os corantes artificiais são, por definição, substâncias produzidas sinteticamente e que possuem composição e estrutura químicas definidas <sup>21</sup>. Os mesmos ainda podem ser definidos como corantes azo ou corantes não azo. Os corantes permitidos no Brasil da classe azo (e seus respectivos códigos de identificação) são: Tartrazina (E102), Amarelo Crepúsculo (E110), Azorrubina (E122), Amaranto (E123), Ponceau 4R (E124) e o Vermelho 40 (E129). Já os permitidos que pertencem à classe não azo (e seus respectivos códigos de identificação) são: Eritrosina (E127), Azul Patente V (E131), Indigotina (E132), Azul Brilhante (E133) e o Verde Rápido (E143). As estruturas químicas dos corantes permitidos no Brasil que foram avaliados no presente trabalho estão mostradas na Figura 1.2, a seguir:



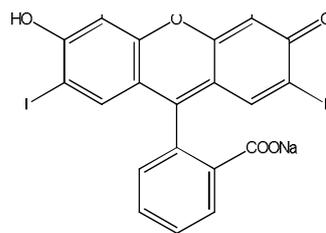
Azorrubina, E122



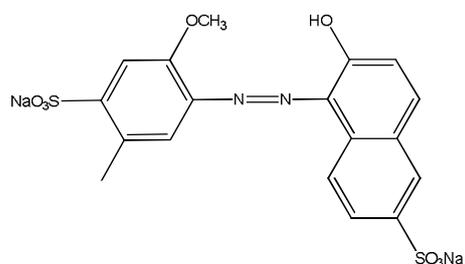
Amaranto, E123



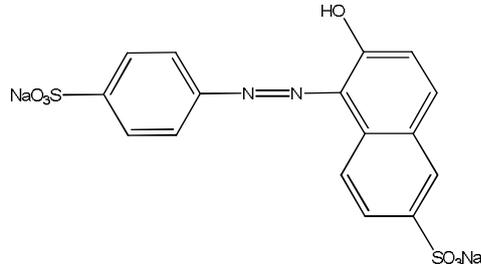
Ponceau 4R, E124



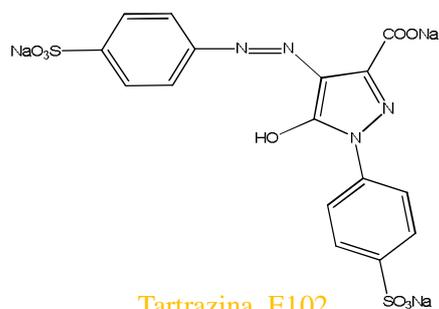
Eritrosina, E127



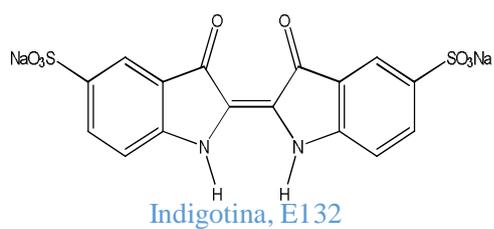
Vermelho 40, E129



Amarelo crepúsculo, E110

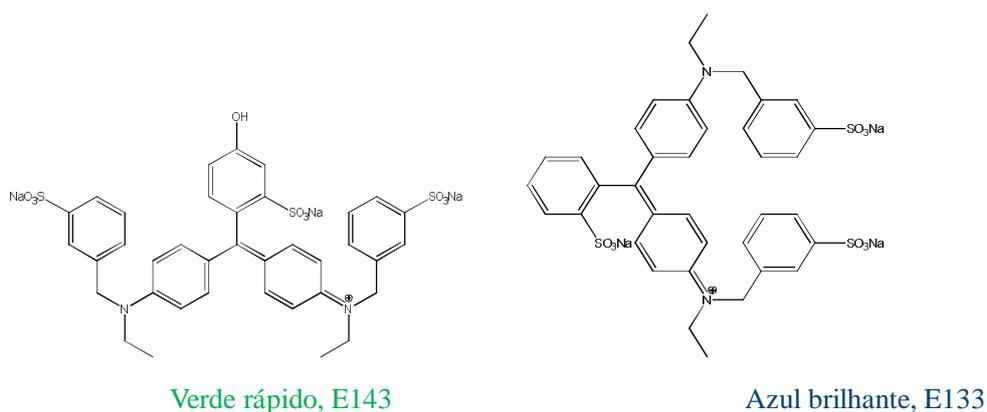


Tartrazina, E102



Indigotina, E132

**Figura 1.2:** Estruturas químicas dos corantes artificiais permitidos no Brasil e seus códigos de identificação. Continua...



**Figura 1.2:** Estruturas químicas dos corantes artificiais permitidos no Brasil utilizados neste trabalho e seus códigos de identificação.

A utilização de corantes artificiais em alimentos traz algumas vantagens, pois são substâncias estáveis ao calor, luz e moderada variação de pH, assim como são isentos de contaminação microbiológica além de apresentarem baixo custo de produção se comparado aos corantes naturais, o que é uma vantagem para as indústrias <sup>22</sup>. Essas características fazem com que os fabricantes prefiram utilizar o corante artificial ao natural, pois assim o produto poderá ter uma maior estabilidade da cor durante o seu prazo de validade. Entretanto, os corantes artificiais citados anteriormente são compostos orgânicos que possuem em sua estrutura química duplas ligações conjugadas, anéis benzênicos simples ou conjugados e compostos nitrogenados que são responsáveis por causarem vários danos à saúde, entre eles o câncer <sup>5</sup>. Por isso, muitos fabricantes estão substituindo os corantes artificiais pelos naturais, os quais não proporcionam danos evidentes à saúde do consumidor <sup>23</sup>.

Na Tabela 1.1 estão listados os possíveis riscos à saúde do consumidor de alimentos contendo pelo menos um desses corantes.

**Tabela 1.1:** Corantes artificiais sintéticos, alimentos em que são utilizados e seus efeitos adversos. Adaptado de Veloso e colaboradores <sup>21</sup>.

Corantes	Tipo de alimento	Efeitos adversos
Amarelo crepúsculo	Cereais, balas, laticínios e goma de mascar.	Pode causar alergia (urticária), angioedema e problemas gástricos.
Azul brilhante	Balas, cereais, queijos, gelatina e laticínios e refrescos.	Pode causar hiperatividade em crianças, asma e eczema.
Amaranto	Cereais, balas, laticínios, geleias e recheios.	Deve ser evitado seu consumo por pessoas sensíveis à aspirina.
Eritrosina	Laticínios, refrescos e pós para gelatinas.	Por conter iodo pode causar hipertireoidismo.
Indigotina	Goma de mascar, iogurtes, balas e refresco.	Pode causar hipertensão, náuseas e problemas respiratórios.
Ponceau 4R	Laticínios, balas, cereais, refrescos, refrigerantes e sobremesas.	Pode causar anemia e doenças renais, assim como também deve ser evitado por pessoas sensíveis à aspirina e asmáticos.
Tartrazina	Laticínios, cereais, frutas em conserva e iogurtes.	Pode causar afecções da flora intestinal e insônia em crianças. Deve ser evitado por pessoas sensíveis à aspirina e asmáticos
Vermelho 40	Cereais, laticínios, geleias, recheios, refresco e refrigerantes.	Pode causar hiperatividade em crianças, problemas respiratórios e eczema.

Pode-se notar que os alimentos mais citados na Tabela 1.1 foram os laticínios, cereais e balas. Todos esses são amplamente consumidos por crianças o que causa maior preocupação quanto ao tipo e a quantidade de corantes artificiais utilizados nestes alimentos.

Na Tabela 1.2 são apresentados os valores da ingestão diária aceitável destes corantes, bem como os limites máximos permitidos destes corantes em iogurtes.

**Tabela 1.2:** Valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) e os limites máximos dos corantes artificiais permitidos no Brasil.

Corantes	IDA (mg/kg massa corpórea) <sup>a</sup>	Limite máximo (mg/100g ó mg/100mL) <sup>b</sup>
Amarelo Crepúsculo	2,5	10
Azul brilhante	10,0	30
Amaranto	0,5	10
Eritrosina	0,1	5
Indigotina	5,0	30
Ponceau 4R	4,0	10
Tartrazina	7,5	30
Vermelho 40	7,0	30
Azorrubina	4,0	5
Verde rápido	10,0	30

a= Prado e colaboradores <sup>5</sup>, b= BRASIL Nº 387, de 09 de Agosto de 1999 <sup>2</sup>.

Observa-se que ao final de um dia, se uma criança consumir mais do que um destes produtos, a ingestão diária pode ser maior do que a aceitável, podendo causar problemas de saúde para essa criança. Foram citadas como exemplo as crianças, pois estas têm massa corpórea menor, o que intensifica o risco, se houver um alto consumo destes corantes, muito mais do que se a mesma quantidade for administrada em um adulto, por exemplo. Entretanto, o consumo destes corantes deve ser evitado não só por crianças como também por adultos.

Dentre os alimentos que podem conter corantes artificiais e que são amplamente consumidos por crianças estão os laticínios, em especial os iogurtes e as bebidas lácteas.

Devido ao elevado consumo desses alimentos pela população e a crescente busca por alimentos de alta qualidade é importante avaliar os constituintes destes alimentos, para assim ser possível garantir que a busca por alimentos saudáveis e de qualidade seja real e

que neles não tenham constituintes causadores de danos à saúde do consumidor à curto ou longo prazo.

Muitas técnicas podem ser utilizadas para a identificação e quantificação de corantes artificiais em alimentos, entre elas, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) <sup>6,7</sup>, a espectrofotometria de absorção molecular na região do Ultravioleta ó Visível (UV-VIS) <sup>8,9</sup> e a eletroforese capilar (CE) <sup>10,11</sup>.

### **1.1.2- Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica na região do UV/VIS.**

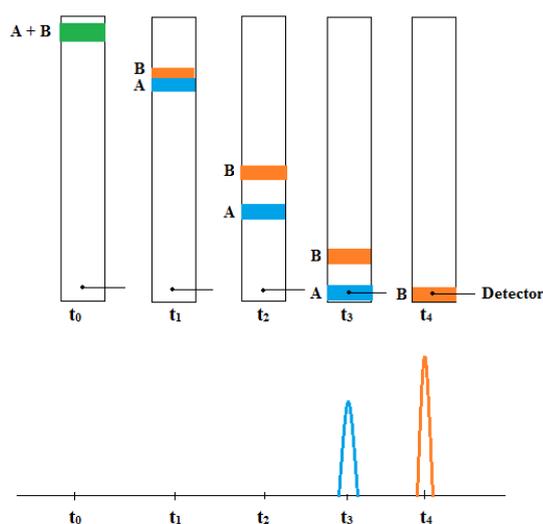
A cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) é uma técnica de separação de misturas complexas. A separação ocorre em instrumentos automatizados, que empregam colunas recheadas com uma fase estacionária (FE) específica, tendo como fase móvel (FM) um líquido e a eluição dos compostos da mistura ocorre sob alta pressão <sup>25</sup>.

A HPLC pode ser usada em análises qualitativas ou quantitativas para a separação de diversos compostos em diferentes tipos de amostras em um curto intervalo de tempo (da ordem de poucos minutos), com alta resolução, eficiência e detectabilidade <sup>25</sup>.

#### **1.1.2.1- Mecanismos de separação em HPLC**

A separação em cromatografia líquida (Figura 1.3) ocorre mediante diferentes mecanismos. Dentre estes está o mecanismo de adsorção, que é o princípio da cromatografia líquido-sólido, onde a fase estacionária (FE) é um sólido e a fase móvel (FM) é um líquido.

Para o mecanismo de adsorção as características físicas que influenciam na separação dos compostos são as polaridades da FM e da FE, a geometria e os fatores estéricos dos solutos, propriedades estas que fazem com que os solutos (analitos) interajam diferentemente com a FM e FE. Quando a fase estacionária é polar como, por exemplo, sílica ( $\text{SiO}_2$ ) ou alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )<sub>n</sub>, a FM deverá ser apolar ou semipolar (por exemplo, hexano ou acetato de etila) para que ocorra a competição entre a fase móvel e os compostos da amostra pela adsorção na FE. Desta forma, os compostos menos polares serão eluídos mais rapidamente que os mais polares. Em muitos casos, onde a mistura a ser separada é constituída de compostos com polaridades diferentes se faz necessário a mudança gradual na polaridade da FM. Geralmente, aumenta-se a polaridade da fase móvel, fazendo com que os analitos fiquem mais solúveis na FM, resultando em melhor separação. Quando a eluição ocorre desta forma, esta é chamada de eluição por gradiente. E quando não é necessária a mudança na composição da FM, diz-se que a eluição é isocrática<sup>25,26</sup>.



**Figura 1.3:** Representação da separação de uma mistura de compostos por eluição em uma coluna cromatográfica e o registro do sinal, gerando o cromatograma.

Outro mecanismo de separação em cromatografia é a partição que é o princípio da cromatografia líquido-líquido. Na partição, tanto a FM quanto a FE são líquidos. A separação ocorre devido à diferença de solubilidade do analito na FM e na FE, ou seja, os compostos mais solúveis na fase móvel são mais facilmente eluídos por ela, enquanto que os compostos mais solúveis na fase estacionária ficarão um tempo maior retidos nesta e

eluirão mais tardiamente. Uma desvantagem desta estratégia diz respeito às solubilidades. Se a FM for solúvel na FE, impossibilitará a repetitividade da separação devido à deterioração da coluna cromatográfica<sup>25,26</sup>.

A cromatografia líquida com fase ligada foi a maneira encontrada para resolver essa problemática. Como o próprio nome já diz, a FE encontra-se ligada quimicamente a um suporte. Com isso, é corrigido o problema da solubilidade da FE na FM. Nesta técnica ocorre ambos os mecanismos de separação, partição e adsorção. O primeiro é mais intenso, pois a FM é líquida e a FE é um filme líquido que recobre um suporte, fazendo com que o mecanismo de partição seja mais determinante para a separação. Entretanto, a presença de grupos ativos na superfície do suporte também influencia na interação da FE com a FM e o analito. E como esta interação ocorre entre a FM (líquida) e uma superfície, o mecanismo de separação envolvido é a adsorção<sup>25,26</sup>.

A depender do tipo (polaridade) do grupo funcional quimicamente ligado à FE (geralmente sílica) pode ser possível a separação de uma maior variedade de compostos. Quando esses grupos são polares (ciano, amino ou diol, por exemplo), esses são denominados de Fase Normal (FN) e quando são apolares (octil ou octadecil, por exemplo) são chamados de Fase Reversa (FR). A FR é mais frequentemente utilizada e foi a fase utilizada no presente trabalho<sup>25,26</sup>.

### **1.1.2.2- Fases móveis utilizadas em HPLC**

As características da fase móvel usada em cromatografia líquida são um dos fatores, mais importantes, que devem ser estabelecidos. A composição da FM é de extrema importância para a separação dos componentes da mistura a ser analisada.

A escolha da FM deve apresentar as seguintes características: possuir alto grau de pureza, solubilizar completamente os analitos e ser insolúvel na fase estacionária, não decompor os analitos ou a FE, não ser tóxica, ter baixa viscosidade e ponto de ebulição,

possibilitar o uso de soluções tampão, ser transparente ao detector, assim como é desejável ser de baixo custo<sup>25,26</sup>.

Cada característica citada anteriormente tem sua importância fundamental na escolha da FM, que serão explicadas a seguir.

- Alto grau de pureza: os solventes utilizados como FM em HPLC devem ser de alto grau de pureza ou de fácil purificação para possibilitar a análise e separação dos analitos em baixa concentração na amostra. A utilização de solventes impuros ou com baixo grau de pureza pode implicar no aparecimento de sinais advindos da impureza do solvente, que pode ser confundido ou atribuído à amostra, assim como também pode causar flutuação na linha base, dificultando a detecção, podendo obstruir as conexões capilares do sistema e ainda pode ficar irreversivelmente aderida à coluna cromatográfica<sup>25</sup>.

Os solventes comumente utilizados em fase reversa são: água, metanol, acetonitrila e tetraidrofurano. Os solventes orgânicos são usados como modificadores, que controlam a força da eluição do solvente. Quando em cromatografia líquida em fase reversa é utilizado eluição por gradiente ou isocrática com uma proporção maior de água, isto provoca um retardamento na eluição dos componentes da amostra, pois ocorre uma diminuição na força do solvente, devido ao aumento da polaridade da FM<sup>26</sup>.

- Solubilidade: a FM deve solubilizar os analitos e não ser solúvel na FE e principalmente, não pode reagir com os componentes da amostra, assim como não deve decompor os analitos e a fase estacionária<sup>25</sup>.

- Viscosidade: o ideal é utilizar solvente com baixa viscosidade (0,4 ó 0,5 mPa·s), pois solvente com viscosidades altas reduzem a eficiência da separação, diminuem a velocidade de transferência de massa do soluto entre a FM e a FE, aumentando assim a pressão interna da coluna. O aumento da pressão pode provocar vazamentos e o desgaste da coluna. Uma alternativa, quando se utiliza solventes viscosos, é diminuir a viscosidade dos solventes que constituem a FM, aumentando a temperatura da análise<sup>25</sup>.

- Ponto de ebulição: deve-se escolher solventes com ponto de ebulição da ordem de 20 ó 50 °C acima da temperatura escolhida para a realização da análise, para evitar a

evaporação do mesmo e assim, a formação de bolhas de ar na coluna e no detector, impossibilitando a detecção<sup>25</sup>.

- Solução tampão: quando os componentes da mistura a ser separados são compostos iônicos ou ionizáveis, é necessário fixar o pH do meio, fazendo com que os compostos sejam forçadamente mantidos na forma iônica ou não-iônica. A escolha da solução tampão a ser utilizada em uma análise dependerá do valor do pH da FM e do valor do comprimento de onda máximo de absorção na região do UV/VIS desta solução<sup>25</sup>.

Alguns autores recomendam que a solução-tampão escolhida possua valor de pH uma ou duas unidades a mais ou a menos do valor do pKa dos compostos de interesse. Mas para que se tenha uma garantia de que o composto está com a ionização necessária para a eluição, é preferível utilizar o valor de  $\text{pH} = \text{pKa} \pm 1,0$ . Obedecendo a equação de Henderson-Hasselbalch para solução tampão<sup>25,26</sup>.

Na literatura algumas soluções-tampão são mais comumente utilizadas para a análise de corantes artificiais em alimentos, sendo eles o acetato de amônio<sup>13</sup>, o acetato de sódio<sup>27</sup> e o fosfato<sup>28</sup>.

Uma particularidade da utilização de solução-tampão é o fato de que, por definição, o pH é medido em soluções aquosas. Entretanto, em cromatografia líquida não se usa apenas água como solvente, é necessário utilizar solventes orgânicos para aumentar a solubilidade dos analitos na FM, e com isso é causada uma incerteza no valor real do pH durante a eluição, pois este valor poderá sofrer influência devido a presença do solvente orgânico. É aconselhável que a medida do pH da solução tampão, quando realizada com um pHmetro, seja efetivada antes de ocorrer a mistura com o(s) solvente(s) orgânico(s), quando se usa bombas binárias, pois a mistura dos solventes é feita antes destes entrarem no sistema cromatográfico.

- Baixo custo: o custo dos solventes está diretamente ligado ao seu grau de pureza. Os solventes utilizados em cromatografia líquida são geralmente produzidos industrialmente e dependendo do tipo, podem ser necessárias várias etapas de purificação que refletem no custo do produto.

### 1.1.2.3- Detector espectrofotométrico na região do UV/VIS

O detector é um dos componentes mais importantes do sistema cromatográfico, sendo também a parte de maior custo. Eles são capazes de medir propriedades físicas ou físico-químicas dos componentes de uma mistura assim que estes saem da coluna cromatográfica, gerando um sinal que geralmente é registrado em um computador <sup>25</sup>.

Os detectores podem ser classificados quanto a sua seletividade como universais, seletivos ou específicos. Os primeiros são assim chamados, pois são sensíveis a qualquer composto que eluir da coluna cromatográfica que não seja a FM. Os seletivos são sensíveis a um determinado grupo de compostos. Já os específicos são sensíveis a um determinado composto ou um pequeno número de compostos, gerando resposta apenas para esses <sup>26</sup>.

No presente trabalho foi utilizado o detector espectrofotométrico com arranjo de fotodiodos (*photodiode array detector*, PAD) com detecção na região do UV/VIS, que é classificado como um detector seletivo, pois ele só possui sensibilidade para compostos que absorvem nesta região do espectro eletromagnético, ou seja, grupos cromóforos que são compostos com elétrons  $\pi$ , elétrons desemparelhados, duplas ligações conjugadas, brometos, iodetos, tiol, nitro (-NO<sub>2</sub>), carbonila (-C = O), nitrila (-C  $\equiv$  N), entre outros <sup>25,26</sup>.

Esse detector é um dos mais modernos na atualidade, tendo inúmeras vantagens quando comparado ao detector fotométrico que só consegue monitorar um ou dois comprimentos de onda fixos, e ao detector espectrofotométrico de comprimento de onda variável que é superior ao fotométrico, mas inferior em qualidade e atribuições ao PAD. O PAD é uma evolução do detector UV de comprimento de onda variável, pois neste a radiação é focalizada em um monocromador que seleciona o comprimento de onda a ser analisado, em seguida essa luz vai para a cela do detector e então para uma fotomultiplicadora que registra a radiação. Já o detector PAD utiliza um arranjo de fotodiodos ao invés de uma fotomultiplicadora. O que traz alguns benefícios, pois cada diodo monitora uma pequena faixa de comprimento de onda fazendo com que toda a região do espectro seja monitorada, sendo possível a obtenção do espectro UV/VIS do analito, durante a corrida cromatográfica. Este monitoramento não era possível de se realizar nos

detectores UV anteriores ao PAD, pois para isso se faz necessário à parada do fluxo na cela do detector para posteriormente o espectro ser gerado<sup>25,26</sup>.

As vantagens do PAD frente aos outros detectores de UV/VIS é que com este é possível obter espectro eletromagnético de cada analito e selecionar o comprimento de onda de máxima absorção para cada analito, eliminando interferentes e aumentando a capacidade de detecção.

Com a utilização do PAD é possível se avaliar a pureza do pico cromatográfico, verificando-o em várias alturas para confirmar se este pico é referente a um único composto e que não houve co-eluição. Assim como, também é possível obter espectros tridimensionais, explicitando o comprimento de onda, o tempo de retenção e a absorbância do analito.

Uma etapa muito importante e determinante para se avaliar, quando se utiliza detectores UV/VIS, é a escolha do solvente, pois este não pode ter absorção máxima no mesmo comprimento de onda dos analitos. Isto é muito comum de ocorrer quando os compostos a serem separados possuem absorção apenas na região do ultravioleta (< 400 nm) e não no visível (400 ó 760 nm), como por exemplo, o metanol (205 nm) e a acetonitrila (190 nm).

Como os corantes artificiais analisados absorvem em comprimentos de onda mais altos na região do visível, a escolha dos solventes pode ser feita de forma mais simples e sem a preocupação deste interferir na detecção dos analitos.

O princípio que rege a quantificação através dos detectores de UV/VIS é a lei de Lambert-Beer que faz uma relação entre a quantidade de luz absorvida (A) ou transmitida pela amostra, a absorvidade molar ( ) do composto, o caminho óptico (b) e a concentração (C) do composto analisado, Equação 1.

$$A = \epsilon b C \quad \text{Equação 1}$$

A absorbância (A) é medida pela relação logarítmica mostrada na Equação 2,

$$A = \log I_0/I \quad \text{Equação 2}$$

onde  $I_0$  é a radiação inicial incidida na amostra e  $I$  é a radiação final. Ou seja, uma parte da radiação incidente é absorvida pelo analito e essa absorção é proporcional à concentração deste na solução. Portanto, quanto maior a concentração do analito na solução maior será o valor da razão  $I_0/I$  e maior será o valor de  $A$ . Como os valores de  $a$  e  $b$  são constantes, a Equação 1 demonstra que existe uma relação direta entre  $A$  e  $C$  <sup>29</sup>.

### 1.1.3- Preparo de amostras

O desenvolvimento de métodos analíticos seletivos e sensíveis é de grande importância para serem aplicados em diferentes áreas do conhecimento. Neste ponto, as ciências analíticas desempenham um papel fundamental, pois atua desde o preparo da amostra até a identificação e/ou quantificação das espécies de interesse.

Órgãos como o Instituto Adolfo Lutz e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), descrevem metodologias oficiais para a determinação de diversos componentes e aditivos em alimentos. Como por exemplo pode-se citar os corantes artificiais cujos órgãos descrevem metodologias qualitativas e quantitativas. Entretanto, essas metodologias envolvem métodos clássicos de preparo das amostras que demandam muitas horas e técnicas como a cromatografia em papel (método qualitativo) e espectrofotometria UV/VIS (método quantitativo), sendo descrita para a última uma metodologia onde só se permite determinar a concentração de um ou dois corantes na mesma solução.

Vários métodos de preparo de amostras são conhecidos na literatura, dentre eles os mais usados para isolar os compostos orgânicos de uma mistura são a Micro Extração em Fase Sólida (do inglês, Solid Phase Micro Extraction, SPME) <sup>30</sup>, a Extração em Fase Sólida (do inglês, Solid Phase Extraction, SPE) <sup>31</sup> e Extração Líquido-Líquido (ELL) <sup>32</sup>.

A SPE é uma técnica de extração bastante utilizada, na qual uma fase sólida e uma fase líquida são usadas para isolar o(s) analito(s) de uma solução. Pode ser também usada para limpar uma amostra antes de usar um método cromatográfico para a separação e

identificação dos analitos de interesse. A amostra é eluída por um cartucho ou uma pequena coluna contendo um sorvente. Em seguida, um solvente, geralmente orgânico e seletivo é utilizado para remover possíveis interferentes e então, outro solvente é usado para retirar do composto sorvente os analitos de interesse. Apesar da SPE apresentar vantagens com relação aos métodos clássicos, tais como praticidade e maior sensibilidade, esta técnica tem algumas limitações. Uma delas refere-se à etapa de dessorção do analito sorvido no cartucho de SPE que requer geralmente, o uso de solventes orgânicos tóxicos <sup>33</sup>.

Porém, procedimentos analíticos de preparo de amostras mais simplificados podem muitas vezes ser tão eficientes quanto os procedimentos citados anteriormente e muitas vezes, mais econômicos, visto que os cartuchos utilizados em SPE são de elevado custo em comparação com a quantidade dos solventes que podem ser usados para precipitação ou extração dos analitos. Além do que esses cartuchos possuem capacidade sortiva seletiva, ou seja, só são capazes de sorver certas classes de compostos.

### **1.1.6 - Planejamento fatorial**

A quimiometria é a área da ciência exata que se refere à aplicação de métodos estatísticos e matemáticos para solucionar problemas de origem química. Uma etapa essencial em trabalhos de pesquisa é o planejamento dos experimentos para obtenção dos dados <sup>34</sup>.

Com um planejamento apropriado espera-se extrair o máximo de informação com um mínimo de experimentos. Se o sistema em questão for afetado por muitas variáveis, torna-se difícil a determinação do grau de influência de uma ou mais variáveis sobre uma resposta de interesse. Para esta finalidade normalmente é empregado um tipo particular de planejamento experimental chamado de planejamento fatorial <sup>34</sup>.

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística que permite determinar se as variáveis escolhidas para serem estudadas em um sistema têm ou não influência sobre a resposta desse sistema. Permite, também, avaliar e quantificar o nível dessa influência e a existência de interação entre as variáveis.

Ao realizar um planejamento fatorial o que se deseja saber é como a resposta depende dos fatores. O tipo mais simples de planejamento fatorial é aquele em que todos os fatores são estudados em apenas dois níveis, é o planejamento do tipo  $2^k$ , onde k corresponde ao número de fatores, ou variáveis a serem estudadas <sup>34</sup>.

### 1.1.7 Validação de método em cromatografia líquida

A validação de um método expressa a confiabilidade de resultados gerados a partir de estudos experimentais. No Brasil, órgãos como a ANVISA e o INMETRO estabelecem regras para a validação de métodos analíticos.

Os parâmetros de validação de um método analítico são: seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção e de quantificação do método, adição de analito e recuperação e estabilidade dos analitos na solução padrão. Outros testes também foram realizados como estabilidade dos analitos na solução padrão, efeito de matriz e percentual de extração.

#### 1.1.5.1- Seletividade

A seletividade é a medida de separação dos analitos de uma amostra. Este deve ser o primeiro parâmetro a ser avaliado em um método cromatográfico, para se obter a informação de quanto um pico está separado de outro, através do cálculo da resolução. A resolução é a medida da separação de dois picos consecutivos que pode ser calculado a partir da largura da base (Equação 3) ou da largura à meia altura (Equação 4) <sup>25</sup> e da distância entre os tempos de retenção de cada pico.

$$R = \frac{2 \times (t_{r2} - t_{r1})}{(W_2 + W_1)} \quad \text{Equação 3}$$

$$R = \frac{1,18 \times (t_{r2} - t_{r1})}{(W_{h2} + W_{h1})} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

$R$  = resolução

$t_{r1}$  = tempo de retenção do pico 1

$t_{r2}$  = tempo de retenção do pico 2

$W_1$  = largura da base do pico 1

$W_2$  = largura da base do pico 2

$W_{h1}$  = largura a meia altura do pico 1

$W_{h2}$  = largura a meia altura do pico 2

Outra informação importante que se obtém através da seletividade é a pureza de cada pico cromatográfico, para confirmar se cada sinal é inerente a um único composto e que não houve co-eluição. Sabe-se que compostos com propriedades semelhantes, impurezas ou compostos de degradação, entre outros que estejam presentes na mistura, podem vir a serem co-eluídos com o composto de interesse aumentando ou reduzindo a intensidade do sinal.

A seletividade, neste caso, pode ser determinada de duas formas. A primeira é comparando a resposta (cromatograma) obtida da análise do analito com e sem a matriz. Se essas respostas forem semelhantes e nenhum outro componente da matriz eluir juntamente com o analito, diz-se que o método é seletivo.

Uma segunda forma de avaliar a seletividade de uma forma mais simples e prática é com a utilização de detectores mais modernos como o espectrômetro de massas e o de arranjo de fotodiodos. Estes detectores geram um espectro do composto de interesse, possibilitando a identificação da pureza do sinal. Para isto, deve-se analisar cada sinal independentemente, selecionando as zonas ascendente e descendente do mesmo, verificando sempre se o espectro correspondente à parte do sinal é o mesmo durante toda a análise. Se positivo, pode-se garantir que aquele sinal corresponde a um único composto e que não houve co-eluição<sup>35,36,37</sup>.

### 1.1.5.2- Linearidade

A linearidade é a capacidade do método fornecer resultados diretamente proporcionais. Em cromatografia, a linearidade é a medida de proporcionalidade direta entre a concentração ou massa do composto de interesse e a área ou altura do sinal cromatográfico. É importante salientar, que a linearidade é restrita a uma determinada faixa de concentração e que os dados obtidos devem ser expressos em relação à faixa estudada.

É importante também que o valor esperado para a concentração do analito na amostra esteja em torno do ponto central da faixa linear de trabalho da curva analítica <sup>37,35</sup>.

Para se determinar a linearidade de um método é necessário construir uma curva analítica na faixa de concentração pretendida com pelo menos 5 níveis de concentração (I×5), cada nível deve ser preparado no mínimo em triplicata (J×3) e a leitura no equipamento deve ser realizada o número de vezes necessário para que  $I \times J \times 30$  <sup>37</sup>.

A avaliação da linearidade pode ser realizada de duas formas. A primeira é simplesmente calculando o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) da curva analítica. Quanto mais próximo de 1,0 for este valor menor será a dispersão dos pontos na curva e a incerteza nos coeficientes de regressão, visto que o  $R^2$  é determinado segundo a Equação 8 <sup>38</sup>.

$$R^2 = \frac{SQ_{Reg}}{SQ_T} \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

$SQ_{Reg}$  = Soma Quadrática da Regressão

$SQ_T$  = Soma Quadrática Total

Para o INMETRO o valor aceitável de  $R^2$  para atestar a linearidade de um método é 0,90 e para a ANVISA é 0,99 <sup>35</sup>.

A segunda forma de atestar e demonstrar de forma mais completa a linearidade de um método é realizando o teste do ajuste do modelo linear através da análise da variância (ANOVA) ou também chamado de ajuste por mínimos quadrados. Que consiste em afirmar

se um modelo tem a capacidade de prever ou pré-dizer respostas que se aproximem ao máximo da resposta observada, deixando o mínimo de resíduos possíveis<sup>34</sup>. Os conceitos básicos que regem a análise da variância é a soma quadrática, média quadrática, falta de ajuste e erro puro.

A soma quadrática (SQ) é uma decomposição em duas partes ( $SQ_R$  e  $SQ_r$ ) dos desvios em relação a média de todas as observações. A soma quadrática da regressão ( $SQ_R$ ) exprime o quanto as observações variam em torno da média global que um dado modelo consegue reproduzir. Já a  $SQ_r$  é a soma quadrática dos resíduos do modelo que se decompõe em  $SQ_{faj}$  e  $SQ_{ep}$ . A soma quadrática da falta de ajuste ( $SQ_{faj}$ ) representa o quanto as respostas observadas estão ajustadas ao modelo proposto e a soma quadrática do erro puro ( $SQ_{ep}$ ) fornece um valor referente ao erro aleatório, ou seja, o quanto os dados estão dispersos em torno da média, dando uma medida da precisão e da exatidão do método. Já as médias quadráticas (MQ) são calculadas dividindo o valor da SQ por seu respectivo número de graus de liberdade e também é uma grandeza para verificar se o modelo proposto está ajustado<sup>34,38</sup>.

Para comprovar se o modelo está ajustado deve ser realizado o teste de significância estatística da regressão e o teste da falta de ajuste. O primeiro teste é expresso pela razão  $MQ_R/MQ_r > F_{1,n-2}$  (n é o número de observações), no nível de confiança estabelecido, geralmente se utiliza o nível de 95%. Valores altos desta razão significam dizer que existe uma relação linear entre as variáveis X e y. O segundo teste é realizado pela razão  $MQ_{faj}/MQ_{ep}$ , neste caso se o valor for menor que o  $F_{tab}$  indica que o modelo está bem ajustado<sup>34,38</sup>.

### 1.1.5.3- Precisão

Precisão é a medida da variabilidade dos resultados gerados a partir de ensaios independentes, repetidos, de uma mesma amostra ou de padrões sob condições conhecidas. Podendo ser expressa pela repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade é determinada quando os ensaios ou análises são realizadas com o mesmo equipamento, instrumentos de medição, procedimento, local, operador e em um curto intervalo de tempo e com a mesma amostra. A precisão intermediária, também

chamada de reprodutibilidade interna, é uma medida da precisão quando ensaios são realizados por operadores ou equipamentos diferentes, do mesmo laboratório. Já a reprodutibilidade é assim denominada quando os ensaios são realizados em laboratórios diferentes.

A precisão expressa como repetitividade é usualmente determinada pelo coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR) como também é chamada (Equação 9) <sup>36</sup>.

$$CV = DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Onde:

DP = Desvio Padrão

CMD = Concentração Média Determinada

O valor máximo de CV aceito para a repetitividade em métodos de quantificação de análise de traços, impurezas ou amostras complexas é de 20 % <sup>35</sup>. É recomendável que os ensaios sejam realizados em, no mínimo, seis replicatas autênticas <sup>37</sup>.

#### 1.1.5.4- Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito depois do branco, que gera um sinal analítico. O LD pode ser determinado, em cromatografia, de três formas: visualmente, pela relação sinal-ruído ou baseado em parâmetros da curva analítica.

No método visual o LD é determinado analisando soluções com concentrações mínimas e distinguindo visualmente qual concentração gera um sinal que difere do sinal do ruído. A segunda forma de determinar o LD é através da relação sinal-ruído (matriz e o branco) e esta deve ser 3:1 ou 2:1. A terceira forma de determinar o LD (Equação 10) é a partir da inclinação da reta (S) e do desvio padrão (s) do branco ou da menor concentração aceitável, que pode ser, por exemplo, o menor ponto da curva analítica <sup>35</sup>.

$$LD = 3,3 \times \frac{S}{S} \quad \text{Equação 10}$$

#### 1.1.5.5- Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada. Os critérios de determinação do LQ são similares aos utilizados para o LD. Entretanto, a relação sinal-ruído deve ser 10:1 e a determinação do LQ utilizando parâmetros da curva analítica pode ser calculado pela Equação 11 <sup>35</sup>.

$$LQ = 10 \times \frac{S}{S} \quad \text{Equação 11}$$

#### 1.1.5.6- Adição e recuperação do analito

Os ensaios de adição e recuperação do analito na amostra tem o objetivo de eliminar possíveis erros sistemáticos advindos do efeito de matriz ou mesmo de etapas de extração durante o preparo das amostras.

O fator de recuperação ( $f_{rec}$ ) é determinado a partir da Equação 12, a seguir: <sup>26</sup>

$$f_{rec} = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor adicionado}} \times 100 \% \quad \text{Equação 12}$$

Onde:

Valor obtido = concentração da amostra fortificada

Valor adicionado = concentração real da amostra

#### 1.1.5.7- Estabilidade do analito na solução de referência

A estabilidade do analito na solução de referência é também um parâmetro importante para ser avaliado. Tanto as soluções de referência quanto as soluções de amostras e

reagentes devem permanecer estáveis durante todo o processo de análise. A estabilidade do analito pode perdurar por algumas horas, dias, semanas e até anos.

O armazenamento das soluções é um fator relevante, pois em condições drásticas de temperatura e luminosidade, a estabilidade pode diminuir consideravelmente. Assim como, o uso de solventes adequados também é um fator determinante para a estabilidade do analito em solução.

A estabilidade da solução de referência deve ser avaliada de tempos em tempos durante todo o período em que a solução esteja armazenada. Essa estabilidade pode ser determinada comparando a resposta instrumental gerada por uma solução de referência armazenada com a resposta de uma solução recém-preparada. É considerada uma solução estável quando essas respostas diferem em no máximo 2 %<sup>37</sup>.

#### **1.1.5.8- Percentual de extração**

Quando o processo de extração faz parte da etapa de preparo da amostra, o percentual de extração é a medida de quanto é possível ser extraído do analito na amostra.

Geralmente são realizadas extrações sucessivas com solventes ou reagentes apropriados e calcula-se o percentual de extração para ter o conhecimento, por exemplo, de quantas etapas são necessárias para extrair o máximo possível do(s) analito(s) da amostra.

### **1.4- Revisão bibliográfica**

#### **1.2.1-Técnicas de análise de corantes alimentícios artificiais.**

As técnicas mais comumente encontradas na literatura para a determinação de corantes em alimentos são: a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção espectrométrica na região do Ultravioleta ó Visível (UV-VIS)<sup>27,39,40</sup> ou detecção por espectrometria de massas (MS)<sup>30,41</sup>, a espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-VIS<sup>8,9,42</sup> e a eletroforese capilar (CE)<sup>10,43</sup>. Técnicas estas que exigem um preparo

prévio das amostras, podendo ser desde uma simples diluição, seguida de filtração, até métodos mais avançados, como a extração em fase sólida (SPE), passando por centrifugação e sonicação das amostras para se conseguir extrair todo o corante. A complexidade do preparo das amostras vai depender do tipo de amostra a ser analisada<sup>22</sup>.

Dependendo da técnica analítica que se tenha disponível para determinar o tipo e a quantidade de corantes em iogurtes e bebidas lácteas pode-se encontrar algumas dificuldades, pois esta é uma matriz muito complexa, ricas em proteínas e lipídios. Moléculas grandes que se analisadas por cromatografia, podem se ligar a coluna cromatográfica de forma irreversível, tornando a separação impossível, além de danificar a coluna cromatográfica.

Na literatura, existem relatos de trabalhos que analisaram, por HPLC, corantes alimentícios artificiais em diversas amostras<sup>27,41,44</sup>, mas não foi encontrado nenhum registro para a análise de iogurtes ou bebidas lácteas, pois o preparo da amostra, de fato, é uma etapa bastante dispendiosa e laboriosa.

Minioti e colaboradores<sup>13</sup> utilizaram HPLC com detecção de arranjo de diodos (DAD) para validar um método visando à separação e quantificação de uma mistura de 13 corantes artificiais e analisaram amostras reais de bebidas com sabor de frutas, licor com sabor de frutas, açúcar de confeitiro, doces e geleia com sabor de amora. Neste trabalho, o preparo das amostras foi bastante simples, devido ao fato da simplicidade das amostras, pois estas são solúveis em água e possuem pouco ou nenhum interferente, necessitando apenas de diluição com água purificada e filtração com filtro microporoso.

Assim como no trabalho citado anteriormente, Prado e colaboradores<sup>44</sup> também utilizaram HPLC-DAD para determinar a concentração dos corantes artificiais permitidos pela legislação brasileira e analisaram amostras de balas, gomas de mascar, confeitos de chocolate e cereais matinais de diversos sabores. Exceto para as amostras de cereais, o preparo das amostras consistiu simplesmente em dissolver as guloseimas em água para extrair o corante. Para os cereais foi necessária a dissolução com uma solução amoniacal em etanol com lavagens sucessivas. O mesmo procedimento não pode ser aplicado a amostras de iogurtes, devido à complexidade da amostra, como já citado anteriormente.

Em trabalho semelhante aos apresentados anteriormente, Bonan e colaboradores<sup>6</sup> analisaram corantes artificiais por HPLC-DAD em amostras de carne, pescados, doces, bolos, compotas, produtos de panificação, frutas e molhos de legumes. Para tanto, desenvolveram métodos de preparo das amostras, onde para as amostras sólidas adicionaram uma solução de etanol/água, em seguida sonicaram a mistura, depois centrifugaram e para finalizar, os corantes contidos no sobrenadante foram extraídos por uma coluna de SPE. Ou seja, o preparo das amostras foi o que mais consumiu tempo para a realização do trabalho, sendo uma etapa extremamente importante, pois se os corantes, não forem extraídos corretamente a determinação por HPLC-DAD ou qualquer outra técnica não será possível ou será realizada de forma equivocada, podendo gerar resultados falsos.

A determinação espectrofotométrica de corante natural à base de luteína em iogurtes desnatados foi realizada por Xavier e colaboradores<sup>45</sup>. A luteína é um tipo de corante natural, pertencente à classe dos carotenóides. No método desenvolvido foram testados três solventes para a extração da luteína do iogurte que foram o acetato de etila, a acetona e o tetraidrofurano. O tetraidrofurano, segundo os autores, foi o solvente mais eficiente, pois é capaz de desnaturar o complexo formado entre proteínas e carotenóides (luteína). Para atestar a eficiência do método desenvolvido, como critério da validação do método, os autores compararam os resultados obtidos pelo método proposto com os obtidos através de análises por HPLC. Mas, para tanto, fez-se necessário utilizar um método de preparo da amostra um pouco dispendioso, pois foi necessário realizar a extração, seguida da saponificação de uma determinada fase. A análise cromatográfica foi realizada na porção saponificada e na não saponificada, tendo em vista a complexidade da natureza do corante natural. O método desenvolvido foi devidamente validado.

Qi e colaboradores<sup>31</sup> analisaram corantes  $\alpha$ -Sudano em amostras de pimenta em pó. Este é um tipo de corante sintético derivado de compostos fenil-azóico que são proibidos na China, mas que ainda continuam sendo utilizados nestes tipos de alimentos. A extração do corante das amostras foi realizada primeiramente testando dois tipos de solventes, n-hexano e acetonitrila, sendo o último o que proporcionou a melhor extração. As amostras foram extraídas com o solvente apropriado em banho ultrassônico, em seguida foi realizada uma etapa de retirada de interferentes por extração em fase sólida com cartucho de Alumina-N e

por fim os extratos foram analisados por HPLC-DAD. Os interferentes citados pelos autores são compostos que são solúveis em gorduras que estão presentes no corante  $\beta$ -Sudanö. Apesar deste corante ser sintético eles são solúveis em solventes de baixa polaridade, diferente dos corantes artificiais que são mais solúveis em solventes mais polares.

Long e colaboradores <sup>46</sup> analisaram seis corantes azo utilizados em amostras de pimentas em pó por HPLC-DAD, empregando como método de preparo da amostra a extração líquido-líquido. Foram utilizados ácido fórmico, clorofórmio e metanol como solventes de extração e esta ocorreu em diversas etapas. Em seguida o extrato foi concentrado sob fluxo de nitrogênio e a solução foi injetada no cromatógrafo. O método foi devidamente validado, entretanto vale salientar que a extração líquido-líquido é um procedimento que envolve um alto consumo de solventes e também pode diluir a amostra, dificultando assim a quantificação de um analito em baixa concentração.

Uma segunda técnica muito utilizada para a determinação de corantes artificiais em alimentos é a espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-VIS. Como já citado anteriormente, essa técnica possui a vantagem da rapidez na leitura das amostras, mas possui algumas limitações e dificuldades, pois a determinação simultânea que se consegue com técnicas cromatográficas não é possível realizar quando se faz uso da espectrofotometria. São necessários cálculos de derivatização e o uso da quimiometria para tratar os espectros e assim conseguir separar sinais correspondentes de cada corante, o que requer experiência do operador.

Vidotti e colaboradores <sup>47</sup> utilizaram a espectrofotometria no UV-VIS para determinar a concentração dos corantes amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina em amostras de pós para gelatinas e sucos com sabor de frutas. Os autores realizaram os cálculos da primeira derivada segundo o método Derivada por filtros Savitzky-Golay dos espectros das amostras, para obter a concentração de cada corante. Na validação da metodologia desenvolvida precisaram comparar os resultados obtidos com os resultados gerados a partir da análise por HPLC-DAD onde os autores observaram que os resultados concordam entre si, demonstrando que o método proposto é eficiente para a determinação simultânea de dois corantes alimentícios, mas talvez se torne ineficiente ou exija mais intervenções

matemáticas, quando for necessário determinar um número maior de analitos (corantes), pois podem ocorrer sobreposições espectrais. Acarretando assim, ser necessário conhecimentos prévios de quimiometria para implementar esta metodologia.

Karaoglan e colaboradores <sup>48</sup> utilizaram a calibração multivariada por Regressão em Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, *Partial Least Squares*, PLS) para analisar uma mistura de quatro corantes artificiais em sucos em pó por análise espectrofotométrica. Para esse tipo de amostra o preparo é bem simples, bastando apenas dissolver a amostra em água destilada e realizar a leitura. Os autores compararam os dados obtidos pelo método proposto com os dados a partir da análise por HPLC e concluíram que não havia diferença significativa entre as médias obtidas pelos dois métodos quando foram submetidas aos teste-t e o teste-F no nível de 95 % de confiança. Comprovando que para amostras de suco em pó, onde o preparo da amostra é bastante simples é possível realizar uma análise confiável através de técnicas menos laboriosas como a espectrofotometria e utilizar técnicas quimiométricas para tratar os dados, associada a técnicas quimiométricas de tratamento de dados.

Uma terceira técnica utilizada para a determinação de corantes em alimentos é a eletroforese capilar (CE), que também é uma técnica de separação, distinta da cromatografia líquida (CL). Na CE, por exemplo, a separação consiste na migração de compostos iônicos ou ionizáveis por um capilar (diâmetro interno da ordem de  $\mu\text{m}$ ) ao invés de uma coluna (diâmetro interno da ordem de mm). <sup>49</sup>

Há uma diversidade de trabalhos na literatura envolvendo a determinação de corantes alimentícios por CE, mas assim como para a CL, não foi encontrado trabalho que envolvesse a determinação destes corantes em iogurtes ou bebidas lácteas produzidas no Brasil.

Huang e colaboradores <sup>50</sup> utilizaram a técnica de CE com detecção PAD para analisar corantes alimentícios artificiais em bebidas gaseificadas, geleias e bebida láctea de maçã contendo 50 % de leite fresco, açúcar, corantes e outros aditivos. Esta bebida é diferente da bebida láctea produzida no Brasil que possui no mínimo 51 % de leite (m/m), soro de leite ou derivados de leite reconstituído ou não, fermentado ou não, podendo ter aditivos ou

cultivo de micro-organismos.<sup>17</sup> O alimento utilizado no citado trabalho se assemelha a um tipo de leite com sabor e não ao iogurte ou a bebida láctea fermentada produzida no Brasil. Os autores encontraram algumas dificuldades no preparo destas amostras, necessitando de uma técnica mais avançada para aprimorar o preparo que foi a SPE. Com a SPE foi possível melhorar a limpeza dos extratos e diminuir o efeito de matriz apresentado durante a validação do método.

Jager e colaboradores<sup>51</sup> analisaram onze corantes alimentícios artificiais por CE com detector UV-VIS em amostras de suco de frutas em pó e guloseimas mastigáveis. O preparo das amostras foi simples, bastando apenas dissolver a amostra em água deionizada, centrifugar, recolher o sobrenadante, filtrar e injetar o filtrado no equipamento. Este procedimento foi semelhante ao utilizado quando a análise é realizada por HPLC, como já descrito no presente texto. Os autores conseguiram a total separação de onze corantes artificiais em apenas 9 minutos, fato que seria extremamente raro de se conseguir por HPLC, pois a coluna de separação em HPLC necessita de um tempo de estabilização depois que todos os analitos são eluídos, o que agrega mais tempo a análise.

## **1.5- Objetivos**

### **1.3.1. Objetivos Gerais**

Desenvolver um método para identificação e quantificação de corantes artificiais em iogurtes e bebidas lácteas, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos.

### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- ❖ Desenvolver um método de preparo de amostra para extração de corantes alimentícios artificiais em iogurtes e bebidas lácteas;
- ❖ Utilizar planejamento fatorial para avaliar qual o melhor método de preparo;
- ❖ Desenvolver um método por HPLC-PAD que seja capaz de separar uma mistura de dez corantes artificiais alimentícios e quantificá-los individualmente;
- ❖ Avaliar as figuras de mérito do procedimento proposto e realizar a devida validação do método;
- ❖ Aplicar o método em amostras reais.

## 2- EXPERIMENTAL

### 2.1- Reagentes, materiais e amostras

Para a realização deste trabalho utilizou-se reagentes e solventes de grau analítico adquiridos comercialmente. Sendo eles: metanol grau HPLC (Panreac PAI ó ACS), acetonitrila (Burdick & Jackson ACS/HPLC), ferrocianeto de potássio tri-hidratado (Neon), sulfato de zinco hepta-hidratado (Alphatec), hidróxido de amônio (Vetec), acetato de amônio (Vetec), metanol P.A. (PROQuímios).

Os corantes analisados foram: Tartrazina (E 102), Amaranto (E 123), Ponceau-4R (E 124), Eritrosina (E127) e Verde rápido (E143) da Sigma; Amarelo crepúsculo (E 110) da Aldrich; Azorrubina (E122) da Fluka; Vermelho 40 (E129), Indigotina (E132) e Azul brilhante (E133) da Sigma-Aldrich. Os corantes apresentavam distintos graus de pureza e como os recipientes contendo os mesmos já estavam abertos há certo tempo, fez-se necessário a determinação da pureza de cada corante. O procedimento empregado para determinar a pureza será descrito posteriormente.

Foram preparadas soluções aquosas de todos os padrões com água tipo III (segundo ANVISA<sup>52</sup>) GEHAKA ó Master All, assim como, também foram preparadas soluções aquosas de  $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$  ( $0,35 \text{ mol L}^{-1}$ ) (RK),  $ZnSO_4.7H_2O$  ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) (RZn),  $NH_4OH$  ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ) e acetato de amônio ( $0,13 \text{ mol L}^{-1}$ ). Tanto as soluções de referência quanto as dos reagentes foram estocadas em frasco de vidro âmbar, exceto as soluções de hidróxido e acetato de amônio que foram preparadas diariamente.

Para garantir que a solução inserida no cromatógrafo estava livre de material particulado fez-se necessário a filtração da solução com filtros em PTFE com membrana, com poro de  $0,45 \mu\text{m}$  da Millex e seringa plástica com capacidade de 10 mL da Plasscalp. Para as análises no HPLC foram utilizados *vials* com capacidade de 1,5 mL da Uniglas.

Foi utilizado um pHmetro OAKTON pH 2100 series para verificar o pH da solução tampão utilizada como eluente.

Foram adquiridas do comércio local quinze amostras entre iogurtes e bebidas lácteas fermentadas, conforme listadas na Tabela 1.3.

**Tabela 1.3:** Descrição das amostras analisadas quanto ao tipo de corante utilizado segundo o fabricante.

<b>Amostra</b>	<b>Descrição das amostras</b>	<b>Corante citado</b>
1	Iogurte parcialmente desnatado sabor salada de frutas (mamão, banana e maçã).	Amarelo crepúsculo (E110)
2	Bebida láctea fermentada com iogurte e polpa de morango.	Sem corante artificial
3	Bebida láctea fermentada com polpa de frutas sabor salada de frutas.	Vermelho Ponceau 4R (E 124)
4	Bebida láctea fermentada com iogurte e polpa de morango.	Sem corante artificial
5	Leite fermentado com polpa de fruta.	Azorrubina (E 122)
6	Bebida láctea fermentada com polpa de fruta.	Vermelho BordeauxØS (E 123) e Ponceau 4R (E 124)
7	Iogurte parcialmente desnatado com polpa de goiaba.	Vermelho Ponceau 4R (E 124) e Azul brilhante (E 133)
8	Iogurte com polpa de morango.	Azorrubina (E 122)
9	Leite fermentado com polpa de fruta sabor framboesa.	Azorrubina (E 122)
10	Leite fermentado com polpa de fruta sabor framboesa.	Azorrubina (E 122)
11	Iogurte com geleia de morango.	Vermelho BordeauxØS (E 123) e Amarelo crepúsculo (E110)
12	Bebida láctea fermentada com polpa de morango.	Vermelho BordeauxØS (E 123) e Ponceaur 4R (E 124)
13	Bebida láctea com polpa de cajá.	Tartrazina (E 102) e Amarelo crepúsculo (E110)
14	Bebida láctea fermentada com polpa de morango.	Ponceaur 4R (E 124)
15	Bebida láctea fermentada com polpa de salada de frutas.	Amarelo crepúsculo (E110)

A concentração das amostras foi calculada a partir do método de adição de padrão, onde foram adicionadas quantidades conhecidas dos corantes às amostras. Em seguida, as amostras foram preparadas segundo o procedimento descrito do item 2.5. Foi construída uma curva analítica, onde se realizou a extrapolação da reta, no eixo das abscissas, e a concentração do corante na amostra analisada foi determinada.

## 2.2- Equipamentos

Cromatógrafo líquido (Figura 1.4) da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), linha Prominence, instalado no LANAGRO, operando com um sistema de bombeamento quaternário de solventes do tipo LC-20AT, injetor automático SIL-20AC<sub>HT</sub>, detector UV-Vis com arranjo de fotodiodos SPD-M20A, forno para coluna CTO-20AC, módulo de comunicação entre o HPLC e o microcomputador modelo CBM-20A, degaseificador DGU-20A<sub>5</sub> e uma coluna Nucleodur C18ec de 4,6 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento. Utilizou-se como software para a aquisição e tratamento dos dados o LC Solution v.1.25SP1.



**Figura 1.4:** Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de fotodiodos.

Foi utilizada uma centrífuga da marca Cientec CT-5000DR, um pipetador automático Thermo Scientific (100 ó 1000 µL), um pipetador manual Ecopipette CAPP (10 ó 100 µL), e um agitador de tubos PA162 PACHANE.

### 2.3- Determinação da pureza dos corantes

Para a determinação da pureza dos corantes dissolveu-se 100 mg do corante em 100 mL de água purificada e tomou-se esta como a solução de referência. Para o cálculo da pureza utilizou-se a equação 13 (segundo Miniotti e colaboradores, 2007).<sup>13</sup>

$$\% \text{ pureza} = \frac{DF \times A}{A_{1cm}^{1\%} \times C} \times 10^5 \quad \text{Equação 13}$$

Onde:

DF = fator de diluição

A = Absorbância (A < 1)

C = Concentração da solução de referência

$A_{1cm}^{1\%}$  = absorvância específica de uma solução aquosa 1%.

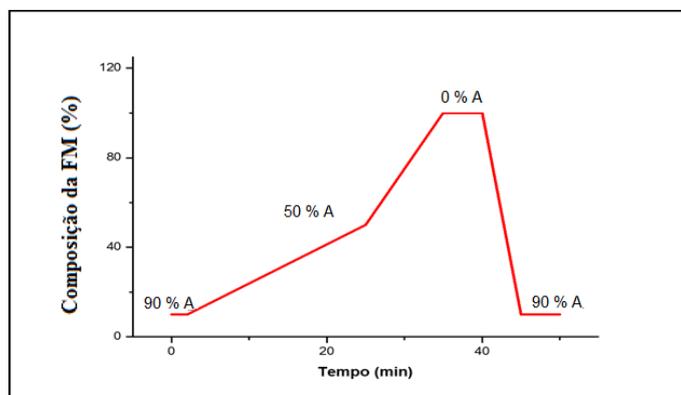
Em seguida foi calculada a concentração real da solução de referência, que foram armazenadas em frascos plásticos âmbar sob refrigeração.

### 2.4- Condições cromatográficas

Foram testados cinco gradientes de eluição para que se conseguisse a completa separação dos picos cromatográficos. Em todos os gradientes testados foram injetados 20 µL de amostra, foi utilizado um fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>, a temperatura do forno foi mantida entre 38 - 40 °C e as fases móveis foram filtradas à vácuo com membrana porosa de 0,45 µm. Os gradientes testados estão descritos a seguir:

1° TESTE

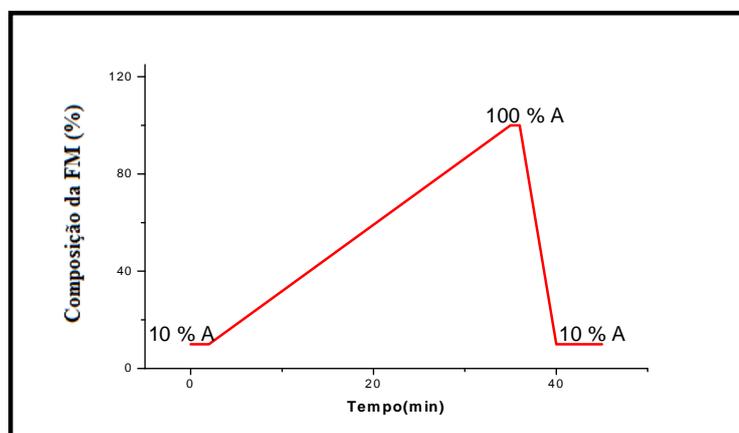
Eluente A: tampão fosfato pH 6,0 e eluente B: metanol. O tempo e o percentual de eluição são mostrados na Figura 1.5.



**Figura 1.5:** Gradiente de eluição dos solventes em HPLC para o 1º teste. A: tampão fosfato pH 6,0 e B: metanol.

## 2º TESTE

Eluente A: acetato de amônio  $30 \text{ mmolL}^{-1}$  pH 6,5 e eluente B: metanol. O tempo e o percentual de eluição são mostrados na Figura 1.6.



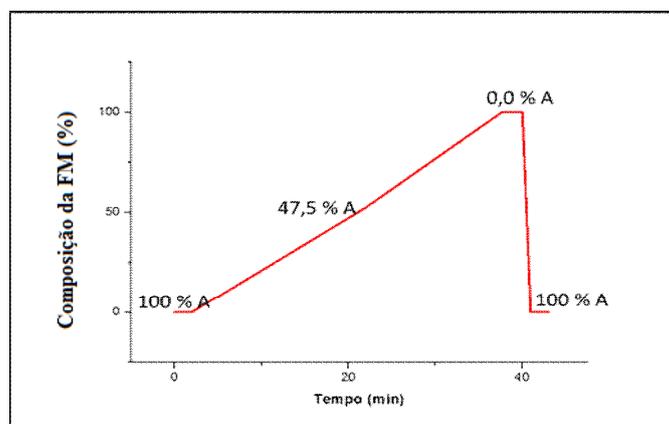
**Figura 1.6:** Gradiente de eluição dos solventes em HPLC para o 2º teste. A: acetato de amônio  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 6,5 e B: metanol.

## 3º TESTE

Eluente A: acetato de amônio  $129 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 6,0 e eluente B: metanol: acetonitrila (80:20). O gradiente se procedeu da mesma forma que no segundo teste, como mostrado na Figura 1.6, mudando apenas o pH do eluente A.

#### 4° TESTE

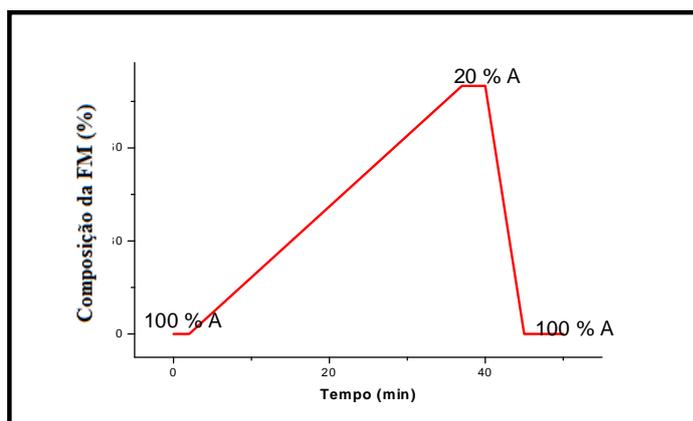
Eluente A: acetato de amônio  $129 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0 (pH ajustado com NaOH) e eluente B: metanol: acetonitrila (80:20) (adaptado de Miniotti e colaboradores, 2007), como mostrado na Figura 1.7.



**Figura 1.7:** Gradiente de eluição dos solventes em HPLC para o 4º teste. A: acetato de amônio  $129 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0 e B: metanol:acetonitrila (80:20).

#### 5° TESTE

Eluente A: acetato de amônio  $129 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 7,0 (pH ajustado com  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) e eluente B: metanol: acetonitrila (80:20). O tempo e o percentual de eluição são mostrados na Figura 1.8 (adaptado de Miniotti e colaboradores, 2007).



**Figura 1.8:** Gradiente de eluição dos solventes em HPLC para o 5º teste. A: acetato de amônio 129 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e B: metanol: acetonitrila (80:20).

## 2.5- Preparo das amostras

Foram realizados quatro testes para o preparo da amostra com o objetivo de precipitar as proteínas e lipídios fazendo com que no sobrenadante estivessem contidos todos os corantes. O primeiro teste foi baseado na literatura <sup>53</sup> e os demais foram adaptações deste trabalho.

### TESTE 1:

Parte 1: Foram adicionados 25 mL de uma solução NaOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 10 g de iogurte/bebida láctea e foram homogeneizados em um Erlenmeyer de 250 mL. Em seguida o recipiente foi colocado em um banho ultrassônico por 15 minutos a 70 °C, o pH foi ajustado para 8 ± 0,1 com ácido sulfúrico e a solução foi agitada <sup>53</sup>.

Parte 2: Em seguida foram adicionados 2 mL da solução de K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>].3H<sub>2</sub>O (0,35 mol L<sup>-1</sup>) (RK) e 2 mL da solução de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1 mol L<sup>-1</sup>) (RZn) e a solução resultante foi agitada, foram adicionados 40 mL de metanol P.A. e a solução final foi submetida a nova agitação seguida de repouso por 15 minutos. Passado este tempo o sobrenadante foi recolhido e filtrado com filtro microporoso.

**TESTE 2:**

Parte 1: Pesou-se 10 g de iogurte/bebida láctea e adicionou-se 1 mL da solução de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ( $0,35 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 1 mL da solução de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e a solução resultante foi agitada e ficou em repouso por 10 minutos.

Parte 2: Adicionou-se 10 mL de solução  $\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH}$  ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ), à solução preparada na parte 1, em seguida esta solução foi centrifugada por 10 minutos, a 6000 rpm e a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Esta etapa foi repetida mais duas vezes, em seguida o sobrenadante foi recolhido para um balão volumétrico de 50 mL, foi aferido com água. A solução resultante foi filtrada com filtro microporoso.

**TESTE 3:**

Parte 1: Pesou-se 10 g de iogurte/bebida láctea e adicionou-se 1 mL da solução de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ( $0,35 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 1 mL da solução de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e a solução resultante foi agitada, ficando em repouso por 10 minutos.

Parte 2: Adicionou-se 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH}$  ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ) mais 5 mL de metanol; em seguida a solução foi centrifugada por 10 minutos, a 6000 rpm e a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Esta etapa foi repetida mais duas vezes, em seguida o sobrenadante foi recolhido para um balão volumétrico de 50 mL, foi aferido com água. A solução resultante foi filtrada com filtro microporoso.

**TESTE 4:**

Parte 1: Pesou-se 10 g de iogurte/bebida láctea e adicionou-se 1 mL da solução de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ( $0,35 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 1 mL da solução de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e a solução resultante foi agitada e ficou em repouso por 10 minutos.

Parte 2: Adicionou-se 10 mL de solução contendo metanol:  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ) na proporção de 8:2, seguida da centrifugação por 10 minutos, a 6000 rpm e a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Esta etapa foi repetida mais duas vezes, em seguida o sobrenadante foi recolhido para um balão

volumétrico de 50 mL, foi aferido com água. A solução resultante foi filtrada com filtro microporoso.

Foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$ , com as condições de extração do TESTE 5, para identificar a melhor quantidade dos reagentes (0,5 ou 1,0 mL) para extrair os corantes e o melhor solvente (metanol ou etanol) a ser utilizado. Para tanto, as condições mostradas na Tabela 1.4 foram testadas:

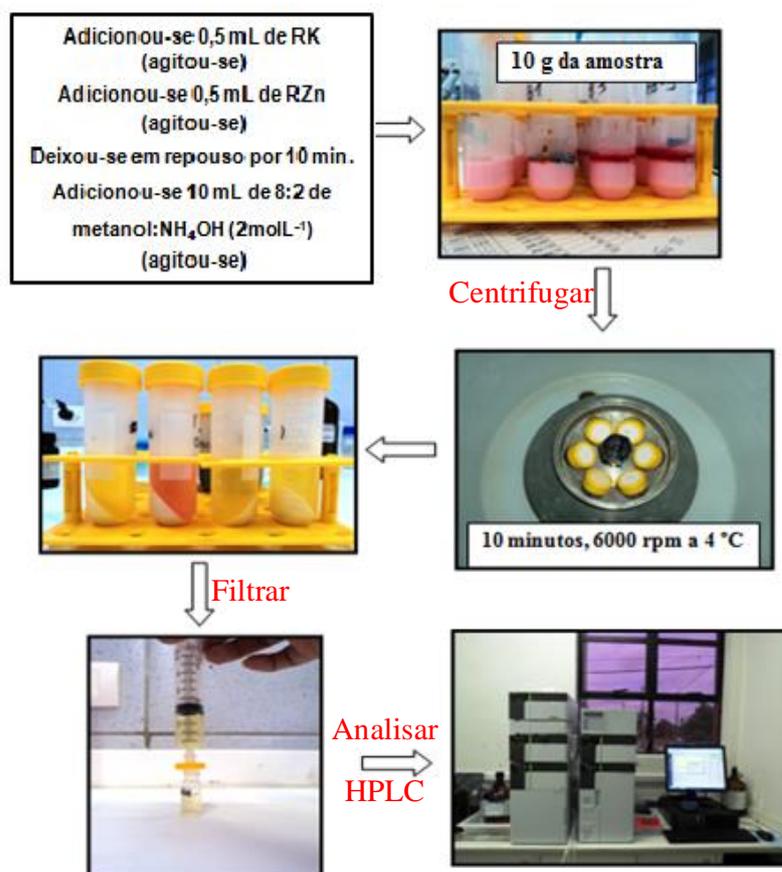
**Tabela 1.4:** Planejamento fatorial  $2^2$  tendo como variáveis a proporção de RK/RZn e os tipos de solventes.

Condição	RK:RZn (mL)	Solventes (2 mL:8 mL)
A	1:1	NH <sub>4</sub> OH:Metanol
B	1:1	NH <sub>4</sub> OH:Etanol
C	0,5:0,5	NH <sub>4</sub> OH:Metanol
D	0,5:0,5	NH <sub>4</sub> OH:Etanol

n = 3

Depois de realizados vários testes para o desenvolvimento da metodologia do preparo da amostra chegou-se a um procedimento definitivo o qual foi utilizado em todos os testes e no tratamento das amostras reais. Procedimento este descrito a seguir:

De cada amostra foram coletadas três alíquotas de 10 g e o preparo seguiu o seguinte esquema (Figura 1.9):



**Figura 1.9:** Esquema do procedimento realizado para o preparo da amostra de iogurte/bebida láctea para posterior análise por cromatografia líquida.

Pesou-se 10 g de iogurte/bebida láctea em tubo Falcon de 50 mL, adicionou-se 0,5 mL da solução de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ( $0,35\text{ mol L}^{-1}$ ) e 0,5 mL da solução de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $1\text{ mol L}^{-1}$ ) agitando-se imediatamente após cada adição. Em seguida a solução permaneceu em repouso 10 min. Decorrido este intervalo de tempo, adicionou-se 10 mL solução 8 volumes de metanol e 2 volumes de  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $2\text{ mol L}^{-1}$ ). A solução foi agitada e centrifugada por 10 minutos, a 6000 rpm e  $4^\circ\text{C}$ . A etapa da centrifugação foi repetida mais duas vezes, sempre adicionando 10 mL da solução 8:2 de metanol:  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $2\text{ mol L}^{-1}$ ). Passado este tempo o sobrenadante foi recolhido para um balão volumétrico de 50 mL, foi aferido com água purificada e a solução resultante foi filtrada em filtro microporoso e em seguida injetada no cromatógrafo.

## 2.6- Validação do método

O método proposto para identificação e quantificação de corantes em iogurte foi validado segundo as instruções do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) <sup>36</sup>, do Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) <sup>37</sup> e segundo RIBANI e colaboradores. <sup>35</sup> Os parâmetros avaliados foram: seletividade, efeito de matriz, linearidade, precisão, limite de detecção e de quantificação do método, recuperação e estabilidade dos analitos na solução padrão. Assim como, também foi avaliado o percentual de extração dos corantes em cada extração, visto que foram realizadas três extrações com alíquotas de 10 mL do solvente como descrito no item 2.5.

### 2.6.1- Seletividade

A seletividade foi determinada de acordo com MAPA <sup>36</sup> e RIBANI e colaboradores <sup>35</sup> através do cálculo da resolução dos picos, visto que se tratava de uma amostra complexa, com possíveis interferentes. Assim como, também foi verificada a pureza de cada pico pela análise do espectro correspondente à zona ascendente e descendente do sinal. Desta forma, podia-se garantir que não existiam outros sinais sobrepostos ao sinal da amostra.

### 2.6.2- Linearidade

Para se determinar a faixa linear da curva analítica dos corantes foram construídas duas diferentes curvas (em triplicata), a partir da solução de referência (item 2.4), que são:

Curva A: 3; 5; 10; 25 e 50 mg L<sup>-1</sup>

Curva B: 0,5; 1; 3; 10 e 25 mg L<sup>-1</sup>

Foi realizada uma regressão linear, segundo o INMETRO<sup>36</sup> e RIBANI e colaboradores<sup>35</sup>, calculou-se o coeficiente de determinação, assim como, também foi realizada uma análise da variância (ANOVA)<sup>34,38</sup>, para avaliar a linearidade e a confiabilidade do modelo proposto pela curva analítica. Os cálculos foram realizados através do Statistica 8.0.<sup>54</sup>

### **2.6.3- Precisão**

Foram preparadas amostras constituídas de iogurte natural branco (isento de corantes) acrescido dos analitos em estudo (dez corantes) em três níveis de concentração. Para cada nível, as análises foram realizadas em seis replicatas, calculadas as concentrações médias, os desvios-padrão de repetitividade e os coeficientes de variação (Equação 9).

### **2.6.4- Limite de detecção**

O limite de detecção (LD) foi calculado de acordo com INMETRO<sup>36</sup> e RIBANI e colaboradores<sup>35</sup>, baseado nos parâmetros da curva de calibração, calculado a partir da equação 10.

O desvio-padrão foi calculado a partir de nove replicatas do valor da área correspondente a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de cada corante, que é o menor ponto da curva analítica.

### **2.6.5- Limite de quantificação**

O limite de quantificação (LQ) foi calculado seguindo os mesmos critérios usados para o cálculo do LD, mas utilizando a Equação 11.

### **2.6.6- Adição de analito e recuperação**

Os ensaios de recuperação foram realizados com amostras fortificadas com concentração de 2 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup>. As amostras foram preparadas em triplicata segundo

o procedimento descrito no item 2.5 e analisadas por HPLC-PAD. O valor correspondente ao percentual de recuperação foi obtido a partir da Equação 12.

### **2.6.7- Percentual de extração**

Para se determinar o percentual que era extraído dos corantes em cada extração foram preparadas três amostras com 10 g de iogurte natural (branco, isento de corantes), a estas foram adicionados volumes correspondentes de cada corante a partir da solução de referência para a concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . As amostras foram preparadas segundo o item 2.5, mas ao final de cada centrifugação era coletada a fração e transferida para um balão volumétrico de 50 mL e seu volume era completado com água purificada. A concentração de cada fração foi medida por HPLC/PAD e os percentuais de extração foram calculados e comparados ao valor de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  que era a concentração real da amostra. Foram realizadas três etapas de extrações.

### **2.6.8- Estabilidade dos analitos nas soluções de referência**

Para avaliar a estabilidade das soluções de referência (item 2.3) foram preparadas soluções aquosas com diluição de 1:10 (ou 1:20 dependendo da solução) e a partir destas foram realizadas medidas na região do UV-VIS de 370 a 800 nm.

A absorvância dessas soluções foi medida no dia em que as soluções de referência foram preparadas e em seguida a cada 30 dias, visto que consta na literatura<sup>13</sup> que estas soluções possuem estabilidade mínima de dois meses, quando armazenadas sob refrigeração em frasco âmbar.

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1- Determinação da pureza dos corantes

Uma etapa primordial para a utilização de produtos químicos é a determinação da pureza destes compostos, pois o uso de substâncias impuras acarreta em resultados errôneos ou não confiáveis. Enquanto o analista não descobrir que a causa de seus resultados é a impureza do reagente, haverá sempre a suspeita de erro das medidas ou mesmo do método em desenvolvimento. Para minimizar ou mesmo eliminar este tipo de erro foi determinada a pureza de cada corante, como descrito no item 2.3

Os valores de comprimento de onda máximo, absorvidade, percentual de pureza calculado para cada composto e concentração real da solução de referência estão apresentados na Tabela 1.5.

**Tabela 1.5:** Comprimento de onda, absorvidade, percentual de pureza calculado e concentração real de cada solução estoque dos corantes.

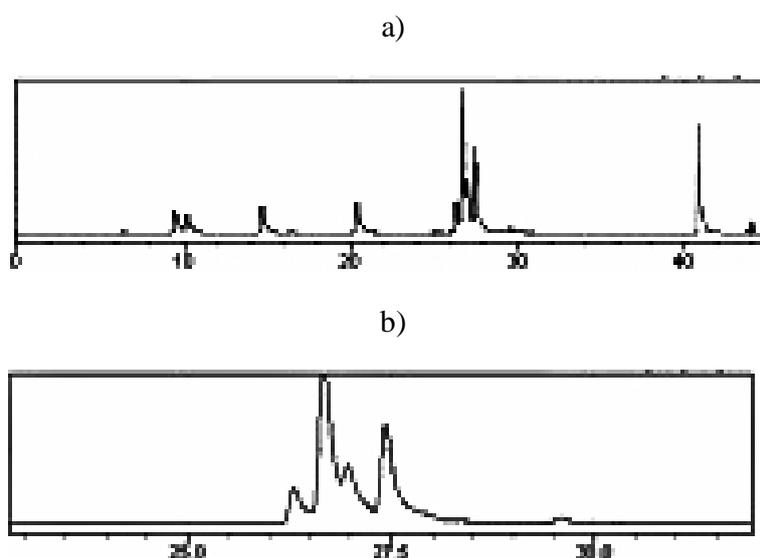
Corante	$A_{1cm}^{1\%}$	máximo (nm)	Pureza (%)	Concentração real da solução referência (mg L <sup>-1</sup> )
E 102	530	427	77,9	790,5
E 110	555	480	82,7	833,2
E 122	510	515	75,6	795,3
E 123	440	520	82,4	840,8
E 124	430	508	73,3	746,7
E 127	1100	527	87,2	886,9
E 129	540	505	85,2	852,7
E 132	480	610	86,6	868,7
E 133	1630	629	58,9	592,6
E 143	1560	624	59,4	607,7

A partir dos valores das concentrações das soluções de referência, foi possível preparar as soluções diluídas para traçar as curvas analíticas e corantes foram adicionados às amostras (amostras simuladas, dopadas) para posterior identificação e quantificação dos corantes.

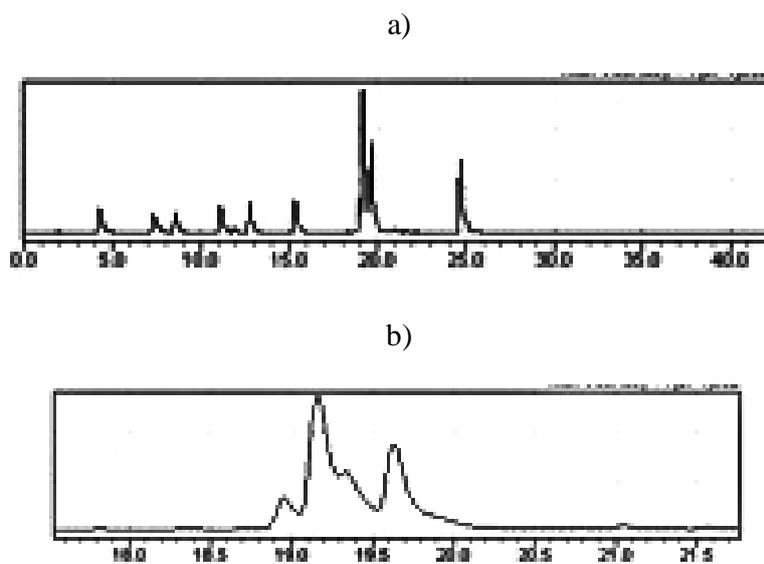
O comprimento de onda cuja absorção do analito foi máxima, Tabela 1.5, foi usado na análise cromatográfica com o detector de arranjo de fotodiodos que abrange toda a região do UV/VIS.

### 3.2- Condições cromatográficas

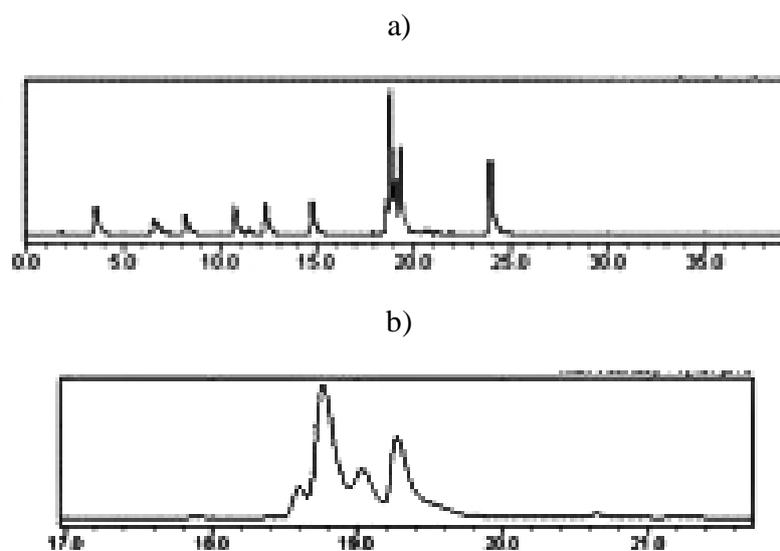
Foram realizados cinco testes de gradientes de eluição para conseguir a completa separação dos dez corantes artificiais (Tartrazina, Amarantho, Ponceau-4R, Eritrosina, Verde rápido, Amarelo crepúsculo, Azorrubina, Vermelho 40, Indigotina e Azul brilhante). Nos três primeiros testes os corantes Azorrubina (E122), Azul brilhante (E133) e Verde rápido (E143) não se separaram (Figura 1.10, 1.11 e 1.12) e ocorreu a formação de cauda nos picos. Além disso, na Figura 1.10a observa-se que o último corante teve o tempo de retenção de 41 minutos.



**Figura 1.10:** Em a) Cromatograma obtido com o gradiente de eluição do 1º TESTE e em b) ampliação da região de co-eluição

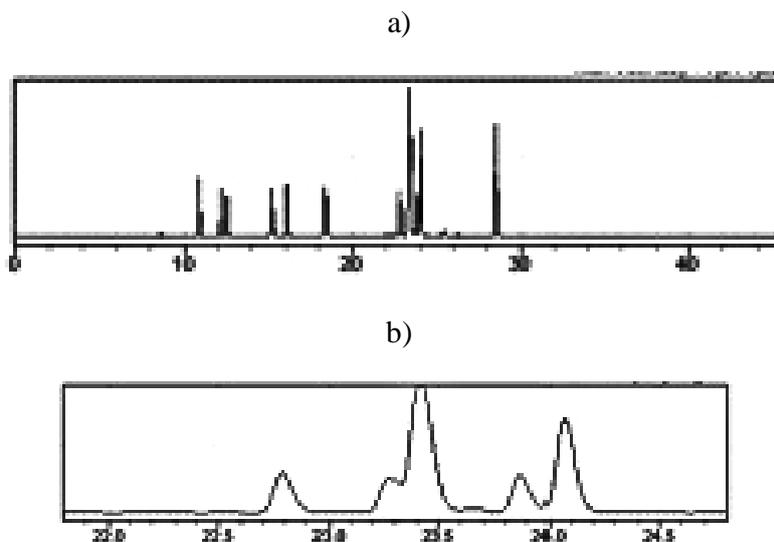


**Figura 1.11:** Em a) Cromatograma obtido com o gradiente de eluição do 2° TESTE e em b) ampliação da região de co-eluição



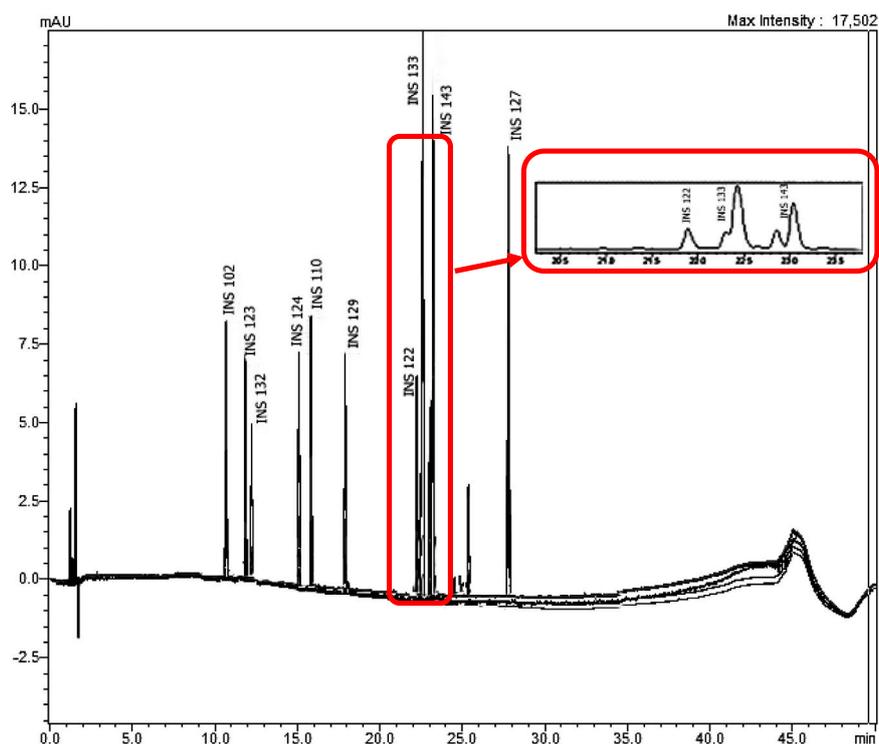
**Figura 1.12:** Em a) Cromatograma obtido com o gradiente de eluição do 3° TESTE e em b) ampliação da região de co-eluição

A separação total de todos os corantes se deu com o gradiente do 4° teste (Figura 1.13).



**Figura 1.13:** Em a) Cromatograma obtido com o gradiente de eluição do 4° TESTE e em b) ampliação da região de co-eluição

Para simplificar o gradiente empregado no 4° TESTE, foi realizada uma pequena alteração na velocidade do gradiente, originando o 5° TESTE. Entretanto, observa-se que a separação, a ordem de eluição e a resolução dos analitos não foram alteradas (Figura 1.14).



**Figura 1.14:** Cromatograma obtido a partir do gradiente de eluição do 5º TESTE e uma ampliação da região de 20 ó 23,5 min. O código INS equivale ao código E de identificação dos corantes.

Com um fluxo de  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$  durante os 50 minutos da corrida cromatográfica foram consumidos 60 mL dos solventes: metanol, acetonitrila e a solução tampão de acetato de amônio.

Observa-se também que o sinal do corante E133 (INS 133) possui um ombro e o E143 (INS 143) tem dois picos, que através da análise pelo detector PAD, confirmou-se que estes sinais não são co-eluições desses com interferentes e sim, contra-íons, pois possuem o mesmo espectro de UV-VIS. Esse fato é comum de ocorrer em análises de corantes como no trabalho de Miniotti e colaboradores<sup>13</sup> onde o corante 104 se apresenta em três sinais distintos.

Os valores da resolução de cada pico calculados a partir da largura a meia altura (Equação 4) estão listados na Tabela 1.6.

**Tabela 1.6:** Valores da resolução dos picos adjacentes calculados a partir da largura a meia altura.

Corantes	Resolução	Corantes	Resolução
E102 / E123	4,16	E129 / E122	16,57
E123 / E132	1,43	E122 / E133	2,42
E132 / E124	10,81	E133 / E143	2,98
E124 / E110	4,27	E143 / E127	16,20
E110/ E 129	9,62		

Para alguns autores <sup>26</sup> o valor aceitável de resolução para um método de quantificação é a partir de 1,5, sendo assim a maioria dos sinais estão bem resolvidos. Exceção para a resolução entre os corantes E123 / E132 que obteve o valor de 1,43, que mesmo sendo um pouco inferior ao limite mínimo, não interferiu na identificação nem na quantificação dos dois corantes.

A ordem de eluição dos corantes no gradiente utilizado está apresentada na Tabela 1.7.

**Tabela 1.7:** Ordem de eluição e o tempo de retenção de cada corante analisado.

Ordem de eluição	Corante	Tempo de retenção (s)
1°	E102	10,70
2°	E123	11,88
3°	E132	12,25
4°	E124	14,80
5°	E110	15,65
6°	E129	17,79
7°	E122	21,88
8°	E133	22,35
9°	E143	23,02
10°	E127	27,36

Os corantes azo foram os primeiros compostos a eluírem da coluna cromatográfica, seguidos dos corantes não azo. Exceto o E132 que foi o terceiro composto eluído e não é um corante azo, mas possui funções cetonas e aminas que conferem uma certa polaridade ao composto, tornando-o mais polar. Os três últimos corantes a eluírem foram: E133, E143 e o E127. Os dois primeiros são derivados do trifenilmetano e o último é classificado como xanteno<sup>5</sup>, esses possuem alto caráter apolar e massas molares elevadas. Por isso, interagem por mais tempo com a coluna e são mais pesados sendo assim os últimos a serem eluídos.

Kischbaum e colaboradores<sup>27</sup> utilizaram como fase móvel um tampão acetato (pH 7,0) e acetonitrila, e conseguiram a separação de 14 corantes artificiais, mas o primeiro composto só eluiu em, aproximadamente, 18 minutos e o último só em 46 minutos. O tempo total de análise era de 53 minutos considerando o tempo de estabilização da coluna e preparação para a próxima análise.

No presente trabalho, o tempo total de análise foi de 40 min e o gradiente de eluição foi estabelecido tendo como base o trabalho de Miniotti e colaboradores.<sup>13</sup> Algumas adaptações foram realizadas, tais como o pH da fase móvel foi alterado de 7,5 para 7,0, por medida de segurança, pois a coluna C-18 é danificada com valores de pH a partir de 8,0.<sup>26</sup> E também foi alterada a base utilizada para ajustar o pH do tampão de acetato de amônio, onde os autores utilizaram NaOH e no presente trabalho foi utilizado NH<sub>4</sub>OH para minimizar a quantidade de íons diferentes na coluna. Pois, o hidróxido de amônio já era utilizado no preparo da amostra. As mudanças realizadas não alteraram a ordem de eluição dos compostos em relação à apresentada pelos autores. Uma vantagem foi a diminuição no tempo de retenção dos últimos compostos, havendo um ganho de 2 minutos no tempo total de análise, no presente método.

### **3.3- Preparo das amostras**

Foram realizados vários testes de diferentes métodos de preparo de amostras, como relatados no item 2.5.

O primeiro foi baseado em um método da ISO 9231:2008<sup>53</sup> para a determinação dos ácidos benzóico e sórbico em leite e produtos lácteos, onde na parte 1 do teste 1 foram adicionados 25 mL de NaOH ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 40 mL de metanol. Essa parte foi excluída, pois mesmo que a extração dos corantes fosse bem sucedida, a solução final estaria muito diluída, o que poderia impossibilitar a detecção e/ou quantificação dos analitos quando as amostras reais fossem analisadas. Outro inconveniente foi a turbidez da solução sobrenadante e a precipitação das proteínas e lipídios que não foi eficiente, atestando assim a ineficiência do teste 1.

Para o teste 2 foi reduzida a quantidade adicionada das soluções de  $0,35 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (RK) e  $1 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (RZn) de 2 para 1 mL e a precipitação das proteínas continuou ocorrendo. Partiu-se então para a etapa da solubilização dos corantes na porção sobrenadante com a adição de 10 mL de solução  $\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH}$  (9:1), mas a solução resultante ainda continuou turva, ou seja os corantes não solubilizaram totalmente neste meio. Testou-se outra estratégia, decidiu-se utilizar inicialmente uma mistura de solução amoniacal<sup>55,56</sup> e o metanol<sup>6</sup> para verificar se aumentaria a solubilização dos corantes no sobrenadante. Uma provável explicação para este fato é que a presença do solvente orgânico faz com que os sais (advindos do RK e RZn, por exemplo) migrem para a fase aquosa e se aglomerem mais facilmente, antecipando a precipitação das proteínas, pois quando não foi utilizado o solvente orgânico observou-se que a solução ficava turva e havia a formação de pouco material precipitado, como ocorreu no teste 1.

O teste 3 foi realizado com a adição do metanol formando uma mistura extratora com a solução amoniacal em uma proporção de 1:1 ( $\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{aq})}$ ). Com essa solução a separação entre o sobrenadante e o precipitado aumentou consideravelmente em comparação com o teste 2. Sendo assim, resolveu-se realizar o teste 4 aumentando a proporção do solvente orgânico para 8:2 ( $\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{aq})}$ ) e com isso obteve-se um sobrenadante bem mais límpido e todo o material sólido foi devidamente precipitado.

Entretanto, os testes não cessaram, buscou-se avaliar a eficiência do etanol como solvente orgânico, ao invés do metanol, pois este é mais tóxico e de maior custo que o etanol. Para tanto, foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$  (Tabela 1.4) para avaliar se havia eficiência do etanol frente ao metanol e também para verificar se a quantidade dos

reagentes RK e RZn utilizados era suficiente ou se estas ainda poderiam ser reduzidas. Os resultados encontram-se na Tabela 1.8 a seguir.

**Tabela 1.8:** Resultados obtidos pela realização do planejamento fatorial  $2^2$  para a etapa de extração dos corantes no preparo das amostras.

Experimentos				
Corante	A (mg L <sup>-1</sup> )	B (mg L <sup>-1</sup> )	C (mg L <sup>-1</sup> )	D (mg L <sup>-1</sup> )
E102	9,39	5,98	9,51	5,80
E110	9,46	9,45	9,65	9,46
E122	8,99	8,88	9,30	9,13
E123	9,17	8,05	9,38	8,36
E124	9,47	9,35	9,66	9,44
E127	8,28	8,50	8,88	8,68
E129	5,61	6,42	8,70	8,74
E132	9,50	9,48	9,72	9,64
E133	9,90	9,71	9,88	9,63
E143	9,40	9,28	9,54	9,36

Os efeitos principais e das interações foram calculados pelo Programa Statistica 8.0<sup>54</sup>, mas não foram significativos no nível de confiança de 95 %. Tendo em vista que os valores das concentrações dos corantes, após as extrações são próximos entre si, na grande maioria dos casos. Sendo assim, resolveu-se analisar a tabela de resultados para assim avaliar qual seria a melhor condição experimental.

Com isso, observou-se que tanto o metanol quanto o etanol eram igualmente eficientes para extrair os corantes, exceto o corante E 102, pois para este o sinal cromatográfico se dividia. Provavelmente, o composto deve ter reagido com o etanol de tal forma que a resposta cromatográfica não gerava apenas um sinal e sim três, impossibilitando o cálculo

da área real equivalente à concentração do corante, como é mostrado na Tabela 1.8, nos experimentos B e D onde foi utilizado o etanol. E quanto a proporção de RK:RZn a diferença foi muito pequena entre essas proporções, mas ainda assim, com a razão 0,5:0,5 foi conseguido valores de concentrações um pouco maiores dos corantes, resultando em uma fração maior de corantes extraídos, principalmente para o corante E129. Nos experimentos A e B para o corante E129, onde a relação dos reagentes foi de 1:1, a extração foi menor que quando utilizado 0,5:0,5. Portanto, foi escolhido como a melhor condição experimental a proporção de 8:2 (MeOH:NH<sub>4</sub>OH<sub>(aq)</sub>) e 0,5:0,5 de RK:RZn.

O procedimento experimental definitivo, mostrado na Figura 1.9, foi utilizado em todos os testes para a validação do método e no tratamento das amostras reais.

### **3.4- Validação do método**

#### **3.4.1- Seletividade**

A seletividade foi verificada através do cálculo da resolução dos picos cromatográficos, apresentados na Tabela 1.6.

A segunda forma utilizada para determinar a seletividade, que só é possível quando se utiliza um detector com arranjo de fotodiodos é analisando a zona ascendente e descendente do sinal cromatográfico verificando se não ocorre mudança no espectro de absorbância na região do UV/Vis do composto de interesse. Ou seja, se toda a área do sinal possuir o mesmo espectro, significa que este representa um único composto. E foi o que ocorreu no presente trabalho, ao analisar todos os sinais verificou-se que não ocorreu co-eluição dos compostos e que não havia interferentes.

### 3.4.2- Linearidade

A linearidade foi verificada em duas curvas com faixas de concentrações distintas. Os valores das equações lineares e dos coeficientes de correlação múltipla para a curva A (item 2.6.3) estão contidos na Tabela 1.9, a seguir.

**Tabela 1.9:** Valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e das equações lineares da curva analítica A (3, 5, 10, 25 e 50 mg L<sup>-1</sup>), para cada corante analisado.

Curva A		
Corante	Equação reta	$R^2$
E102	Área = 60914 C + 14539	0,9998
E110	Área = 60661 C + 10563	1
E122	Área = 55591 C + 599,76	1
E123	Área = 49556 C + 11729	1
E124	Área = 52265 C + 6456,6	1
E127	Área = 134851 C + 19442	0,9999
E129	Área = 63661 C + 8703,5	0,9999
E132	Área = 45348 C + 12163	0,9999
E133	Área = 263606 C + 78143	0,9995
E143	Área = 177810 C - 6996,8	0,9999

Após realizar alguns testes observou-se que a capacidade de coloração dos corantes artificiais é alto. Decidiu-se diminuir a faixa de concentração da curva analítica (curva B) e esta foi utilizada para a validação do método.

As equações das curvas analíticas de todos os corantes estão contidas na Tabela 1.10, assim como o coeficiente de determinação e os valores referentes aos testes de falta de ajuste e de significância.

**Tabela 1.10:** Valores dos coeficientes de determinação e das equações lineares da curva analítica B (0,5; 1; 3; 10 e 25 mg L<sup>-1</sup>) e valores referentes aos testes de falta de ajuste e de significância para cada corante analisado.

Corante	Equação linear	R <sup>2</sup>	MQ <sub>R</sub> /MQ <sub>r</sub>	MQ <sub>faj</sub> /MQ <sub>ep</sub>
E102	Área = 5756,3 + 62743,4*C	0,9997	1,59.10 <sup>5</sup>	3,92
E110	Área = 5076,4 + 61803,3*C	0,9996	1,18.10 <sup>5</sup>	2,53
E122	Área = 3862,3 + 56212,0*C	0,9993	6,15.10 <sup>4</sup>	2,12
E123	Área = 9730,9 + 50334,9*C	0,9998	1,08.10 <sup>5</sup>	4,43
E124	Área = -252,3 + 53602,1*C	0,9998	5,57.10 <sup>2</sup>	4,24
E127	Área = -13284,2 + 1,4.10 <sup>5</sup> *C	0,9997	6,60.10 <sup>4</sup>	7,59
E129	Área = 8436,2 + 63810,8*C	0,9998	1,28.10 <sup>5</sup>	2,25
E132	Área = -8374,5+42846,3*C	0,9991	4,02.10 <sup>4</sup>	19,5
E133	Área = 4468,1 + 2,7.10 <sup>5</sup> *C	0,9996	5,88.10 <sup>4</sup>	0,57
E143	Área = 12222,8 + 1,7.10 <sup>5</sup> *C	0,9998	9,71.10 <sup>4</sup>	4,31

Para atestar a linearidade da curva analítica e se realmente o modelo linear é eficaz a este método, realizou-se a análise da variância univariada (ANOVA). Os valores das somas e médias quadráticas, assim como todos os dados que constitui a ANOVA e as curvas analíticas estão apresentados na Tabela 1.17, no apêndice. Os valores referentes aos teste de significância estatística da regressão e do teste da falta de ajuste, onde  $MQ_R/MQ_r > F_{1,n-2}$  (4,08) referente ao primeiro teste e  $MQ_{faj}/MQ_{ep} < F_{m-p,n-m}$  (2,84) referentes ao segundo

teste, demonstraram que apenas os modelos gerados para os corantes E110, E122, E129 e E133 obtiveram valores de  $MQ_{faj}/MQ_{ep} < 2,84$ . Isto indica que o modelo ainda precisa de ajustes para poder ser adotado.

### 3.4.4- Precisão

Para verificar a precisão do método foram preparadas amostras brancas fortificadas em três níveis de fortificação. Os corantes adicionados a estas amostras foram extraídos através do procedimento descrito no item 2.6.4 e analisados por HPLC-PAD. Os valores das concentrações médias, dos desvios-padrão e dos coeficientes de variação estão apresentados na Tabela 1.11, a seguir.

**Tabela 1.11:** Valores das concentrações médias, dos desvios-padrão de repetitividade ( $s_r$ ) e dos Coeficientes de Variação (CV) para cada nível de concentração dos corantes analisados.

Corante	Nível 1 (1 mg L <sup>-1</sup> )	Nível 2 (5 mg L <sup>-1</sup> )	Nível 3 (10 mg L <sup>-1</sup> )
	Conc.(mg Kg <sup>-1</sup> )/ $s_r$ /CV(%)	Conc.(mg Kg <sup>-1</sup> )/ $s_r$ /CV(%)	Conc.(mg Kg <sup>-1</sup> )/ $s_r$ /CV(%)
E102	0,97 / 0,02 / 0,40	6,72 / 0,32 / 4,71	8,65 / 0,11 / 1,23
E110	1,03 / 0,02 / 1,92	7,08 / 0,17 / 2,35	9,06 / 0,09 / 0,98
E122	0,96 / 0,02 / 2,34	2,80 / 0,14 / 4,87	3,36 / 0,05 / 1,57
E123	0,89 / 0,02 / 2,40	6,61 / 0,20 / 3,07	8,47 / 0,11 / 1,30
E124	0,99 / 0,02 / 1,98	5,71 / 0,29 / 5,14	7,93 / 0,09 / 1,18
E127	1,23 / 0,02 / 1,25	7,14 / 0,43 / 6,07	9,60 / 0,27 / 2,83
E129	0,74 / 0,09 / 12,05	4,81 / 0,48 / 9,95	5,09 / 0,82 / 16,20
E132	1,38 / 0,02 / 1,27	6,86 / 0,34 / 4,98	7,73 / 0,20 / 2,58
E133	0,76 / 0,01 / 1,96	5,20 / 0,19 / 3,70	6,73 / 0,07 / 1,11
E143	0,80 / 0,01 / 1,96	5,20 / 0,25 / 4,71	6,62 / 0,09 / 1,43

n = 6

Os valores de CV apresentados na Tabela 1.11 estão abaixo do limite máximo estabelecido para análise de traços ou impurezas em amostras, que é de 20 % para análises cromatográficas.<sup>35</sup> De todos os corantes analisados o E129 foi o que apresentou o maior coeficiente de variação (16,2 %). Acredita-se que esta maior variabilidade dos dados esteja ligada ao processo de extração, que neste trabalho é uma etapa determinante para a quantificação dos analitos.

### 3.4.5- Limite de Detecção e de Quantificação

Os valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de cada corante analisado estão listados na Tabela 1.12 a seguir.

**Tabela 1.12:** Valores dos LD e LQ dos corantes artificiais analisados.

Corante	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
E102	1,22	3,71
E110	1,06	3,49
E122	1,32	4,01
E123	1,41	4,27
E124	1,20	3,64
E127	0,37	1,12
E129	4,58	13,9
E132	1,36	4,13
E133	0,18	0,54
E143	0,29	0,89

n = 9

Os valores dos LD<sub>50</sub> e LQ<sub>50</sub> estão de acordo com a literatura, onde alguns autores como Miniotti e colaboradores<sup>13</sup> e Vachirapatana e colaboradores<sup>57</sup> relatam valores similares aos encontrados no presente trabalho.

### 3.4.6- Adição e recuperação do analito

Os ensaios de adição e recuperação foram realizados em dois níveis de concentração, N1 (2 mg L<sup>-1</sup>) e N2(10 mg L<sup>-1</sup>).

Os valores do percentual médio de recuperação estão apresentados na Tabela 1.13.

**Tabela 1.13:** Valores do percentual médio de recuperação por nível de concentração de cada corante artificial analisado.

Corante	Recuperação N1 (%)	Recuperação N2 (%)
	(2 mg L <sup>-1</sup> )	(10 mg L <sup>-1</sup> )
E102	101,07	98,77
E110	105,12	100,11
E122	101,92	97,14
E123	103,01	97,11
E124	100,16	97,25
E127	99,83	94,39
E129	97,21	81,84
E132	114,68	111,38
E133	101,56	98,14
E143	101,08	98,77

n = 3

Segundo Ribani e colaboradores<sup>35</sup> o percentual aceitável de recuperação é de 70 ó 120 %. Considerando este intervalo de aceitação, todos os corantes apresentaram ensaios de recuperação aceitáveis. Comprovando a exatidão do método desenvolvido. Com a ressalva de que a maioria dos ensaios obtiveram valores de recuperação muito próximos de 100 % e apenas para o E132 que foi um pouco acima deste valor, mas ainda assim dentro da faixa aceitável.

Pode-se observar que os valores de recuperação obtidos no N1 foram ligeiramente maiores que os obtidos no N2, isso se deve ao fato de que para uma amostra com menor concentração o método de extração desenvolvido é capaz de extrair mais eficientemente que para uma amostra com maior concentração. Isto pode indicar um erro sistemático, que pode ser devidamente corrigido com a realização de mais extrações com solvente na última etapa do preparo da amostra.

#### **3.4.7- Percentual de extração**

O percentual de extração foi calculado para verificar a eficiência do método de extração dos corantes, com o objetivo de atestar se as três extrações realizadas eram suficientes para extrair todo ou uma parte considerável de cada corante na amostra.

Os percentuais de extração foram calculados e comparados com o valor de 5 mg L<sup>-1</sup> que era a concentração real da amostra simulada e os dados estão listados na Tabela 1.14.

**Tabela 1.14:** Resultados obtidos para a extração de corantes em iogurtes e bebidas lácteas e os desvios-padrão de cada extração.

Corante	1ª Extração (%)	2ª Extração (%)	3ª Extração (%)	Extração total média (%)
E102	72,9 ± 0,9	13,5 ± 0,1	7,1 ± 0,9	93,4 ± 0,9
E110	69,2 ± 0,9	13,1 ± 3,9	7,9 ± 0,9	90,3 ± 0,9
E122	67,1 ± 1,1	14,9 ± 5,1	10,8 ± 0,9	92,8 ± 1,1
E123	75,1 ± 1,0	15,1 ± 0,1	7,6 ± 0,9	97,8 ± 1,0
E124	70,4 ± 0,9	14,0 ± 3,6	8,5 ± 0,8	93,0 ± 0,9
E127	18,6 ± 1,6	42,7 ± 6,5	22,4 ± 0,6	83,7 ± 1,6
E129	35,6 ± 3,8	14,5 ± 3,3	14,2 ± 1,5	64,3 ± 3,8
E132	65,3 ± 2,0	13,8 ± 3,5	4,9 ± 0,1	84,1 ± 2,0
E133	67,9 ± 1,5	15,7 ± 0,15	8,8 ± 0,8	92,4 ± 1,5
E143	74,8 ± 1,5	16,5 ± 1,4	4,9 ± 0,4	96,2 ± 1,5

n = 3

O menor percentual de extração foi observado para o corante E 129, sendo necessário realizar mais do que três extrações consecutivas para que a extração do corante seja completa ou próxima dos 100% como ocorre para os demais corantes. Acredita-se que a solubilização deste corante no meio é menor que a solubilização dos outros corantes.

### 3.4.8- Estabilidade dos analitos nas soluções de referência

Foi avaliada a estabilidade dos corantes nas soluções de referência para verificar por quanto tempo era confiável estocar estas soluções.

Na Tabela 1.15 estão listados os valores das absorvâncias e das purezas de cada solução de referência dos corantes medidos em três meses consecutivos.

**Tabela 1.15:** Valores das absorvâncias e da percentagem de pureza de cada solução de referência dos corantes medidos em três meses consecutivos.

Corante	Absorvância	Pureza (%)
E 102	0,4189 / 0,4222 / 0,4250	77,88 / 78,49 / 79,01
E 110	0,4624 / 0,4702 / 0,4662	82,74 / 84,14 / 83,42
E 122	0,2028 <sup>a</sup> / 0,2021 <sup>a</sup> / 0,1912 <sup>b</sup>	75,60 <sup>a</sup> / 75,34 <sup>a</sup> / 76,51 <sup>b</sup>
E 123	0,3699 / 0,3274 / 0,3736	82,43 / 72,95 / 83,24
E 124	0,3211 / 0,3735 / 0,3244	73,35 / 85,32 / 74,12
E 127	0,4878 / 0,5084 / 0,5259	87,22 / 90,88 / 94,03
E 129	0,4605 / 0,4671 / 0,4680	85,19 / 86,41 / 86,59
E 132	0,4170 / 0,4219 / 0,3587	86,62 / 87,64 / 74,50
E 133	0,4830 / 0,5056 / 0,5077	58,97 / 61,73 / 61,99
E 143	--- / 0,7921 / 0,8146	--- / 99,27 / 102,08

As soluções aquosas dos corantes se mantiveram estáveis durante três meses que foi o tempo de execução experimental deste trabalho. Com a ressalva de que algumas medidas foram realizadas em soluções diferentes (a e b, Tabela 1.15). Este fato ocorreu devido ao total consumo da solução anterior.

### 3.4.9- Análise das amostras reais

Para testar a capacidade do método, após todo o processo de validação, foram analisadas, em triplicata, quinze amostras de bebidas lácteas e iogurtes adquiridas do comércio local.

Os resultados relatando quais corantes foram identificados e quantificados nas amostras de iogurtes e bebidas lácteas analisadas encontram-se na Tabela 1.16.

**Tabela 1.16:** Corantes artificiais identificados e quantificados nas amostras reais de iogurtes e bebidas lácteas.

Amostra	Corante expresso pelo fabricante	Corante identificado / concentração (mg L <sup>-1</sup> )
1	E110	COR / NQ
2	Sem corante artificial	NQ
3	E 124	E110 / 0,89 ± 0,27 COR / NQ
4	Sem corante artificial	NQ
5	E122	E122 / 5,34 ± 0,15
6	E123 e E124	E122 / 1,43 ± 0,05
7	E124 e E133	NQ
8	E122	E122 / 5,32 ± 0,62
9	E122	E122 / 11,75 ± 0,21
10	E122	E122 / 11,72 ± 0,13
11	E123 e E110	E123 / 12,56 ± 0,08
12	E123 e E124	COR / NQ
13	E102 e E110	E102 / 75,30 ± 3,85 E127 / 4,16 ± 0,00
14	E124	E123 / 3,12 ± 0,03 E124 / 12,16 ± 0,12
15	E110	NQ

n = 3, Onde: NQ = Não Quantificado; COR = Corante desconhecido

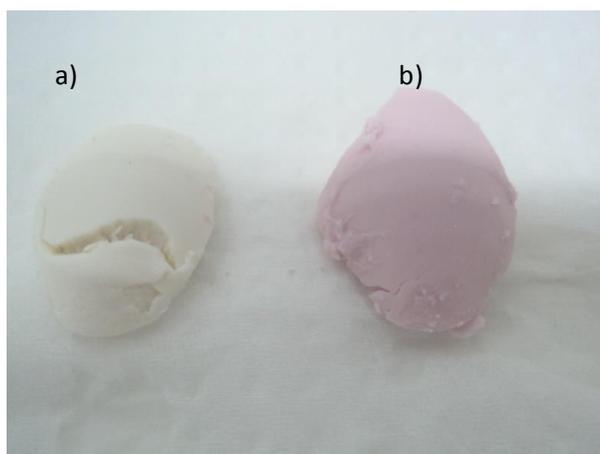
A amostra que obteve a maior concentração foi a amostra **13** com 75,30 ± 3,85 mg L<sup>-1</sup> para o corante E102 onde o limite máximo é 300 mg L<sup>-1</sup>. Comprovando que a concentração

da amostra estava abaixo do limite máximo legislado, para essa e para as demais amostras. Ratificando a afirmação anterior sobre a alta capacidade de coloração dos corantes artificiais.

O corante mais encontrado nas amostras foi o E122 (Azorrubina), provavelmente por apresentar cor vermelho e ser muito utilizado para colorir as bebidas de sabor morango. Um fato curioso é que alguns fabricantes relatam que seu produto contém um determinado corante e pelo presente método foi identificado e quantificado outro tipo. E algumas vezes não existia corante artificial, ou a concentração estava abaixo do LD do método. Como, por exemplo, nas amostras **7, 12 e 15**, não foram detectados nenhum dos corantes relatados pelos fabricantes.

Dentre as amostras analisadas estavam duas (**2 e 4**), onde o segundo o rótulo não havia corante artificial, apenas natural. Então, essas amostras foram analisadas para confirmar ou não a afirmação do fabricante. E está foi realmente confirmada, ou seja, não haviam corantes artificiais nas amostras ou a concentração destes estavam abaixo do limite de detecção do presente método.

Na Figura 1.15a, observa-se que após extração, na amostra que continha corante artificial o precipitado ficava completamente branco e na amostra que apresentava corante natural, o precipitado continuava colorido, Figura 1.15b.



**Figura 1.15:** Em a) Precipitado da amostra que apresentava apenas corante artificial e em b) Precipitado da amostra que apresentava corante natural.

A Figura 1.15 demonstra que o corante natural não é extraído pelo presente método, o que já foi relatado por Qi e colaboradores <sup>31</sup>, que utilizaram solvente de baixa polaridade como o n-hexano para extrair corantes naturais de amostras de alimentos.

## 4- CONCLUSÕES

Pode-se concluir que de forma simples foi possível se extrair corantes artificiais presentes em amostras de iogurtes e bebidas lácteas. Para tanto foi desenvolvido um método de extração simultânea por solventes para identificação e quantificação por HPLC-PAD de dez corantes artificiais alimentícios comercialmente permitidos no Brasil e em outros países, para utilização em amostras de iogurtes e bebidas lácteas.

O método de extração foi simples, rápido e de custo moderado. Embora fosse usada uma centrífuga para homogeneizar as soluções, ao comparar o custo de métodos de extração mais sofisticados como a extração em fase sólida, o método desenvolvido no presente trabalho torna-se de baixo custo.

O método foi devidamente validado, para tanto, foram avaliadas as figuras de mérito: seletividade, efeito de matriz, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, percentual de extração e foi estudada a estabilidade da solução referência. Os corantes E123, E127, E129 e o E133 apresentaram efeito de matriz de acordo como o teste t de Student, mas esse efeito foi eliminado na etapa de quantificação das amostras com a realização do método de adição de padrão para se determinar a real concentração das amostras, visto que não havia disponível um material de referência certificado para atestar o método desenvolvido.

A concentração de corantes artificiais determinadas nas amostras reais analisadas estavam abaixo do limite máximo estabelecido de 50 ó 300 mg L<sup>-1</sup>. A concentração das amostras variaram de 0,89 ó 75 mg L<sup>-1</sup> e os corantes identificados foram: E102, E110, E122, E123, E124 e o E127, sendo o E122 o corante identificado em 33 % das amostras analisadas. Amostras que discriminavam no rótulo de suas embalagens não conter corantes artificiais foram também analisadas, e de fato não foram extraídos nenhum tipo de corante artificial das mesmas.

## 5- PERSPECTIVAS

As perspectivas para o trabalho proposto são:

1. Realizar um novo estudo do gradiente de eluição, a fim de diminuir o tempo de análise sem prejudicar a separação dos sinais cromatográficos.
2. Realizar o teste da reprodutibilidade do método.
3. Analisar um número maior de amostras reais para avaliar a robustez do método proposto. Em seguida, implementar o método desenvolvido, no presente trabalho, como método oficial para a determinação de corantes artificiais em iogurtes e bebidas lácteas pelo MAPA.

## 6- APÊNDICE

**Tabela 1.18:** Dados da ANOVA do método desenvolvido para cada corante analisado.

<b>Corante</b>	<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>Grau de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>
E102	Regressão	$1,50 \cdot 10^{13}$	1	$1,50 \cdot 10^{13}$
	resíduo	$4,06 \cdot 10^9$	43	$9,44 \cdot 10^7$
	Falta de ajuste	$9,23 \cdot 10^8$	3	$3,08 \cdot 10^8$
	Erro puro	$3,14 \cdot 10^9$	40	$7,84 \cdot 10^7$
	Total	$1,50 \cdot 10^{13}$		
	% explicado	99,97		
	% explicável	99,99		
E110	Regressão	$1,45 \cdot 10^{13}$	1	$1,45 \cdot 10^{13}$
	resíduo	$5,28 \cdot 10^9$	43	$1,23 \cdot 10^8$
	Falta de ajuste	$8,42 \cdot 10^8$	3	$2,80 \cdot 10^8$
	Erro puro	$4,44 \cdot 10^9$	40	$1,11 \cdot 10^8$
	Total	$1,45 \cdot 10^{13}$		
	% explicado	99,96		
	% explicável	99,99		
E122	Regressão	$1,20 \cdot 10^{13}$	1	$1,20 \cdot 10^{13}$
	resíduo	$8,41 \cdot 10^9$	43	$1,95 \cdot 10^8$
	Falta de ajuste	$1,15 \cdot 10^9$	3	$3,84 \cdot 10^8$
	Erro puro	$7,26 \cdot 10^9$	40	$1,81 \cdot 10^8$
	Total	$1,20 \cdot 10^{13}$		

	% explicado	99,93		
	% explicável	99,99		
<hr/>				
E123	Regressão	$9,65.10^{12}$	1	$9,65.10^{12}$
	resíduo	$3,84.10^9$	43	$8,94.10^7$
	Falta de ajuste	$9,59.10^8$	3	$3,20.10^8$
	Erro puro	$2,88.10^9$	40	$7,21.10^7$
	Total	$9,65.10^{12}$		
	% explicado	99,96		
	% explicável	99,99		
<hr/>				
E124	Regressão	$1,09.10^{13}$	1	$7,63.10^{14}$
	resíduo	$3,58.10^9$	43	$1,37.10^{12}$
	Falta de ajuste	$8,65.10^8$	3	$2,88.10^8$
	Erro puro	$2,72.10^9$	40	$6,79.10^7$
	Total	$1,09.10^{13}$		
	% explicado	99,97		
	% explicável	99,99		
<hr/>				
E127	Regressão	$7,12.10^{13}$	1	$7,12.10^{13}$
	resíduo	$4,64.10^{10}$	43	$1,08.10^9$
	Falta de ajuste	$1,68.10^{10}$	3	$5,61.10^9$
	Erro puro	$2,96.10^{10}$	40	$7,40.10^8$
	Total	$7,13.10^{13}$		
	% explicado	99,93		
	% explicável	99,97		
<hr/>				
E129	Regressão	$1,55.10^{13}$	1	$1,55.10^{13}$

	resíduo	$5,22 \cdot 10^9$	43	$1,21 \cdot 10^8$
	Falta de ajuste	$7,53 \cdot 10^8$	3	$2,51 \cdot 10^8$
	Erro puro	$4,47 \cdot 10^9$	40	$1,12 \cdot 10^8$
	Total	$1,55 \cdot 10^{13}$		
	% explicado	99,96		
	% explicável	99,99		
<hr/>				
E132	Regressão	$6,22 \cdot 10^{12}$	1	$6,22 \cdot 10^{12}$
	resíduo	$5,87 \cdot 10^9$	38	$1,54 \cdot 10^8$
	Falta de ajuste	$3,67 \cdot 10^9$	3	$1,22 \cdot 10^9$
	Erro puro	$2,19 \cdot 10^9$	35	$6,27 \cdot 10^7$
	Total	$6,22 \cdot 10^{12}$		
	% explicado	99,91		
	% explicável	99,94		
<hr/>				
E133	Regressão	$2,87 \cdot 10^{14}$	1	$2,87 \cdot 10^{14}$
	resíduo	$2,10 \cdot 10^{11}$	43	$4,88 \cdot 10^9$
	Falta de ajuste	$8,62 \cdot 10^9$	3	$-1,14 \cdot 10^{10}$
	Erro puro	$2,01 \cdot 10^{11}$	40	$3,47 \cdot 10^9$
	Total	$2,87 \cdot 10^{14}$		
	% explicado			
	% explicável			
<hr/>				
E143	Regressão	$1,16 \cdot 10^{14}$	1	$1,16 \cdot 10^{14}$
	resíduo	$5,12 \cdot 10^{10}$	43	$1,19 \cdot 10^9$
	Falta de ajuste	$1,25 \cdot 10^{10}$	3	$4,18 \cdot 10^9$
	Erro puro	$3,87 \cdot 10^{10}$	40	$9,68 \cdot 10^8$
	Total	$1,16 \cdot 10^{14}$		

% explicado                    99,95  
% explicável                    99,98

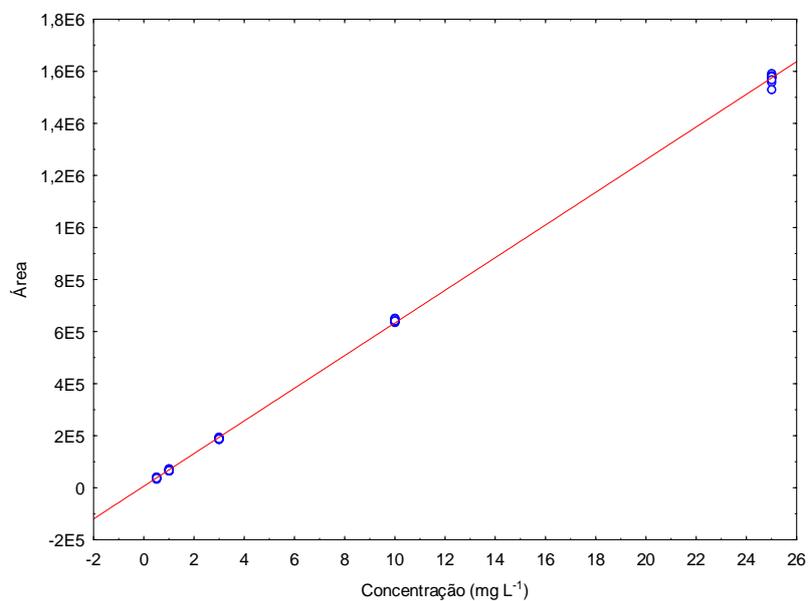


Figura 1.16: Curva analítica referente ao corante E102

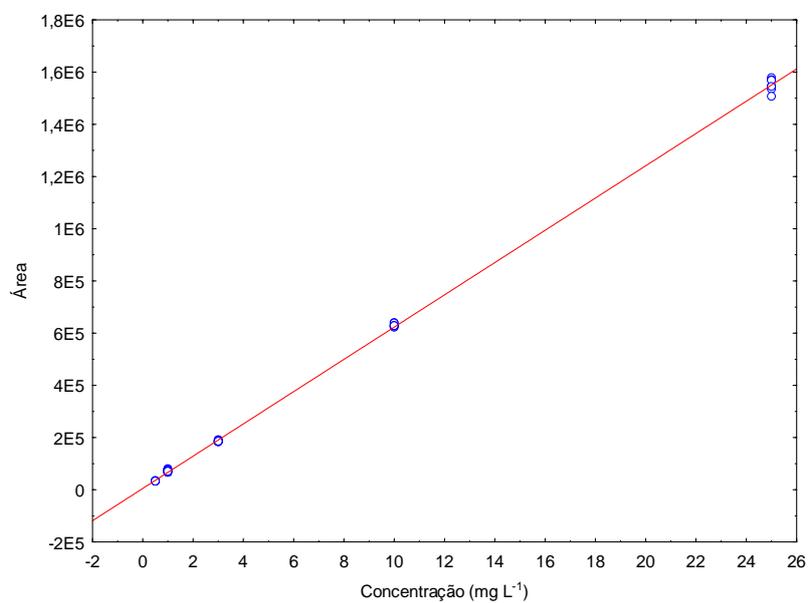


Figura 1.17: Curva analítica referente ao corante E110

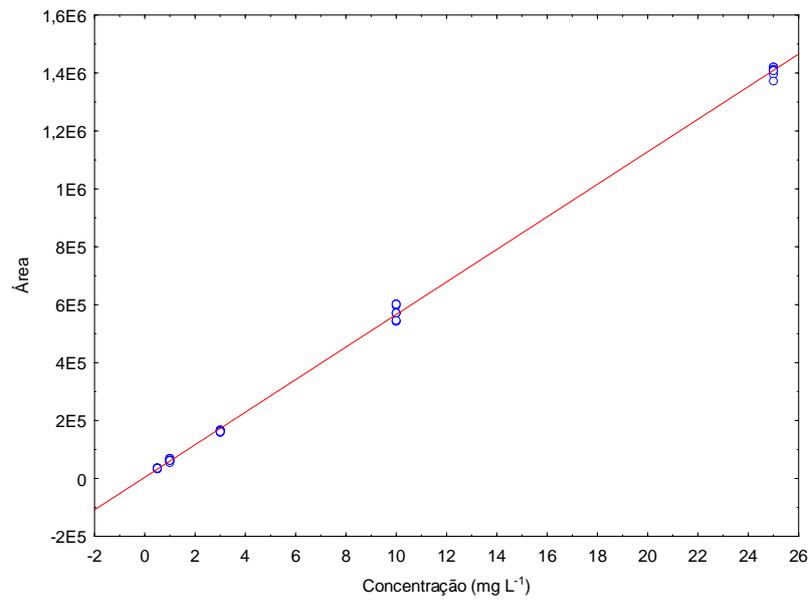


Figura 1.18: Curva analítica referente ao corante E122

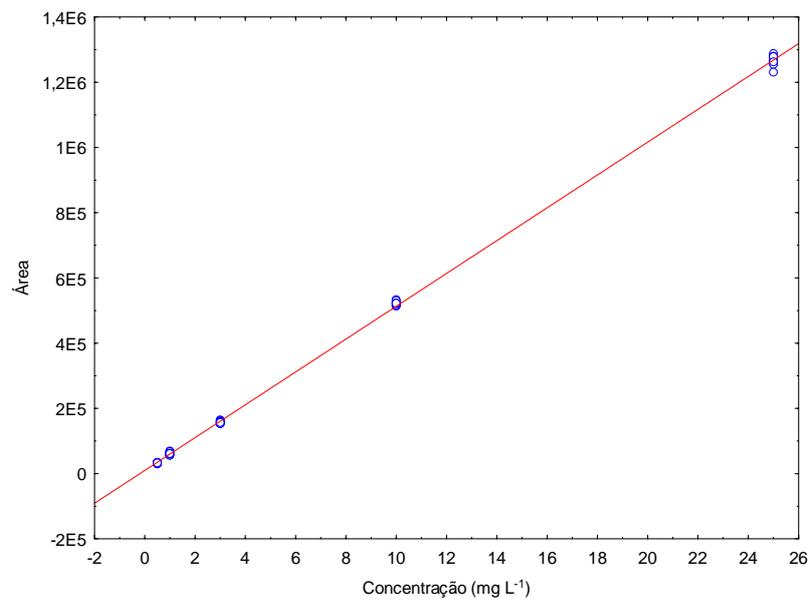


Figura 1.19: Curva analítica referente ao corante E123

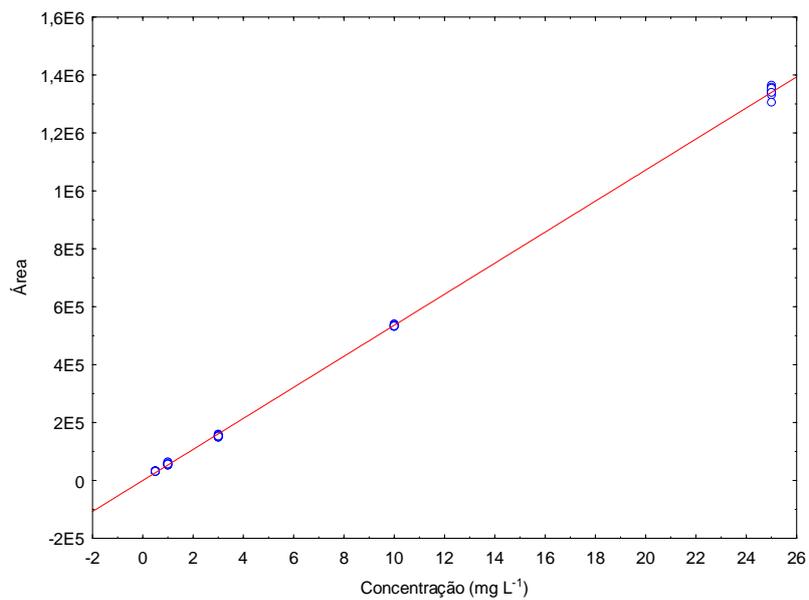


Figura 1.20: Curva analítica referente ao corante E124

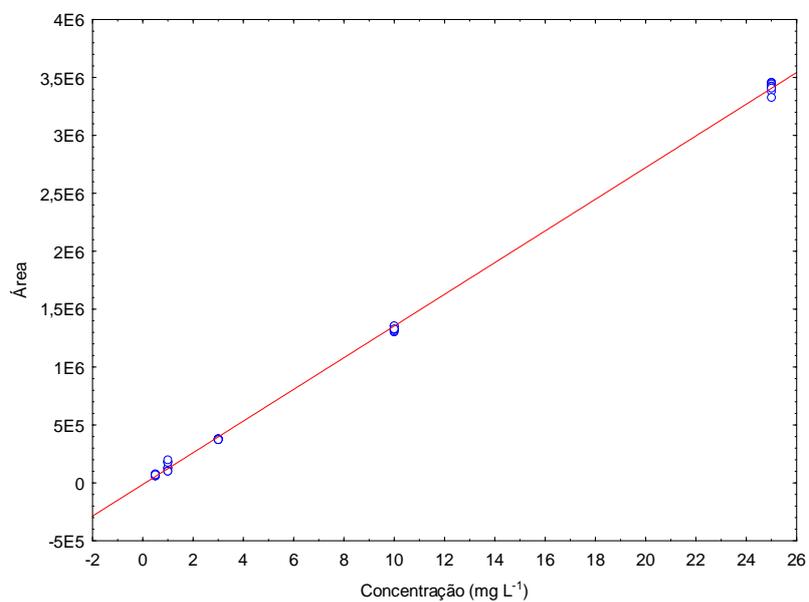


Figura 1.21: Curva analítica referente ao corante E127

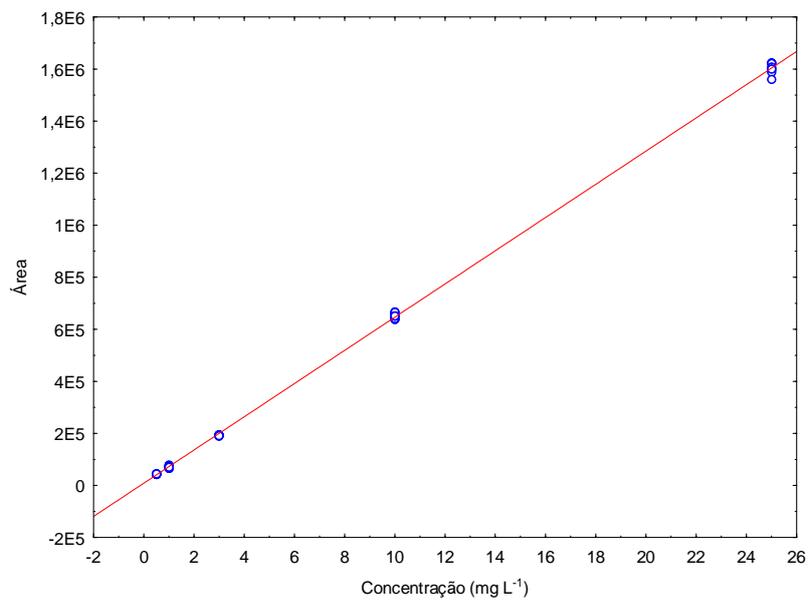


Figura 1.22: Curva analítica referente ao corante E129

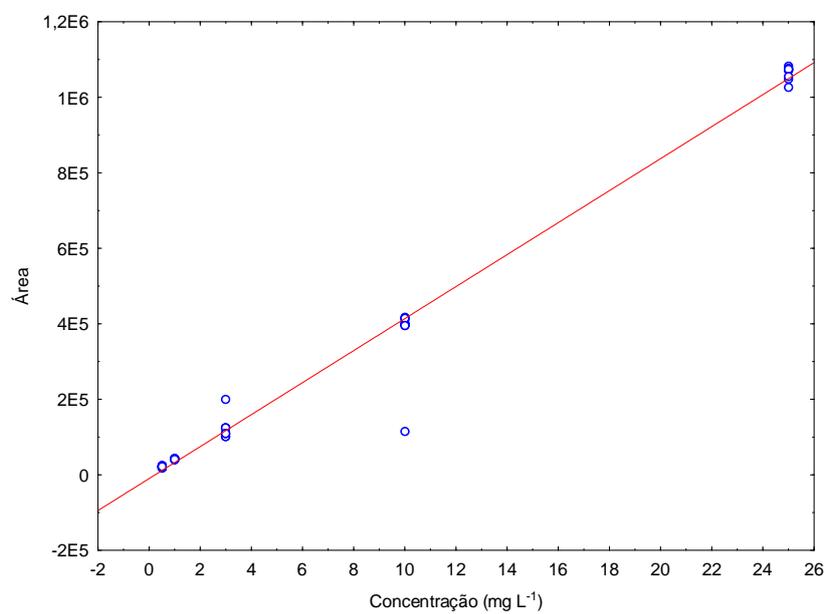


Figura 1.23: Curva analítica referente ao corante E132

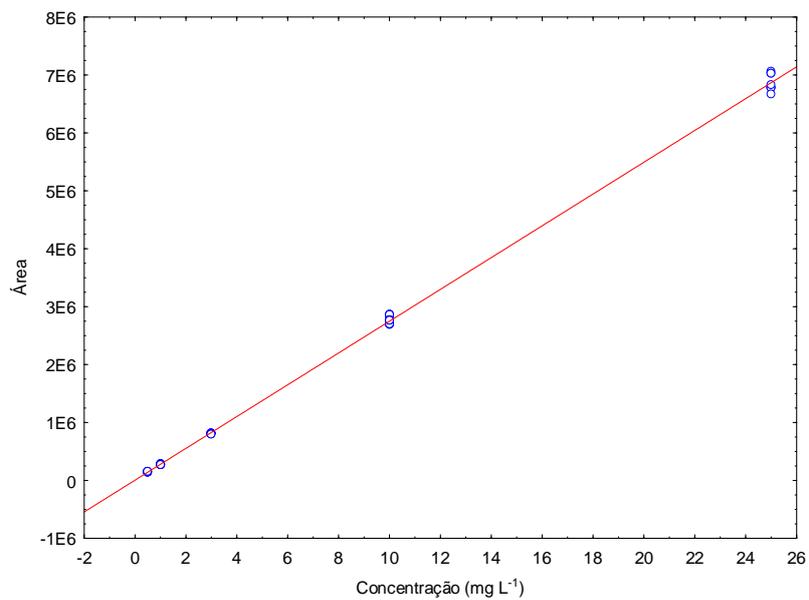


Figura 1.24: Curva analítica referente ao corante E133

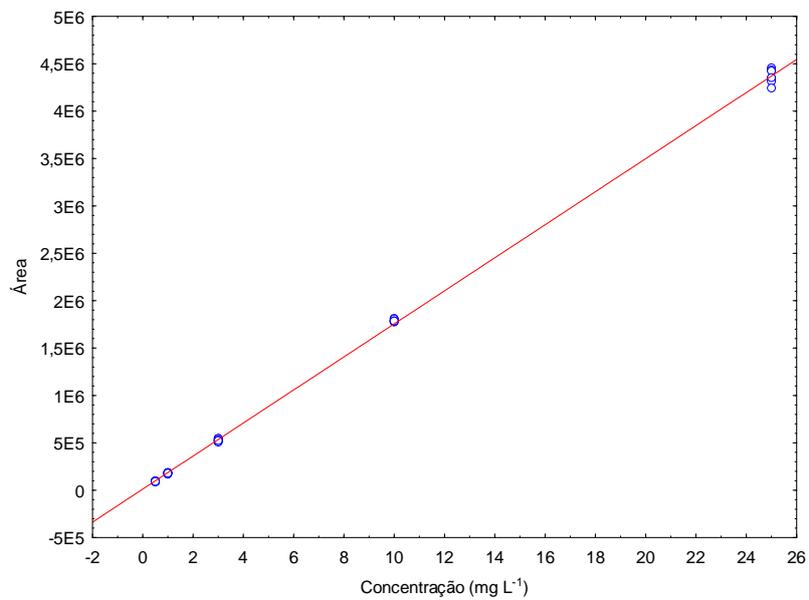


Figura 1.25: Curva analítica referente ao corante E143

## 7- REFERÊNCIAS

1. Iogurtes: mudando as embalagens para crescer. Acessado em: <<http://www.abre.org.br/noticias/iogurtes-mudando-as-embalagens-para-crescer/>>  
Acessado em: 26 de Novembro de 2013
2. BRASIL Nº 387 de 09 de Agosto de 1999. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/aditivos\\_bk.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/aditivos_bk.htm). Acessado em: 12 de Setembro de 2013
3. BRASIL Nº 386 de 05 de Agosto de 1999. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/aditivos\\_bk.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/aditivos_bk.htm). Acessado em: 12 de Setembro de 2013
4. Dossiê Corantes. *Food Ingredients Brasil* **9**, 40-59(2009). Disponível em: <http://revista-fi.com.br/edicoes/9/revista-food-ingredients-brasil-edicao-9>. Acessado em: 19 de Novembro de 2012
5. PRADO, M.A.; GODOY, H.T. **Corantes artificiais em alimentos**. Alimentos e Nutrição - *Brazilian Journal of Food and Nutrition*, **14**, 237-250(2003).
6. BONAN, S. et al. **Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector**. *Dyes and Pigments*, **99**, 36-40(2013).
7. ALVES, S.P. et al. **Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection**. *Food Chemistry*, **107**, 489-496(2008).
8. DOS SANTOS, M.E.; DEMIATE, I.M. & NAGATA, N. **Determinação simultânea de amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo em alimentos via espectrofotometria UV-VIS e métodos de calibração multivariada**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **30**, 903-909(2010).

9. EL-SHEIKH, A.H.; AL-DEGS, Y.S. **Dyes and Pigments Spectrophotometric determination of food dyes in soft drinks by second order multivariate calibration of the absorbance spectra-pH data matrices.** *Dyes and Pigments*, **97**, 330-339(2013).
10. PRADO, M.A. et al. **Validation of methodology for simultaneous determination of synthetic dyes in alcoholic beverages by capillary electrophoresis.** *Journal of Chromatography A*, **1136**, 231-236(2006).
11. LÓPEZ-MONTES, A.M. et al. **Identification of synthetic dyes in early colour photographs using capillary electrophoresis and electrospray ionisation ó mass spectrometry.** *Talanta*, **114**, 217-226(2013).
12. ZENEBON, O.; PASCUET, N.S. *Instituto Adolf Lutz -Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos - Capítulo IV - Procedimentos e determinações gerais.* 83 - 160(2005).
13. MIMIOTI, K.S.; SAKELLARIOU, C.F.; THOMAIDIS, N.S. **Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector.** *Analytica Chimica Acta*, **583**, 103-110(2007).
14. BRASIL Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Consulta publica N° 28 de 01 de Junho de 2000.*
15. BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - *INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 46, DE 23 DE OUTUBRO DE 2007.*
16. GAVA, A.J.; SILVA, C.A.; FRIAS, J.R. *Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações.* Editora Nobel: São Paulo, (2008).
17. BRASIL Instrução Normativa N° 36, de 31 de Outubro de 2000.
18. LAZARINI, C. Estabilização de iogurte e bebida láctea fermentada. at <[http://www.milknet.com.br/?pg=informativo\\_ler&id=61&local=1](http://www.milknet.com.br/?pg=informativo_ler&id=61&local=1)> Acessado em: 17 de Setembro de 2013

19. Processo de Fabricação do Iogurte. at <<http://www.danone.com.br/tudo-sobre-iogurte/processo-de-producao/>> Acessado em: 17 de Setembro de 2013
20. BRASIL *Diário oficial da união - Portaria N° 540, Regulamento técnico: Aditivos alimentares-definições, classificação e emprego, de 27 de Outubro de 1997.*
21. VELOSO, L.D. **Dossiê Técnico - Corantes e Pigmentos. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas - SBTR 1-38(2012).**at < <http://www.respostatecnica.org.br>> Acessado em: 25 de Junho de 2013
22. KUCHARSKA, M.; GRABKA, J. **A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes.** *Talanta*, **80**, 1045-1051(2010).
23. CONSTANT, P.B.; STRINGHETA, P.C.; SANDI, D. **Corantes Alimentícios.** *Boletim CEPPA* 203 - 220(2002). at <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/view/1248>> Acessado em: 12 de Setembro de 2013
24. BRASIL Resolução CNS/MS N° 04, de 24 de Novembro de 1988.
25. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Fundamentos de Cromatografia.* (Editora da Unicamp: Campinas - SP, 2010).
26. LANÇAS, F.M. *Cromatografia Líquida Moderna HPLC/CLAE.* Editora Átomo
27. KIRSCHBAUM, J. et al. Development and Evaluation of an **HPLC-DAD Method for Determination of Synthetic Food Colorants.** *Chromatographia*, **57**, 115-119(2003).
28. VIDOTTI, E.C.; COSTA, W.F.; OLIVEIRA, C.C. **Development of a green chromatographic method for determination of colorants in food samples.** *Talanta*, **68**, 516-521(2006).
29. SKOOG, D.A. et al. *Fundamentos da Química Analítica.* Ed.Thomson (2007).
30. YU, C. et al. **Comparison of dual solvent-stir bars microextraction and U-shaped hollow fiber ó liquid phase microextraction for the analysis of Sudan**

- dyes in food samples by high-performance liquid chromatography ó ultraviolet / mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1188**, 124-131(2008).**
31. QI, P. et al. **Interference-free simultaneous determination of Sudan dyes in chili foods using solid phase extraction coupled with HPLC-DAD. *Food Chemistry*, **125**, 1462-1467(2011).**
  32. NEVADO, J.J.; CABANILLAS, C.G.; SALCEDO, A.M. **Simultaneous determination of carminic acid, riboflavin, curcumin and erythrosine by derivative spectrophotometry and ratio. *Talanta*, **41**, 789-797(1994).**
  33. BARRINUEVO, W.; LANLAS, F. **Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. *Química Nova*, **24**, 172-175(2001).**
  34. NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. ***Como fazer experimentos*. (Editora da Unicamp: Campinas, 2007).**
  35. RIBANI, M. et al. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, **27**, 771-780(2004).**
  36. INMETRO ***Orientação sobre validação de métodos analíticos*. (DOQ-CGCRE-008 - Revisão 04 - Julho: 2011).**
  37. BRASIL, M. ***Guia de validação e controle de qualidade analítica*. (Brasília - DF, 2011).**
  38. PIMENTEL, M.F.; NETO, B.B. **Calibração: Uma Revisão para Químicos Analíticos. *Química Nova*, **19**, 268-277(1996).**
  39. DINÇ, E.; AKTAS, A.H.; USTUNDAG, O. **New liquid chromatographic-chemometric approach for the determination of sunset and tartrazine in commercial preparation. *Food Composition and Additives*, **88**, 1748-1755(2005).**

40. KISELEVA, M.G.; PIMENOVA, V.V.; ELLER, K.I. **Optimization of Conditions for the HPLC Determination of Synthetic Dyes in Food.** *Journal of Analytical Chemistry*, **58**, 685-690(2003).
41. ZOU, T. et al. **Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors.** *Food Chemistry*, **138**, 1742-1748(2013).
42. ALTINOZ, S.; TOPTAN, S. **Simultaneous determination of Indigotin and Ponceau-4R in food samples by using Vierordt's method , ratio spectra first order derivative and derivative UV spectrophotometry.** *Journal of Food Composition and Analysis*, **16**, 517-530(2003).
43. DOSSI, N. et al. **A capillary electrophoresis microsystem for the rapid in-channel amperometric detection of synthetic dyes in food.** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **601**, 1-7(2007).
44. PRADO, M.A.; GODOY, H.T. **Teores de corantes artificiais em alimentos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência.** *Química Nova*, **30**, 268-273(2007).
45. XAVIER, A.A. et al. **Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado.** *Química Nova*, **XY**, 1-6(2012).
46. LONG, C. et al. **A new liquid ó liquid extraction method for determination of 6 azo-dyes in chilli products by high-performance liquid chromatography.** *Food Chemistry*, **126**, 1324-1329(2011).
47. VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.D. **Espectrofotometria derivativa: uma estratégia simples para a determinação simultânea de corantes em alimentos.** *Química Nova*, **29**, 230-233(2006).

48. KARAOGLAN, G.K. et al. **Abilities of Partial Least-Squares (PLS-2) Multivariate Calibration in the Analysis of Quaternary Mixture of Food Colors (E-110, E-122, E-124, E-131).** *Chemometrics*, **40**, 1893-1903(2007).
49. TAVARES, M.F. **Eletroforese capilar: conceitos básicos.** *Química Nova*, **19**, 173 - 181(1996).
50. HUANG, H. et al. **Analysis of food colorants by capillary electrophoresis with large-volume sample stacking.** *Journal of Chromatography A*, **995**, 29-36(2003).
51. JAGER, A.V.; TONIN, F.G.; TAVARES, M.F. **Optimizing the separation of food dyes by capillary electrophoresis.** *Journal of Separation Science*, **28**, 957-965(2005).
52. ANVISA *Manual de boas práticas em biodisponibilidade e bioequivalência.* (2002). Disponível em:  
<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/bioequivalencia/publicacoes/index.asp>.  
Acessado em: 24 de Outubro de 2013
53. *International Standard - ISO 9231/IDF 139 - Milk and milk products - Determination of the benzoic and sorbic acid contents. English 9231*, (Switzerland, 2008).
54. StatSoft, Inc. (2008). STATISTICA (data analysis software system) Versão 8.0 [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
55. *International Standard - ISO 13496:2000(E) - Meat and meat products - Detection of colouring agents - Method using thin-layer chromatography.* (Switzerland, 2000).
56. ZENEBO, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. *Instituto Adolf Lutz - Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos.* (São Paulo, 2008).
57. VACHIRAPATAMA, N.; MAHAJAROENSIRI, J.; VISESSANGUAN, W. **Identification and Determination of Seven Synthetic Dyes in Foodstuffs and Soft Drinks on Monolithic C18 Column by High Performance Liquid Chromatography.** *Journal of Food and Drug Analysis*, **16**, 77-82(2008).

58. TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A.Z. **Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos.** *Ciência e tecnologia de Alimentos*, **21**, 310-313(2001).
59. COSTA, C.L.; CHAVES, M.H. **Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica.** *Química Nova*, **28**, 149-152(2005).

## Capítulo II

*Eletroforese capilar como método de preparação de amostras para caracterização de proteínas em aplicações proteômicas*

*1-Introdução, fundamentação teórica, revisão bibliográfica & objetivos*

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo da proteômica através do mapeamento de peptídeos vem crescendo ao longo das últimas décadas e a cada dia mais técnicas são utilizadas para o desenvolvimento desta ciência <sup>1</sup>. Devido a esse crescimento, o estudo da proteômica vem se desenvolvendo e vários métodos de análise para a elucidação de causas de diversas doenças fazendo com que o diagnóstico seja mais rápido e o tratamento mais eficaz <sup>2,3</sup>.

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica de separação muito eficiente e reprodutível para a análise de proteínas e peptídeos. A CE se destaca pela variedade de detectores os quais podem ser acoplados ao sistema como o espectrômetro de absorção molecular na região ultravioleta e visível (UV-Vis), o espectromêtro de massas (MS), a fluorescência induzida por laser (LIF), entre outros.

Para possibilitar a análise de proteínas em fluidos biológicos geralmente é necessário que seja realizado um tratamento prévio das amostras. Uma ferramenta que vem sendo amplamente usada é digerir as proteínas contidas nas amostras, por digestão química, térmica ou até mesmo uma combinação desses dois métodos <sup>4,5</sup>.

Após o processo de digestão se faz necessário realizar um mapeamento dos peptídeos gerados. Esse mapeamento é comumente realizado através de análises por espectrometria de massas, pois fornece informações sobre a massa molar das proteínas e peptídeos, facilitando assim a identificação de cada fragmento, ou seja, de cada peptídeo gerado.

Sendo assim, no presente trabalho foi desenvolvido um método de preparo de amostra que iniciou com o emprego da técnica de CE-UV/Vis para a separação das proteínas e fracionamento da amostra inicial com a finalidade de diminuir a quantidade de proteínas em cada fração. Considerando que em amostras reais de fluidos biológicos ou amostras de tecidos, é provável se encontrar uma grande quantidade de proteínas. Fazendo com que esta etapa de separação e fracionamento da amostra facilite a desnaturação e digestão das proteínas para a posterior análise por LC-ESI-MS.

O presente trabalho foi realizado em colaboração com o laboratório de eletroforese capilar na Universidade de Montreal no Canadá.

## **1.1. Fundamentação teórica**

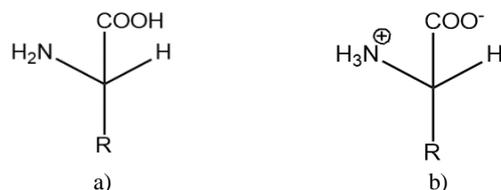
### **1.1.1. Proteínas, proteômica e mapeamento de peptídeos**

#### **1.1.1.1. Proteínas**

Proteínas são moléculas biológicas que possuem diferentes formas e funções. Participam de diversos processos biológicos, como o transporte de oxigênio (hemoglobina), são os principais formadores dos músculos e são responsáveis pela contração muscular (miosina e actina). Participam também do sistema imunológico (imunoglobulinas), do processo digestivo, através das enzimas e ainda são responsáveis pelo controle do metabolismo, agindo como hormônios (insulina) <sup>6</sup>.

Quimicamente as proteínas são polímeros formados por uma combinação dos 20 - aminoácidos existentes. Estes aminoácidos podem se polimerizar com comprimento variável de 40 a 34000 resíduos de aminoácidos. Os 20 tipos de cadeias laterais (R) geram os diferentes -aminoácidos e a forma com que esses se polimerizam constituem uma grande diversidade de proteínas ( $20^x$ , onde x é o número de aminoácidos da cadeia). Por exemplo, um dipeptídeo é formado por dois aminoácidos, ou seja, podem existir  $20^2 = 400$  combinações possíveis para se formar um dipeptídeo. Os aminoácidos são compostos que possuem um grupo amino ( $\text{óNH}_2$ ) e um grupo carboxila ( $\text{óCOOH}$ ). Os grupos formadores das proteínas quando expostos a condições de pH fisiológico (pH 7,4) encontram-se ionizados:  $\text{ó NH}_3^+$ ,  $\text{ó NH}_2^+$  ó e  $\text{ó COO}^\delta$ . Os aminoácidos possuem uma fórmula geral onde

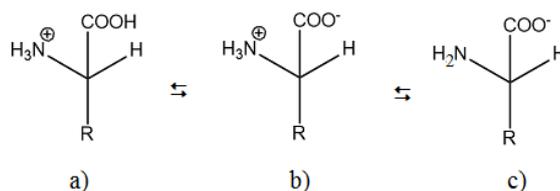
os grupos carboxila e amino são ligados a um carbono (carbono assimétrico) que também possuem um hidrogênio e um grupo R (cadeia lateral), como mostrado na Figura 2.1<sup>6,7</sup>.



**Figura 2.1:** Estrutura (a) geral e (b) Zwitteriônica dos  $\alpha$ -amoniácidos. A forma Zwitteriônica ocorre em pH fisiológico.

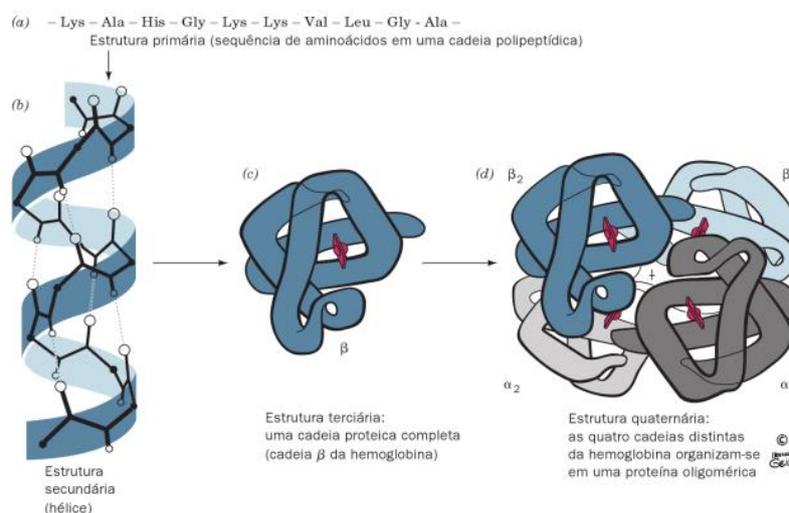
Os aminoácidos podem ser classificados como apolares e polares. Os primeiros são assim chamados, pois o grupo R são cadeias carbônicas de hidrocarbonetos, ou seja, não interagem com a água e situam-se internamente nas moléculas de proteínas. Já os aminoácidos polares, são divididos em polares com carga e sem carga elétrica líquida (hidroxila, tiol ou amida). São compostos hidrofílicos que interagem com a água e são comumente situados na superfície da molécula das proteínas<sup>6,7</sup>.

Um conceito importante no estudo das proteínas é o ponto isoelétrico (pI), que corresponde ao valor de pH onde a molécula de proteína está eletricamente neutra. Nesse ponto a proteína não tem fluxo eletroforético, quando submetida a um campo elétrico. Quando presentes em soluções ácidas e o pH do meio está abaixo do pI as proteínas apresentam-se carregadas positivamente, pois os grupos amino e carboxila são protonados pelo excesso de H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> do meio (Figura 2.2). A recíproca é verdadeira, pois quando uma proteína é disposta em pH básico ou acima do pI, esta adquire uma carga negativa devido a abundância de OH<sup>-</sup>, que desprotona os grupos amino e carboxila<sup>6,7</sup>.



**Figura 2.2:** Estruturas básicas das proteínas em: a) pH abaixo do pI, b) pH igual ao pI e em c) pH acima do valor do pI.

Estruturalmente as proteínas podem assumir quatro diferentes tipos: primária, secundária, terciária e quaternária. As proteínas com estrutura molecular primária possuem uma cadeia linear de aminoácidos ligados entre si por ligações covalentes chamadas de ligações peptídicas (Figura 2.3a). A estrutura secundária ocorre quando são formadas ligações de hidrogênio intermolecular, fazendo com que a proteína assumira a forma  $\alpha$ -hélice (Figura 2.3b). A estrutura terciária (Figura 2.3c) faz referência à conformação tridimensional da proteína que ocorre geralmente quando metais ou o enxofre (ponte de enxofre ou ligações de dissulfetos) presentes na molécula realizam ligações intermoleculares. Esse tipo de estrutura é dividida em duas diferentes classes, fibrosa ou globular. Já a estrutura proteica quaternária é formada quando várias estruturas terciárias se combinam entre si, formando uma nova proteína como é o caso da hemoglobina humana (Figura 2.3d). É importante conhecer os tipos de estruturas moleculares das proteínas para se avaliar alguma modificação estrutural, pois uma simples substituição de um aminoácido na molécula acarreta em mudanças, distorções na estrutura inicial da proteína, alterando sua forma e principalmente sua função. No metabolismo humano ou mesmo de animais esse fato pode ser uma indicação do metabolismo anormal de determinadas células ou hormônios, indicando uma provável enfermidade <sup>7</sup>.



**Figura 2.3:** Estruturas das proteínas (a)primária, (b)secundária, (c)terciária e (d)quaternária <sup>7</sup>.

### 1.1.1.2. Proteômica

Proteômica é a parte da ciência que estuda quali e quantitativamente as proteínas contidas em um fluido biológico com o objetivo de realizar o diagnóstico precoce ou o tratamento de diversos tipos de doenças incluindo câncer <sup>2</sup>. Os estudos que antecedem a proteômica é o projeto do genoma humano que vem se desenvolvendo desde a década de 1940 e que tem como ideia fundamental a sequência que envolve atualmente o estudo dos genes transcrição proteínas metabólitos. Os nomes atribuídos a estas etapas contêm os sufixos ãomaõ ou ãômicaõ que significam totalidade. Originando os nomes genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica <sup>1</sup>.

O estudo dos genes permite traçar o perfil molecular para identificar alterações do DNA e RNA. Porém, algumas informações importantes e complementares, como os processos que exprimem as funções e atividades das proteínas, para a identificação de uma anormalidade no metabolismo humano não são obtidas apenas pelo estudo do DNA e do RNA. Por isso, é de extrema importância que seja realizado um trabalho em conjunto entre

a genômica e a proteômica para se obter um diagnóstico ou tratamento mais rápido e eficaz das doenças <sup>1,2</sup>.

A tendência da ciência é fazer com que os dados clínicos sejam obtidos de forma rápida e menos invasiva possível, por isso a importância de analisar e buscar resultados satisfatórios a partir de fluidos ou mesmo de tecidos corporais saudáveis ou anormais.

É grande a riqueza de dados que podem ser obtidos através da análise das proteínas de um fluido ou tecido humano. Os diagnósticos podem vir através da presença de uma proteína incomum (agente externo, como bactéria, por exemplo) em um determinado metabolismo ou mesmo da identificação da modificação estrutural de uma proteína quando se compara o fluido de uma pessoa saudável ao de uma doente. Essa modificação pode se dar pela substituição de um peptídeo por outro na molécula de uma proteína <sup>8</sup>.

A anemia falciforme é uma enfermidade bastante comum e ocorre quando no gene de um indivíduo há uma troca da base Adenina pela Timina (A T). Ocasionalmente uma substituição do ácido glutâmico (Glu 6) pelo aminoácido Valina na molécula da hemoglobina <sup>9</sup>. Portanto, a identificação prévia desta proteína alterada no organismo humano, faz com que o diagnóstico e o tratamento sejam realizados com o objetivo de minimizar os danos à saúde do portador desta anomalia genética.

Existem várias técnicas utilizadas na proteômica como o uso de biomarcadores para proteínas ou a automatização na análise de vários tipos de amostras para a rotina clínica, que possibilita o diagnóstico rápido de doenças. Essas técnicas são classificadas como: proteômica do tipo *Top-down* ou *Bottom-up* <sup>2</sup>.

Na proteômica do tipo *Top-down* as proteínas passam por um processo de purificação e são analisadas sem sofrerem nenhuma alteração proposital, preservando as propriedades físico-químicas das moléculas, tais como peso molecular, pI, hidrofobicidade, estrutura, entre outras. Entretanto, análises dessas propriedades possuem limitada capacidade de quantificação. Já na proteômica *Bottom-up* também conhecida por *shotgun* as proteínas são fragmentadas, geralmente por um processo de digestão envolvendo enzimas, e é realizado um mapeamento dos peptídeos que constituía originalmente a molécula da proteína. As vantagens para esse método são a reprodutibilidade e a sensibilidade, mesmo para amostras

complexas como o soro sanguíneo. E como desvantagens ou limitações na proteômica do tipo *bottom-up*, um ou mais peptídeos podem ser perdidos no processo de preparo da amostra ou mesmo durante a análise <sup>1,2,10</sup>.

Ao longo dos anos, algumas técnicas vêm sendo usadas e aprimoradas para o estudo da proteômica. Dentre as mais utilizadas estão: a eletroforese em gel de poliacrilamida em 1D ou 2D, que consiste no acoplamento ao gel de dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida (SDS-PAGE) que separa as proteínas de acordo com o seu tamanho. Estas técnicas possuem algumas limitações em amostras com grande diversidade de proteínas em diferentes concentrações, pois as porções das proteínas em maior concentração, dificulta a migração das porções em menor concentração. Além de dificultar a extração das proteínas intactas do gel, para possibilitar a análise do tipo *top-down*. E tanto a eletroforese em gel em 1D quanto em 2D necessita da adição de um revelador, dentre os mais usados estão o Azul de Coomassie e o nitrato de prata, que tornam possível a visualização das bandas ou pontos referentes a cada proteína no gel <sup>2</sup>. Outra técnica utilizada para análise de proteínas é a Espectrometria de massas com ionização/dessorção a laser em superfície ionizada (SELDI-MS) que é eficiente (boa resolução do sinal) para a análise de proteínas com peso molecular abaixo de 20 kDa <sup>8</sup>. Uma outra técnica é a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS) que possibilita a separação e identificação de proteínas presentes em amostras de plasma sanguíneo e urina, porém as amostras precisam ser previamente digeridas, o que impossibilita a identificação de amostras com biomarcadores. Uma última e eficiente técnica é a eletroforese capilar acoplada ao espectrômetro de massas (CE-MS) que é capaz de separar e identificar eficientemente tanto as proteínas quanto seus peptídeos formadores e quando comparada a outras técnicas, por exemplo a LC, a eletroforese capilar é uma técnica mais simples, mais rápida, possui alta eficiência de separação e baixo consumo de solvente e de amostra <sup>11</sup>.

### 1.1.1.3. Mapeamento de peptídeos

Estudado pela primeira vez na década de 1950 por Vernon Ingran o mapeamento de peptídeos foi utilizado para explicar que a anemia falciforme ocorre devido a troca do Glu 6 Val em um dos peptídeos que constitui a hemoglobina, como foi previamente citado no item 1.1.1.2<sup>7,12</sup>.

A realização do mapeamento peptídico é possível devido as modificações (pós-traducionais) ou mutações que podem ocorrer nas proteínas causando uma substituição de peptídeos ou aminoácidos e ainda mudanças nas cargas dos peptídeos. Estas alterações ocasionam uma mudança no tempo de migração dos peptídeos, quando analisado por CE, por exemplo, ou causam uma relação massa/carga ( $m/z$ ) diferente no espectro de massas. Indicando que há alteração em uma determinada proteína originalmente conhecida<sup>11,12</sup>.

O mapeamento de peptídeos pode ser realizado utilizando HPLC, SDS-PAGE ou CE, ou seja, toda e qualquer técnica que permita realizar a separação dos peptídeos advindos de uma ou mais proteínas, depois de passado por um processo de digestão destas<sup>7</sup>.

Agregar essas técnicas a um método de preparo de amostra eficaz e aliar a isso a detecção por espectrometria de massas faz do mapeamento peptídico uma ferramenta eficaz, complementar ao estudo da proteômica. Os métodos de ionização mais utilizados para a espectrometria de massas são a ionização *eletrospray* (ESI) e a ionização/dessorção da matriz assistida por laser (MALDI). Onde o ESI é comumente usado em amostras líquidas como plasma, soro, urina e o MALDI é mais usado para amostras sólidas, como os tecidos, por exemplo. A análise por espectrometria de massas também proporciona o uso de biomarcadores nas proteínas para diferenciar células normais de células modificadas, por ser capaz de identificar esses compostos<sup>13</sup>.

### 1.1.2. Princípios básicos da técnica de eletroforese capilar

A eletroforese é uma técnica de separação de componentes de uma mistura, que foi descoberta por Arne Wilhelm Kaurin Tiselius durante a década de 1930 e lhe rendeu um prêmio Nobel de química no ano de 1948 por um trabalho pioneiro, onde ele realizou a separação de proteínas contidas no soro sanguíneo <sup>14,15</sup>.

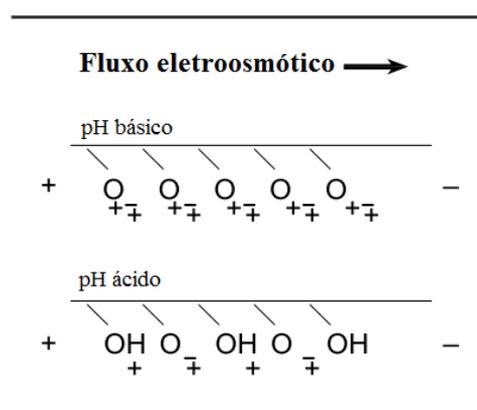
A partir das pioneiras pesquisas desenvolvidas por Tiselius os princípios da eletroforese evoluíram a cada década, mas apenas no início da década de 1980 que James Jorgenson e Krynyn Lukacs <sup>16</sup>, que são considerados os pioneiros a utilizar tubos finos de vidro com diâmetro interno de 75 µm para realizar a separação de compostos, introduziram a técnica da eletroforese capilar.

Por definição, a separação por eletroforese capilar (CE ó do inglês, *Capillary Electrophoresis*) ocorre quando espécies carregadas (íons ou compostos ionizáveis) migram através de um tubo quando sofrem influência de um campo elétrico <sup>14,15</sup>.

O uso de tubos cada vez mais finos, a chegar em dimensões capilares (15 ó 100 µm), foi uma excelente descoberta e facilitou a automatização desta técnica. O que seria extremamente difícil de ocorrer quando se utilizavam tubos largos em eletroforese, pois a passagem de corrente elétrica por um meio condutor causa um aumento na temperatura, gerado pela dissipação do calor pelas extremidades do tubo, fenômeno esse conhecido por efeito ou aquecimento Joule. Esse aquecimento gera gradientes de temperatura que podem ocasionar o fenômeno de convecção, fazendo com que os componentes da amostra se misturem continuamente e não cheguem a se separarem por completo, que é o objetivo da técnica. Sendo assim, quanto mais estreito for o diâmetro interno do tubo, mais rápido e eficiente será a separação dos componentes da mistura <sup>15</sup>.

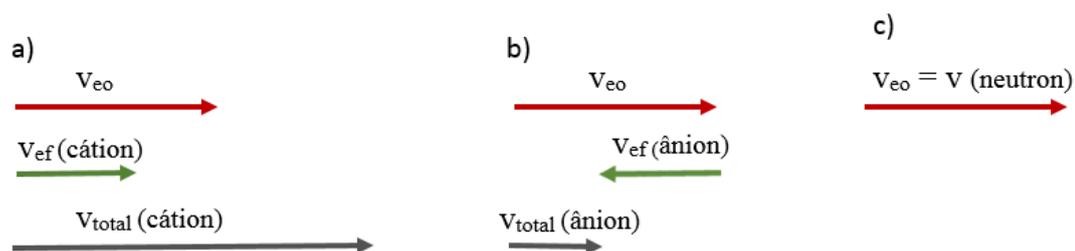
As separações em CE se baseiam na presença do fluxo eletrosmótico (FEO), que consiste num fluxo eletricamente induzido. O FEO é um princípio muito importante na eletroforese capilar é gerado devido ao fenômeno da eletrosmose, que é oriundo das cargas elétricas nas paredes do capilar. Os capilares geralmente utilizados em CE são os de

sílica fundida, esta por sua vez possui um pI de 1,5, portanto, qualquer valor de pH acima deste pI (na solução tampão) fará a superfície do capilar ficar carregada negativamente ( $\text{SiOH} \rightleftharpoons \text{SiO}^- + \text{H}^+$ ). Sendo assim, em meio aquoso a superfície do capilar carregada com cargas negativas atrairá as cargas positivas da solução, formando uma dupla camada elétrica. Fazendo com que o FEO esteja sempre direcionado do ânodo (+) para o cátodo (-) (Figura 2.4) <sup>15,17</sup>.



**Figura 2.4:** Efeito do pH no fluxo eletrosmótico. Adaptado de <sup>17</sup>.

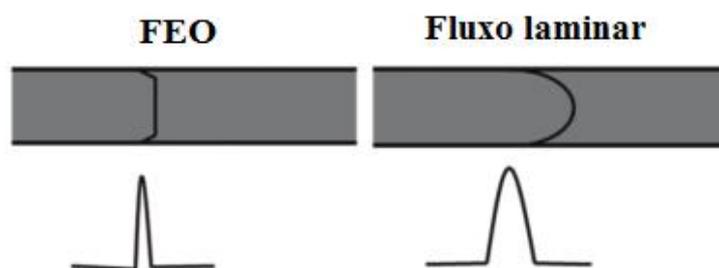
Esse fenômeno tem uma implicação direta na velocidade eletroforética ( $v_{ef}$ ), que é a velocidade dos íons durante a migração, como mostrado no esquema de vetores na Figura 2.5 <sup>15,17</sup>.



**Figura 2.5:** Composição dos vetores da velocidade eletrosmótica ( $v_{eo}$ ) e da velocidade eletroforética ( $v_{ef}$ ). a) Soma vetorial da velocidade total do cátion, b) soma vetorial da velocidade total do ânion e c) velocidade do nêutron.

Em resumo pode-se observar que a  $v_{ef}$  do cátion é maior que a  $v_{ef}$  do ânion e que a velocidade de um composto neutro é igual a velocidade eletroosmótica ( $v_{eo}$ ) ou seja, este migrará na mesma direção e velocidade do fluxo eletroosmótico. Se não existisse o FEO o composto neutro não migraria pelo capilar <sup>16</sup>.

O tipo de fluxo que é gerado dentro do capilar favorece a eficiência desta técnica, pois o FEO possui o perfil linear da velocidade eletroosmótica. Por outro lado, se o fluxo gerado fosse induzido por pressão no capilar, seria um fluxo laminar (Figura 2.6). Essa diferença tem uma implicação direta na altura e definição do sinal gerado no eletroferograma <sup>15,18</sup>.



**Figura 2.6:** Perfil do FEO e do fluxo laminar em um capilar e suas conseqüências na distribuição do sinal <sup>18</sup>.

Algumas propriedades podem ser manipuladas para controlar o FEO e aprimorar a eficiência da análise, tais como: alterar o pH, a concentração e a força iônica da solução tampão, trocar o tipo de tampão, mudando assim o tipo de eletrólito da solução ou mesmo alterar a temperatura do sistema <sup>15</sup>.

Assim como as propriedades citadas anteriormente para aprimorar a eficiência da análise por CE, uma outra propriedade também é muito importante e desta muitas vezes depende da viabilidade de se obter uma resposta da análise em questão. Essa propriedade é o estudo da superfície interna do capilar. O capilar de sílica fundida que é usado na CE, como foi a pouco citado, possui na sua superfície grupos silanóis que em meio aquoso, adquirem cargas podendo adsorver as proteínas, inviabilizando a análise. Essa adsorção é indesejável, pois causa diminuição na resolução do sinal, devido ao alargamento das

bandas. Para tanto, alguns artifícios são usados para minimizar essa atração, que são: um mecanismo estático, onde é aderido um revestimento na parede interna do capilar e o outro é um mecanismo dinâmico, em que é utilizada uma solução tampão com valores extremos de pH ou um aditivo para minimizar a interação entre as proteínas e a parede do capilar<sup>19, 20,21</sup>.

No mecanismo estático é realizada uma modificação química na parede do capilar, aderindo um revestimento que altera as propriedades químicas da superfície, minimizando a adsorção das proteínas nas paredes. Por outro lado, os revestimentos comumente usados (polibreno ou poli(dimetilacrilamida), por exemplo) não possuem a robustez necessária que a técnica exige. Pois estes, tem um curto tempo de vida útil, podendo se desprender da parede do capilar, popularmente conhecido como sangramento do capilar, chegando a contaminar a amostra. Podem ainda causar alargamento de banda, calda nos picos e variação no tempo de migração<sup>5,22</sup>.

Já no mecanismo dinâmico o uso de solução tampão para o controle do pH é largamente usado, pois em um valor específico de pH é possível controlar tanto a carga da proteína quanto o FEO. Com isso, pode-se entender que causar uma modificação temporária nas características químicas da parede do capilar utilizando soluções tampão em valores extremos de pH é uma forma menos laboriosa de minimizar ou excluir a adsorção das proteínas ou peptídeos pela sílica. Entretanto, em valores extremos de pH a estrutura da proteína pode ser alterada ou mesmo ocorrer a lise (quebra) da molécula, acarretando no aparecimento de múltiplos sinais. Outra dificuldade é que em pH superior a 11 pode ocorrer dissolução da sílica e com isso a parede interna do capilar é danificada, inviabilizando o uso do mesmo. O ideal é se trabalhar em um valor de pH acima do pI das proteínas em questão, pois nessas condições tanto a parede do capilar quanto a proteína estarão carregadas negativamente, o que ocasiona uma repulsão entre estas. Entretanto, nessas condições as proteínas com cargas negativas são direcionadas para o ânodo pelo FEO, o que acarreta numa repulsão que é vencida pela força do FEO que é elevada em valores altos de pH. Porém, isso pode causar um maior tempo de migração do analito<sup>15,19,21</sup>.

Já quando se trabalha com pH ácido e abaixo do pI das moléculas, estas ficam positivamente carregadas. Essa é uma condição adequada para a análise de peptídeos, pois

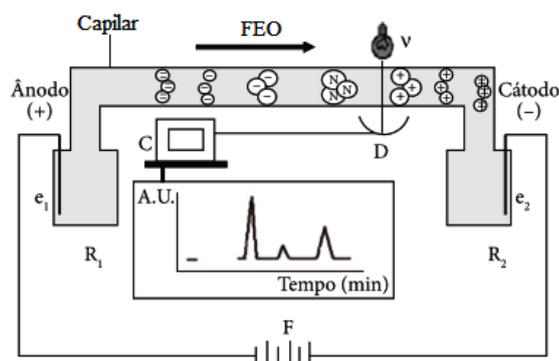
a quantidade de cargas existentes é muito menor que a das proteínas. Sendo assim, a força de atração entre a parede do capilar (ó) e o peptídeo (+) é menor que a força do FEO e este consegue conduzir os peptídeos em direção ao cátodo.

Tão importante quanto conhecer e controlar o pH da solução tampão é determinar sua concentração. A faixa de concentração geralmente utilizada em CE varia de 5 a 200 mmol L<sup>-1</sup> e é inversamente proporcional ao pH. Ou seja, quanto maior o pH, menor deve ser a concentração da solução tampão, em geral. Os extremos de concentração não são aconselhados, pois em baixas concentrações o FEO pode se tornar inconstante, dificultando assim a reprodutibilidade do tempo de migração. E quando se utiliza altas concentrações pode ocasionar excesso de calor no sistema (efeito Joule), comprometendo a eficiência da separação.<sup>21</sup>

### 1.1.2.1- Instrumentação geral

A técnica da eletroforese capilar pode ser aplicada de diferentes formas: eletroforese capilar com focagem isoelétrica (CIEF), isotacoforese capilar (CITP), cromatografia capilar eletrocínica micelar (MECC), electroforese capilar em gel (CGE) e eletroforese capilar de zona (CZE), também conhecida como CE em solução livre. O CZE é o mais comumente usado modo de CE por ser mais simples instrumentalmente e por causa da sua eficiência e elevada resolução<sup>3,17,23</sup>.

Os componentes físicos (Figura 2.7) que compõe um equipamento de CE são basicamente dois reservatórios contendo o eletrólito adequado (R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>), um sistema de injeção, um capilar com determinado diâmetro interno (podendo ser internamente revestido ou não), uma fonte de alta tensão (F) operando com até 30 kV de voltagem, um detector (D), um par de eletrodos (e<sub>1</sub> e e<sub>2</sub>), todo o sistema é acoplado a um computador (C) contendo um software que possibilita a aquisição e o tratamento dos dados<sup>18</sup>.



**Figura 2.7:** Representação esquemática básica de um equipamento de eletroforese capilar <sup>18</sup>.

Os capilares usados em CE podem ser de Teflon<sup>®</sup> ou sílica fundida, sendo este último o mais utilizado. Para proporcionar maleabilidade e resistência, o capilar é revestido externamente por um polímero (poliimida ou poliacrilato, por exemplo). Como os capilares são revestidos se faz necessário abrir uma janela no capilar removendo parte desse revestimento por aquecimento, na altura do detector para que a luz ou feixe óptico (a depender do tipo de detector) possa atravessar o capilar e detectar o analito.

Os capilares de sílica fundida podem ser usados com ou sem revestimento interno, dependendo do objetivo da análise. Cada tipo tem suas particularidades, como já foi explicado anteriormente. Para revestir internamente os capilares são usados polímeros hidrofílicos que são ligados nas terminações Si-OH presentes na sílica <sup>5,24,25</sup>.

Existem basicamente dois modos de injeção de amostra em CE. A injeção hidrodinâmica e a eletrocinética que também é chamada de eletromigração. O primeiro modo de injeção é baseado na diferença de pressão (por pressurização, por vácuo ou por gravidade) que é aplicada entre o reservatório da amostra e o capilar. O volume de amostra que é injetado desta forma pode ser calculado através da Equação 1, podendo variar entre 1 e 50 nL <sup>18</sup>.

$$V_{inj} = \frac{\Delta P d^4 \pi t_{inj}}{128 \eta L} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$\Delta P$  = pressão aplicada no capilar

$d$  = diâmetro interno do capilar

$t_{inj}$  = tempo de injeção

$\eta$  = viscosidade da amostra

$L$  = comprimento total do capilar

Esse modo de injeção é apropriado para análises quantitativas e para amostras desconhecidas, por não ser seletivo e ser bem representativo da composição e concentração dos componentes da amostra.

Já na injeção eletrocinética, um gradiente de potencial é aplicado em todo o capilar por um determinado intervalo de tempo. Ou seja, a quantidade de amostra injetada ( $Q$ ) no capilar depende da mobilidade eletroforética do analito, do FEO e da condutividade da amostra (Equação 2).

$$Q = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) V \pi r^2 C t_{inj}}{L} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

$\mu_{ep}$  = mobilidade eletroforética

$C$  = concentração do analito

$\mu_{eo}$  = mobilidade eletroosmótica

$t_{inj}$  = tempo de injeção

$V$  = voltagem

$L$  = comprimento total do capilar

$r$  = raio interno do capilar

Esse modo de injeção é seletivo e não representa bem todos os componentes da amostra, sendo mais indicado para amostras conhecidas ou para amostras com interferentes. É obrigatoriamente usado em CE em gel, pois nesta técnica é impossível realizar a transferência de volumes da amostra como é feito na injeção hidrodinâmica.

### **1.1.2.2- Modos de detecção**

Dentre as técnicas de separação existentes na atualidade como a cromatografia líquida ou até mesmo as técnicas eletroforéticas em gel, por exemplo, a eletroforese capilar tem um diferencial, pois necessita de uma menor quantidade de amostra, consome bem menos solventes e em geral tem um tempo de análise menor. Além da adaptabilidade com vários sistemas de detecção como: absorção no UV-Vis, condutividade, fluorescência, métodos eletroquímicos, espectrometria de massas, entre outros. Tornando a CE uma técnica com alta sensibilidade e reprodutibilidade frente as outras técnicas <sup>18</sup>.

Os detectores mais utilizados em CE para o estudo da proteômica são o espectrômetro de absorção molecular na região UV-Vis e o espectrômetro de massas, devido às características dos analitos em questão que permitem a detecção por esses tipos de detectores. As proteínas possuem duplas ligações conjugadas, que caracterizam os grupos cromóforos que é a característica primordial para que um composto seja detectado por um espectrômetro UV-Vis. E para um composto ser detectado por espectrometria de massas este precisa ser ionizado e vaporizado sem perder suas características químicas, etapas que são viáveis às proteínas e peptídeos <sup>26</sup>.

A detecção por espectrometria de absorção na região do UV-Vis acoplada a técnica de eletroforese capilar obedece a Lei de Lambert-Beer (Equação 3), assim como a técnica de HPLC. Sendo que para a CE a sensibilidade da detecção é inferior se comparado com o uso deste detector pela HPLC, devido a diminuição do caminho óptico que em CE é da ordem de  $\mu\text{m}$  e em HPLC é  $\text{mm}$ . Desta forma, o feixe de luz deve ser precisamente focalizado, para que o mínimo de luz seja dispersa <sup>18</sup>.

$$A = b C$$

Equação 3

Onde:

A = Absorbância

C = concentração molar

= absorptividade molar

b = caminho óptico

A detecção no UV-Vis pode ser realizada direta ou indiretamente. Na primeira forma os analitos absorvem na região de detecção e se utiliza preferencialmente um eletrólito que não absorva na mesma região do analito. Pois assim, o sinal será equivalente apenas a absorbância da espécie analisada. Já a detecção indireta é utilizada quando as espécies possuem fraca absorção ou não absorvem na região do UV-Vis. Nesses casos é necessário que o eletrólito de corrida possua ao menos uma espécie que tenha um grupo cromóforo. Este modo de detecção é geralmente utilizado para análise de cátions e ânions inorgânicos, amins de cadeia curta, ácidos carboxílicos e alguns aminoácidos<sup>18</sup>.

Na Tabela 2.1 estão listados alguns tipos de detectores usados em CE e seus limites de detecção<sup>15,18</sup>.

**Tabela 2.1:** Tipos de detectores usados em CE e seus limites de detecção.

Modo de detecção	Limite de detecção (mol L <sup>-1</sup> )
Absorbância UV-Vis	
direto	10 <sup>-5</sup> ó 10 <sup>-7</sup>
indireto	10 <sup>-4</sup> ó 10 <sup>-5</sup>
Fluorescência	10 <sup>-13</sup> ó 10 <sup>-16</sup>
Amperométrico	10 <sup>-7</sup> ó 10 <sup>-10</sup>
Conducométrico	10 <sup>-7</sup> ó 10 <sup>-9</sup>
Espectrometria de massas	10 <sup>-4</sup> ó 10 <sup>-10</sup>

O acoplamento da espectrometria de massas como sistema de detecção para a técnica de eletroforese capilar vem sendo aplicado há mais de 20 anos. Esta fusão se fez possível

devido à alta eficiência e poder de resolução da CE aliados a alta sensibilidade e grande diversidade de espécies analisáveis pela espectrometria de massas, se comparada a outros tipos de detectores. Os detectores UV-Vis e de fluorescência, por exemplo, fornecem pouca informação sobre a estrutura química das espécies estudadas <sup>26</sup>.

A etapa mais importante na análise por MS é a ionização das espécies, pois se esta etapa for ineficiente a detecção não é possível. Existem alguns modos de ionização, dentre eles estão: a ionização/dessorção de matriz assistida por laser (MALDI), a ionização por impacto de elétrons (EI), a ionização química (CI), a ionização por *electrospray* (ESI), entre outros. Um dos mais simples e muito utilizado é o ESI, por necessitar apenas de uma fonte de alta tensão (1000 ó 7000 V) em contato com a amostra. Neste tipo de ionização é formado um *spray* eletrostático, onde as pequenas gotas formadas são carregadas e formam os íons. Um grande proveito deste tipo de ionização frente as outras é que a dessolvatação dos íons formados acontece paulatinamente a temperaturas que variam de 25 ó 80 °C. Desta forma a geração de fragmentos ou moléculas ionizadas como subprodutos é inexistente. Isso garante que os íons formados em fase gasosa preservem suas estruturas, o que é ideal para estudos de especiação química <sup>26</sup>.

## 1.2. Revisão bibliográfica

O estudo da proteômica utilizando como ferramentas o mapeamento de peptídeos vem se desenvolvendo a cada ano e a grande diversidade de pesquisadores nesta área faz com que hajam várias linhas de pesquisas. Alguns autores preferem trabalhar com capilares revestidos internamente e muitos desenvolvem a cada dia novos revestimentos e processos para revestir mais eficientemente esses capilares. Outros preferem trabalhar com capilares sem revestimento interno, manipulando a parede do capilar de forma reversível. Na atualidade são poucos os trabalhos para o estudo da proteômica por CE em que se utilizam capilar sem revestimento. E esse foi o desafio do presente trabalho, mostrar que é possível de forma simples realizar grandes descobertas na área da proteômica.

Um dos trabalhos pioneiros na área de proteômica utilizando a eletroforese capilar como técnica de análise, foi o de Jorgenson e Lukacs <sup>16</sup>. Neste trabalho, os autores analisaram aminoácidos e dipeptídeos de uma forma rústica se comparada as avançadas tecnologias da atualidade. Eles usaram um tubo de vidro de 80 ó 100 cm de comprimento total, 75 µm de diâmetro interno (d.i.) e 550 µm de diâmetro externo (d.e.). Essas dimensões foram necessárias para possibilitar seu resfriamento, melhorando assim a eficiência da separação. O detector utilizado foi de fluorescência (*on-column*) com uma lâmpada com arco de mercúrio a alta pressão construído pelos autores. O eletrólito utilizado foi a solução tampão fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup> a pH 7 (que ficavam contidos em béqueres), sob tensão de +30 kV. Os autores conseguiram separar aminoácidos básicos, neutros e ácidos em 25 minutos. Também foi analisada uma amostra de urina humana em que eles adicionaram um marcador químico e detectaram alguns compostos. Porém não foram capazes de identificá-los, possivelmente devido às limitações da técnica e do detector utilizado na época. Mesmo assim os autores desde já comprovaram a eficiência da técnica em analisar amostras reais.

Uma das limitações da técnica de eletroforese capilar, quando utiliza-se o detector UV-Vis, é o limite de detecção que é da ordem de 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. Esta concentração pode ser considerada relativamente alta quando se trata da análise de alguns fluidos biológicos. Com o objetivo de propor uma solução para esta problemática Bonneil e Waldron <sup>12</sup> propuseram um método para separar e identificar peptídeos da cadeia B da insulina, citocromo C e -caseína. As etapas do método consistia primeiramente da digestão das proteínas, seguida da pré-concentração, separação e detecção dos peptídeos extraídos. Todas essas etapas ocorreram em linha e em um intervalo de tempo de quatro horas. Para tanto, os autores utilizaram um tampão de fosfato de sódio com pH de 2,5. Para a pré-concentração dos peptídeos foi utilizado um pré-concentrador de C18 e as espécies foram desorvidas com uma mistura de acetonitrila:tampão fosfato, 90:10 (v/v). Foram avaliados capilares de vários diâmetros interno e comprimento total, sendo o de 75 µm (d.i.), 45 cm comprimento total e 30 cm de comprimento efetivo o que obteve o melhor resultado. O método desenvolvido apresentou boa reprodutibilidade, e o pré-concentrador era reutilizável. Porém o método obteve baixa resolução se comparada a métodos convencionais de CE. Apesar das limitações, com o método proposto foi possível

quantificar peptídeos em concentrações de 50 ó 100 nmol L<sup>-1</sup> e o fator de pré-concentração das amostras foi de 800 vezes.

Uma linha de pesquisa que cresce a cada dia para aprimorar o diagnóstico ou tratamento de doenças com o estudo da proteômica utilizando CE é introduzir e avaliar a eficiência de revestimentos internos no capilar para minimizar o processo de adsorção das proteínas e peptídeos nestes e também o desenvolvimento de digestores que antecedem a análise por CE.

Migneault e colaboradores <sup>22</sup> avaliaram dois métodos para imobilizar a enzima tripsina e criar um micro-reator para realizar a digestão da proteína hemoglobina humana. Em um dos métodos, os autores imobilizaram a tripsina utilizando o glutaraldeído, realizando um acoplamento covalente com um vidro poroso servindo como suporte sólido. No outro método, foi realizado uma reação de ligação cruzada sem a utilização de suportes sólidos. As separações dos peptídeos foram realizadas por CZE com 15 kV a 25 °C e o detector de UV-Vis operando a 200 nm. Para tanto os autores usaram um capilar de sílica fundida com 50 µm (d.i.), 360 µm (d.e.), 50 cm de comprimento efetivo (até o detector) e 60 cm de comprimento total, para realizar a imobilização da tripsina. Uma solução de fosfato de sódio de 50 mmol L<sup>-1</sup> e pH 2,5 foi usada como tampão. Os peptídeos obtidos pelos dois métodos de imobilização também foram analisados por MALDI-MS. Dentre os parâmetros usados na avaliação da eficiência de cada método de imobilização como o número de etapas, o pH de atuação, entre outras, fizeram com que os autores concluíssem que os melhores resultados foram obtidos com o método que utilizava o suporte sólido, através do acoplamento covalente controlado por vidro poroso. Isso ocorreu devido a sua ampla área superficial que possibilitava o contato entre a enzima e a proteína o que permitiu que a digestão da proteína ocorresse em quatro horas, um tempo reduzido se comparado com as 24 horas necessárias para a digestão por tripsina livre em solução.

Ghfourifar e colaboradores <sup>5</sup> imobilizaram a enzima quimotripsina por reticulação polimérica ou também conhecido por método da ligação cruzada com glutaraldeído para a produção de partículas poliméricas. O capilar de sílica fundida foi preenchido com as partículas poliméricas e este serviu como um microreator para a digestão das seguintes proteínas: mioglobina, albumina de soro bovino (BSA) e caseína bovina. Em seguida, o

mapeamento dos peptídeos dessas proteínas foi realizado por CE-MS (mioglobina), CE-UV (BSA) e CE-LIF (caseína bovina). A digestão ocorreu durante 30 minutos a 37 °C. Dentre os peptídeos da mioglobina que foram coletados, 17 foram identificados por CE-MS. Um dos objetivos dos autores é acoplar esse microreator a diferentes técnicas de separação, acredita-se que por esse motivo eles analisaram apenas uma proteína por vez em três equipamentos diferentes.

Zhu e colaboradores <sup>27</sup> desenvolveram um método de polimerização térmica para revestir internamente um capilar para separação de proteínas e peptídeos por eletroforese capilar de zona com ionização por eletrospray e detecção por espectrometria de massas (CZE-ESI-MS). Os autores utilizaram como revestimento o polímero poliacrilamida linear (LPA) que é largamente usado para esta finalidade e compararam a eficiência deste com capilares revestidos também com LPA comerciais. Para avaliar a eficiência do capilar revestido em desenvolvimento os autores analisaram: uma mistura de quatro proteínas ( - lactoglobulina, citocromo-C, mioglobina e anidrase carbônica), os peptídeos digeridos da BSA e um anticorpo intacto. O novo capilar com LPA permaneceu estável por 97 análises consecutivas e se manteve depois de ser armazenado durante 50 dias, para a análise dos peptídeos da BSA. Os autores compararam o desempenho do capilar comercial e do preparado em laboratório e concluíram que o desenvolvido por eles obteve uma melhor eficiência de separação frente ao comercial.

Lin e colaboradores <sup>3</sup> desenvolveram um método por CZE-UV para determinação de cadeias de globina (longo polipeptídeo composto de mais de 100 aminoácidos) e variantes da hemoglobina para associar as propriedades dessas proteínas a uma doença chamada talassemia, uma enfermidade autossômica recessiva do sangue que é hereditária. Para isso, os autores compararam amostras de sangue de pessoas doentes ao de pessoas saudáveis. Para a análise por CZE-UV foi utilizado um capilar de sílica fundida de 50 µm, sem revestimento interno, com 70 cm de comprimento total, a 25 °C e operando com 16 kV de voltagem. O detector UV estava ajustado para medições a 214 nm. Fosfato de sódio 100 mmol L<sup>-1</sup> a pH 2,14 foi usado como tampão. As amostras de sangue necessitaram de um prévio tratamento para serem injetadas no equipamento de CZE-UV. Os autores constataram que as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$  de amostras de pessoas saudáveis tiveram um tempo de

migração menor que as de portadoras da doença. Os autores concluíram que o método proposto é rápido e simples, pois utiliza capilar sem revestimento, mas conta com o uso de soluções tampão altamente ácidas para minimizar a adsorção das proteínas também altamente ácidas no capilar. Métodos mais simples, menos laboriosos possuem uma tendência maior a aplicação clínica para diagnósticos.

## **1.3. Objetivos**

### **1.3.1. Objetivos Gerais**

Desenvolver um método de preparo de amostras de proteínas através do fracionamento da amostra inicial, por eletroforese capilar, resultando em sub-misturas de complexidade reduzida para posterior análise por espectrometria de massas e estudos de proteômica.

### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- ❖ Desenvolver a separação de proteínas por CE-UV/Vis,
- ❖ Avaliar o uso de três diferentes condições de pré e pós condicionamento, com distintas soluções tampão;
- ❖ Realizar um procedimento de coleta de frações e identificar cada proteína em cada fração por LC-ESI-MS;
- ❖ Digerir as proteínas em cada fração com quimotripsina livre em solução e realizar mapeamento peptídico por CE-UV e LC-ESI-MS.

## 2- EXPERIMENTAL

### 2.1- Materiais e Reagentes

Mioglobina (Mio) de coração de cavalo, albumina de soro bovino (BSA) de coração de cavalo,  $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -lactoglobulina A e B (LGB), hemoglobina humana (Hemo),  $\alpha$ -quimotripsina (CT) de pâncreas bovino de tipo II, Trizma base (tris [hidroximetil] amino-metano, Tampão Tris), fosfato de sódio monobásico mono-hidratado, fosfato tribásico de sódio dodeca-hidratado e ácido bórico foram todos da Sigma Aldrich (St-Louis, MO, EUA). O ácido fosfórico utilizado foi da Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canadá). O ácido clorídrico e a acetonitrila foram da EM Science (Darmstadt, Alemanha). Hidróxido de sódio e acetona foram da Fisher Scientific. Borato de sódio da A&C (Montréal, QC, Canadá). *Vials* de 2,5 mL polipropileno, com diâmetro 6 x 29 mm da Life Science (Canadá) foi usado para a disposição dos eletrólitos e amostras em todos os experimentos. Também foi utilizado um filtro de nylon com membrana de 0,22  $\mu$ m da Cameo.

### 2.2- Equipamentos

Foi utilizado um equipamento de eletroforese capilar (CE) da Agilent (Alemanha) modelo G1600AX equipado com detector UV-Vis com arranjo de fotodiodos (PDA). O software utilizado para a aquisição dos dados foi o ChemStation B.03.03 SW. A separação dos analitos foi realizada em um capilar de sílica fundida (75  $\mu$ m diâmetro interno ID, 360  $\mu$ m diâmetro externo OD) da Polymicro Technologies (Phoenix, Arizona, USA). O comprimento total ( $C_T$ ) do capilar foi de 50 cm e o comprimento até o detector ( $C_D$ ) foi de 42 cm.

Um pHmetro da Fisher Scientific accumet<sup>®</sup> model 20, uma centrífuga a vácuo Savant Speed Vac SC 110 (EUA), uma incubadora de banho seco da Fisher Scientific, uma outra incubadora de banho seco da Fisher Scientific Isotemp 125D, uma mini centrífuga da Costar model 10, um agitador vortex da Barnstead Thermolyne 16700 Mixer, um marcador de janela da MicroSolv CE foram utilizados no presente trabalho.

## **2.3- Soluções**

Todas as soluções foram preparadas usando água purificada (resistividade 18,2 MW.cm) obtida em sistema Milli-Q, Millipore (Bedford, MA, EUA) .

Foram preparadas soluções de: NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> e 0,1 mol L<sup>-1</sup>, HCl 1 mol L<sup>-1</sup> e 0,1 mol L<sup>-1</sup>. As soluções dos eletrólitos foram preparadas segundo a equação de Hendersonó Hasselbalch, tampão fosfato 25 mmol L<sup>-1</sup> (pH 2,5; 6,8; 11,3), tampão borato 25 mmol L<sup>-1</sup> (pH 10), tampão tris 100 mmol L<sup>-1</sup> e 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8,3).

## **2.4- Separação de proteínas e peptídeos por CE**

### **2.4.1- Condicionamento do capilar**

#### **2.4.1.1- Capilar novo**

O condicionamento de um capilar novo se faz necessário para que ocorra a ativação do capilar e consiste na lavagem com as seguintes soluções: fluxo de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> durante 20 minutos, seguido de fluxo de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> durante 10 minutos e de solução tampão

por 10 minutos, finalizando com fluxo de lavagem com água por 5 minutos e ar por 5 minutos. Todas as lavagens foram realizadas a uma pressão de 950 mbar.

#### **2.4.1.2- Capilar usado (condicionamento diário)**

Para a ativação diária do capilar usado, foram desenvolvidos dois métodos, um ácido e um básico. O método ácido era utilizado quando eram analisados peptídeos ou aminoácidos e o condicionamento se dava da seguinte forma: fluxo de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> durante 20 minutos, fluxo de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> durante 10 minutos, fluxo de água por 10 minutos seguido de fluxo da solução tampão ácida durante 10 minutos.

Já o condicionamento para o método básico que era utilizado para a análise de proteínas consistiu da lavagem com fluxo de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> durante 20 minutos, fluxo de água por 10 minutos seguido da solução tampão básica durante 10 minutos.

#### **2.4.2- Avaliação do método de separação dos analitos**

Antes e após cada injeção da amostra era necessário a lavagem do capilar para retirar quaisquer resquícios da amostra anterior que porventura tenham ficado aderidos a superfície do capilar. Dois métodos de condicionamento entre as análises foram avaliados e estão apresentados na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2:** Parâmetros de condicionamento do capilar para o desenvolvimento do método de separação das proteínas e dos peptídeos por CE-UV.

	Proteínas			Peptídeos	
	Ação	Método 1a	Método 2a	Método 1b	Método 2b
<b>Pré-condicionamento</b>	Fluxo	NaOH 0,1 molL <sup>-1</sup> , 2 min	NaOH 0,1 molL <sup>-1</sup> , 3 min	HCl 1 molL <sup>-1</sup> , 3 min	HCl 0,1 molL <sup>-1</sup> , 3 min
	Fluxo	H <sub>2</sub> O, 2 min	Tampão, 3 min	Tampão, 3 min	Tampão, 3 min
	Fluxo	Tampão, 3 min			
<b>Injeção</b>	Pressão	Amostra, 5 s	Amostra, 5 s	Amostra, 5 s	Amostra, 5 s
	Pressão	Tampão, 2 s	Tampão, 2 s	Tampão, 2 s	Tampão, 2 s
<b>Pós-condicionamento</b>	Fluxo	NaOH 0,1 molL <sup>-1</sup> , 1 min	HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> , 2 min	NaOH 0,1 molL <sup>-1</sup> , 1 min	NaOH 0,1 molL <sup>-1</sup> , 2 min
	Fluxo	Espera, 0,2 min	Espera, 0,2 min	Espera, 0,2 min	Espera, 0,2 min
	Fluxo	H <sub>2</sub> O, 3 min	H <sub>2</sub> O, 1 min	H <sub>2</sub> O, 1 min	H <sub>2</sub> O, 1 min
			NaOH 1 molL <sup>-1</sup> 1 min	HCl 1 molL <sup>-1</sup> 2 min	HCl 1 molL <sup>-1</sup> 1 min

Fluxo = 950 mbar, Pressão = 34,5 mbar.

Também foi avaliado o potencial aplicado no sistema e foram testadas as tensões de 15 e 20 kV durante 10 minutos.

Foi avaliada a eficiência das soluções: tampão tris 10 mmol L<sup>-1</sup> e 100 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8,3), tampão fosfato 25 mmol L<sup>-1</sup> (pH 11,3) e tampão borato 25 mmol L<sup>-1</sup> (pH 10), utilizadas quando os analitos eram proteínas e o tampão fosfato 25 mmol L<sup>-1</sup> (pH 2,5) usado também para a análise de peptídeos e aminoácidos.

Para a desenvolvimento do método de separação foi testado o aminoácido hidrocloreto de L-triptofano metil éster (H-trp-OMe-H) (na concentração de 100 µmol L<sup>-1</sup>), assim como também foi analisada uma amostra padrão da Beckmam<sup>®</sup> que era composta de água, ácido bórico, borato de sódio, ácido benzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido p-hidroxifenilacético e EDTA, em concentrações não fornecidas pelo fabricante. As proteínas

utilizadas para desenvolver o método foram a mioglobina ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pI 7,14), a BSA ( $1,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pI 5,82) e a LGB ( $5,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pI 5,4). As proteínas foram avaliadas tanto individualmente quanto misturadas.

A repetitividade do tempo de migração ( $t_m$ ) de cada proteína foi verificada repetindo as análises por sete vezes consecutivas utilizando o método de separação que obteve o melhor resultado.

## 2.5- Método de coleta de frações em CE

O método de coleta de frações tem o objetivo de dividir a mistura amostral em frações menores com um número menor de proteínas, permitindo assim uma melhor identificação de cada componente da amostra inicial. Este método consiste na interrupção do potencial elétrico do sistema em um determinado tempo, permitindo assim a troca do injetor para o novo coletor, sem que o sistema continue fluindo. O tempo selecionado para interrupção do sistema foi escolhido de acordo com os tempos de migração de cada analito em um tempo total de análise de 10 minutos. A amostra inicial foi dividida em quatro frações, cada fração foi coletada por dez vezes consecutivas e a programação do método de coleta de frações é apresentada na Tabela 2.3. Cada fração era recolhida para o *vial* que continha  $100 \mu\text{L}$  da solução tampão apropriada. Para tanto foi preparada uma solução com as cinco proteínas (mioglobina, BSA,  $\alpha$ -caseína, LGB e hemoglobina), estudadas no presente trabalho, todas com a concentração de  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

**Tabela 2.3:** Programação do método de coleta de frações em CE.

Tempo (min)	Comando	Ação
0,0	<i>Outlet</i>	Fração 1
0,1	Voltage	20 kV
2,2	<i>Outlet</i>	Fração 2
2,3	Voltage	20 kV
4,5	<i>Outlet</i>	Fração 3
4,6	Voltage	20 kV
6,7	<i>Outlet</i>	Fração 4
6,8	Voltage	20 kV
9,0	<i>Outlet</i>	Tampão
9,1	Voltage	20 kV

## 2.6- Análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

### 2.6.1- Separação por cromatografia líquida

As frações 2, 3 e 4 coletadas por CE-UV foram encaminhadas para análise no Centro Regional de Espectrometria da Universidade de Montreal (Canadá). O instrumento utilizado foi um aparelho de cromatografia líquida acoplada a um MS com um analisador de tempo de voo (LC-TOF) Agilent Technologies modelo 1100 series. A fonte de ionização foi por *eletrospray* positiva. A coluna utilizada foi Poroshell 300SB-C8 (Agilent Technologies), com as dimensões de 2,1 x 75 mm, com partículas de 5 µm, equipada com um termostatizador TCC G1316A operando a 40 °C. O cromatógrafo líquido era acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) modelo G1315D, analisando a faixa de

comprimentos de onda de 200 ó 400 nm. Os eluentes utilizados foram a água (eluyente A) e a acetonitrila (eluyente B), ambos sendo adicionados de ácido fórmico com concentração final 0,1%. O gradiente de eluição é mostrado na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4:** Gradiente de eluição das proteínas analisadas por LC-TOF/MS.

Tempo (min.)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0,0	90	10
0,1	90	10
6,0	20	80
7,0	20	80
10,2	90	10
14,0	90	10

## 2.6.2- Análise por LC-ESI-MS de proteínas e peptídeos

Um espectrômetro de massas por tempo de voo (MS-TOF) com fonte de íons positivos *dual ESI*, identificando compostos com faixa de massa variando de 110 ó 3200 m/z, foi utilizado para as análises de proteínas e dos peptídeos. Os parâmetros da fonte são: temperatura do gás de 350 °C, fluxo do gás de 10,0 L min<sup>-1</sup> e nebulizador com pressão de 35 psi.

## 2.7- Digestão das proteínas

### 2.7.1- Desnaturação das proteínas induzida por aquecimento

Inicialmente para se avaliar qual a rota de desnaturação que levaria ao melhor resultado foi preparada uma solução de mioglobina com concentração de 60 µmol L<sup>-1</sup>. Desta solução foram retiradas quatro aliquotas de 100 µL, sendo uma para o branco e as outras três para se realizar o procedimento de desnaturação. Todas as aliquotas foram

aquecidas durante 30, 45 ou 60 minutos a 90 °C. Em seguida, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente por 10 minutos e digeridas pela enzima quimotripsina. O mesmo procedimento foi realizado, posteriormente, com soluções de BSA, LGB e  $\alpha$ -caseína também com concentração final de 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

### **2.7.2- Digestão das proteínas em solução por quimotripsina livre**

Foi preparada uma solução 6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de quimotripsina solubilizada em uma solução tampão Tris 100  $\text{mmol L}^{-1}$  e pH 7,8, desta solução foram retirados 100  $\mu\text{L}$  e adicionados a solução contendo a(s) proteína(s) desnaturada(s) (item 2.7.1). Todas as soluções tanto de proteínas quanto de quimotripsina foram preparadas de forma que a concentração da solução final, após a mistura das mesmas, fossem 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Essas soluções foram mantidas aquecidas em banho-maria por 15, 30 ou 60 minutos a 37 °C. Após cada digestão as alíquotas eram colocadas em um banho de gelo seco e acetona por 30 segundos, para interromper o processo de digestão. Em seguida as alíquotas digeridas foram analisadas qualitativamente por CE-UV/Vis apenas para verificar se houve a digestão das proteínas e posteriormente essas alíquotas foram encaminhadas para análise por LC-ESI-MS.

### **2.7.3- Dessalinização e extração dos peptídeos usando resina C18**

Antes de se iniciar o processo de dessalinização, seguido da extração dos peptídeos digeridos, foi necessário remover o solvente das amostras. Para tanto, utilizou-se uma centrífuga a vácuo Savant Speed Vac SC 110 (EUA) operando com rotação de 3000 rpm durante 25 minutos.

Em seguida, a amostra seca foi submetida ao procedimento de dessalinização dos peptídeos que foi realizado segundo o protocolo da Zip Tip<sup>®</sup> 28, que consistiu na preparação das soluções apresentadas na Tabela 2.5 a seguir:

**Tabela 2.5:** Soluções utilizadas para a dessalinização da amostra, segundo protocolo da Zip Tip<sup>®</sup> para resina C18.

Solução	Composição	Volume (µL) Acetonitrila	Volume (µL) Água	Volume (µL)TFA	Volume total (µL)
<b>1</b> (hidratação)	50:50, ACN:H <sub>2</sub> O, 0,1 % TFA	500	490	10	1000
<b>2</b> (lavagem)	0,1 % TFA em H <sub>2</sub> O	0	990	10	1000
<b>3</b> (eluição peptídeo)	60:40, ACN:H <sub>2</sub> O, 0,1 % TFA	600	390	10	1000
<b>4</b> (reconstituição da amostra)	5:95, ACN:H <sub>2</sub> O, 0,1 % TFA	50	940	10	1000

TFA = Ácido Trifluoroacético 10 %, ACN = Acetonitrila

Para amostras sólidas se fazia necessário a reconstituição da amostra adicionando 13 µL da solução **4**, depois a solução foi agitada com um agitador vórtex por 30 segundos e centrifugada também por 30 segundos.

Utilizando um pipetador P10, inicialmente, o cartucho Zip Tip<sup>®</sup> C18 foi hidratado, para tanto aspirou-se 10 µL da solução **1**, descartou-se a solução e esta etapa foi repetida. Em seguida, aspirou-se 10 µL da solução **2**, descartou-se a solução e repetiu-se a etapa. É importante aspirar e expelir as soluções muito lentamente para evitar a entrada de ar na resina C18. A etapa seguinte foi a adsorção dos peptídeos no material, para tanto aspirou-se lentamente 10 µL da amostra e expeliu-se o líquido de volta no tubo e repetiu-se 6 vezes sem liberar o pipetador. A seguir aspirou-se 10 µL da solução **2** e expeliu-se o líquido no recipiente de descarte, repetiu-se 5 vezes, também sem liberar o pipetador. Para efetuar a última etapa aspirou-se cerca de 1,3 µL da solução **3** (resfriada), expeliu-se a amostra no

vial reservado, repetiu-se mais duas vezes e a amostra foi encaminhada para análise por LC-ESI-MS como descrito no ítem 2.6.2.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Separação de proteínas e peptídeos por CE**

##### **3.1.1. Condicionamento do capilar**

Diariamente era necessário realizar o condicionamento do capilar já usado como descrito no ítem 2.4.1.2 e também quando era preparado um novo capilar (ítem 2.4.1.1). O condicionamento era realizado para remover qualquer partícula do interior do capilar e para ativar a parede do capilar para que o mesmo fosse eletricamente carregado de acordo com a necessidade da análise. Por exemplo, para a análise de peptídeos e aminoácidos era necessário trabalhar em um pH ácido, semelhante ao pH do eletrólito usado para a separação dos analitos. Condição oposta ocorreu para a análise de proteínas quando foi escolhido trabalhar em pH básico (eletrólito) e assim o capilar era ativado em pH básico.

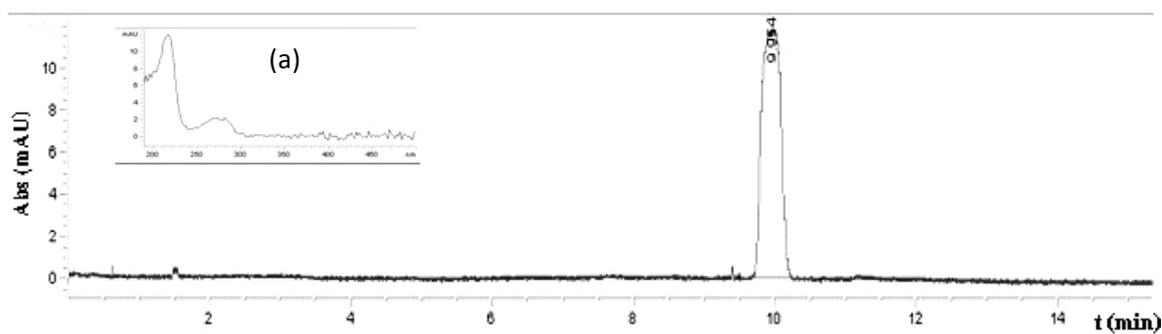
##### **3.1.2. Avaliação do método de separação dos analitos**

Dentre os métodos desenvolvidos e avaliados para a separação devida das proteínas, peptídeos e aminoácidos por CE-UV que estão apresentados na Tabela 2.2, os métodos que foram eficientes para a separação foi o método 2a para proteínas (mioglobina, BSA, - caseína, LGB e hemoglobina) e 2b para peptídeos (gerados da quebra das proteínas citadas anteriormente) e o aminoácido H-trp-OMe-H.

Em cada método avaliado foram analisadas as proteínas citadas e o aminoácido individualmente e posteriormente os analitos foram misturados e analisados para verificar a eficiência da separação dos mesmos pelo método proposto.

A diferença entre os métodos 1b e 2b são sutís, apenas diferem na etapa de pré-condicionamento, onde a concentração do HCl varia em 0,1 e 1,0 mol L<sup>-1</sup> e na etapa do pós-condicionamento onde no primeiro método se utiliza NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> por 1 minuto e no método 2b o mesmo eluente é rinçado por 2 minutos. O uso de uma base em um método onde os analitos necessitam de um meio ácido para migrarem pelo capilar, tem o objetivo de limpar o capilar, para remover impurezas ou algum componente da amostra que tenha ficado retido na parede do capilar. Acredita-se que o menor tempo era insuficiente para limpar efetivamente o capilar. Em seguida, o capilar é lavado com água para remover a base do capilar e posteriormente é passado o HCl 1 mol L<sup>-1</sup> por 2 minutos no método 1b e por 1 minuto no método 2b. O HCl, na concentração utilizada, é agressivo para a parede interna do capilar, sendo assim esta não necessitaria de uma lavagem relativamente longa para reativá-la para o meio ácido que é necessário para realizar a análise.

Os sinais dos aminoácidos não apareciam quando o método 1b estava sendo avaliado, acredita-se que as etapas de pré e pós-condicionamento não eram eficientes para ativar a parede do capilar e sendo assim, o sinal não era gerado. Porém, quando o método 2b foi testado e as modificações foram realizadas, os sinais foram gerados com boa intensidade e corrente estável, indicando que a solução tampão estava no pH adequado e a condição foi robusta durante toda a análise. Na Figura 2.8 a seguir é mostrado um eletroferograma do aminoácido H-trp-OMe-H 100 μmol L<sup>-1</sup>, com solução tampão fosfato de sódio 25 mmol L<sup>-1</sup> (pH 2,5) e tensão de 15 kV.



**Figura 2.8:** Eletroferograma do aminoácido H-Trp-OMe-H  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  sob as condições do método 2b. Em (a) é apresentado o espectro UV a 220 nm do aminoácido analisado.

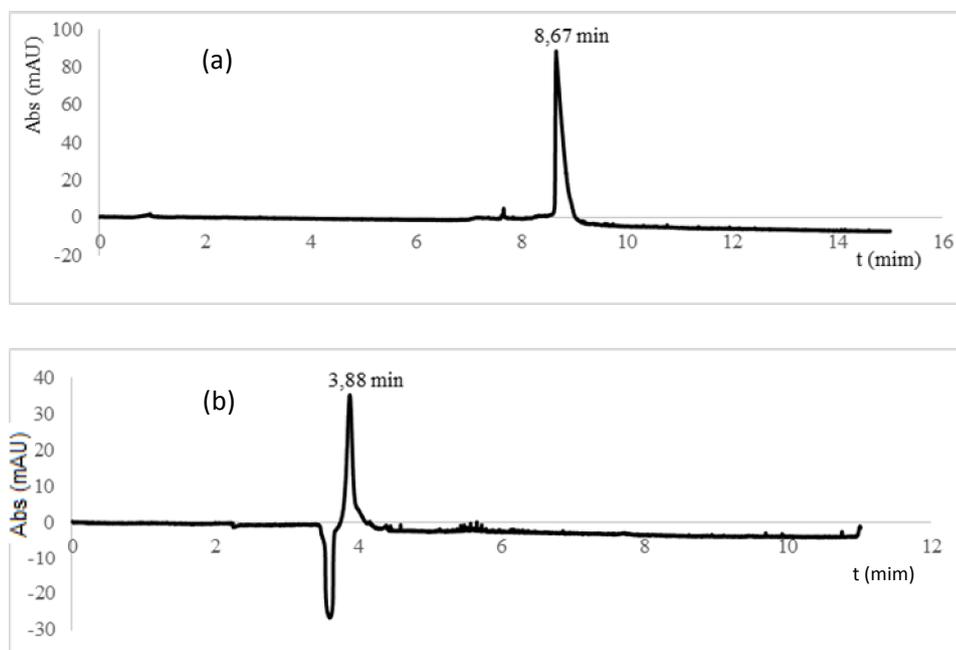
Nas condições do método 2b para a solução  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  H-Trp-OMe-H, foi gerado um sinal em  $9,91 \pm 0,10$  minutos. A análise foi realizada em triplicata.

Inicialmente o método 2b também foi utilizado para analisar as proteínas, mas a grande maioria das proteínas tem pI superior a 2,5 que é o valor de pH do meio, sendo assim, todas as proteínas estavam carregadas positivamente ( $\text{pH}_{\text{meio}} < \text{pI}_{\text{proteína}}$ ). Desta forma a atração da proteína pela parede do capilar (carga negativa) é forte, fato este que pode ocasionar uma forte adsorção entre estes, retardar o tempo de migração e ainda causar caldas nos sinais.

No presente trabalho, com as proteínas que foram utilizadas para o desenvolvimento do método não ocorreu uma forte adsorção entre os analitos e a parede do capilar, mas o tempo de migração foi tardio (sinais entre 8 e 10 minutos) quando comparados aos tempos de migração obtidos nos métodos 1a e 2a que foram avaliados posteriormente a esse teste.

Devido aos resultados obtidos com o uso de uma solução tampão ácido para analisar proteínas, decidiu-se desenvolver um método com todos os reagentes alcalinos inclusive os eletrólitos (método 1a). Com este método os analitos geraram sinais, mas decidiu-se introduzir um reagente ácido ao método com o objetivo de limpar e remover impurezas do capilar como explicado anteriormente para o método 2b para os peptídeos e aminoácidos. Criando assim o método 2a que foi utilizado durante todas as análises e com todos os eletrólitos avaliados.

A seguir é mostrado (Figura 2.9) uma comparação dos sinais obtidos para a mioglobina  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  quando analisada pelo método 2a (solução tampão tris pH 8,3,  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e 2b (solução tampão fosfato pH 2,5,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$ ), ambos sob tensão de 15 kV.



**Figura 2.9:** Diferença no tempo de migração da mioglobina  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  quando se utilizou um eletrólito ácido (a) e um básico (b) para análise de proteínas por CE-UV.

A mudança do pH do meio ocasionou uma diminuição de cinco minutos no tempo de migração do analito, possibilitando uma diminuição no tempo total de análise.

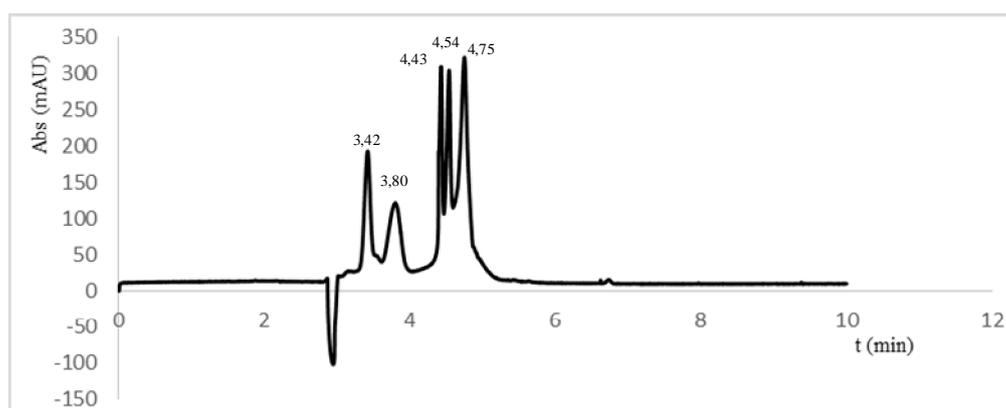
O sinal negativo apresentado na Figura 2.9b é devido ao grupo acetato da solução tampão Tris que não possui um grupo cromóforo, sendo assim este não absorve a radiação UV e gera um sinal negativo na linha de base <sup>14</sup>.

A solução tampão Tris possui a vantagem de poder ser usada em altas concentrações sem ocasionar o efeito Joule (aquecimento da solução). Por este motivo, decidiu-se aumentar a concentração deste eletrólito, pois a intensidade do sinal estava baixa se comparada com a intensidade gerada quando o mesmo analito na mesma concentração foi analisado usando solução tampão fosfato, por exemplo. Então a concentração inicialmente

usada que era de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  foi incrementada para  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  e assim perdurou por todas as análises seguintes.

Com o objetivo de diminuir ainda mais o tempo de migração de todos os analitos o valor da tensão foi aumentado de 15 kV para 20 kV, para todas as análises seguintes.

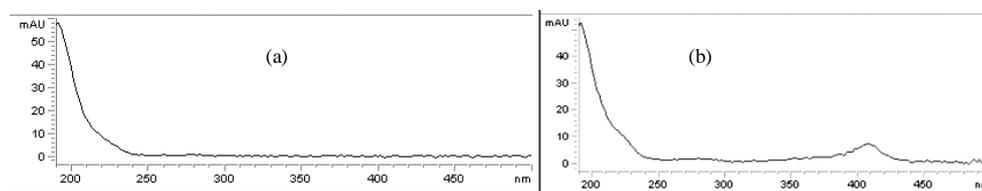
Após estabelecer todos os parâmetros do método para a análise das proteínas individualmente, foi preparada uma mistura das três proteínas nas mesmas concentrações utilizadas para o desenvolvimento do método e esta mistura foi analisada por CE-UV/Vis. Em seguida, foram adicionadas mais duas proteínas para compor uma mistura mais diversificada. Tendo em vista que uma amostra real provavelmente será constituída de uma grande quantidade de proteínas. As proteínas adicionadas foram hemoglobina humana ( $12,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pI 7,1) e a  $\alpha$ -caseína ( $29,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pI 4,6). O eletroferograma da mistura das cinco proteínas está apresentado na Figura 2.10.



**Figura 2.10:** Eletroferograma gerado a partir da análise da mistura das cinco proteínas. Sendo na sequência: mioglobina 3,42 min.,  $\alpha$ -caseína 3,80 min., dois sinais referentes a  $\beta$ -lactoglobulina A e B 4,43 min. e 4,54 min. e a hemoglobina 4,75 min.

A sequência foi estimada fazendo uma analogia do tempo de migração de cada proteína quando analisadas individualmente e também pela visualização do espectro referente a cada sinal. A mioglobina e a hemoglobina possuem em suas estruturas uma molécula de ferro o que proporciona cor a estas proteínas e seus espectros possuem uma pequena banda de

absorção na região do visível. Na Figura 2.11 a seguir são mostrados dois exemplos de espectro de proteínas com e sem ferro nas estruturas moleculares.



**Figura 2.11:** Espectros de UV da proteína (a) BSA e (b) Mioglobina.

As proteínas apresentam o aspecto de um pó branco e todos os espectros possuem padrão semelhante a Figura 2.11(a). Já a mioglobina e a hemoglobina que possuem a característica física de um pó marrom, apresentam uma fraca absorção na região visível e um espectro semelhante ao apresentado na Figura 2.11(b). Motivo este que torna inviável a identificação e quantificação precisa de uma mistura complexa de proteínas por espectrometria de absorção UV/Vis e se faz necessário a análise das mesmas por espectrometria de massas.

Após o estabelecimento das condições de condicionamento do capilar (método 2a), decidiu-se avaliar a eficiência de outros eletrólitos para ampliar as possibilidades de análise. Esta avaliação foi realizada tendo em vista que os fluidos biológicos podem ser de diferentes origens e, conseqüentemente, ser constituído de diversas proteínas que podem não ser facilmente separadas por um único eletrólito em apenas um valor de pH. Para tanto foram utilizadas a solução tampão borato a 25 mmol L<sup>-1</sup> (pH 10,2) e a solução tampão fosfato a 12,5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 11,3). Os tempos de migração obtidos utilizando as diferentes soluções tampão estão apresentados na Tabela 2.6.

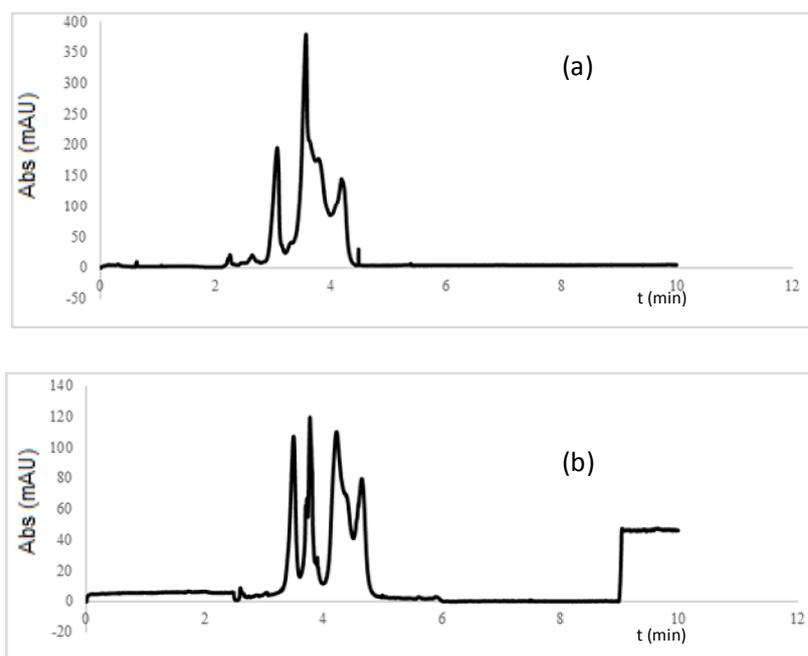
**Tabela 2.6:** Tempos de migração das proteínas analisadas pelo método 2a utilizando as soluções tampões fosfato, borato e Tris, nas condições apresentadas.

Proteína	12,5 mmol L <sup>-1</sup>	25 mmol L <sup>-1</sup>	100 mmol L <sup>-1</sup>
	Fosfato, pH 11,3	Borato, pH 10,2	Tris, pH 8,3
Mioglobina (30 μmol L <sup>-1</sup> )	3,9 min	3,22 min	3,3 min
-LGB (5,4 μmol L <sup>-1</sup> )	3,6 min	4,15 min	Dois sinais = 4,06/4,25 min
BSA (1,4 μmol L <sup>-1</sup> )	3,8 min	4,12 min	4,35 min
Hemoglobina (12,9 μmol L <sup>-1</sup> )	3,36 min	3,6 min	Sinal largo, em 4,5 ó 7,6 min
-caseína (29,4 μmol L <sup>-1</sup> )	3,05 min	3,45 min	3,73 min

n = 3, Tensão = 20 Kv

Dentre os eletrólitos utilizados o único que foi capaz de separar os isômeros da LGB A e B foi a solução tampão Tris, com as demais soluções foi obtido um único sinal.

Cada proteína foi analisada individualmente e, posteriormente foi preparada uma mistura com as cinco proteínas todas com a concentração final equivalente a utilizada nas análises individuais. A seguir, na Figura 2.12, são apresentados os eletroferogramas das misturas das proteínas obtidos com as soluções tampão borato pH 10,2 (25 mmol L<sup>-1</sup>) e fosfato pH 11,3 (12,5 mmol L<sup>-1</sup>).



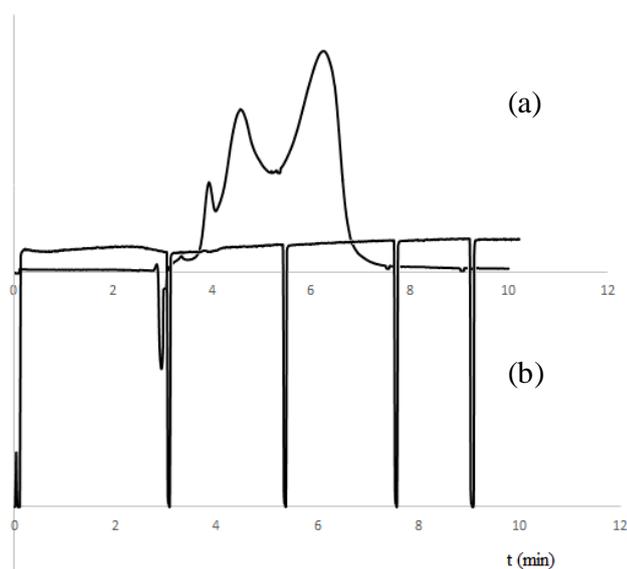
**Figura 2.12:** Eletroferograma obtido usando (a) solução tampão fosfato 12,5 mmol L<sup>-1</sup>, pH 11,3 e (b) solução tampão borato 25 mmol L<sup>-1</sup>, pH 10,2.

Assim como já foi observado na Figura 2.10, os eletroferogramas apresentados na Figura 2.12 não possuem todos os picos bem resolvidos, o que era de se esperar quando se utiliza um capilar sem revestimento interno. Mesmo utilizando estratégias (controle do pH) para minimizar a interação Coulômbica entre os grupos silânicos da parede do capilar não revestido e as proteínas, este fator diminui a resolução da separação das proteínas quando analisadas por CZE<sup>29,30</sup>.

Mesmo não obtendo uma excelente separação de todos os componentes da mistura amostral, é perfeitamente aceitável os dados obtidos para o presente trabalho, pois o objetivo principal é utilizar a eletroforese capilar como um método de preparo das amostras e realizar uma separação inicial para a posterior divisão da amostra, sem que essa perca suas características e possa ser melhor analisada e identificados todos os seus constituintes pela espectrometria de massas que fornece dados mais ricos e robustos dos analitos.

### 3.2. Coleta das frações por CE-UV/Vis

A mistura amostral com as cinco proteínas estudadas neste trabalho foi analisada por CE-UV/Vis, todas com concentração de  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ , sob as condições de pré e pós-condicionamento do método 2a, utilizando a solução tampão Tris  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8,3. Entretanto, foi utilizada a programação de interrupção da tensão elétrica de acordo como mostrado na Tabela 2.3 (item 2.5). A Figura 2.13 mostra a superposição dos gráficos (sem a escala das ordenadas) referentes ao eletroferograma (a) e a corrente elétrica (b) durante os 10 minutos da análise.



**Figura 2.13:** Superposição dos gráficos referentes ao eletroferograma (a) e a corrente elétrica (b) da coleta das frações da mistura padrão simulada.

As frações coletadas foram enviadas para análise por LC-ESI-MS para a identificação das proteínas contidas em cada fração. Esses resultados serão apresentados no item 3.5.

### 3.3. Repetitividade

Para verificar a precisão do método, as soluções das proteínas foram analisadas separada e repetidamente por 7 vezes consecutivas. O tempo de migração ( $t_m$ ), o desvio padrão ( $S_r$ ) e o Coeficiente de Variação (CV) estão apresentados na Tabela 2.7 a seguir:

**Tabela 2.7:** Valores do tempo de migração médio, do desvio padrão de repetitividade e do coeficiente de variação para expressar a precisão do método de separação das proteínas.

Proteína	$t_m$ (min)	$S_r$ (min)	CV (%)
Mioglobina (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	3,31	0,02	0,57
-LGB (5,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	4,61 / 4,76	0,14 / 0,14	3,02 / 3,03
BSA (1,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	4,93	0,03	0,69
Hemoglobina (12,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	6,05	0,18	2,97
-caseína (29,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	3,21	0,06	2,00

n = 7

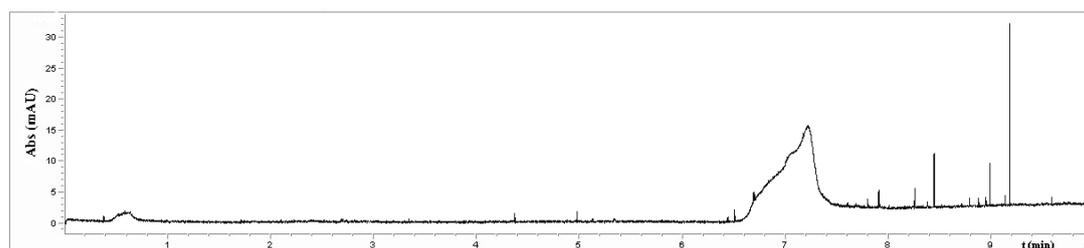
Os valores calculados para o coeficiente de variação são inferiores a 20 %, que é o valor limite para determinar a precisão de um método para análise de elementos em escala micro <sup>31</sup>. Isso comprova que o método proposto é preciso, nos termos em que foi desenvolvido.

Os valores apresentados na Tabela 2.7 foram obtidos através da análise das proteínas pelo método 2a utilizando solução tampão Tris 100  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 8,3 e tensão de 20 kV. Esses valores diferem um pouco dos apresentados na Tabela 2.6, isso pode ter ocorrido

devido ao fato das análises terem sido realizadas com soluções tampão e capilares preparados em tempos diferentes.

### 3.4. Desnaturação e digestão das proteínas

Inicialmente foi realizada uma tentativa de digerir as proteínas sem que estas fossem submetidas ao aquecimento. Para a avaliação foi preparada uma solução com mioglobina:quimotripsina (3:1) que foi mantida a 37 °C por 24 horas. Entretanto, a proteína não foi digerida, por este método. Acredita-se que a etapa de desnaturação da proteína seja essencial para a digestão, pois nesta etapa ocorre a exposição das cadeias laterais da molécula que se encontram na parte interna da proteína e possibilita a interação com a enzima <sup>7</sup>. Na Figura 2.14 está apresentado o eletroferograma da mistura de mioglobina e quimotripsina resultante do contato durante 24 horas da enzima com o substrato.

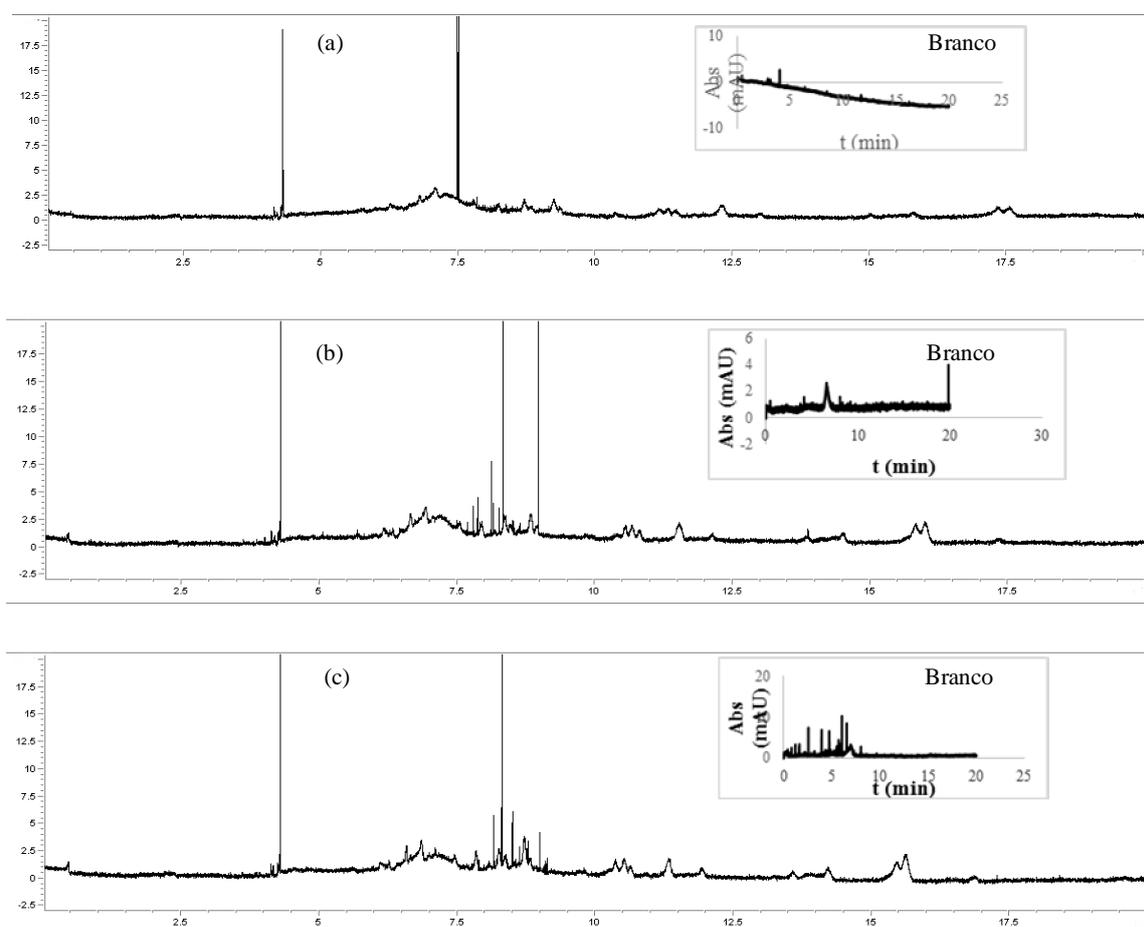


**Figura 2.14:** Eletroferograma da mistura de quimotripsina e mioglobina nas condições do método 2b utilizando solução tampão fosfato, 25 mmol L<sup>-1</sup>, pH 2,5.

Sendo assim, o método foi acrescido da etapa de desnaturação da proteína. Ainda tomando como exemplo a mioglobina, esta foi aquecida em banho-maria a 90 °C, visto que a grande maioria das proteínas possuem temperatura média de fusão (temperatura de desnaturação) abaixo de 100 °C <sup>7</sup>.

Para avaliar qual o tempo de aquecimento e de digestão com quimotripsina livre seria necessário para obter a lise das proteínas, alíquotas digeridas durante 60 minutos com a

enzima quimiotripsina, foram aquecidas a 90 °C por 30, 45 e 60 min. Desses três experimentos o melhor resultado foi obtido quando a proteína foi aquecida por 60 min. Sendo assim, o tempo de aquecimento foi estabelecido como 60 min. A partir deste ponto foi avaliado o tempo de digestão entre a proteína desnaturada e a enzima. Para tanto, a proteína desnaturada foi digerida durante 15, 30 e 60 min. Qualitativamente a diferença na quantidade e intensidade dos sinais são mínimas entre 30 e 60 min., como apresentado na Figura 2.15.



**Figura 2.15:** Eletroferograma resultante da digestão por quimiotripsina livre da mioglobina desnaturada (1:10, E:S) durante (a) 15 min., (b) 30 min., (c) 60 min. Sob as condições do método 2b utilizando solução tampão fosfato, 25 mmol L<sup>-1</sup>, pH 2,5 e um tempo total de análise de 20 minutos.

Pela análise dos eletroferogramas apresentados na Figura 2.15 observa-se que em (c) alguns sinais possuem uma intensidade ligeiramente maior que em (b). Mas, acredita-se que

o tempo de 30 minutos seja suficiente para a digestão das proteínas estudadas neste trabalho. Deve-se descartar os sinais finos, pois estes não são equivalentes a compostos na amostra e sim partículas que dispersam o feixe de luz.

Os resultados obtidos no presente trabalho, até o momento, são mais animadores que os encontrados por alguns autores, em relação a simplicidade do método e ao curto tempo de desnaturação e digestão das proteínas.

Sun e colaboradores <sup>4</sup> desenvolveram um método de digestão com tripsina livre que necessitava de 12 horas a 37 °C para digerir BSA na proporção 1:30 (E:S), após a desnaturação química assistida por ureia, e analisaram os peptídeos resultantes por CZE-ESI-MS. Migneault e colaboradores <sup>32</sup> também utilizaram a tripsina livre para digerir proteínas e com o método proposto que também desnaturava a proteína quimicamente com ureia, eram necessárias 24 horas a 37 °C para a digestão da proteína lisozima utilizada no método. Ghafourifar e colaboradores <sup>5</sup> desenvolveram um método de digestão de proteínas utilizando a enzima quimiotripsina, enzima semelhante a utilizada neste trabalho, e que consistiu na desnaturação química e térmica, por 15 min a 50 °C, com ureia e ditiotreitol para reduzir ligações dissulfeto. Em seguida foi adicionado iodocetamida para evitar a oxidação do tiol e impedir que as ligações dissulfeto se formem novamente. Os autores precisaram diluir a solução resultante, para poder realizar a digestão, visto que em soluções com alta concentração salina a ação das enzimas é dificultada <sup>7</sup>.

No caso de uma amostra com baixa concentração essa etapa de diluição pode inviabilizar a detecção. Após a etapa de desnaturação do substrato os autores realizaram tanto a digestão por quimiotripsina livre em solução quanto a digestão com a enzima imobilizada em um digestor. Para a enzima em solução foram necessárias 24 horas a 37 °C para digerir o substrato. Um tempo bastante superior ao utilizado no presente trabalho.

### **3.5. Análise por MS, identificação das proteínas e dos peptídeos na mistura e nas frações**

As cinco proteínas utilizadas neste trabalho para desenvolver um método de preparo de amostra para um posterior mapeamento de seus peptídeos com o objetivo de estudos sobre proteômica foram analisadas individualmente por LC-ESI-MS. As relações massa/carga ( $m/z$ ) de cada proteína encontra-se na Tabela 2.8.

**Tabela 2.8:** Relação massa/carga das proteínas analisadas por LC-ESI-MS.

Proteína	$m/z$
Hemoglobina (60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	15127,5
Mioglobina (1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	16952,7
-LGB (1,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	18364,3
-caseína (60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	24024,4
BSA (0,37 $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	66431,7

Essas medidas foram necessárias para confirmar a massa de cada proteína e identificá-las nas frações coletadas por CE-UV/VIS.

Foram coletadas quatro frações na etapa de divisão da mistura das proteínas por CE-UV/VIS. Dessas, em apenas três frações (F2-F4) foram identificadas proteínas e estas são apresentadas na Tabela 2.9, a seguir:

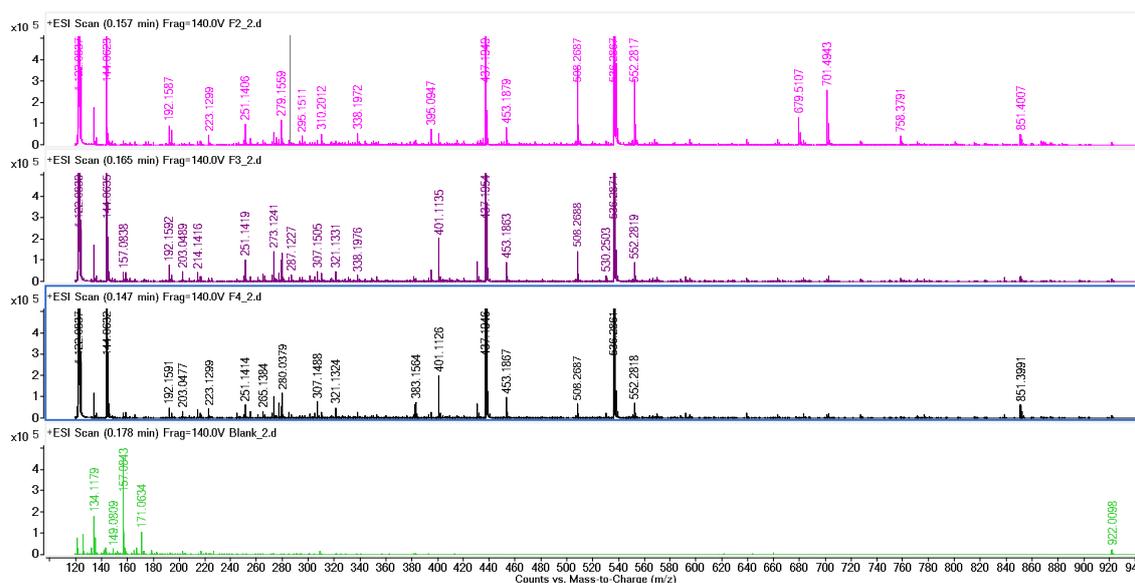
**Tabela 2.9:** Proteínas coletadas na frações por CE-UV/VIS e analisadas por LC-ESI-MS.

Fração	$m/z$
F2	16952,5
F3	18363,0 / 24056,8 / 66468,7
F4	66466,7

Analisando as relações  $m/z$  e comparando com os dados da Tabela 2.8, observa-se que em F2 foi coletada apenas a mioglobina, em F3 foram coletadas LGB, -caseína e BSA e em F4 também foi coletada a BSA. Há uma pequena diferença dos valores exatos entre as  $m/z$  das proteínas apresentadas nas Tabelas 2.8 e 2.9. Uma justificativa para esta diferença seria o fato de que moléculas grandes como proteínas podem adquirir múltiplas cargas durante a etapa de ionização por eletrospray. Outra justificativa seria a fração de BSA ter

$Cl^{37}$  e  $Cl^{35}$  ligado, causando assim essa diferença nas massas das proteínas identificadas nas frações coletadas por CE-UV/VIS.

A última etapa realizada no presente trabalho até o momento foi analisar os peptídeos resultantes da digestão das proteínas por quimiotripsina livre em solução. Na Figura 2.16 estão apresentados os fragmentos peptídicos obtidos da digestão das misturas de proteínas de acordo com as frações coletadas.



**Figura 2.16:** Espectros de massa obtidos por LC-ESI-MS dos peptídeos resultantes da digestão das proteínas contidas nas frações (a) F2, (b) F3, (c) F4. O (d) branco é referente a quimiotripsina.

Os sinais obtidos nos espectros de massas das diferentes frações são semelhantes em sua grande maioria o que intriga, visto que são provenientes de diferentes proteínas. Uma possível explicação é o fato da quimiotripsina catalisar a hidrólise de ligações peptídicas, mais especificamente, ligações que contêm resíduos de aminoácidos que apresentam cadeias laterais hidrofóbicas, como por exemplo, tem-se a fenilalanina (Phe), o triptofano (Trp) e a tirosina (Tyr). Entretanto mais estudos devem ser realizados para se conseguir uma condição de digestão que se possa diferenciar os resíduos de peptídeos advindos de diferentes proteínas.

O que se obtém de positivo com esses resultados é que o método desenvolvido foi capaz de digerir as proteínas dentro de suas limitações. Uma tentativa de aprimorar a clivagem das proteínas pode ser a associação entre a desnaturação química e térmica ou mesmo acrescentar, por exemplo, o dodecilsulfato de sódio (SDS) que é um potente agente desnaturante de proteínas.

Os estudos de proteômica e mapeamento de peptídeos serão realizados futuramente, pois as análises das amostras não foram realizadas em tempo hábil para que essas estruturas fossem elucidadas.

#### **4. CONCLUSÃO**

A eletroforese capilar com detecção UV demonstrou ser uma técnica bastante eficiente para análise de proteínas, pois possibilitou o fracionamento da amostra para posterior análise e identificação das proteínas por espectrometria de massas. Foi desenvolvido um método de desnaturação e digestão das proteínas simples e com um tempo bastante reduzido de duas horas totais frente a outros trabalhos da literatura que utilizaram de 12 a 24 horas apenas para a etapa da digestão.

O método de digestão desenvolvido foi eficiente para digerir as proteínas mioglobina, BSA, LGB, hemoglobina e  $\alpha$ -caseína, contidas em cada fração recolhida por CE-UV/Vis. Porém, os resíduos de aminoácidos detectados por LC-ESI-MS foram bastante semelhantes mesmo vindos de diferentes proteínas. Isso provavelmente pode ter ocorrido devido aos sítios de clivagem preferencial da enzima quimotripsina utilizada. Portanto, sugere que mais estudos devem ser realizados para uma completa diferenciação. Possibilitando assim, a realização do mapeamento dos peptídeos e a aplicação em estudos proteômicos.

O método de separação das proteínas por CE-UV/Vis foi avaliado por três soluções tampão (Tris, fosfato e borato), mas apenas com o tampão Tris foi seguido todo o método até a etapa de digestão das proteínas e análise dos peptídeos. Pois não houve tempo hábil para realizar todas as etapas do método com as demais soluções tampão.

## 5. PERSPECTIVAS

As perspectivas para o método proposto são:

4. Realizar todas as etapas do método com as soluções tampão borato 25 mmol L<sup>-1</sup> (pH 10,2) e fosfato 12,5 mmol L<sup>-1</sup> (pH11,3).
5. Aprimorar as condições de digestão visando uma diferenciação mais evidente entre as m/z dos fragmentos de peptídeos gerados pelo processo de digestão com a enzima quimotripsina livre em solução
6. Realizar a identificação de cada fragmento, ou seja, o mapeamento dos peptídeos por LC-ESI-MS.
7. Analisar amostras reais para verificar a confiabilidade do método e realizar a sua validação.

## 6. REFERÊNCIAS

1. WRIGHT, P. C.; NOIREL, J.; OW, S.; FAZELI, A. **A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations.** *Theriogenology* **77**, 7386765, 2012.
2. BARBOSA, E. B. *et al.* **Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas.** *Revista da Associação Medicina Brasileira* **58**, 3666375, 2012.
3. LIN, L.; CHEN, D.-N.; GUO, J.; ZHOU, W.-J.; XU, X.-M. **Development of a capillary zone electrophoresis method for rapid determination of human globin chains in  $\alpha$  and  $\beta$ -thalassemia subjects.** *Blood Cells, Mol. Dis.* **55**, 62667, 2015.
4. SUN, L. *et al.* **Capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for quantitative parallel reaction monitoring of peptide abundance and single-shot proteomic analysis of a human cell line.** *Journal of Chromatography A* **1359**, 3036308, 2014.
5. GHAFOURIFAR, G.; ANTOINE, F.; WALDRON, K. C. **Development of glutaraldehyde-crosslinked chymotrypsin and an in situ immobilized enzyme microreactor with peptide mapping by capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* **34**, 180461811, 2013.
6. MARZZOCO, A.; BAYARDO, B.T. *Bioquímica Básica*. Ed. Guanabara Koogan.
7. VOET, D.; VOET, J. G. *Bioquímica*. Ed. Artmed, 2013.
8. ALDRED, S.; GRANT, M. M.; GRIFFITHS, H. R. **The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research.** *Clinical Biochemistry.* **37**, 9436952, 2004.
9. VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*. Ed. Wiley, 2011.
10. SLYSZ, G. W.; SCHRIEMER, D. C. **Blending protein separation and peptide analysis through real-time proteolytic digestion.** *Analytical Chemistry.* **77**, 15726

- 1579, 2005.
11. BONNEIL, E.; MERCIER, M.; WALDRON, K. C. **Reproducibility of a solid-phase trypsin microreactor for peptide mapping by capillary electrophoresis.** *Analytica Chimica Acta* **404**, 29645, 2000.
  12. BONNEIL, E.; WALDRON, K. C. **On-line system for peptide mapping by capillary electrophoresis at sub-micromolar concentrations.** *Talanta* **53**, 6876-699, 2000.
  13. PAN, S. *et al.* **Mass Spectrometry Based Targeted Protein Quantification : Methods and Applications.** *Journal Proteome Research* **8**, 7876797, 2009.
  14. HEIGER, D. *An introduction high performance capillary electrophoresis.* Ed. Agilent Technologies, 2000.
  15. TAVARES, M. F. M. **Eletroforese capilar: conceitos básicos.** *Química. Nova* **19**, 1736181, 1996.
  16. JORGENSON, J. W.; LUKACS, K. D. **Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries.** *Analytical Chemistry.* **53**, 129861302, 1981.
  17. SCHWARTZ, H.; PRITCHETT, T. *Introduction to Capillary Electrophoresis.* Ed. Beckman Coulter.
  18. SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. **Conceitos básicos em Eletroforese Capilar.** *Science Chromatography.* **4**, 2876297, 2012.
  19. SCHWARTZ, H.; PRITCHETT, T. *Separation of Proteins and Peptides by Capillary Electrophoresis : Application to Analytical Biotechnology Separation of Proteins and Peptides by Capillary Electrophoresis : Application to Analytical Biotechnology.* Ed. Beckman Coulter.
  20. HU, S.; DOVICH, N. J. **Capillary electrophoresis for the analysis of biopolymers.** *Analytical Chemistry* **74**, 283362850, 2002.
  21. TAVARES, M. F. M. **Mecanismos de separação em eletroforese capilar.** *Química*

*Nova* **20**, 4936511, 1997.

22. MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; VINH, J.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. **Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry.** *Electrophoresis* **25**, 13676-1378, 2004.
23. BERGSTROM, T.; FREDRIKSSON, S.-Å.; NILSSON, C.; ÅSTOT, C. **Deamidation in ricin studied by capillary zone electrophoresis- and liquid chromatography-mass spectrometry.** *Journal of Chromatography B* **974**, 1096-117, 2015.
24. CHIU, R. W.; JIMENEZ, J. C.; MONNIN, C. A. **High molecular weight polyarginine as a capillary coating for separation of cationic proteins by capillary electrophoresis.** *Analytica Chimica Acta* **307**, 1936201, 1995.
25. DARTIGUENAVE, C.; HAMAD, H.; WALDRON, K. C. **Immobilization of trypsin onto 1,4-diisothiocyanatobenzene-activated porous glass for microreactor-based peptide mapping by capillary electrophoresis: effect of calcium ions on the immobilization procedure.** *Analytica Chimica Acta* **663**, 1986-205, 2010.
26. ASSUNÇÃO, N. A.; BECHARA, E. J. H.; SIMIONATO, A. V. C.; TAVARES, M. F. M.; CARRILHO, E. **Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS): vinte anos de desenvolvimento.** *Química Nova* **31**, 212462133, 2008.
27. ZHU, G.; SUN, L.; DOVICH, N. J. **Thermally-initiated free radical polymerization for reproducible production of stable linear polyacrylamide coated capillaries, and their application to proteomic analysis using capillary zone electrophoresis-mass spectrometry.** *Talanta* **146**, 8396843, 2016.
28. ZIP TIP PROTOCOL. em <<http://www.millipore.com/catalogue/module/c5737>>
29. LAUER, H. H.; MCMANIGILL, D. **Capillary zone electrophoresis of proteins in**

- untreated fused silica tubing.** *Analytical Chemistry* **58**, 1666170, 1986.
30. LEE, K.-J.; HEO, G. S. **Free solution capillary electrophoresis of proteins using untreated fused-silica capillaries.** *Journal Chromatography* **559**, 3176324 (1991).
31. 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* **27**, 7716780, 2004.
32. MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; VINH, J.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. **Two Glutaraldehyde-Immobilized Trypsin Preparations for Peptide Mapping by Capillary Zone Electrophoresis , Liquid Chromatography , and Mass Spectrometry.** *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **31**, 7896806, 2008.

# Anexo 1

Food Chemistry 183 (2015) 154–160



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)



Analytical Methods

## Simultaneous determination of synthetic colorants in yogurt by HPLC



Waleska de Araújo Siqueira Bento<sup>a</sup>, Bruno Parente Lima<sup>b,1</sup>, Ana Paula S. Paim<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química Fundamental, Avenida Jornalista Aníbal Fernandes, s/n<sup>o</sup>, Cidade Universitária, CEP 50740-560 Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup> Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco (LANAGRO), Rua Manoel de Medeiros, s/n<sup>o</sup> – Dois Irmãos, CEP: 52171-030 Recife, PE, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 November 2014

Received in revised form 10 March 2015

Accepted 14 March 2015

Available online 20 March 2015

#### Keywords:

Sample preparation

Yogurt

Milk drink

Synthetic colorant

HPLC

### ABSTRACT

This article reports on a method to determine synthetic dyes in yogurts and milk drinks. Initially a method for extraction of artificial dyes was developed to pretreat samples in order to extract most of the artificial colorants. Then, the colorants were analyzed by HPLC–PAD using gradient elutions. The method was linear in the range of 0.5–25 mg L<sup>-1</sup> colorants (0.9991 < R<sup>2</sup> < 0.9998), with LOD of 0.18–4.58 µg L<sup>-1</sup>. The results recovery test on two levels ranged from 82% to 115%. The reference solution of the analytes remained stable for 3 months. In the yogurt samples analyzed, the dye E122 (1.4–11.75 mg L<sup>-1</sup>) was found in most samples, followed by dye E123 (3.12 and 12.56 mg L<sup>-1</sup>). All samples had concentrations below the maximum level allowed for use in yogurt (100 mg/100 g dyes).

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Yogurt is a product obtained by fermenting milk with the lactic acid bacteria *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* (Trejo, Corzo-Martinez, Wilkinson, Higginbotham, & Harte, 2014). Yogurt can contain a maximum of 30% (w/w) non-dairy ingredients (MAPA, 2007), while milk drink, under Brazilian law, has to contain at least 51% milk (w/w), whey or milk derivatives reconstituted or not, fermented or not, and may have an additive or microorganisms (MAPA, 2005).

The use of food additives is a common practice throughout the world. Food synthetic colorants are the most interesting group of food additives used in the food industry because the color of a product is important for its attractiveness to the consumer (Kucharska & Grabka, 2010). However, their use range and dosage are restricted strictly around the world (Sun, Sun, Li, Zhang, & Yang, 2013).

In Brazil, the use and maximum limit of colorants in foods is controlled by the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA), based on a legislative resolution (ANVISA, 1999).

Food can be colored with natural or synthetic food colorants. Natural food colorants can be isolated from suitable plants, fungi

or insects (Zeng, Wang, Zhang, & Tong, 1993). Synthetic colorants are also widely used for coloration of food not only to improve appearance and color but also to maintain the natural color during processing or storage (Ghoreishi, Behpour, & Golestaneh, 2012; Llamas, Garrido, Di Nezio, & Fernandez-Band, 2009). Synthetic colorants have several advantages, compared to natural colorants, such as high stability with relation to light, oxygen and pH, color uniformity, low microbiological contamination, and relatively lower production costs (Alves, Brum, Andrade, & Netto, 2008).

The following synthetic azo colorants are permitted in food in Brazil: Tartrazine (INS102), Sunset yellow (INS110), Azorubine (INS122), Amaranth (INS123), Ponceau 4R (INS124), and Allura Red (INS129). The permitted food colorants that are not azo are: Erythroazine (INS127), Patent Blue V (INS131), Indigo Carmine (INS132), Brilliant Blue FCF (INS133) e o Fast Green FCF (INS143).

Synthetic colorants are organic compounds with a chemical structure containing double bonds alternating with single bonds, simple or conjugated aromatic rings and azo compounds. The azo-colorants are capable of being reduced by azoreductase enzymes in intestinal bacteria and in liver cells with the release of aromatic amines to the organism (Hildenbrand, Schmahl, Wodarz, Kimmel, & Dartsch, 1999; Rafi, Hall, & Cerniglia, 1997). This may cause frequent headaches in adults while children often become distracted and hyperactive (Hawley & Buckley, 1976). These effects make knowledge about food components an important issue for the detection of and information on the synthetic colorants in food-stuffs and beverages.

\* Corresponding author. Tel.: +55 81 21267469; fax: +55 81 21268440.

E-mail addresses: [anaspaim@ufpe.br](mailto:anaspaim@ufpe.br), [paulapaim@pq.cnpq.br](mailto:paulapaim@pq.cnpq.br) (A.P.S. Paim).

<sup>1</sup> Present address: Laboratório Nacional Agropecuário no Pará – Lanagro/PA – Coordenação Geral de Apoio Laboratorial – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Av. Almirante Barroso, n<sup>o</sup> 1234, Belém, PA, Brazil.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.050>

0308-8146/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Towards developing this knowledge, many analytical methods have been developed using spectrometric determination (Blanco, Campana, & Barrero, 1996; El-Sheikh & Al-Degs, 2013; Ni, Qi, & Kokot, 2001; Santos, Demiate, & Nagata, 2010), Raman spectroscopic (Uhlemanna et al., 2012), voltammetry (Gan, Sun, Meng, Song, & Zhang, 2013; Ghoreishi et al., 2012; Ni, Bai, & Jin, 1997), capillary electrophoresis (Huang, Chiu, Sue, & Cheng, 2003; López-Montes, Dupont, Desmazières, & Lavédrine, 2013; Prado, Boas, Bronze, & Godoy, 2006), and high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) (Kirschbaum, Krause, Pfalzgraf, & Bruckner, 2003) for synthetic colorant determination in foodstuffs and beverages. These techniques require prior sample preparation and can be used anywhere from a simple dilution followed by filtration up to more advanced techniques such as solid phase extraction (SPE) through centrifugation and sonication of samples to extract all the colorant. The complexity of the sample preparation will depend on the type of sample being analyzed.

Procedures to determine colorants in samples of yogurt, however, were not found in the literature. The aim of the present work, then, was to develop an HPLC-DAD method for the separation and quantification, in a single run, of the 10 food synthetic colorants in yogurt. The colorants taken into account were used as permitted as food additives in food: i.e. INS numbers 102, 110, 122, 123, 124, 127, 129, 132, 133 and 143.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

Chromatographic analysis was carried out with a Liquid chromatograph from Shimadzu (Kyoto, Japan), containing a Prominence line operating system with a quaternary pump solvent type LC-20AT, automatic injector SIL-20A, UV-Vis detector with a photodiode array SPD-M20A, column oven CTO-20AC, communication module between the microcomputer and HPLC model CBM-20A, DGU-20A5 degasser. The software LC Solution v.1.25SP1 was used for data acquisition and processing.

A manual pipettor Ecopipette CAPP (10–100 mL), and PA162 PACHANE shaker tubes, a centrifugal brand Cientec CT-5000DR and an automatic pipettor Thermo Scientific (100–1000 µL) were used to prepare the reference and sample solutions.

A spectrometer UV/VIS Lambda 25 (Perkin Elmer) was used for the acquisition of synthetic colorants absorption spectrum. The pH of the buffer solution was measured by a pHmeter pH 2100 series OAKTON (Vernon Hills, IL, USA).

### 2.2. Chemical and reagents

All the chemicals were of an analytical grade and used without further purification. The water was purified with a Milli-Q system (Millipore, USA).

Methanol (HPLC grade) was purchased from Panreac PAI-ACS (Barcelona, Spain), acetonitrile (HPLC grade) was purchased from Burdick & Jackson ACS (Muskegon, MI, USA), and methanol PA from PROQuímios (Rio de Janeiro, Brazil).

The following synthetic food colorants were analyzed: Tartrazine (INS 102), Bordeaux-S (INS 123), Ponceau-4R (INS 124), Erythrosine (INS 127) and Fast Green (INS 143) from Sigma (St. Louis, MO, USA); Twilight Yellow (INS 110) from Aldrich; Azorubine (INS 122) from Fluka (St. Louis, MO, USA); 40 Red (INS 129), Indigo Carmine (INS 132) and Brilliant Blue (INS 133) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

A solution of 0.35 mol L<sup>-1</sup> K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O (RK) was prepared by dissolving 15 g solid (Neon, Brazil) in 100 mL water. A 2 mol L<sup>-1</sup> ammonia solution was prepared by dilution of 10 mL

concentrated solution (Vetec, Brazil) in 90 mL water. A solution 1 mol L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (RZn) was prepared by dissolving 28.7 g of solid (Alphatec, Brazil) in 100 mL water. Solution 0.13 mol L<sup>-1</sup> CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> was prepared by dissolving 77.1 mg (Vetec, Brazil) in 100 mL water. Reference solutions and reagents were stored in amber glass bottles, except the solutions of ammonium hydroxide and ammonium acetate. These were prepared daily.

### 2.3. Determination of the purity of colorants

Some synthetic dyes are sold with impurities making the determination of the purity of these necessary. To determine purity, 100 mg of colorant is dissolved in 100 mL of purified water and this has been taken as the reference solution. The percentage of purity was calculated accordingly (Minioti, Sakellariou, & Thomaidis, 2007). In this equation, the following variables are considered: dilution factor of measured solution from standard solution; absorbance of measure solution with reference to water; concentration of reference solution; and specific absorbance of aqueous solution of the colorant at 1% (w/v).

### 2.4. Preparation of reference solution of colorant

Considering the purity of each synthetic colorant, mixed reference working solutions in concentrations ranging from 0.5 to 25 mg L<sup>-1</sup> were prepared by mixing the individual standards and diluting them with water. All solutions were stored under refrigeration at 4 °C and remained stable for three months.

The colorants were determined at 427 nm (INS 102), 480 nm (INS 110), 515 nm (INS 122), 520 nm (INS 123), 508 nm (INS 124), 527 nm (INS 127), 505 nm (INS 129), 610 nm (INS 132), 629 nm (INS 133), and 624 nm (INS 143).

### 2.5. Sample

Fifteen samples of yogurt and fermented milk drinks with different flavors were purchased from commercial markets in Recife (Pernambuco, Brazil). All samples were stored in a refrigerator, at 5 °C, until analysis.

### 2.6. Extraction of colorants from samples

As a necessary step for the precipitation of proteins, three samples containing 10 g of yogurt or milk drink was blended with 0.5 mL of K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O (0.35 mol L<sup>-1</sup>) and 0.5 mL ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1 mol L<sup>-1</sup>) in a 50 mL Falcon tube. The solution was agitated with a tube shaker (PA162 PACHANE) immediately after each addition and left to stand for 10 min. After this time interval, 10 mL of solution methanol:ammonium hydroxide (2 mol L<sup>-1</sup>) (80:20) was added, the solution was stirred and centrifuged using a centrifuge (Cientec CT-5000DR) at 6000 rpm and 4 °C for 10 min. The centrifugal step was repeated twice more, each time with an addition of 10 mL methanol:ammonium hydroxide, in order to extract the maximum possible colors from the samples.

After each centrifugation, the fractions were collected and transferred to the same 50 mL volumetric flask and its volume was topped up with purified water. An aliquot of the final solution (1 mL) was filtered through 0.45 µm membrane filters from Millipore (Brazil) using a plastic syringe with a capacity of 10 mL of Plascalpand and transferred to a vial with capacity of 1.5 mL of Uniglas and then injected into the chromatograph. The concentration of each sample was determined by HPLC-PAD.

### 2.7. Evaluation of extraction percentage of colorants

To determine the percentage of colorant extracted, three samples containing 10 g of yogurt (white, free of colorants), was mixed

with volumes corresponding to each colorant from the reference solution at 5 mg L<sup>-1</sup>.

The samples were prepared according to item 2.6. After each centrifugation, the fraction was transferred to volumetric flask of 50 mL and its volume was topped up with purified water. The concentration of each fraction was measured by HPLC–PAD and the percentages of extraction were calculated and compared to the value of 5 mg L<sup>-1</sup>.

### 2.8. Chromatographic conditions

A NUCLEODUR C18ec column (Macherey–Nagel, Dueren, Germany, 150 mm × 4.6 mm i.d.), with a medium density octadecyl modification, endcapped with spherical shaped 3 μm particles and with a carbon load of 17.5% was used for the separation.

The mobile phase consisted of eluent A, ammonium acetate 1% (pH 7.0, adjusted with ammonium hydroxide); and eluent B, methanol:acetonitrile (80:20). The gradient elution program is shown in Table 1. The injection volume was 20 μL. The flow rate was 1.2 mL min<sup>-1</sup>, the column temperature was maintained between 38–40 °C and the mobile phase was passed through 0.45 μm membrane filter. The food colorants were determined at 427–624 nm.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Determination of the purity of colorants

The manufacturing process can reduce the colorant content (Kirschbaum et al., 2003) by formation of inorganic salts as by-products, e.g. NaCl, thus leading to erroneous or unreliable results. For this reason, investigation of the purity of colorants is an important preliminary step to minimize or even eliminate this type of error.

The values of the maximum wavelength, specific absorbance, purity percentage, and concentration for each colorant reference solution are presented in Table 2. The wavelength of absorption maximum was used for the chromatographic analysis with a photodiode array detector.

As can be seen, the purity of colorant standards ranged from 59.0% (INS133) to 87.2% (INS127). Therefore, for posterior studies, colorant standard solutions were prepared in accordance with their purity values.

Reference solution stability was determined by comparing the instrumental response generated by reference solution storage with the analytical signal generated by a freshly prepared solution. The aqueous solutions were diluted 1:10 or 1:20, depending on the solution. The absorbance from 370 to 800 nm was measured on the day that the reference solutions were prepared and then every 30 days using an UV–Visible spectrometer. In this work, all solutions of colorants were stored at 4 °C in the dark and were stable for at least 3 months. In the literature (Miniotti et al., 2007), it is reported that these solutions have minimal stability of two months when stored under refrigeration in amber vials.

### 3.2. Extraction of colorants from samples

Four methodologies for sample preparation were tested to precipitate proteins and lipids and maintain the colorants in supernatant. The first test was based on the method of sample preparation for the determination of benzoic and sorbic acids in milk and milk products (ISO 9231, 2008), in order to precipitate proteins present in the samples. In part 1 of this test, 25 mL of NaOH (0.1 mol L<sup>-1</sup>) and 40 mL of methanol were added to the yogurt samples. This step was excluded from the next tests,

**Table 1**  
Gradient program for separation of the artificial food colorants.

Time (min)	Mobile phase A (%) <sup>a</sup>	Mobile phase B (%) <sup>a</sup>
0	100	0
2	100	0
37	20	80
40	20	80
45	100	0
50	100	0

<sup>a</sup> Mobile phase A is ammonium acetate 1% (pH 7.0) and mobile phase B is methanol:acetonitrile (80:20).

**Table 2**  
Specific absorbance, maximum wavelength, calculated purity percentage and real concentration of each colorant reference solution.

Colorants	A <sub>1cm</sub> <sup>1%</sup>	λ <sub>max</sub> (nm)	Purity (%)	Real concentration of the reference solution (mg L <sup>-1</sup> )
INS 102	530	427	77.9	790.5
INS 110	555	480	82.7	833.2
INS 122	510	515	75.6	795.3
INS 123	440	520	82.4	840.8
INS 124	430	508	73.3	746.7
INS 127	1100	527	87.2	887.0
INS 129	540	505	85.2	852.7
INS 132	480	610	86.6	868.7
INS 133	1630	629	59.0	592.6
INS 143	1560	624	59.4	607.7

because even if the synthetic colorant extraction were successful, the final solution would be too diluted, which could hinder the detection and/or quantification of the analytes in real samples. Another drawback was the turbidity of the supernatant solution and the inefficient precipitation of proteins and lipids, thus proving the inefficiency of test 1.

The second test was conducted to verify if the precipitation of proteins occurred and whether the colorant solubility in the supernatant increased; low volumes of RK and RZN reagents and ten mL of water:ammonium hydroxide (9:1) were added at the pre-treatment and solubility stages, respectively. Although the precipitation was effectively observed, the resulting solution remained turbid, indicating that the colorants had not been totally dissolved and, as a result, the solid material had not completely precipitated.

Another strategy involved a mixture of ammonium hydroxide (ISO 13496, 2000; Zenebon, Pascuet, & Tiglea, 2008) and methanol (Bonan, Fedrizzi, Menotta, & Elisabetta, 2013) solutions in the proportion of 8:2 methanol:ammonium hydroxide (2 mol L<sup>-1</sup>), to test if the solubility of the synthetic colorant in the supernatant increased. The objective of this test is to verify if the presence of the organic solvent causes the salts (arising from the RK and RZN for example) to migrate to the aqueous phase and agglomerate more easily, anticipating the precipitation of the proteins. When no organic solvent was used, the solution became turbid and there was little precipitate forming material, as in the first test.

The fourth test was performed with addition of methanol to form an extraction mixture with the ammonium hydroxide solution in a ratio of 1:1 (MeOH:NH<sub>4</sub>OH (aq)). With this solution the separation between the supernatant and the precipitate increased considerably compared to the second test. Therefore, it was decided to perform a fourth test, increasing the proportion of organic solvent to 8:2 (MeOH:NH<sub>4</sub>OH (aq)), which then yielded a much clearer supernatant and totally precipitated solid material.

In these tests, most of the natural colorants were not extracted, with the exception of the Annatto natural colorant (INS 160b) which is soluble in polar solvents, as reported by Tocchini and

Mercadante (2001), who used methanol and acetone to extract the colorant from plant seeds. Costa and Chaves (2005) tested different types of solvent/extraction solutions (hexane, acetone,  $\text{NaHCO}_3$  (aq), and  $\text{NaOH}$  (aq)) to find better extraction efficiency which was obtained with the  $\text{NaOH}$  (aq) solution. This means that the extraction is similar to that used in the present work, employing methanol in a basic medium. However, except for this colorant, the proposed method is not able to extract natural colorants, being unique to artificial colors. According to Qi, Zeng, Wen, Liang, and Zhang (2011) natural colorants are easily extracted using solvents of low polarity such as hexane.

### 3.3. Evaluation of extraction percentage of colorants

Three extractions of colorants from the samples were accomplished using the proposed method described in 3.2. The extraction percentages were calculated after each extraction to verify if a substantial part of the analyte had been extracted from the sample. The percentage of extraction was calculated comparing with the sample concentration ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) and are shown in Supplementary Table S1.

The lowest extraction efficiency was observed for the synthetic colorant INS 129 ( $64.3 \pm 3.8\%$ ). Even after three extractions, the extraction efficiency for the INS 129 was not as high as for the other colorants as, for example, INS 123 ( $97.8 \pm 1.0\%$ ). The use of a methanol–water (95:5) mixture employed by Sun et al. (2013) resulted in extraction efficiency around 80% and 64% for the INS129 and INS127 colorants. Use of methanol as extraction reagent is important because polar compounds are soluble in methanol. In our work, besides the use of methanol, we also used ammonium hydroxide to raise the pH value, in order to deprotonate the colorants and render them more soluble in the aqueous medium. The structures of the colorant are shown in Supplementary Fig. S1.

### 3.4. Optimization of the separation

A simple method to determine ten food colorants in a single procedure is advantageous for routine analysis. Towards this, gradient elution was tested to attain complete separation of the artificial colorants. Three initial tests were evaluated using the following: phosphate buffer (pH 6.0) and methanol; ammonium acetate buffer (pH 6.5) and methanol; and 1% (m/v) ammonium acetate solution at pH 6.0 and a mixture of methanol:acetonitrile (80:20). The ammonium acetate buffer is known as a modifier for the purification and separation of azo food colorants (Dinc, Aktas, & Ustundag, 2005; Garcia-Falcon & Simal-Gandara, 2005; Miniotti et al., 2007).

The results obtained in these three tests, however, were unsuccessful. The INS122, INS133, INS143 colorants did not have a satisfactory chromatographic separation with the presence of double peaks in the chromatograms. The INS143 colorant presented a retention time of 41 minutes. Thus, it was necessary to make changes in the composition of the mobile phase to improve these results. The best results were achieved by use of the mobile phase containing an acetonitrile–methanol (20:80) mixture and 1% (m/v) ammonium acetate solution at pH 7.0 (adjusted with ammonium hydroxide solution). Increasing the pH of the aqueous portion of the mobile phase resulted in a poor resolution of the separation of some colorants. A higher concentration of ammonium acetate led to an increase of the retention time, probably due the enhanced interaction of the analyte with the stationary phase.

The elution gradient was established based on Miniotti et al. (2007), but some adjustments were made, such as a modification of the pH of the mobile phase to 7.0, because the C-18 column is damaged if a solution with a pH higher than 8.0 (Lanças, 2009) is

used. Also, the base used to adjust the pH of ammonium acetate solution was an ammonium hydroxide solution, used to minimize the amount of different ions in the column. Ammonium hydroxide was also used in the sample preparation. These changes did not modify the order of elution and they diminished the time necessary for the chromatographic separation. A chromatogram of the elution of the colorants was obtained with the optimized gradient program (Table 1) by scanning in the wavelength range from 300 to 650 nm, continuously, as shown in Fig. 1.

A total of 60 mL of the solvents methanol, acetonitrile and 1% (m/v) ammonium acetate solution was consumed during the 50 min of the chromatographic run at a gradient program flow of  $1.2 \text{ mL min}^{-1}$ .

The azo compounds were the first to be eluted from the chromatographic column, followed by non-azo colorants, except for INS 132, which was the third eluted compound. INS 132 is not an azo colorant, but has ketones and amine functions, which confer a polar character onto the compound. The last three synthetic colorants eluted were INS133, INS143 that are derived from triphenylmethane, followed by INS127 that is classified as xanthene (Prado & Godoy, 2003) and have an apolar character. Thus, these compounds interact longer with the column and they are the last to be eluted.

Some of colorants contain sulfur in their chemical structure, thus creating small peaks in the chromatogram derived from isomers probably in mono, di and tri-sulfo-derivative forms (Bonan et al., 2013; Miniotti et al., 2007). This occurred with the INS 133 and INS 143 colorants. As can be observed, the INS 133 (22.35 min) colorant appears with a small shoulder in the signal and the INS 143 (22.85 and 23.02 min) showed two signals. Analysis using a photodiode array detector (PAD) confirmed that these peaks did not represent a co-elution.

### 3.5. Validation of the method

Linear equations of mixed reference solutions, coefficients of determination ( $R^2$ ), limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), resolution ( $R_s$ ), retention time (TR) and repeatability (intra-assay) RSD (%) of each synthetic colorant studied are presented in Table 3.

Calibration curves were traced for a mixed colorant solution in range of  $0.5$  to  $25 \text{ mg L}^{-1}$  of each colorant and the calibration equations were determined using the peak area of the substances. In the case of the INS 143 colorant, the sum of the peak areas of two signals was used.

Linearity was evaluated by the values of the coefficients of determination ( $R^2$ ) and linear calibration curve for each synthetic colorant, shown in Table 3. As can be seen, linearity was obtained in the range of  $0.5$  to  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , with the correlation coefficient of  $0.9991$ – $0.9998$ .

The value of the limit of detection (LOD) was calculated as three times the standard deviation of the blank solution divided by the slope of the analytical curve. The limit of quantification (LOQ) was ten times the standard deviation of the blank solution divided by the slope of the analytical curve for each colorant analyzed (Ribani, Bottoli, Collins, Jardim, & Melo, 2004). The LOD and LOQ ranged from  $0.18$  to  $4.58 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  and from  $0.54$  to  $13.9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. These values are consistent with the literature, where some authors Miniotti et al. (2007) and Vachirapatama, Mahajaroensiri, and Visessanguan (2008) reported values similar to those found in the present study.

Selectivity was assessed, initially, by calculating the resolution ( $R_s$ ) of the chromatographic peak, as can be seen in Table 3. According to the literature (Lanças, 2009) the acceptable resolution value for a method of quantification is from 1.5, as indication that most signals are well resolved. The resolution of colorants INS 123

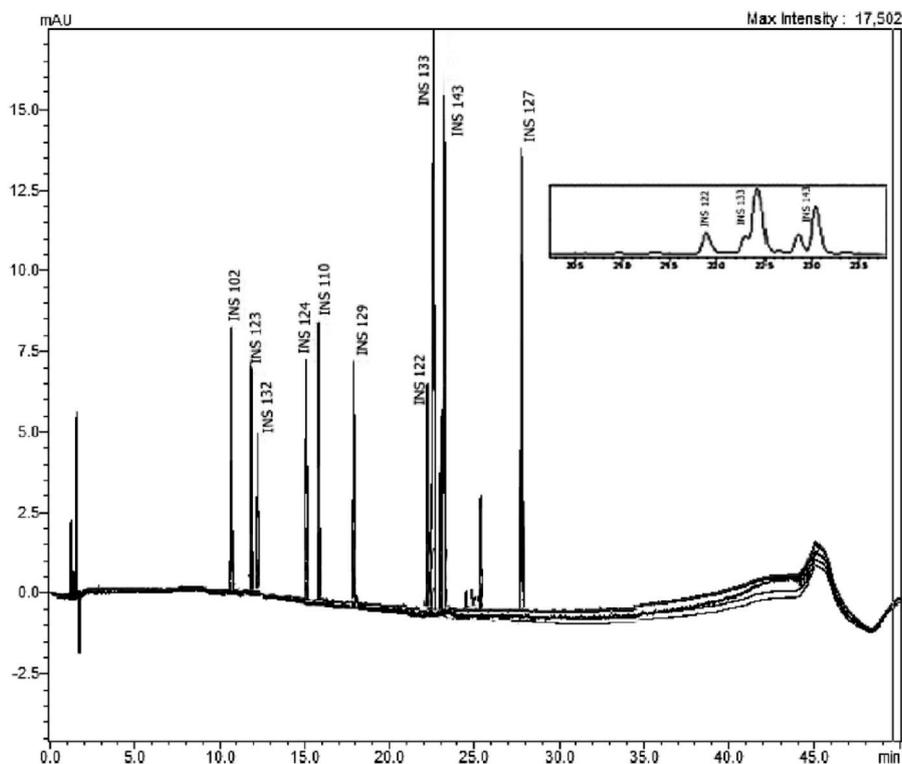


Fig. 1. Chromatogram of a reference mixture solution using the gradient program in Table 1.

Table 3

Linear equations, coefficients of determination ( $R^2$ ), limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), resolution ( $R_s$ ), retention time ( $t_R$ ), repeatability (intra-assay) and RSD (%) of each synthetic colorant studied.

Colorant	Calibration equation	$R^2$	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$R_s$	$t_R$ (min)	Repeatability (intra-assay) RSD (%)
INS102	Area = $5756.3 + 62743.4 \times C$	0.9997	1.22	3.71		10.70	1.23
INS110	Area = $5076.4 + 61803.3 \times C$	0.9996	1.06	3.49	4.2	15.65	0.99
INS122	Area = $3862.3 + 56212.0 \times C$	0.9993	1.32	4.01	1.4	21.88	1.57
INS123	Area = $9730.9 + 50334.9 \times C$	0.9998	1.41	4.27	10.8	11.88	1.30
INS124	Area = $-252.3 + 53602.1 \times C$	0.9998	1.20	3.64	4.3	14.80	1.81
INS127	Area = $-13284.2 + 1.4 \times 10^5 \times C$	0.9997	0.37	1.12	9.6	27.36	2.83
INS129	Area = $8436.2 + 63810.8 \times C$	0.9998	4.58	13.9	16.6	17.79	16.20
INS132	Area = $-8374.5 + 42846.3 \times C$	0.9991	1.36	4.13	2.4	12.25	2.58
INS133	Area = $4468.1 + 2.7 \times 10^5 \times C$	0.9996	0.18	0.54	3.0	22.35	1.11
INS143	Area = $12222.8 + 1.7 \times 10^5 \times C$	0.9998	0.29	0.89	16.2	23.02	1.43

$n = 6$ ; C: concentration.

and INS 132 was slightly unsatisfactory ( $R_s = 1.43$ ). However, this value was considered acceptable and there were no difficulties in identifying or quantifying the two colorants. The second method used to determine the selectivity, using a photodiode array detector, is by analyzing the ascending and descending zone of the chromatographic signal and checking to see if there is any change in the absorbance spectrum in the UV–VIS region of the compound interest. In other words, if the total area of the signal has the same absorbance spectrum, this means that is a single compound. The analysis of all signals found non-co-eluting compounds but no interfering species.

The retention time ( $t_R$ ) of each colorant, in minutes, showed that an excellent separation was achieved within 28 min. This indicates that 50 min is sufficient time for one measure, considering the stabilization time of column and preparation of system for the next analysis.

The repeatability was evaluated to certify the accuracy of the method and was expressed through the residual standard deviation (RSD).

The accuracy and the recovery (Table 4) of the method were verified at two fortification levels (1 and  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) and the RSD calculation ranged from 0.33 to 2.72% ( $n = 3$ ). The RSD values

**Table 4**  
Average percentage of recovery (%) and RSD values for each concentration level of artificial colorant analyzed.

Colorant	1 mg L <sup>-1</sup>	10 mg L <sup>-1</sup>
INS 102	98.1 ± 0.3	106.6 ± 1.3
INS 110	105.1 ± 1.6	100.1 ± 1.7
INS 122	101.9 ± 1.6	97.1 ± 1.6
INS 123	103.0 ± 1.6	97.1 ± 1.8
INS 124	100.2 ± 1.7	97.2 ± 1.7
INS 127	99.8 ± 1.5	94.4 ± 1.6
INS 129	97.2 ± 2.5	81.8 ± 2.0
INS 132	114.7 ± 0.3	111.4 ± 2.7
INS 133	101.6 ± 1.6	98.1 ± 1.7
INS 143	101.1 ± 1.7	98.8 ± 1.6

n = 3.

**Table 5**  
Artificial colorants identified and quantified in real samples of yogurt (Y) and milk drink (MD).

Sample	Name of colorant declared on the label	Colorant found	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )
Y1	INS 110	NI	
MD2	No artificial colorant	NI	
MD3	INS 124	INS 110	0.89 ± 0.27
MD4	No artificial colorant	NI	
MD5	INS 122	INS 122	5.34 ± 0.15
MD6	INS 123	INS 122	1.43 ± 0.05
Y7	INS 124	NI	
	INS133		
Y8	INS122	INS 122	5.32 ± 0.62
MD9	INS 122	INS 122	11.75 ± 0.21
MD10	INS 122	INS 122	11.72 ± 0.13
Y11	INS 123	INS 123	12.56 ± 0.08
	INS 110		
MD12	INS 123	NI	
	INS 124		
MD13	INS 102	INS 102	75.30 ± 3.85
	INS 110	INS 127	4.16 ± 0.00
MD14	INS 124	INS123	3.12 ± 0.03
		INS124	12.16 ± 0.12
MD15	INS 110	NI	

n = 3.

obtained are below the maximum limit for trace analysis or impurities in samples, which is 20% for chromatographic analyses (Ribani et al., 2004).

The data showed that the recovery for the analytes was in the range of 81.84–114.68% and these results are within the level considered acceptable in the literature. This demonstrates that the approach could ensure simultaneous examination of 10 food colorants with better recovery.

### 3.6. Application to real samples

The method developed was applied to analyze fifteen samples of yogurt and milk drink and the results are shown in Table 5.

As can be seen, 6 out of the 10 colorants were detected, at least once. The concentrations of colorants in yogurt and milk drink ranged from 0.89 (sample MD3) to 75.30 mg L<sup>-1</sup> (sample MD13).

The sample MD13 had the highest concentration among the others, containing 75.30 ± 3.85 mg L<sup>-1</sup> of INS 102 colorant. A curious fact is that some manufacturers report that their product contains a particular colorant although our method identified and quantified a different one and sometimes there was no synthetic colorant. As an example, in the samples Y7, MD12 and MD15 the colorants were not identified or the values were below the limit of detection for all colorants studied in this work.

Among the samples analyzed there were two (samples MD2 and MD4), where the manufacturer stated that no artificial colorant had been used, just natural. Analysis confirmed the absence of artificial colorant or values were below the LOD for the colorant amounts present in the proposed method. In the others, the most commonly used dye was INS 122, having been identified in 33% of samples in a range from 1.43 to 11.75 mg L<sup>-1</sup>.

## 4. Conclusions

A method was developed to determine ten artificial food colorants, commercially accepted in Brazil and other countries, in samples of yogurt and milk drinks. For this purpose, initially, a method of sample preparation was developed, which involved a simultaneous extraction step for the ten artificial colorants. The extraction method was simple, rapid and of moderate cost. Although a centrifuge was used to mix the solutions, when compared to the cost of more sophisticated methods of extraction such as solid phase extraction, the method developed in this work was inexpensive.

The method was validated, and the colorant concentration in the samples varied from 0.89 to 75.30 mg L<sup>-1</sup> for INS 110 and INS 102, respectively. The concentration of certain artificial colorants in real samples was below the upper limit of 1000 mg/100 g. Among the artificial colorants quantified in samples of yogurt and milk drinks, INS 122 was identified in 33% of samples. The method developed proved specific for artificial colorants but not for the natural colorant Annatto.

## Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.050>.

## References

- Alves, S. P., Brum, D. M., Andrade, E. C. B., & Netto, A. D. P. (2008). Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection. *Food Chemistry*, *107*, 489–496.
- ANVISA (National Agency of Sanitary Surveillance). Resolution nº 387, August 5, 1999. URL <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/634c188049da4ee8ad9aaf6dcb9c53c/Microsoft+Word+Resolu%C3%A7%C3%A3o+n%C2%BA+387+de+05+de+agosto+de+1999.pdf?MOD=AJPERES>. Accessed 05.08.14.
- Blanco, C. C., Campana, A. M. G., & Barrero, F. A. (1996). Derivative spectrophotometric resolution of mixtures of the food colourants Tartrazine, Amaranth and Curcumin in a micellar medium. *Talanta*, *43*, 1019–1027.
- Bonan, S., Fedrizzi, G., Menotta, S., & Elisabetta, C. (2013). Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Dyes and Pigments*, *99*, 36–40.
- Costa, C. L., & Chaves, M. H. (2005). Extração de pigmentos das sementes de Bixa orellana L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. *Química Nova*, *28*, 149–152.
- Ding, E., Aktas, A. H., & Ustundag, O. (2005). New liquid chromatographic-chemometric approach for the determination of sunset and tartrazine in commercial preparation. *Food Composition and Additives*, *88*, 1748–1755.
- El-Sheikh, A. H., & Al-Degs, Y. S. (2013). Dyes and pigments spectrophotometric determination of food dyes in soft drinks by second order multivariate calibration of the absorbance spectra-pH data matrices. *Dyes and Pigments*, *97*, 330–339.
- Gan, T., Sun, J., Meng, W., Song, L., & Zhang, Y. (2013). Electrochemical sensor based on graphene and mesoporous TiO<sub>2</sub> for the simultaneous determination of trace colorants in food. *Food Chemistry*, *141*, 3731–3737.
- García-Falcon, M. S., & Simal-Gandara, J. (2005). Determination of food dyes in soft drinks containing natural pigments by liquid chromatography with minimal clean-up. *Food Control*, *16*, 293–297.

- Ghoreishi, S. M., Behpour, M., & Golestaneh, M. (2012). Simultaneous determination of Sunset yellow and Tartrazine in soft drinks using gold nanoparticles carbon paste electrode. *Food Chemistry*, 132, 637–641.
- Hawley, C., & Buckley, R. E. (1976). Hyperkinesia and sensitivity to aniline food dyes. *Journal of Orthomolecular Psychiatry*, 5, 129–137.
- Hildenbrand, S., Schmahl, W., Wodatz, R., Kimmel, R., & Dartsch, P. C. (1999). Azo dyes and carcinogenic aromatic amines in cell cultures. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 72, 52–56.
- Huang, H. Y., Chiu, C. W., Sue, S. L., & Cheng, C. F. (2003). Analysis of food colorants by capillary electrophoresis with large-volume sample stacking. *Journal of Chromatography A*, 995, 29–36.
- ISO 13496 (2000). Meat and meat products. Detection of colouring agents – Method using thin-layer chromatography. Geneva – Switzerland, 2000. URL [http://www.iso.org/iso/catalogue\\_detail.htm?csnumber=21237](http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=21237). Accessed 05.08.2014.
- ISO 9231 (2008) IDF 139:2008. Milk and milk products – Determination of the benzoic and sorbic acid contents. Geneva – Switzerland, 2008. URL [http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=43697](http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=43697). Accessed 05.08.14.
- Kirschbaum, J., Krause, C., Pfalzgraf, S., & Bruckner, H. (2003). Development and Evaluation of an HPLC-DAD Method for Determination of Synthetic Food Colorants. *Chromatographia Supplement*, 57, 115–119.
- Kucharska, M., & Grabka, J. (2010). A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. *Talanta*, 80, 1045–1051.
- Lanças, F.M. Cromatografia Líquida Moderna HPLC/CLAE. (2009). Editora Atômica, Campinas-SP.
- Llamas, N. E., Garrido, M., Di Nezio, M. S., & Fernandez-Band, B. S. (2009). Second order advantage in the determination of amaranth, Sunset yellow PCF and Tartrazine by UV-vis and multivariate curve resolution-alternating least squares. *Analytica Chimica Acta*, 655, 38–42.
- López-Montes, A. M., Dupont, A. L., Desmazières, B., & Lavédrine, B. (2013). Identification of synthetic dyes in early colour photographs using capillary electrophoresis and electrospray ionisation – mass spectrometry. *Talanta*, 114, 217–226.
- MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). Normative Statement nº 46, October 23, 2007. URL <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspacao/files/2012/08/instru%387%383o-normativa-n%38ba-46-de-23-de-outubro-de-2007.pdf>. Accessed 05.08.14.
- MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply). Normative Statement nº 16, August 23, 2005. URL <http://www.defesaagropecuaria.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=702>. Accessed 05.08.2014.
- Minioti, K. S., Sakellariou, C. F., & Thomaidis, N. S. (2007). Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Analytica Chimica Acta*, 583, 103–110.
- Ni, Y., Bai, L., & Jin, L. (1997). Multicomponent chemometric determination of colorant mixtures by voltammetry. *Analytical Letters*, 30, 1761–1777.
- Ni, Y., Qi, M., & Kokot, S. (2001). Simultaneous spectrophotometric determination of ternary mixtures of tartrazine, sunset yellow, and ponceau 4r by h-point standard addition method. *Analytical Letters*, 34, 2585–2596.
- Prado, M. A., Boas, L. F. V., Bronze, M. R., & Godoy, H. T. (2006). Validation of methodology for simultaneous determination of synthetic dyes in alcoholic beverages by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1136, 231–236.
- Prado, M. A., & Godoy, H. T. (2003). Corantes artificiais em alimentos. *Alimentos e Nutrição*, 14, 237–250.
- Qi, P., Zeng, T., Wen, Z., Liang, X., & Zhang, X. (2011). Interference-free simultaneous determination of Sudan dyes in chili foods using solid phase extraction coupled with HPLC – DAD. *Food Chemistry*, 125, 1462–1487.
- Rañi, F., Hall, J. D., & Cerniglia, C. E. (1997). Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by Clostridium species from the human intestinal tract. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 897–901.
- Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., & Melo, L. F. C. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771–780.
- Santos, M. E., Demiate, I. M., & Nagata, N. (2010). Determinação simultânea de amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo em alimentos via espectrofotometria UV-VIS e métodos de calibração multivariada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 903–909.
- Sun, H., Sun, N., Li, H., Zhang, J., & Yang, Y. (2013). Development of multiresidue analysis for 21 synthetic colorants in meat by microwave-assisted extraction–solid-phase extraction–reversed-phase ultrahigh performance liquid chromatography. *Food Analytical Methods*, 6, 1291–1299.
- Tocchini, L., & Mercadente, A. Z. (2001). Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. *Ciência e tecnologia de Alimentos*, 21, 310–313.
- Trejo, R., Corzo-Martinez, M., Wilkinson, S., Higginbotham, K., & Harte, F. M. (2014). Effect of a low temperature step during fermentation on the physico-chemical properties of fat-free yogurt. *International Dairy Journal*, 36, 14–20.
- Uhlmann, U., Strelau, K. K., Webers, K., Filho, P. A. C., Roscha, P., & Poppac, J. (2012). Raman spectroscopic determination of norbixin and tartrazine in sugar. *Food Additives and Contaminants*, 29, 1244–1255.
- Vachirapatana, N., Mahajaroensiri, J., & Visessanguan, W. (2008). Identification and determination of seven synthetic dyes in foodstuffs and soft drinks on monolithic C18 column by high performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16, 77–82.
- Zenebon, O., Pascuet, N. S., & Tiglia, P. (2008). Instituto Adolf Lutz – Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, São Paulo- SP.
- Zeng, W., Wang, P., Zhang, H., & Tong, S. (1993). Qualitative and quantitative analyses of synthetic pigments in foods by using the branch and bound algorithm. *Analytica Chimica Acta*, 284, 445–451.