

**II Seminário de Corantes Naturais para Alimentos  
I Simpósio Internacional de Urucum**

**ANÁLISE QUÍMICA DE CORANTES**

**Helena Yuco YABIKU**

[www.ourucum.com.br](http://www.ourucum.com.br)

II Seminário de Corantes Naturais para Alimentos  
I Simpósio Internacional de Urucum

## ANÁLISE QUÍMICA DE CORANTES

Helena Yuco YABIKU  
Instituto Adolfo Lutz

Segundo a Resolução nº 04 de 24 de novembro de 1988, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, os corantes são classificados em:

- corantes naturais – C I
- corantes artificiais – C II
- corantes sintéticos idênticos aos naturais – C III
- corantes caramelo – C IV
- corantes inorgânicos – C V

Vários são os métodos analíticos para a determinação de substâncias corantes. Vamos ver alguns métodos dos corantes mais usuais.

Dois são os casos a ser considerados na análise de corantes artificiais:

- quando se trata de corante puro
- quando se trata de corante no alimento

A análise do corante puro compreende várias determinações e devem obedecer às Normas de Identificação e Qualidade que os tornam aptos para ser usados em alimentos (Tabela 1).

### IDENTIFICAÇÃO

Os métodos cromatográficos e espectrofotométricos são mais usados, mais simples e de maior aplicação na rotina.

A cromatografia em camada delgada, sobre sílicagel, dá bons resultados, mas a escolha recai no processo mais simples de cromatografia em papel. Esta técnica dá bons resultados desde que sejam usadas soluções-padrão simultaneamente com as soluções das amostras.

#### Cromatografia em papel

##### Material

Micropipetas, papel Whatman nº 1, cuba cromatográfica.

##### Reagentes

|            |   |                              |       |
|------------|---|------------------------------|-------|
| Solvente A | { | Citrato de sódio . . . . .   | 2g    |
|            |   | Amoníaco (D = 0,92). . . . . | 20ml  |
|            |   | Água até completar. . . . .  | 100ml |
| Solvente B | { | n-butanol . . . . .          | 50ml  |
|            |   | Álcool . . . . .             | 25ml  |
|            |   | Água . . . . .               | 25ml  |
|            |   | Amoníaco (D = 0,92). . . . . | 10ml  |

Soluções-padrão, dos corantes, a 1%

**II Seminário de Corantes Naturais para Alimentos**  
**I Simpósio Internacional de Urucum**

**TABELA 1. Corantes artificiais — Índices de pureza.**

| Nome técnico            | Corantes | Nome científico  | No Color Index 1971 | Determinação — Limite |                            |                                |                           |                |                            |                   |                       |
|-------------------------|----------|--|---------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------|----------------------------|-------------------|-----------------------|
|                         |          |  |                     | Mínimo (%)            | Máximo (%)                 |                                |                           |                |                            |                   |                       |
|                         |          |  |                     | Corante puro          | Substâncias voláteis 135°C | Substâncias insolúveis em água | Substâncias intermedárias | Extrato etéreo | Cloreto e sulfato de sódio | Mistura de óxidos | Corantes subsidiários |
| Amarelo crepúsculo FCF  |          | Sal dissódico do ácido 1-(4-sulfenilazo)-2-naftol-6-sulfônico  | 15.985              | 85,0                  | 10,0                       | 0,5                            | 0,5                       | 0,2            | 5,0                        | 1,0               | 5,0                   |
| Azul brilhante FCF      |          | Sal dissódico do 4-[4-(N-etil-p-sulfobenzilamino)-fenil]-(2-sulfono fenil)-metileno [-1-(N-etil-N-p-sulfobenzil)-delta 2,5-ciclohexadienimina]** | 42.090              | 85,0                  | 10,0                       | 0,2                            | 0,5                       | 0,2            | 5,0***                     | 1,0***            | 3,0                   |
| Bordeaux S ou amarantho |          | Sal trissódico do ácido 1-(4-sulfo-1-naftilazo)-2-naftol-3,6-dissulfônico  | 16.185              | 85,0                  | 10,0                       | 0,5                            | 0,5                       | 0,2            | 5,0                        | 1,0               | 4,0                   |
| Eritrosina              |          | Sal dissódico ou dipotássico do 2',4',5',7'-tetraodofluoresceína   | 45.430              | 85,0                  | 10,0                       | 0,2                            | 0,5                       | 0,1            | 5,0                        | 1,0               | 4,0                   |
| Indigotina              |          | Sal dissódico do ácido indigotina-5,5'-dissulfônico  | 73.015              | 85,0                  | 10,0                       | 0,5                            | —                         | 0,5            | 7,0                        | 1,0               | 5,0                   |
| Ponceau 4R              |          | Sal trissódico do ácido 1-(4-sulfo-1-naftilazo)-2-naftol-6,8-dissulfônico  | 16.255              | 82,0                  | 10,0                       | 0,2                            | 0,5                       | 0,2            | 8,0                        | —                 | 2,0                   |
| Tartrazina              |          | Sal trissódico do ácido 5-hidroxi-1-p-sulfonetil-4-(p-sulfenilazo)-pirazol-3-carboxílico   | 19.140              | 85,0                  | 10,0                       | 0,5                            | —                         | 0,3            | 6,0                        | 1,0               | 3,0                   |
| Vermelho 40*            |          | Sal dissódico do ácido 5-(2-metoxi-5-metil-4-sulfenilazo)-6-hidroxi-2-naftaleno sulfônico  | 16.035              | 85,0                  | —                          | 0,2                            | —                         | —              | —                          | —                 | —                     |

\* Especificações:

a) Soma de matéria volátil (a 135°C), cloretos e sulfatos (calculados como sais de sódio) — máximo: 1,4%;

b) Matéria insolúvel em água-máximo: 0,2%;

c) Corantes subsidiários de alta sulfonação (como sais de sódio) — máximo: 1%;

d) Sal dissódico do ácido 6-hidroxi-5-(2-metoxi-5-metil-4-sulfenil) azo-8-(2-metoxi-5-metil-4-sulfenoxi)-2-naftaleno-sulfônico — máximo: 1%;

e) Sal sódico do ácido 6-hidroxi-2-naftaleno-sulfônico (sal de Schaeffer) — máximo: 0,3%;

f) Ácido 4-amino-5-metoxi-0-tolueno-sulfônico — máximo: 0,2%;

g) Sal dissódico do ácido 6,6'-oxibis-2-naftaleno sulfônico — máximo: 1%;

h) Chumbo (como Pb) — máximo: 10 ppm;

i) Arsênio (como As) — máximo: 1 ppm;

j) Corante total — mínimo: 85%.

II Seminário de Corantes Naturais para Alimentos  
I Simpósio Internacional de Urucum

### Procedimento

Prepare soluções a 1% com as amostras a ser analisadas. Sobre uma folha de papel Whatman nº 1, a 2cm das extremidades, em pontos distantes 2cm uns dos outros, coloque 2µl de cada uma das soluções a 1% das amostras e 2µl de cada uma das soluções a 1% dos respectivos padrões. Seque. Corra o cromatograma com o solvente A ou B.

### Espectrofotometria

Um corante em solução pode ser identificado pelo seu espectro de absorção no visível e ultravioleta, desde que em condições idênticas de trabalho, sobretudo de pH.

### Material

Pipetas de 1ml, balões volumétricos de 100ml, peagâmetro, espectrofotômetro.

### Reagente

Solução de acetato de amônio 0,02M.

### Procedimento

Pese 0,100g da amostra e dilua a 100ml com uma solução de acetato de amônio 0,02M (pH = 5,6). Pipete 1ml desta solução e dilua a 100ml com a solução de acetato de amônio 0,02M. Controle o pH da solução, que deverá ser de 5,6. Meça a absorção no visível e ultravioleta. Os máximos e mínimos de absorção são bem definidos, podendo variar de 2 a 3nm. Compare com os espectros obtidos nas mesmas condições para corantes-padrão.

### Determinação do corante puro

Um método simples de determinação de corante puro baseia-se nos valores de absorção específica do corante. Dispondo de padrões de pureza conhecida obtêm-se os seus valores de absorção específica e com estes valores poder-se-á calcular as concentrações do corante puro, nas amostras cujos espectros forem obtidos nas mesmas condições.

### Método comparativo

#### Procedimento

Meça no comprimento de onda de absorção máxima no visível, indicado na Tabela 2, a absorbância de uma solução da amostra a 0,001% em acetato de amônio 0,02M. Meça nas mesmas condições a absorbância de uma solução do padrão a 0,001% em acetato de amônio 0,02M.

#### Cálculo

$$A \times \frac{B}{P} = \text{corante puro por cento p/p}$$

B = absorbância observada para a amostra

P = absorbância observada para o padrão

A = percentagem de corante puro do padrão

II Seminário de Corantes Naturais para Alimentos  
I Simpósio Internacional de Urucum

TABELA 2. Características espectrofotométricas de alguns corantes.

| Corantes                | Nº de código<br>Colour Index<br>(1975) | E <sub>1%</sub><br>1cm<br>no máximo<br>do visível | Absorção |        |              |        |        |        |
|-------------------------|--|---|----------|--------|--------------|--------|--------|--------|
|                         |  |   | Visível  |        | Ultravioleta |        |        |        |
|                         |  |   | Máximo   | Mínimo | Máximo       | Mínimo | Máximo | Mínimo |
| <b>Amarelos</b>         |  |   |          |        |              |        |        |        |
| Laranja GGN             | 15980                                  | 480,5   | 475      | 345    | 313          | 220    | 287    | -      |
| Amarelo ácido           | 13055                                  | 642,7   | 386      | 300    | 245          | -      | -      | -      |
| Amarelo crepúsculo      | 15985                                  | 564,1   | 481      | 350    | 310          | 228    | 285    | -      |
| Tartrazina              | 19140                                  | 536,6   | 426      | 310    | 257          | -      | -      | -      |
| <b>Azuis</b>            |  |   |          |        |              |        |        |        |
| Azul brilhante          | 42090                                  | 1640,0  | 630      | -      | 308          | -      | -      | -      |
| Azul indantreno         | 69800                                  | 1640,0  | 620      | -      | -            | 284    | 260    | -      |
| Azul indigotina         | 73015                                  | 449,3   | 610      | 395    | 287          | 250    | 268    | 230    |
| <b>Vermelhos</b>        |  |   |          |        |              |        |        |        |
| Bordeaux S ou amarantho | 16185                                  | 436,0   | 519      | 380    | 330          | 250    | 308    | -      |
| Eritrosina              | 45430                                  | 1130,0  | 524      | 380    | 310          | 260    | 290    | 230    |
| Escarlate GN            | 14815                                  | 295,2   | 489      | 395    | 330          | 298    | 220    | 260    |
| Ponceau 4R ou N Cocina  | 16255                                  | 442,5   | 507      | 375    | 332          | 245    | 220    | 300    |
| Vermelho sólido E       | 16045                                  | 477,9   | 505      | 350    | 315          | 283    | 230    | 305    |
| Vermelho 40             | 16035                                  | 536,0   | 505      | -      | -            | -      | -      | -      |

II Seminário de Corantes Naturais para Alimentos  
I Simpósio Internacional de Urucum

### Método baseado no valor da absortividade

#### Procedimento

Siga a técnica indicada acima para a obtenção da absorbância da solução da amostra e faça o cálculo, através da fórmula abaixo, verificando na Tabela 2 o valor da absortividade ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) para cada corante.

#### Cálculo

$$\frac{A \times 100}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times C} = \text{corante puro por cento p/p}$$

A = absorbância da solução da amostra  
C = concentração da solução da amostra

No caso da análise de corantes em alimentos envolve todo um tratamento prévio de extração e identificação.

Os corantes artificiais permitidos em alimentos são produtos de síntese, quase todos azocompostos. São conhecidos como derivados "ácidos" de hulha por se fixarem em lã, em meio ácido e é nisto que se baseia a técnica de extração mais usada para sua pesquisa nos alimentos.

#### Preparo da amostra

a) **Bebidas não alcoólicas** — A grande maioria destas amostras pode ser tratada diretamente com fio de lã. Se necessário, acidifique as amostras com ácido acético ou bissulfito de potássio.

b) **Bebidas alcoólicas** — Aqueça as amostras antes de serem acidificadas (se necessário, como em a) até ebulição, por alguns minutos, a fim de eliminar o álcool.

c) **Amostras solúveis em água** — Dissolva as amostras em água e acidifique como em a.

d) **Produtos amiláceos** — Adicione 50ml de uma solução de hidróxido de amônio a 2%, em álcool a 70%, a 10g da amostra finamente moída. Após repouso de 3 horas, centrifugue. Transfira o sobrenadante para uma cápsula e evapore em banho-maria. Dissolva o resíduo com 30ml de água acidificada como em a.

e) **Produtos contendo gordura** — Desengordure a amostra, tratando-a com éter de petróleo antes de obter a solução do corante com água quente. Note que os corantes solúveis em óleos tendem a colorir os solventes orgânicos. Nos casos em que se apresentar maior dificuldade, recomenda-se um tratamento a quente com acetona ou álcool a 50-90%, contendo 2% de hidróxido de amônio. Os solventes orgânicos são então removidos em banho-maria e o resíduo dissolvido como em d.

## Extração dos corantes

### Procedimento

Coloque 20cm de um fio de lã branca (previamente fervido em solução diluída de hidróxido de sódio, depois em água), em 35ml da solução ligeiramente ácida obtida da amostra. Ferva por alguns minutos. Retire o fio. Lave em água fria. Transfira para um béquer de 100ml e ferva com solução de hidróxido de amônio a 10%. (Se a coloração for extraída por esta solução, significa que existem corantes ácidos). Remova o fio de lã, acidifique ligeiramente e ferva. Adicione novo fio de lã e ferva. Retire o fio e extraia a coloração novamente com 5ml de solução de hidróxido de amônio a 10%. Filtre, se necessário, através de pequena porção de algodão. Evapore cuidadosamente até um volume de cerca de 1ml. (Esta técnica de dupla extração com fio de lã tem por objetivo um produto mais puro, mas nem sempre é necessária. Corantes naturais poderão tingir o fio no primeiro tratamento, mas a coloração não é removida pela solução de hidróxido de amônio. Corantes básicos podem ser separados tratando a amostra com solução de hidróxido de amônio e fervendo-a com o fio de lã, removendo a coloração com ácido acético diluído).

### Separação e identificação dos corantes extraídos

Sempre será melhor correr um cromatograma para separação e identificação dos corantes, mas poder-se-á obter bons resultados, em certos casos, comparando-se as reações de fragmentos de fios de lã tingidos pela amostra e outros tingidos por soluções de corantes conhecidos, com ácidos e bases fortes.

### Cromatografia em papel

Os corantes podem ser separados usando qualquer das técnicas usuais de cromatografia em papel. Na técnica, são utilizados papel Whatman nº 1 e um solvente adequado, tanto em cromatografia ascendente, como na circular.

### Procedimento

Corte uma folha de papel Whatman nº 1 de tal modo que possa ser enrolada em forma de cilindro e caiba em um béquer de 1 litro sem tocar os lados. Trace uma paralela a 2cm da extremidade do papel. Coloque em pontos distantes 2cm uns dos outros, sobre a linha, diferentes soluções de corantes conhecidos semelhantes aos extraídos da amostra e, em um deles, a solução concentrada obtida da amostra. Seque as manchas ao ar. Enrole o papel em forma de cilindro, prendendo os cantos superiores com um clipe, sem deixar que as verticais se toquem. Coloque o solvente escolhido num béquer até atingir a altura de 1cm. Coloque neste béquer o cilindro de papel e cubra-o com vidro de relógio. Deixe correr o cromatograma até o solvente percorrer aproximadamente 15cm. Retire e seque o papel. Identifique o corante por comparação com as manchas obtidas pelos corantes conhecidos. Corra novo cromatograma, usando solventes diferentes no caso de dúvidas. As manchas poderão ser eluídas e as soluções obtidas examinadas espectrofotometricamente, usando solução de acetato de amônio 0,02M (pH = 5,6) para eluição.

Alguns corantes naturais são adicionados aos alimentos para lhes dar ou reforçar a cor. Os mais empregados são urucum, cúrcuma, beta-caroteno e caramelo.

Em cada caso é necessário investigar, por meio de reações conhecidas e específicas, a sua presença.

II Seminário de Corantes Naturais para Alimentos  
I Simpósio Internacional de Urucum

Utilizando a solução obtida na extração, pode-se identificar o corante com o auxílio de espectros de absorção no ultravioleta e visível, ou mesmo no infravermelho, em comparação com os padrões conhecidos.

### Urucum

#### Cromatografia em coluna

#### Material

Coluna de 1cm de diâmetro e 8 a 10cm de altura, béqueres de 250ml, provetas de 10ml, pipeta de 5ml.

#### Reagentes

Benzeno  
Clorofórmio desidratado com carbonato de potássio, anidro  
Alumina para coluna cromatográfica

Reativo de Carr-Price { Solução a 20% de tricloreto de antimônio em clorofórmio  
filtrado sobre sulfato de sódio anidro

#### Procedimento

Dissolva uma quantidade da amostra em benzeno de modo a se obter uma coloração semelhante à de uma solução de bicromato de potássio a 0,1%. Prepare uma coluna de 1cm de diâmetro e 8 a 10cm de altura com emulsão de alumina em benzeno. Escoe lentamente o solvente. Passe pela coluna a solução benzênica obtida da amostra. Lave 3 vezes com 10ml de benzeno sem deixar secar a coluna. A bixina (corante do urucum) é fortemente adsorvida pela alumina e forma uma zona vermelho-alaranjada viva na parte superior da coluna (diferença com a crocetina do açafraão, que é amarela-brilhante). Uma zona de amarelo muito pálido migra através da coluna ao lavar com benzeno. Escoe todo o benzeno da coluna e lave 3 vezes com clorofórmio. A zona do urucum adsorvido não é eluída em benzeno, éter de petróleo, clorofórmio, acetona, álcool e metanol (com os 2 últimos solventes a cor passa a laranja). Adicione 5ml do reativo de Carr-Price. Forma-se uma coloração verde-azulada (presença de bixina), diferença da crocetina que vira para violeta brilhante.

### Cúrcuma

#### Material

Béquer de 100ml, filtro, papel de filtro, proveta de 50ml, banho-maria.

#### Reagentes

Ácido acético glacial  
Ácido bórico  
Ácido oxálico

### Procedimento

Pese aproximadamente 1,0g da amostra em um béquer de 100ml e dissolva em 50ml de ácido acético glacial. Filtre, se necessário. Coloque o béquer em banho-maria, a 100°C, durante 10 minutos. Em seguida, adicione 2g de ácido bórico e 2g de ácido oxálico. Deixe em banho-maria fervente por mais 10 minutos. Uma coloração vermelha indica a presença de cúrcuma.

### Identificação de caramelo em bebidas

#### Reagentes

Oxido de magnésio  
Acetato neutro de chumbo  
Mistura álcool butílico – éter de petróleo (1 + 5)  
Resorcina a 5% em ácido clorídrico (D = 1,18)

#### Procedimento

Adicione 1g de acetato neutro de chumbo e 0,5g de óxido de magnésio a 50ml da amostra, após ter evaporado o álcool. Agite bem. Filtre, recolhendo de 30 a 35ml do filtrado em um cilindro munido de rolha esmerilhada. Adicione 10ml da mistura álcool-éter. Agite com cuidado (abrindo vez por outra o frasco) durante 5 minutos. Deixe em repouso. Retire com uma pipeta 5ml da camada etérea para um tubo de ensaio. Adicione a este 2ml da solução de resorcina, de tal modo que escorra pelas paredes do tubo até ao fundo. Na presença de caramelo, na zona de contato das duas camadas forma-se um anel vermelho.

### Determinação de beta-caroteno em massas alimentícias

#### Material

Almofariz, frasco Erlenmeyer de 100ml, funis, agitador mecânico, bastão de vidro, balão volumétrico de 50ml, proveta de 50ml, espectrofotômetro.

#### Reagente

Éter de petróleo (ponto de ebulição 40-65°C)

#### Procedimento

Pese exatamente uma quantidade da amostra devidamente triturada (cerca de 10g). Transfira quantitativamente para um frasco Erlenmeyer de 100ml, junte cerca de 30ml de éter de petróleo e extraia o  $\beta$ -caroteno por agitação, durante 1 hora. Passe o sobrenadante através de um filtro para um balão volumétrico de 50ml. Junte ao resíduo no Erlenmeyer mais 20ml de éter de petróleo e deixe no agitador por mais 30 minutos, transferindo o sobrenadante para o mesmo balão. Complete o volume com éter de petróleo. Determine a absorção em espectrofotômetro a 450nm, usando éter de petróleo como branco.

**Nota** – A presença de outras substâncias capazes de ser extraídas e determinadas como  $\beta$ -caroteno poderá ser pesquisada, por cromatografia em papel, em uma alíquota do extrato etéreo, usando como solvente a solução de acetona a 2%, em éter de petróleo; o  $\beta$ -caroteno migra com o solvente, apresentando maior R, que as demais substâncias.