

USO DE FILMES DE QUITOSANA PARA EXTRAÇÃO DO CORANTE ALIMENTAR BORDEAUX S COM QUANTIFICAÇÃO POR ANÁLISE DE IMAGENS DIGITAISIgor Coreixas de Sá^a, Fernanda Neves Feiteira^a, Rafael Machado Dornellas^a e Wagner Felipe Pacheco^{a,*}^aDepartamento de Química Analítica, Universidade Federal Fluminense, 24020-141 Niterói – RJ, Brasil

Recebido: 29/08/2023; aceito: 10/01/2024; publicado online: 14/03/2024

USE OF CHITOSAN FILMS TO REMOVE BORDEAUX S FOOD COLORING WITH QUANTIFICATION BY DIGITAL IMAGE ANALYSIS. Bordeaux S is a food dye still allowed in Brazil, being present in soft drinks, gelatins, chewing gums, candies and many other industrialized foodstuffs. Because of its carcinogenic potential, it is forbidden to be added to food in Japan, in the USA and in most of the European Union. Many studies related to the employment of digital images analysis to food quality control have been published in recent years mainly due to its low costs of implementation. Nevertheless, one of the few drawbacks of applying this technique is its poor sensitivity, which can be significantly improved by employing solid substrates, such as chitosan films. In this work, chitosan sorbent films were synthesized, characterized and used to retain Bordeaux S present in gelatin samples, followed by recording the films' images and quantifying the analyte by digital images analysis. The proposed method was able to extract the analyte and eliminate interferences present in the matrixes in a single step. LOD of 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ and LOQ of 74 $\mu\text{g L}^{-1}$ were obtained, allowing adequate quantification when considering the recommendations of the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA).

Keywords: Bordeaux S; food dyes; digital image analysis.

INTRODUÇÃO

A coloração é uma propriedade considerada importante por consumidores ao avaliarem alimentos. Assim sendo, uma grande variedade de corantes alimentícios de origens tanto naturais quanto sintéticas é frequentemente adicionada a alimentos, a fim de torná-los esteticamente mais atrativos.¹

De acordo com o Regulamento Técnico No. 540/1997 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), corantes são intencionalmente adicionados aos alimentos, a fim de modificar suas características físicas, químicas, ou sensoriais, sem propósito nutricional, durante os processos de manufatura, processamento, preparo, tratamento, embalagem, condicionamento, estocagem transporte ou manuseio.²

O azocorante sintético Bordeaux S (Figura 1), comercializado sob diferentes nomes, incluindo E 123, FD&C No. 2, Food Red 9, CI-16185,¹ é um corante sintético obtido pela diazotização do ácido 4-amino-1-naftaleno sulfônico com o ácido 3-hidroxi-2,7-naftaleno dissulfônico. Em sua forma em pó adquire coloração vermelho-amarronzada, tornando-se rosado em soluções diluídas. Está presente em diversos alimentos industrializados, tais como refrigerantes, doces, sucos em pó, sorvetes, chicletes, gelatinas, vinhos, café e chocolate.

Embora banido nos EUA, na maior parte da União Europeia e no Japão devido ao seu potencial genotóxico e carcinogênico,^{3,4} este corante é permitido no Brasil em produtos alimentícios pela ANVISA

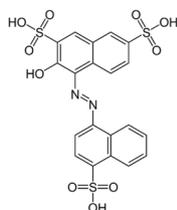
em concentração de até 0,50 mg kg⁻¹ de massa corporal do indivíduo que o ingere.⁵ Por tal motivo, é importantíssimo o desenvolvimento de métodos analíticos para a sua determinação em alimentos. Muitos destes métodos são baseados em sensores eletroquímicos,⁶⁻⁸ espectrometria de absorção molecular na região do UV-Vis,⁹⁻¹² espectrometria de fluorescência molecular,¹³ espectroscopia no infravermelho,¹⁴ métodos cromatográficos com detecção por absorção molecular no UV-Vis¹⁵⁻¹⁷ e métodos eletroforéticos.^{18,19} Contudo, essas metodologias empregam aparatos de custo mais elevado²⁰ do que análises químicas baseadas em alterações de cor registradas por dispositivos de imagem.²¹⁻²³

A técnica de análise de imagens digitais (DIA, do inglês *digital images analysis*), aplicada ao controle de qualidade de produtos tem ganhado espaço no campo da indústria nos anos mais recentes, devido aos seus baixos custos de implementação, possibilidade de automação do monitoramento de linhas produtivas e de avaliação de numerosos parâmetros, tais como coloração, homogeneidade e imperfeições de produtos simultaneamente.²⁴ DIA também tem sido empregada para monitoramento de saúde ocupacional, na análise de amostras perigosas como carcinogênicas, altamente tóxicas ou potencialmente explosivas.²¹

Essa técnica é baseada na extração de informações de imagens digitais geradas por substâncias coloridas, já que estas apresentam a coloração da radiação refletida, complementar à absorvida,²⁵⁻²⁷ exceto quando em modo transmitância.

Imagens digitais podem ser geradas empregando diferentes equipamentos, incluindo câmeras digitais, *webcams*, *smartphones* e *scanners*. O processamento dos dados obtidos das imagens é realizado por um *software* capaz de prover valores numéricos para definir a intensidade de coloração numa área selecionada da imagem.^{22,28,29}

Todavia, um dos poucos empecilhos no emprego desta técnica analítica é sua baixa sensibilidade. Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que o uso de suportes sortivos sólidos para a retenção de analitos podem melhorar significativamente a sensibilidade dessa técnica, em muitos casos alcançando valores equiparáveis com as demais mencionadas anteriormente.^{25,30-32} Nesse cenário, uma opção de suporte sortivo é dada por quitosana em forma de filmes.

**Figura 1.** Azocorante sintético Bordeaux S

*e-mail: wfpacheco@id.uff.br

A quitosana é um poliaminossacarídeo natural e abundante, produzido sinteticamente por desacetilação da quitina, consistindo de cadeias lineares de β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glicose com unidades desacetiladas. O elevado potencial da quitosana de adsorver moléculas de corantes é atribuído aos vários grupos funcionais reativos e à flexibilidade de sua cadeia polimérica, que também permite o preparo de materiais como filmes, membranas, aerogéis e hidrogéis.³³

No presente trabalho, quitosana foi empregada sob a forma de filme para adsorver Bordeaux S, e este analito foi determinado em amostras de gelatinas, empregando a técnica de análise de imagens digitais. Essa abordagem possibilitou a extração do analito e eliminação de interferentes, em uma única etapa. Os resultados aqui obtidos foram melhores em termos de limites de detecção e quantificação quando comparados a outros métodos espectrofotométricos, cromatográficos e eletroforéticos, demonstrando a aplicabilidade do método proposto para a verificação do cumprimento da legislação brasileira.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e instrumentação

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, não sendo realizadas maiores purificações. As soluções necessárias foram preparadas com água ultrapura (18 M Ω cm de resistividade) obtida através de um sistema purificador Arium Pró Sartorius (Alemanha). Soluções estoque 200,0 mg L⁻¹ do corante Bordeaux S (Roha, Índia) foram preparadas a partir da solubilização do sólido, e diluídas em meio aquoso a padrões analíticos de 0,200-4,00 mg L⁻¹, os quais eram preparados diariamente. Tampões citrato/fosfato de sódio 0,200 mol L⁻¹ e Britton-Robinson²⁵ 0,200 mol L⁻¹ foram preparados pela solubilização e diluição dos reagentes (Sigma-Aldrich, Alemanha).

Os materiais foram pesados em balança analítica (Sartorius, Alemanha). Um scanner HP DeskJet GT 5822 (EUA) foi empregado para obter as imagens digitais em 300 dpi, 24 bits e formato .tiff, em tamanho de 2550 \times 3507 pixels. O software ImageJ³⁴ (National Institutes of Health, EUA) foi utilizado para o processamento dos dados. Uma mesa agitadora KASVI K45 (Hong Kong) foi também empregada, e medidas de pH tomadas com pHmetro (Sensorglass, Brasil). O alongamento dos filmes de quitosana foi determinado com um paquímetro digital (Mitutoyo, Japão), com resolução de 0,010 \pm 0,005 mm.

Procedimento geral

Padrões analíticos do corante foram preparados em balões volumétricos de 50,00 mL, por adição de incrementos crescentes da solução estoque e tamponados com tampão citrato/fosfato de sódio 0,200 mol L⁻¹ em pH 7,5. Em seguida, 10,0 mL de cada solução foi transferida para tubos de polipropileno de 15,0 mL. Filmes de quitosana de 1,0 cm² foram adicionados a cada tubo, os quais foram colocados sobre mesa agitadora por 90 min a 90 rpm. Brancos analíticos foram preparados da mesma forma, porém sem conterem o analito.

Por fim, os filmes foram separados das soluções, secos em dessecador por cerca de 15 min e tiveram suas imagens obtidas com auxílio do scanner, a fim de ser determinada a relação entre coloração do filme e concentração das soluções.

Preparo das amostras

Alíquotas de 1,0 g de amostras de gelatinas foram transferidas para béqueres e dissolvidas em 80,0 mL de água ultrapura a 65 °C

até total solubilização. Em seguida as soluções foram resfriadas à temperatura ambiente (25 °C) e quantitativamente transferidas a balões volumétricos de 100,00 mL, cujos volumes foram completados com água ultrapura.

500 μ L de amostras assim diluídas de gelatinas comuns foram transferidas para tubos de polipropileno e tamponadas com citrato/fosfato de sódio 0,200 mol L⁻¹ em pH 7,5 até volume final de 10,0 mL. Amostras de gelatinas *diet* e zero, por apresentarem maior conteúdo do corante, foram preparadas de modo análogo, porém empregando-se 200 μ L das soluções diluídas.

Obtenção do sinal analítico

As imagens obtidas dos filmes de quitosana em que o analito se encontrava retido foram analisadas empregando-se o software ImageJ³⁴ e os sinais analíticos (S) foram dados conforme a Equação 1, em que P₀ corresponde à intensidade de cor obtida para os brancos analíticos e P aos padrões ou amostras. Já que o corante Bordeaux S adsorvido nos filmes de quitosana apresentam coloração rosa-avermelhada, o canal verde foi selecionado, por ser a coloração complementar à visualizada e assim fornecer maior sensibilidade analítica.

$$S = -\log \frac{P}{P_0} \quad (1)$$

Preparo dos filmes de quitosana

Os filmes poliméricos foram produzidos empregando-se o método de fundição por solvente,³³ dissolvendo-se 3,33 g de quitosana em pó (Sigma Aldrich, Alemanha) em 1,0 L de solução aquosa de ácido acético 2,0% v v⁻¹ a temperatura ambiente (25 °C), sob agitação magnética durante período de 6 h. A mistura resultante foi filtrada a vácuo e 150 mL do filtrado foram depositados sobre placas de petri de 15 cm de diâmetro, as quais foram aquecidas a 65 °C por 48 h, a fim de eliminar o ácido acético residual. Por fim, os filmes foram removidos das placas, cortados em porções de 1 cm² com auxílio de um bisturi e armazenados em dessecadores a 25 °C.

Caracterização dos filmes de quitosana

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os estudos de infravermelho com os filmes de quitosana puros e após adsorverem o corante foram realizados com um espectrômetro Agilent Cary FT-IR 660 com atenuância total de transmitância (ATR) de 400 a 4000 cm⁻¹, empregando-se reflectância difusa e pastilhas de KBr.

Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A morfologia dos filmes de quitosana puros foi determinada com auxílio de equipamento Thermo Scientific SEM Quanta Feg 250 de 5 a 10 kV e faixa de magnificação de 100 a 1600 vezes, tendo sido necessário depósito de filme fino de ouro na superfície da amostra para torná-la condutora.

Grau de desacetilação

O grau de desacetilação da quitosana foi determinado por método de titulação potenciométrica,³⁵⁻³⁷ dissolvendo-se 0,25 g de quitosana em 20,0 mL de solução padronizada de HCl 0,10 mol L⁻¹, transferindo-se a mistura para balão volumétrico de 100,00 mL e completando-se o volume deste com água ultrapura.

O pH das soluções assim preparadas foi ajustado a aproximadamente 2,0 com solução padronizada de NaOH 0,10 mol L⁻¹,

condição tomada como o ponto inicial da titulação, a qual prosseguiu até atingir-se pH próximo de 11,0. A curva de titulação foi gerada tomando-se o pH em função do volume de NaOH adicionado, dada pela Equação 2.

$$\text{pH} = \left(\frac{V_0 + V}{M_B} \right) \times ([\text{H}^+ - \text{OH}^-]) \quad (2)$$

Em que V (mL) é o volume de NaOH gasto na titulação, V_0 (mL) é o volume da solução de quitosana analisada, e M_B a concentração molar da solução de NaOH. O ponto final foi calculado segundo a Equação 3, e este foi empregado na Equação 4 para determinar o grau de desacetilação (\emptyset).

$$\emptyset = \frac{M_A V_A - M_B V_f}{1000} \quad (3)$$

$$\text{GD}(\%) = \frac{\emptyset}{\left[\left(\frac{W - 161\emptyset}{204} + \emptyset \right) \right]} \quad (4)$$

Em que M_A (mol L⁻¹) e V_A (mL) são, respectivamente, concentração e volume da solução de HCl adicionada, M_B (mol L⁻¹) a concentração da solução padrão de NaOH, e V_f (mL) o volume de titulante adicionado no ponto final da titulação. W (g) corresponde à massa adicionada de quitosana, e os termos 161 e 204 às massas molares (g mol⁻¹) de quitosana e quitina, respectivamente.³⁵

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização dos filmes de quitosana

Os espectros de FT-IR (Figura 1S, material suplementar) mostram os picos característicos da quitosana. Bandas em 3365 e 3261 cm⁻¹ referem-se ao estiramento das ligações O-H e H-N-H. Ainda que com elevado grau de desacetilação, discutido a seguir, ainda há a presença do estiramento da ligação C=O proveniente dos grupos funcionais amida da quitina, em aproximadamente 1640 cm⁻¹, banda esta que se sobrepõe com aquela referente às vibrações angulares da ligação N-H em 1580 cm⁻¹.

Quando comparamos o espectro de infravermelho do filme de quitosana antes e depois do processo sortivo, notamos alterações. O espectro do filme contendo o corante Bordeaux S sorvido apresenta uma mais banda proeminente em 3446 cm⁻¹, quando comparado ao filme puro. Em 1586 e 1419 cm⁻¹ há um significativo aumento no sinal devido ao estiramento vibracional C=C e N=N, respectivamente. Tais grupos estão presentes apenas no corante.³⁸

Pelas imagens de microscopia eletrônica (Figura 2S, material suplementar) é possível notar a baixa porosidade da estrutura do filme, característico de filmes poliméricos de quitosana produzidos empregando-se o método de fundição por solvente.³⁹ As imagens mostram que a superfície do filme é, de fato, homogênea e apresenta sulcos cruzando sua estrutura inteira, provavelmente devido aos cortes em sua superfície feitos com o bisturi para moldar o filme e removê-lo da placa de petri.

O grau de desacetilação é uma das características mais importantes dos filmes de quitosana e pode influenciar sua performance em muitos aspectos, como sua atividade microbiana e antioxidante.⁴⁰ Quando calculado por titulação potenciométrica (Figura 3S, material suplementar), foi obtido percentual de 85,6 ± 0,5%, mostrando que restam poucas moléculas de quitina no filme sintetizado. Portanto, a maior parte dos monômeros presentes é de quitosana, o que leva a uma maior solubilidade em soluções ácidas diluídas, bem como

um comportamento mais pronunciadamente catiônico devido à protonação dos grupos amino em sua estrutura. Tal fato viabiliza interações eletrostáticas entre corante e sorvente, resultando numa maior capacidade de adsorção.³⁵⁻³⁷

O grau de inchamento dos filmes de quitosana foi avaliado em diferentes níveis de pH empregando-se tampão Britton-Robinson 0,200 mol L⁻¹. Filmes de quitosana de 1,0 cm² foram pesados antes e depois de entrarem em contato com o tampão, sob agitação. Os filmes foram pesados após determinados intervalos de tempo, e o grau de inchamento foi dado como a variação percentual de massa antes e após o processo, como mostra a Figura 2. Percebe-se, então, que o grau de inchamento dos filmes de quitosana é maior em pH fortemente ácido. Tal fato se dá devido à protonação dos grupos amino presentes na quitosana, que, em condições extremas, provoca repulsão entre os diversos monômeros deste biopolímero, levando ao inchamento.^{41,42}

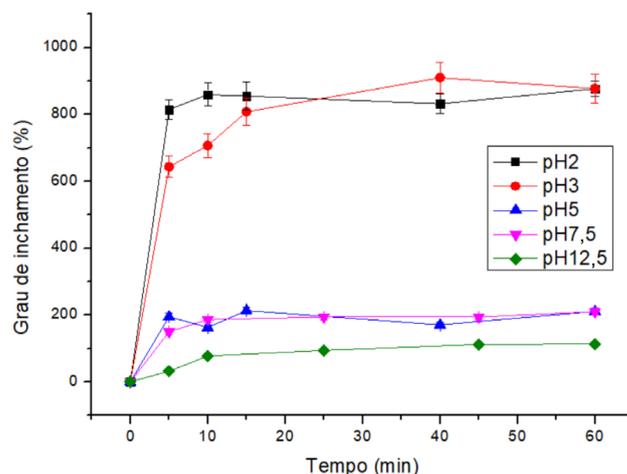


Figura 2. Grau de inchamento dos filmes de quitosana em diferentes níveis de pH (filmes de 1,0 cm², tampão Britton-Robinson 0,200 mol L⁻¹, 90 rpm)

O alongamento do filme de quitosana em função da variação de pH, que resulta no aumento de sua área superficial, é mostrado na Figura 3. A Tabela 1 informa acerca das características gerais do filme. Tais resultados corroboram a ocorrência da expansão das cadeias poliméricas do filme pela protonação da estrutura.^{41,42}

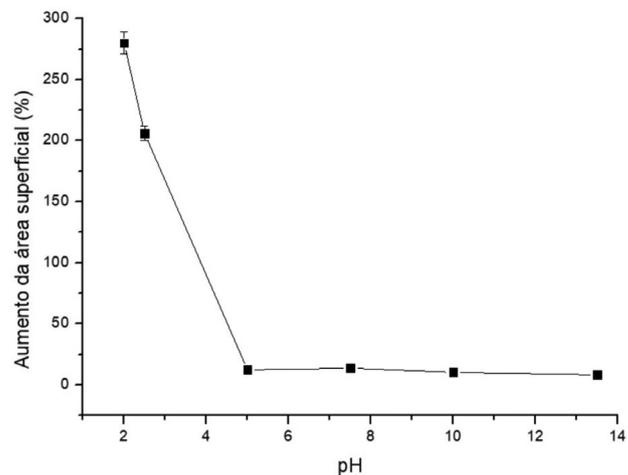


Figura 3. Alongamento do filme de quitosana em diferentes níveis de pH (filmes de 1,0 cm², tampão Britton-Robinson 0,200 mol L⁻¹, 90 rpm, 60 min)

Otimização do método

A otimização da metodologia foi realizada de modo univariado,

Tabela 1. Características do filme de quitosana sintetizado

Grau de desacetilação	85,6 ± 0,5%
Peso molecular médio	190-310 kDa
Grau de inchamento	200% ^a
Alongamento	12,3% ^a

^aNas condições otimizadas: pH 7,5.

tendo sido avaliada a influência dos parâmetros pH, tempo de agitação e área superficial do filme sobre o sinal analítico. A velocidade de agitação foi fixada em 90 rpm para todos os experimentos, por ser a máxima oferecida pela mesa agitadora empregada. Tal decisão foi tomada tendo em vista que o processo de sorção é favorecido por maiores velocidades de agitação, devido à maior transferência de massa adsorvente-adsorvato.⁴³

Influência do pH do meio

A influência do pH sobre o processo de adsorção foi avaliada variando-se o pH de 2,0 a 13,5 empregando-se para tal feito tampão Britton-Robinson 0,200 mol L⁻¹. Os resultados deste estudo são mostrados na Figura 4a. Máximo sinal analítico foi obtido na faixa de pH entre 6,0 e 8,0. Por esse motivo, os experimentos subsequentes foram realizados em pH 7,5.

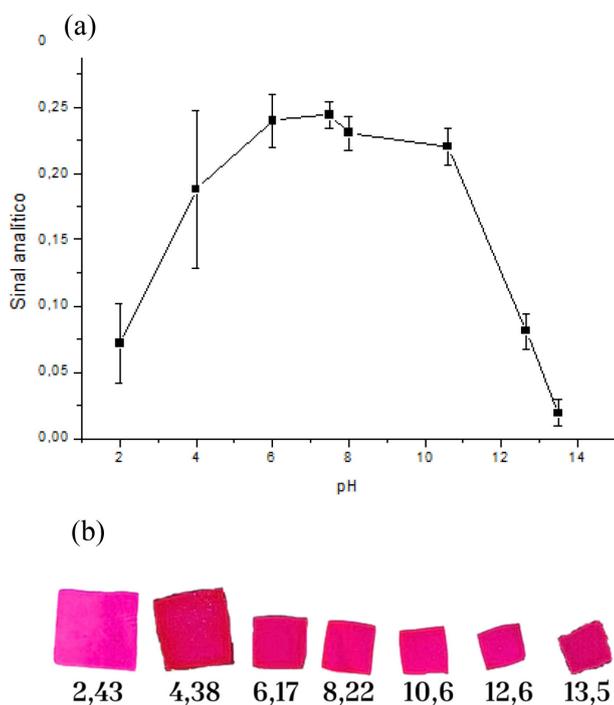


Figura 4. (a) Influência do pH sobre o sinal analítico. (b) Imagens digitais obtidas para os filmes de quitosana contendo Bordeaux S em diferentes níveis de pH (Bordeaux S 2,00 mg L⁻¹, filmes de 1,0 cm², tampão Britton-Robinson 0,200 mol L⁻¹, 90 rpm, 60 min)

Sabe-se que o corante em questão apresenta três grupos sulfônicos (Figura 1), dois dos quais estão sempre ionizados, o que faz com que o corante esteja sempre negativamente carregado, ainda que o terceiro grupo sulfônico apresente pK_a igual a 6,5.⁴⁴ Visto que a quitosana pode adquirir carga superficial positiva devido à protonação de seus grupos amino,^{45,46} o mecanismo de sorção é afetado por interações de caráter eletrostático entre filme sólido e corante.

Contudo, conforme a acidez do meio é significativamente aumentada, o excesso de cargas positivas na matriz polimérica faz

com que haja repulsão entre os monômeros, ocasionando um processo de inchamento do filme,^{41,42} como já mencionado e ilustrado na Figura 4b. Esse inchamento é responsável pela maior variabilidade do sinal analítico em meio significativamente ácido, já que assim o corante passa a se difundir por maior região de filme, diminuindo a intensidade da coloração observada.

A diminuição do sinal analítico em meio alcalino é atribuída ao fato de que a superfície polimérica perde sua carga positiva, reduzindo consideravelmente as interações intermoleculares eletrostáticas entre filme sólido e corante.

Influência da área superficial do filme de quitosana

Os filmes de quitosana apresentavam espessura de aproximadamente 0,09 mm, parâmetro insignificante quando comparado à área superficial dos mesmos. Assim, o processo de sorção pode ser entendido bidimensionalmente. A Figura 5 mostra a variação do sinal analítico sob a influência de diferentes áreas superficiais de filme.

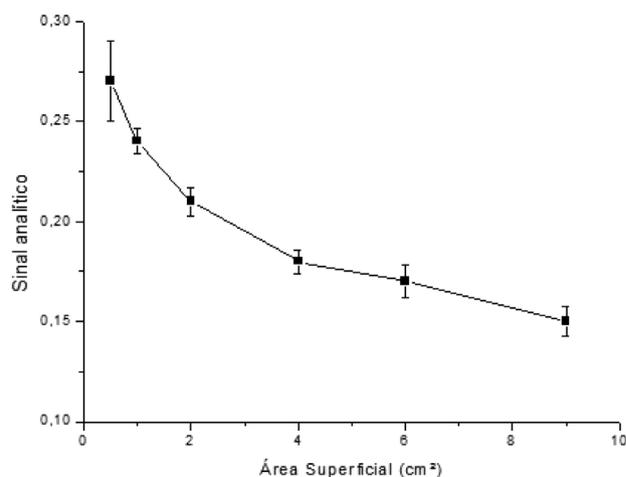


Figura 5. Influência da área superficial do filme de quitosana sobre o sinal analítico (Bordeaux S 2,00 mg L⁻¹, tampão citrato/fosfato de sódio 0,200 mol L⁻¹ pH 7,5, 90 rpm, 60 min)

Sinais analíticos mais elevados foram obtidos com filmes de menor área superficial, por apresentarem maior grau de saturação de corante nos sítios sortivos, o que gerou intensidade de coloração mais elevada nestes filmes. Por outro lado, a dispersão da coloração é observada nos filmes de maior área superficial, ocasionando menores sinais analíticos.

Embora maior sensibilidade tenha sido alcançada com filmes de 0,49 cm², as replicatas apresentaram maior variabilidade, comprometendo a precisão do método. Portanto, nos experimentos posteriores empregaram-se filmes de 1,0 cm².

Influência do tempo de agitação

Um processo sortivo pode ser categorizado em quatro etapas: (i) transporte advectivo, em que partículas do soluto movem-se do seio da solução para uma camada de solução imóvel, através de fluxos advectivos ou dispersão axial ou difusiva; (ii) transferência para a solução imóvel, em que partículas do soluto fixam-se sobre a superfície adsorvente desta camada; (iii) transferência de massa, em que partículas do soluto fixam-se sobre a superfície do adsorvente sólido; (iv) difusão intrapartícula, em que o soluto move-se para dentro dos poros do sólido sorvente.⁴⁷

Estes eventos requerem tempo, por isso este é um importante parâmetro a ser avaliado, a fim de garantir que o equilíbrio químico seja atingido. Tempo de contato de 90 min foi selecionado para os experimentos posteriores, visto que maior sinal analítico foi alcançado

nessa condição (Figura 6). Vale ressaltar que, embora esse equilíbrio sortivo venha efetivamente a requerer longo intervalo de tempo para ser atingido, a velocidade analítica do método como um todo não é comprometida, já que várias replicatas de padrões analíticos e amostras podem ser processadas simultaneamente, numa única imagem digital.

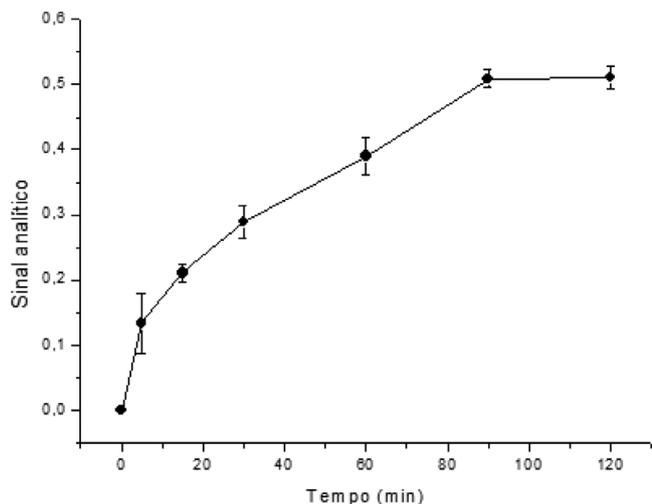


Figura 6. Influência do tempo de agitação (Bordeaux S 2,00 mg L⁻¹, tampão citratofosfato de sódio 0,200 mol L⁻¹ pH 7,5, filmes de 1,0 cm², 90 rpm)

Estudos cinéticos

Para caracterizar o processo de sorção do corante Bordeaux S sobre o filme de quitosana, em termos cinéticos, foram testados os quatro modelos mais aplicados na literatura: pseudo primeira ordem, pseudo segunda ordem, Elovich e o modelo difusão intrapartícula. Somente o modelo de pseudo segunda ordem obteve bons coeficientes de correlação para com os dados avaliados: ao relacionar t/q_t com tempo, obteve-se um modelo linear (Figura 4S, material suplementar).

O modelo de pseudo primeira ordem apresentou baixíssima correlação. Para melhor concordância deste modelo seria necessário o conhecimento da capacidade sortiva do filme de quitosana no equilíbrio, ou seja, em um tempo infinito, o que torna o processo virtualmente impossível.^{48,49}

De fato, processos de quimiossorção tratam-se de fenômenos de monocamada, e, por efeitos estéricos, o tempo necessário para alcançar o equilíbrio químico sortivo é menor. Por conseguinte, é comum os processos de quimiossorção terem baixíssima correlação com os modelos de primeira ordem e boa correlação com os de segunda ordem.^{49,50}

Figuras de mérito do método

Tendo sido otimizados os parâmetros atuantes sobre o método desenvolvido, curvas analíticas para o corante Bordeaux S foram construídas sob condições de maior sensibilidade. A Figura 7a ilustra imagens digitais obtidas nas diferentes concentrações de padrão de calibração. A Figura 7b exemplifica os histogramas obtidos em cada canal passível de ser analisado (vermelho, verde e azul). Por fim, a Figura 7c mostra as relações matemáticas entre sinais analíticos obtidos nos diferentes canais e concentrações de analito. Nota-se que os três canais oferecem relações lineares entres estes parâmetros, porém aquele que oferece maior sensibilidade ao método é o canal verde. De fato, este canal corresponde à coloração complementar àquela exibida pelos filmes.

Significância da relação linear e limites de detecção e quantificação

Estudos de análise de variância (ANOVA) aplicados para avaliação da linearidade das curvas analíticas geradas pelo método proposto indicaram adequabilidade do modelo linear ao intervalo de concentrações de analito empregado. O modelo de regressão ajustado por mínimos quadrados foi significativo para o método proposto e não sofreu falta de ajuste, explicando 99,68% da variabilidade dos dados. O coeficiente de determinação obtido indica elevada correlação entre as variáveis sinal analítico e concentração de corante. Considerando-se os resíduos, os testes Shapiro-Wilk e Cochran mostraram distribuição normal, não tendenciosa, dos dados. Adicionalmente, a aplicação do teste de Durbin-Watson aos dados indicou que nenhum erro sistemático é oriundo da ordem de análise.⁵¹ A Tabela 2 resume os resultados destes testes estatísticos aplicados às curvas analíticas.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados conforme as Equações 5 e 6, respectivamente, em que δ é o desvio padrão entre sinais obtidos para os pontos de menor concentração de analito das curvas analíticas, e S é o coeficiente angular médio.⁵¹ Assim, LOD e LOQ foram equivalentes, respectivamente, a 0,020 mg L⁻¹ e 0,074 mg L⁻¹.

$$\text{LOD} = \frac{3\delta}{S} \quad (5)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10\delta}{S} \quad (6)$$

A Tabela 3 apresenta comparação entre LOD e LOQ calculados para o método proposto e demais métodos presentes na literatura, para determinação de Bordeaux S em amostras de alimentos. É possível notar que o método aqui apresentado exhibe limites melhores que muitos dos já desenvolvidos.

Exatidão e precisão

A precisão do método foi avaliada em termos de repetitividade e reprodutibilidade.⁵¹ A repetitividade foi calculada como o desvio padrão relativo dos sinais analíticos obtidos em dez medidas de uma mesma imagem de filme de quitosana contendo a menor concentração de corante presente na curva analítica (0,500 mg L⁻¹), estabelecida então como 2,1%. A reprodutibilidade, por sua vez, foi tomada como o desvio padrão relativo dos sinais analíticos obtidos para as medidas de dez imagens diferentes de filme contendo a mesma concentração de corante, equivalente a 4,1%.

A exatidão do método proposto foi avaliada segundo duas diferentes abordagens: primeiramente em termos de testes de recuperação, fortificando-se soluções das amostras e, posteriormente, comparando-se estatisticamente os resultados obtidos nas quantificações com método consolidado de absorção molecular na região do UV-Vis.¹¹

Os testes de recuperação foram conduzidos empregando-se amostras de gelatinas comuns. Alíquotas de 500 μL das soluções diluídas das amostras foram submetidas em triplicata ao método proposto. Em seguida, alíquotas em triplicata de mesmo volume e das mesmas amostras foram fortificadas com 0,500 mg L⁻¹ de padrão analítico do corante. A recuperação média, dada pela média das razões percentuais entre as concentrações efetivamente obtidas para as amostras fortificadas e as esperadas, foi empregada como a exatidão do método,⁵¹ equivalente a 99,1%.

A exatidão do método proposto foi também confirmada pela comparação dos resultados das quantificações de amostras de gelatinas comuns, com os resultados obtidos por método espectrofotométrico

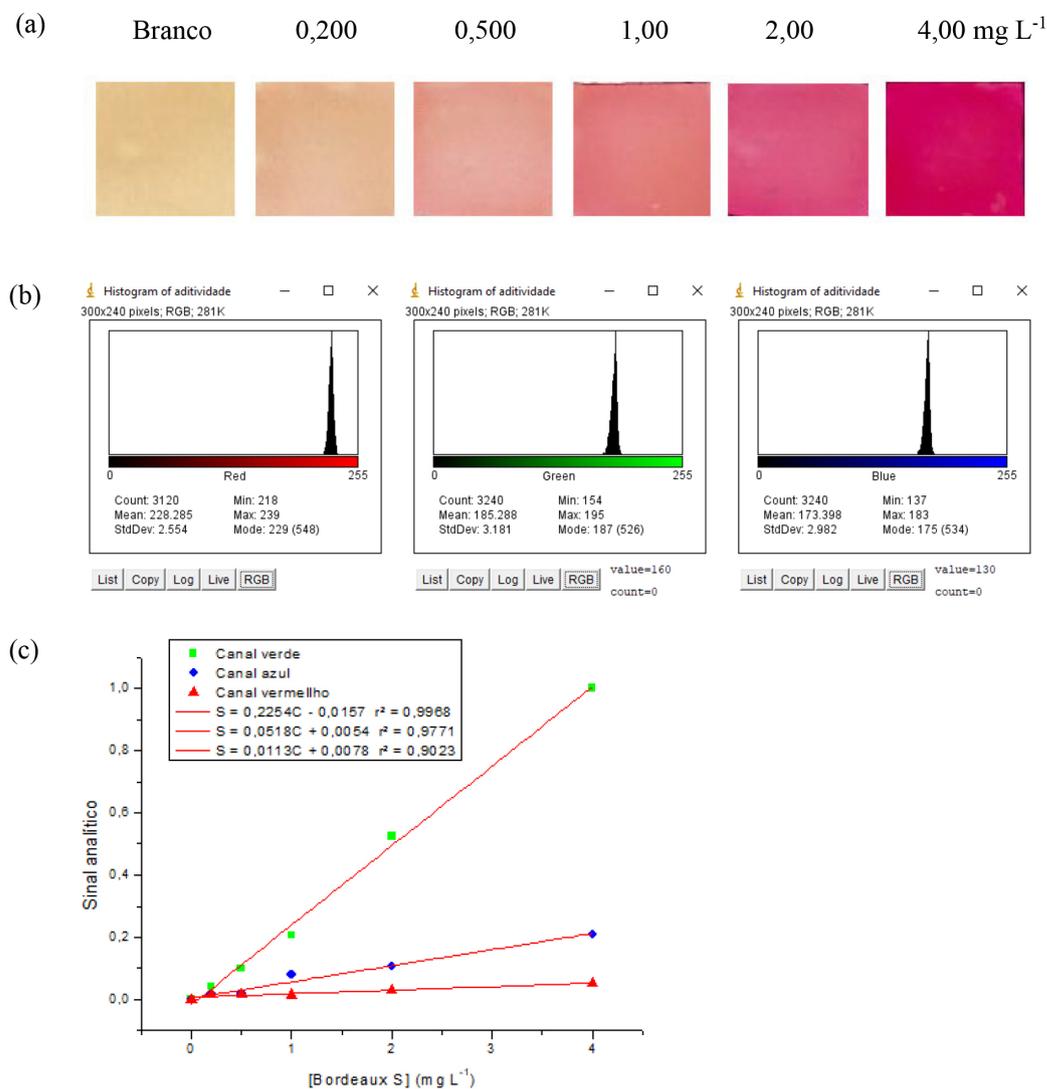


Figura 7. (a) Exemplos de imagens digitais geradas para a construção de curvas analíticas. (b) Exemplos dos histogramas gerados pelo software em cada canal de cor. (c) Exemplos de curvas analíticas geradas em cada canal (Bordeaux S 0,200-4,00 mg L⁻¹, tampão citrato/fosfato de sódio 0,200 mol L⁻¹ pH 7,5, filmes de 1,0 cm², 90 rpm, 90 min)

Tabela 2. Testes estatísticos aplicados às curvas analíticas para quantificação de Bordeaux S sorvido em filmes de quitosana

Teste	Conclusão
ANOVA	A significância do modelo linear é aceita
Falta de ajuste	O modelo não sofre de falta de ajuste
Coefficiente de determinação	Superior a 0,99
Resíduos	Distribuição normal
Outliers	Não foram observados
Teste de autocorrelação	Independente da ordem de observação

ANOVA: Análise de variância.

pré-estabelecido,¹¹ como informa a Tabela 4. Todas as amostras foram avaliadas em triplicatas.

Após a aplicação do teste *t*-Student com equivalência estatística da precisão no nível de confiança de 95%, para efetuar a comparação entre estes resultados, verificou-se que não há diferença estatística entre os resultados apresentados por ambos os métodos. Essa equivalência estatística juntamente com os elevados percentuais de

Tabela 3. Comparação de LOD e LOQ entre o método proposto e outros reportados na literatura para a determinação de Bordeaux S em alimentos

Técnica instrumental	LOD e LOQ (µg mL ⁻¹)	Referência
UV-Vis	0,10 e 0,31	11
UPLC	0,10 e 0,25	52
HPLC	0,12 e 0,35	53
HPLC-MS	0,005 e 0,010	54
Eletroforese capilar por zona	0,14 e 0,50	55
Eletroforese capilar	1,1 e 3,6	56
Voltametria de pulso diferencial	0,03 e 0,09	57
ELISA	0,003 e 0,010	58
Adsorção em filme de quitosana/DIA	0,020 e 0,074	Presente estudo

UV-Vis: Espectrometria de absorção molecular na região do ultravioleta e visível. UPLC: Cromatografia a líquido de ultra performance. HPLC: Cromatografia a líquido de alta performance. HPLC-MS: Cromatografia a líquido de alta performance acoplada a espectrometria de massas. ELISA: Ensaio imunossorvente enzimático.

Tabela 4. Quantificações de amostras de gelatinas empregando o método proposto e consolidado ($F_{\text{crítico}} = 9,28$; $t_{\text{crítico}} = 2,78$)⁵¹

Amostra	Método proposto (mg g ⁻¹)	Método consolidado (mg g ⁻¹) ¹¹	$t_{\text{calculado}}$
I	13,97 ± 0,11	14,04 ± 0,07	0,57
II	30,60 ± 0,12	31,98 ± 0,10	2,41
III	14,88 ± 0,11	15,86 ± 0,05	2,38

recuperação alcançados para as amostras, permitem concluir que o método apresenta exatidão satisfatória.⁵¹

Enfim, a Tabela 5 mostra um resumo dos parâmetros de mérito do método desenvolvido.

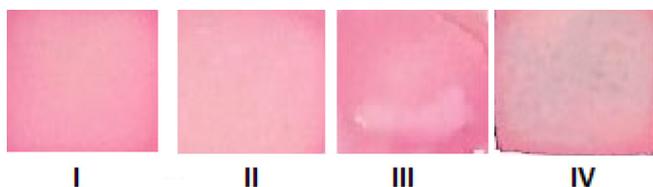
Tabela 5. Figuras de mérito para o método de quantificação de Bordeaux S sorvido em filmes de quitosana

Parâmetro	Resultado
Curva analítica típica	S = 0,2866C – 0,0105
Faixa linear	0,074-4,00 mg L ⁻¹
LOD _{instrumental}	20 µg L ⁻¹
LOQ _{instrumental}	74 µg L ⁻¹
LOD _{método}	40 µg g ⁻¹
LOQ _{método}	148 µg g ⁻¹
Repetitividade (%)	2,1%
Reprodutibilidade (%)	4,1%
Exatidão (%)	99,1%

LOD: Limite de detecção. LOQ: Limite de quantificação.

Aplicação da metodologia

Quatro amostras diferentes de gelatinas foram analisadas segundo o método proposto, todas de sabor cereja, de três marcas diferentes. A Tabela 6 apresenta as características de cada amostra e conteúdo de Bordeaux S (mg g⁻¹), e a Figura 8 ilustra uma replicata de cada amostra.

**Figura 8.** Imagens digitais do corante presente em cada amostra de gelatina (I-IV, de acordo com a Tabela 6) sorvido em filmes de quitosana (tampão citratofosfato de sódio 0,200 mol L⁻¹ pH 7,5, filmes de 1,0 cm², 90 rpm, 90 min)

É importante notar que, considerando-se a massa total de corante por pacote de gelatina, e o peso de um indivíduo adulto como 70 kg, o total de corante para todas as amostras foi muito superior à máxima ingestão diária permitida segundo a ANVISA (0,50 mg kg⁻¹ de massa corporal do indivíduo que o ingere).

Tabela 6. Características das amostras de gelatina analisadas e determinações de Bordeaux S

Amostra de gelatina	Tipo	[Bordeaux S] (mg g ⁻¹)	Peso líquido por pacote (g)	Total de corante por pacote (mg)
I	Diet	37,85 ± 0,07	12	454,2 ± 0,8
II	Normal	13,97 ± 0,11	25	349,3 ± 3,3
III	Zero	30,60 ± 0,12	12	367,2 ± 1,4
IV	Normal	14,88 ± 0,11	30	446,9 ± 2,8

CONCLUSÕES

Os filmes de quitosana sintetizados e caracterizados neste trabalho são capazes de seletivamente extrair o corante Bordeaux S presente em amostras de gelatinas. A precisão do método proposto foi dada em termos de repetitividade (2,1%) e reprodutibilidade (4,1%), enquanto a exatidão foi dada em termos de comparação entre curvas analítica e de adição de analito (99,4%). O LOQ alcançado foi de 0,074 mg L⁻¹, o que permite quantificar adequadamente o corante de amostras de alimentos, segundo as determinações da agência reguladora ANVISA. De fato, o LOQ alcançado foi significativamente inferior ao apresentado por diversos outros já reportados na literatura.

Portanto, é possível afirmar que a metodologia inovadora proposta neste presente estudo foi comprovada como uma alternativa adequada para a quantificação de Bordeaux S em amostras de alimentos, mostrando-se ainda de elevada praticidade e baixo custo.

MATERIAL SUPLEMENTAR

O material referente a caracterização dos filmes de quitosana: espectro de FT-IR, imagem de microscopia eletrônica de varredura dos filmes de quitosana, curva de titulação potenciométrica bem como o modelo cinético está disponível no material suplementar em <http://quimicanova.s bq.org.br/>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo fornecimento de bolsas e projetos de pesquisa (E-26/211.186/2019 e E-26/202.717/2019).

REFERÊNCIAS

1. Yamjala, K.; Nainar, M. S.; Ramiseti, N. R.; *Food Chem.* **2016**, *192*, 813. [Crossref]
2. Ministério da Saúde, https://bvms.saude.gov.br/bvms/saudelegis/svs/1/1997/prt0540_27_10_1997.html, acessado em Fevereiro 2024.
3. Rawat, D.; Mishra, V.; Sharma, R. S.; *Chemosphere* **2016**, *155*, 591. [Crossref]
4. Buledi, J. A.; Solangi, A. R.; Hyder, A.; Khand, N. H.; Memon, S. A.; Mallah, A.; Mahar, N.; Dragoi, E. N.; Show, P.; Behzadpour, M.; Karimi-Maleh, H.; *Food Chem. Toxicol.* **2022**, *165*, 113177. [Crossref]
5. Martins, M. S.; *Aditivos & Ingredientes* **2015**, *32*. [Link] acessado em Fevereiro 2024
6. Gao, Y.; Wang, L.; Zhang, Y.; Zou, L.; Li, G.; Ye, B.; *Talanta* **2017**, *168*, 146. [Crossref]
7. Jahani, P. M.; Aflatoonian, M. R.; Rayeni, R. A.; Di Bartolomeo, A.; Mohammadi, S. Z.; *Food Chem. Toxicol.* **2022**, *163*, 112962. [Crossref]
8. Beitollahi, H.; Nejad, F. G.; Dourandish, Z.; Tajik, S.; *Environ. Res.* **2022**, *214*, 113725. [Crossref]
9. Wu, H.; Gao, N.; Zhang, L.; Li, Y.; Shi, Y.; Du, L.; *Food Analytical Methods* **2016**, *9*, 614. [Crossref]
10. Pourreza, N.; Elhami, S.; *J. Iran. Chem. Soc.* **2009**, *6*, 784. [Crossref]
11. Ni, Y.; Wang, Y.; Kokot, S.; *Talanta* **2009**, *78*, 432. [Crossref]

12. Wu, S.; Yu, Y.; Zhang, C.; Chen, F.; *J. Anal. Sci. Technol.* **2020**, *11*, 6. [Crossref]
13. Kaur, A.; Gupta, U.; Hasan, I.; Muhammad, R.; Ahmad Khan, R.; *Microchem. J.* **2021**, *170*, 106720. [Crossref]
14. Shotts, M. L.; Plans Pujolras, M.; Rossell, C.; Rodriguez-Saona, L.; *J. Cereal Sci.* **2018**, *82*, 65. [Crossref]
15. de Andrade, F. I.; Guedes, M. I. F.; Vieira, I. G. P.; Mendes, F. N. P.; Rodrigues, P. A. S.; Maia, C. S. C.; Ávila, M. M. M.; Ribeiro, L. M.; *Food Chem.* **2014**, *157*, 193. [Crossref]
16. Dong, M. Y.; Wu, H. L.; Long, W. J.; Wang, T.; Yu, R. Q.; *Microchem. J.* **2021**, *171*, 106775. [Crossref]
17. Palianskikh, A. I.; Sychik, S. I.; Leschev, S. M.; Pliashak, Y. M.; Fiodarava, T. A.; Belyshava, L. L.; *Food Chem.* **2022**, *369*, 130947. [Crossref]
18. Schuster, R.; Gratzfeld-Hüsgen, A.; *Chemistry, Agricultural and Food Sciences* **2000**. [Link] acessado em Fevereiro 2024
19. da Silva Neto, G. F.; Rodrigues, M. L. A.; Fonseca, A.; *Talanta* **2021**, *221*, 121602. [Crossref]
20. Rovina, K.; Siddiquee, S.; Shaarani, S. M.; *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *65*, 68. [Crossref]
21. Capitán-Vallvey, L. F.; López-Ruiz, N.; Martínez-Olmos, A.; Erenas, M. M.; Palma, A. J.; *Anal. Chim. Acta* **2015**, *899*, 23. [Crossref]
22. Gomes, M. S.; Trevizan, L. C.; Nóbrega, J. A.; Kamogawa, M. Y.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1577. [Crossref]
23. Costa, G. O.; Feiteira, F. N.; Schuenck, R. M.; Pacheco, W. F.; *Anal. Methods* **2018**, *10*, 4463. [Crossref]
24. Foca, G.; Masino, F.; Antonelli, A.; Ulrici, A.; *Anal. Chim. Acta* **2011**, *706*, 238. [Crossref]
25. de Sá, I. C.; Feiteira, F. N.; Pacheco, W. F.; *Food Analytical Methods* **2020**, *13*, 962. [Crossref]
26. Patel, S.; Shrivastava, K.; Sinha, D.; Karbhal, I.; Patle, T. K.; Monisha; Tikeshwari; *Spectrochim. Acta, Part A* **2023**, *299*, 122824. [Crossref]
27. Wi, J.; Jon, S.; Bae, G.; Kim, Y.; Jon, S.; *J. Electroanal. Chem.* **2023**, *949*, 117766. [Crossref]
28. Firdaus, M. L.; Okumura, R. M.; Nursaadah, E.; Handayani, D.; Mayub, A.; Rahmidar, L.; Permana, M. D.; Luthfiah, A.; Wyantuti, S.; Eddy, D. R.; Hartati, Y. W.; *Science and Technology Indonesia* **2023**, *8*, 660. [Crossref]
29. Souza, V. S.; Silva, S. M. S.; Maia, L. C.; Monteiro, D. S.; Souza, A. L. V.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2023**, *240*, 104929. [Crossref]
30. Feiteira, F. N.; dos Reis, L. G. T.; Pacheco, W. F.; Cassella, R. J.; *Microchem. J.* **2015**, *119*, 44. [Crossref]
31. Costa, G. O.; Feiteira, F. N.; Schuenck, H. M.; Pacheco, W. F.; *Anal. Methods* **2018**, *10*, 4463. [Crossref]
32. Feiteira, F. N.; Barreiros, J. V. P. P.; Pacheco, W. F.; *Quim. Nova* **2021**, *44*, 20. [Crossref]
33. Sirajudheen, P.; Poovathumkuzhi, N. C.; Vigneshwaran, S.; Chelaveetil, B. M.; Meenakshi, S.; *Carbohydr. Polym.* **2021**, *273*, 118604. [Crossref]
34. Rasband, W.; *ImageJ*, versão 1.38e; National Institutes of Health, USA, 1987.
35. Jiang, X.; Chen, L.; Zhong, W.; *Carbohydr. Polym.* **2003**, *54*, 457. [Crossref]
36. Tan, S. C.; Khor, E.; Tan, T. K.; Wong, S. M.; *Talanta* **1998**, *45*, 713. [Crossref]
37. He, X.; Li, K.; Xing, R.; Liu, S.; Hu, L.; Li, P.; *Egypt. J. Aquat. Res.* **2016**, *42*, 75. [Crossref]
38. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7th ed.; John Wiley & Sons: Chichester, 2005.
39. Crini, G.; Badot, P. M.; *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 399. [Crossref]
40. Zheng, T.; Tang, P.; Li, G.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2022**, *139*, 1. [Crossref]
41. Rêgo, T. V.; Cadaval, T. R. S.; Dotto, G. L.; Pinto, L. A. A.; *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *411*, 27. [Crossref]
42. Dotto, G. L.; Moura, J. M.; Cadaval, T. R. S.; Pinto, L. A. A.; *Chem. Eng. J.* **2013**, *214*, 8. [Crossref]
43. Crini, G.; *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 1061. [Crossref]
44. Omrani, E.; Ahmadpour, A.; Heravi, M.; Bastami, T. R.; *Journal of Water Process Engineering* **2022**, *47*, 102581. [Crossref]
45. Saheed, I. O.; Oh, W. D.; Suah, F. B. M.; *J. Hazard. Mater.* **2021**, *408*, 124889. [Crossref]
46. Sadiq, A. C.; Olasupo, A.; Ngah, W. S. W.; Rahim, N. Y.; Suah, F. B. M.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *191*, 1151. [Crossref]
47. Patel, H.; *Appl. Water Sci.* **2019**, *9*, 1. [Crossref]
48. Jiwalak, N.; Rattanaphani, S.; Bremner, J. B.; Rattanaphani, V.; *Fibers Polym.* **2010**, *11*, 572. [Crossref]
49. Subramani, S. E.; Thinakaran, N.; *Process Saf. Environ. Prot.* **2017**, *106*, 1. [Crossref]
50. Amaral, C. N. R.; Feiteira, F. N.; Cruz, R. C.; Cravo, V. O.; Cassella, R. J.; Pacheco, W. F.; *J. Environ. Chem. Eng.* **2016**, *4*, 4184. [Crossref]
51. Miller, J. C.; Miller, J. N.; *Statistics for Analytical Chemistry*, 3rd ed.; Prentice Hall: New York, 1993.
52. Yang, Y.; Zhang, J.; Shao, B.; *Anal. Methods* **2014**, *6*, 5872. [Crossref]
53. Alves, S. P.; Brum, D. M.; de Andrade, E. C. B.; Pereira Netto, A. D.; *Food Chem.* **2008**, *107*, 489. [Crossref]
54. Martin, F.; Oberson, J. M.; Meschiari, M.; Munari, C.; *Food Chem.* **2016**, *197*, 1249. [Crossref]
55. Wu, Z. Y.; Zhang, F.; Kuang, Z.; Fang, F.; Song, Y. Y.; *Microchem. J.* **2022**, *179*, 107499. [Crossref]
56. Pérez-Urquiza, M.; Beltrán, J. L.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *898*, 271. [Crossref]
57. Tajik, S.; Orooji, Y.; Karimi, F.; Ghazanfari, Z.; Beitollahi, H.; Shokouhimehr, M.; Varma, R. S.; Jang, H. W.; *Journal of Food Measurement and Characterization* **2021**, *15*, 4617. [Crossref]
58. Zhang, B.; Du, D.; Meng, M.; Eremin, S. A.; Rybakov, V. B.; Zhao, J.; Yin, Y.; Xi, R.; *Food Analytical Methods* **2014**, *7*, 1498. [Crossref]