



Universidade de Brasília - UnB

Instituto de Química

**Determinação de corantes alimentícios sintéticos
através de cromatografia em papel e imagens
digitais.**

Autora: Alicia Fuentes Mouzinho

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília, DF

2023

Alicia Fuentes Mouzinho

Determinação de corantes alimentícios sintéticos através de cromatografia em papel e imagens digitais.

Trabalho de conclusão do curso de Bacharelado em Química apresentado ao Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito de obtenção do Título de Bacharel em Química.

Universidade de Brasília - UnB

Instituto de Química

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília, DF

2023

Alicia Fuentes Mouzinho

Determinação de corantes alimentícios sintéticos através de cromatografia em papel e imagens digitais.

Trabalho de conclusão do curso de Bacharelado em Química apresentado ao Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito de obtenção do Título de Bacharel em Química.

Brasília, DF, 15 de dezembro de 2023

Prof. Dr. Alexandre Fonseca
Orientador

Prof. Dr. Cyro Lucas Silva Chagas
IQ/UnB
Convidado 1

Prof. Dr. Carlos Martin Infante
Cordova
IQ/UnB
Convidado 2

Brasília,DF
2023

Dedico este trabalho aos meus pais e a minha irmã, por serem o meu porto seguro e por sempre acreditarem em mim. Amo vocês.

Alicia Fuentes Mouzinho

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus porque só Ele sabe o quão longo e difícil foi o caminho até chegar aqui, foi Ele que me deu forças e sabedoria para continuar quando o fim parecia estar tão longe. Agradeço por me mostrar que planos mudam ao longo do caminho e que o resultado é surpreendentemente melhor do que imaginava.

Gostaria de agradecer meus pais, Maria e Helder, que desde sempre fizeram o possível e o impossível para que eu tivesse todas as oportunidades que esse mundo tinha a me oferecer. Obrigada por acreditarem em mim e me apoiarem durante toda a minha vida. Obrigada por me entenderem quando decidi mudar de curso. Agradeço a minha irmã, Arian, por ser a melhor irmã do mundo e por sempre fazer tudo a seu alcance para me ver feliz.

Agradeço as minhas melhores amigas, que estão comigo desde o colégio, por serem irmãs para mim, por sempre me ouvirem e estarem presentes na minha vida. Obrigada por serem um ombro amigo nesses altos e baixos que foram os meus anos na UnB e por sempre torcerem por mim.

Agradeço aos amigos que fiz durante a faculdade. Obrigada pela convivência, pelos momentos de surto juntos, risadas, estudos e tantas outras coisas. Vocês fizeram toda a diferença durante esse período, onde muitas vezes não foi nada fácil e espero levar vocês para a vida toda.

Agradecimentos ao meu professor e orientador Alexandre Fonseca, por ter me aceitado em seu laboratório e me dado a oportunidade de desenvolver esse Trabalho de Conclusão de Curso, com todo o auxílio e orientação necessários.

Alicia Fuentes Mouzinho

“Porque Deus tanto amou o mundo que deu o seu Filho Unigênito, para que todo o que nele crer não pereça, mas tenha a vida eterna.”

(Bíblia Sagrada, João 3: 16)

Resumo

Este trabalho consiste na avaliação da determinação de corantes alimentícios sintéticos por meio da cromatografia em papel e imagens digitais baseadas no sistema *Red, Blue and Green* (RGB). Este método emergente é uma alternativa viável e econômica em comparação com técnicas convencionais, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Uma cabine foi projetada para abrigar o papel cromatográfico, com uma câmera posicionada externamente na parte superior, para evitar interferências externas. Um programa, já desenvolvido no laboratório, foi usado para obter sinais quantitativos através da leitura em tempo real de imagens e das cores captadas pela webcam. Para validar o método, medidas foram conduzidas para quantificar padrões dos corantes amaranço e azul brilhante, revelando coeficientes de determinação de regressão adequados. Este dispositivo simples, de execução rápida e baixo custo, demonstrou potencial aplicabilidade na determinação de corantes alimentícios sintéticos, sugerindo sua continuidade para avaliações analíticas futuras.

Palavras-chave: corantes alimentícios sintéticos, cromatografia em papel, imagens digitais, sistema RGB, baixo custo.

Abstract

This work consists in evaluating the determination of synthetic food dyes through paper chromatography and digital images based on the Red, Blue, and Green (RGB) system. This emerging method proves to be a viable and economical alternative compared to conventional techniques such as high-performance liquid chromatography (HPLC). A chamber was designed to house the chromatographic paper, with an externally positioned camera at the top to prevent external interferences. A program, previously developed in the laboratory, was employed to obtain quantitative signals by real-time image analysis and reading of colors captured by the webcam. To validate the method, measurements were conducted to quantify standards of amaranth and brilliant blue dyes, revealing adequate regression coefficients of determination. This straightforward, swift-execution, and low-cost device demonstrated potential applicability in determining synthetic food dyes, suggesting its continuity for future analytical assessments.

Key-words: Synthetic food dyes, paper chromatography, digital images, RGB system, low cost.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura química da tartrazina (E-102). Fonte: (ZANONI; YAMANAKA, 2016).	17
Figura 2 – Estrutura química do amarantho (E-123). Fonte: (MEDICINE, 2005).	18
Figura 3 – Estrutura química do azul brilhante (E-133). Fonte: (SÁ et al., 2020)	18
Figura 4 – Estrutura química do eritrosina (E-127). Fonte: (SPELLMEIER; STÜLP, 2009).	19
Figura 5 – Estrutura química do azul de indigotina (E-132). Fonte: (ZANONI; YAMANAKA, 2016).	20
Figura 6 – Esquema ilustrativo do desenvolvimento cromatográfico em CP. Fonte: (MACHADO, 2019).	21
Figura 7 – Vistas de um cubo RGB. Fonte: (SACHS, 1999).	24
Figura 8 – Cabine para aquisição de imagens. (A) Cabine montada (B) Base da cabine. Fonte: Acervo pessoal.	25
Figura 9 – Placas plásticas utilizadas na base da cabine (A) Placas plásticas (B) Base da cabine montada. Fonte: Acervo pessoal.	26
Figura 10 – Suporte fixado na base da cabine (A) Cabine com tampa (B) Suporte. Fonte: Acervo pessoal.	26
Figura 11 – Papel cromatográfico (A) Antes da fusão da cera (B) Depois da fusão da cera. Fonte: Acervo pessoal.	27
Figura 12 – Preparação para a plastificação do papel cromatográfico (A) Papel cromatográfico (B) Plástico para a plastificação (C) Papel cromatográfico com o plástico (D) Papel cromatográfico com o plástico e o papel sulfite para proteção. Fonte: Acervo pessoal.	28
Figura 13 – Programa antes da leitura. Fonte: Acervo pessoal.	29
Figura 14 – Programa durante da leitura. Fonte: Acervo pessoal.	29
Figura 15 – Papel colocado em uma placa de acrílico com o auxílio de um clips. Fonte: Acervo pessoal.	31
Figura 16 – Imagem do papel cromatográfico com interferências externas. Fonte: Acervo pessoal.	34
Figura 17 – Imagem do papel cromatográfico obtida com o auxílio da cabine. Fonte: Acervo pessoal.	34
Figura 18 – Corrida cromatográfica de 8 trilhas. Fonte: Acervo pessoal.	35
Figura 19 – Repetibilidade pipetagem (A) Normal (B) Reversa. Fonte: Acervo pessoal.	36
Figura 20 – Cromatograma repetibilidade pipetagem. (A) Normal (B) Reversa. Fonte: Acervo pessoal.	37

Figura 21 – Repetibilidade secagem. (A) Ao final (B) Imediata individual. Fonte: Acervo pessoal.	38
Figura 22 – Cromatograma repetibilidade secagem (A) Ao final (B) Imediata indi- vidual. Fonte: Acervo pessoal.	39
Figura 23 – Imagem do papel cromatográfico após corrida com os padrões. Fonte: Acervo pessoal.	40
Figura 24 – Cromatograma. Fonte: Acervo pessoal.	41
Figura 25 – Curva analítica para a determinação de amarantho obtida pela altura dos picos. Fonte: Acervo pessoal.	42
Figura 26 – Curva analítica para o azul brilhante obtida pela altura dos picos. Fonte: Acervo pessoal.	42
Figura 27 – Curva analítica para o amarantho obtida pela área dos sinais. Fonte: Acervo pessoal.	43
Figura 28 – Curva analítica para o azul brilhante obtida pela área dos sinais. Fonte: Acervo pessoal.	43

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Corantes alimentícios sintéticos permitidos no Brasil	16
Tabela 2 – Configuração dos parâmetros da câmera (Vídeo Proc Amp).....	30
Tabela 3 – Configuração dos parâmetros da câmera (Controle de câmera).....	30
Tabela 4 – Volumes adicionados das soluções estoque de amaranço em balão de 10 mL para a preparação dos padrões desse corante.....	30
Tabela 5 – Volumes adicionados das soluções estoque de azul brilhante em balão de 10 mL para a preparação dos padrões desse corante.....	31
Tabela 6 – Medidas pipetagem normal.....	37
Tabela 7 – Medidas pipetagem reversa.....	38
Tabela 8 – Medidas secagem ao final	39
Tabela 9 – Medidas secagem imediata individual	40

Lista de abreviaturas e siglas

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CP	Cromatografia em papel
Dm	Distância percorrida pela fase móvel
Ds	Distância percorrida pela substância
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
INS	Sistema internacional de numeração (do inglês, <i>International Numbering System</i>)
RBG	<i>Red, Blue and Green</i>
RDC	Resolução de diretoria colegiada
Rf	Fator de retenção (do inglês, <i>Retardation Factor</i>)
SC	Sinal de cor
TLC	Cromatografia de camada delgada (do inglês, <i>Thin Layer Chromatography</i>)

Sumário

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Contextualização.....	14
1.2	Objetivo	15
1.3	Objetivos específicos.....	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	Corantes.....	16
2.1.1	Corantes azo.....	16
2.1.2	Corantes triarilmetanos	18
2.1.3	Corantes xantenos	19
2.1.4	Corantes indigoides	19
2.2	Métodos de determinação.....	20
2.3	Uso de imagens digitais em química analítica.....	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Aparatos.....	25
3.2	Cabine para aquisição das imagens	25
3.3	Preparação do papel cromatográfico com trilhas de separação.....	27
3.4	Programa de computador para aquisição dos cromatogramas.....	28
3.5	Reagentes e soluções.....	30
3.6	Procedimento para as medidas.....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1	Escolha de eluente	33
4.2	Papel.....	33
4.3	Obtenção de imagem.....	34
4.4	Corridas cromatográficas para amostras	35
4.5	Ensaio com os padrões	36
5	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46

1 Introdução

1.1 Contextualização

Corantes são, comumente, usados desde os tempos antigos. Historiadores acreditam que os corantes alimentícios surgiram em 1500 A.C, aproximadamente. Exemplos de uso de corantes alimentício são o açafrão, que é mencionado no poema *Ilíada* de Homero, além disso, foi dito por Plínio, o Velho, que a indústria de vinhos gaulesa usava fumaça e extrato de aloé para melhorar a cor e o sabor de seus vinhos (SHARMA; MCKONE; MARKOW, 2011). Em meados do século XIX era, praticamente, impossível encontrar qualquer alimento ou bebida que não apresentasse alguma adulteração com corante. Em 1820, o químico inglês Friedrich Accum foi o primeiro a trazer atenção à população sobre o uso de corantes em sua publicação “Um Tratado sobre Adulterações de Alimentos e Venenos Culinários” (SHARMA; MCKONE; MARKOW, 2011). Em 1856, o químico inglês William Perkin sintetizou o primeiro corante orgânico, o roxo anilina (SHARMA; MCKONE; MARKOW, 2011).

De acordo com o item 1.2 da Portaria n. 540, de 27 de outubro de 1997, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, define que corantes são aditivos alimentares usados para melhorar a aparência e a qualidade dos alimentos e torná-los mais atraentes para os consumidores. Também define-se que aditivos alimentares são ingredientes adicionados intencionalmente aos alimentos com objetivo de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002).

Na indústria alimentícia são usados os corantes naturais e os sintéticos. Corantes sintéticos são aqueles obtidos por síntese química e seu uso é alto graças à sua estabilidade, cor atraente e baixo custo (PRADO; GODOY, 2003). Entretanto, problemas de saúde, como alergias, rinite, broncoconstrição, hiperatividade, danificação cromossômica ou tumores, têm sido reportados pela literatura, relacionando-os ao seu uso (SANTOS; SILVA; NETA, 2022).

Por conta disso é necessário o controle de qualidade de corantes sintéticos nos alimentos. Sendo assim, diversos métodos analíticos são usados, como, por exemplo: cromatografia de camada delgada, espectrometria, eletroforese capilar, cromatografia em coluna, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Pensando em uma determinação qualitativa e quantitativa, o método mais utilizado é HPLC por ser um método confiável e ter uma alta repetibilidade de seus resultados (KUCHARSKA; GRABKA, 2010).

No contexto apresentado, a proposta de trabalho é a utilização de cromatografia

em papel como uma técnica de determinação alternativa, que possibilita a separação dos componentes da amostra, em que mesmo apresentando algumas limitações de caráter quantitativo, podem ser ultrapassadas com o uso de imagens digitais como alternativa de detecção rápida e eficiente.

1.2 Objetivo

Esse trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento e a avaliação de um método para a determinação de corantes artificiais em alimentos industrializados, baseado na separação dos analitos por cromatografia em papel e na sua detecção por imagens digitais.

1.3 Objetivos específicos

- Identificar o tipo de papel cromatográfico mais adequado para a separação;
- Buscar a fase móvel que proporcione a melhor resolução na separação;
- Construir curvas analíticas para a determinação do azul brilhante e do amaranço;

2 Fundamentação Teórica

Neste capítulo é abordado a classificação dos corantes alimentícios sintéticos permitidos no Brasil, suas características e formas de determinações quantitativas já realizadas ao longo dos anos com diferentes técnicas.

2.1 Corantes

O Decreto-Lei n. 986, de 21 de outubro de 1969, determina que as informações “Colorido Artificialmente” e “Aromatizado Artificialmente” sejam declaradas no painel principal dos alimentos que contenham adição de corantes artificiais e aromas artificiais, respectivamente. Devem ser claramente indicadas na embalagem, para que os consumidores possam identificá-los e fazer escolhas informadas.

A Resolução-RDC (Resolução de Diretoria Colegiada) n. 259, de 20 de setembro, de 2002, exige que os aditivos alimentares sejam declarados na lista de ingredientes por meio de sua classe funcional seguida do seu nome completo ou número INS (Sistema Internacional de Numeração).

Na Tabela 1 é possível visualizar os corantes artificiais permitidos no Brasil. Esses são divididos em 4 grupos: corante azo, corante trifenilmetanos, corante xantenos e corante indigoides. (PRADO; GODOY, 2007).

Tabela 1 – Corantes alimentícios sintéticos permitidos no Brasil

Tartrazina	Amarelo Crepúsculo
Azorrubin	Amaranto
Ponceau 4R	Eritrosina
Vermelho 40	Azul Patente V
Indigotina	Azul Brilhante
Verde Rápido	

2.1.1 Corantes azo

Compreende os compostos formados por pelo menos um grupo azo funcional de estrutura $R-N=N-R$, e pelo menos um grupo sulfonato (SO_3^-). Os corantes desse tipo são obtidos por uma reação de diazotização de uma amina primária aromática, seguido pelo acoplamento do sal de diazônio com um fenol ou uma amina aromática (BRITO et al.,). Além disso, possuem caráter ácido, sendo suas propriedades físicas muito semelhantes entre si. Quimicamente, são reduzíveis com facilidade por agentes redutores fortes, sendo então pouco sensíveis a agentes oxidantes (ZANONI; YAMANAKA, 2016).

- **Tartrazina (E-102)**

O uso desse corante é permitido em laticínios, licores, fermentados, produtos de cereais, frutas e iogurtes (FEITOSA, 2016).

Nos Estados Unidos e na Europa, diversas pesquisas realizadas desde a década de 70, mostraram que esse corante pode causar reações alérgicas em algumas pessoas, como asma, bronquite, rinite, náusea, broncoespasmos, urticária, eczema e dor de cabeça. Sendo assim, desde 1980 (para drogas de uso oral) e 1981 (para alimentos), o FDA (*Food and Drug Administration*) exige que a tartrazina seja listada no rótulo de todos os produtos que o contenha, de modo que os consumidores sensíveis possam evitá-lo (ANVISA, 2007).

É possível visualizar a estrutura química da tartrazina na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura química da tartrazina (E-102). Fonte: (ZANONI; YAMANAKA, 2016).



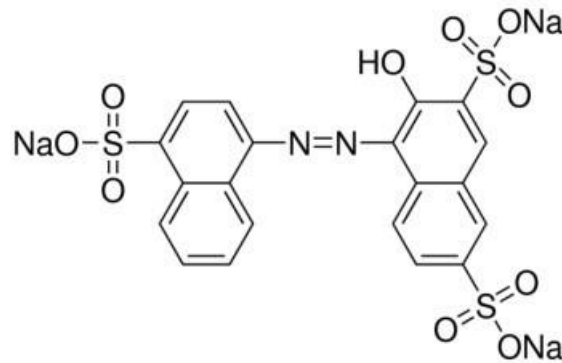
- **Amaranto (E-123)**

É empregado em cereais, balas, laticínios, gelados, recheios, xaropes, preparados líquidos (FEITOSA, 2016).

Há evidências conflitantes sobre se o corante é ou não carcinogênico. Sendo assim, foi banido nos Estados Unidos em 1976, no entanto, é permitido no Canadá. Na Inglaterra, seu uso é permitido de forma provisória até que sejam apresentados estudos mais conclusivos. No Japão, as indústrias de alimentos voluntariamente baniram o corante. Já na União Europeia, o seu uso é permitido (PRADO; GODOY, 2003).

É possível visualizar a estrutura química do amaranto na Figura 2.

Figura 2 – Estrutura química do amaranto (E-123). Fonte: (MEDICINE, 2005).



2.1.2 Corantes triarilmetanos

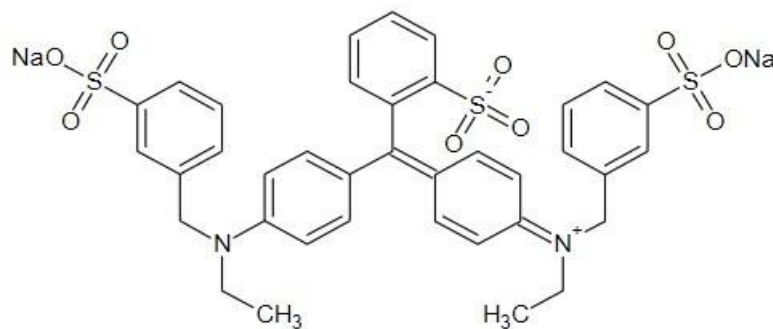
Os corantes triarilmetanos são compostos orgânicos sintéticos que possuem estruturas moleculares do tipo trifenilmetano, além de três radicais arila e também grupos sulfônicos, o que os torna altamente solúveis em água. O modo de preparação desses corantes é através de uma condensação de um fenol substituído (BRITO et al.,). No Brasil são permitidos três corantes dessa categoria (PRADO; GODOY, 2007).

• Azul brilhante (E-133)

É usado em laticínios, balas, cereais, queijos, recheios, gelatinas, licores, refrescos. Mostrou-se capaz de causar hiperatividade em crianças, eczema e asma, como também deve ser evitado por pessoas sensíveis a purinas (SANTOS; SILVA; NETA, 2022).

Nos Estados Unidos, não há restrições no uso desse produto, no entanto, no Canadá, seu uso é permitido apenas até um limite máximo de 100 ppm (parte por milhão). Na Inglaterra, é permitido usar esse produto apenas em alguns alimentos específicos. Já na União Europeia, o uso deste produto é permitido sem restrições (PRADO; GODOY, 2003). É possível ver a estrutura química do azul brilhante na Figura 3.

Figura 3 – Estrutura química do azul brilhante (E-133). Fonte: (SÁ et al., 2020)



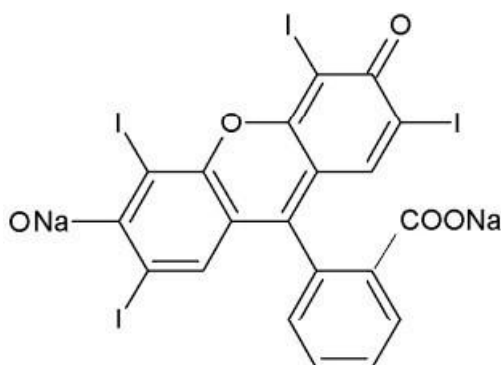
2.1.3 Corantes xantenos

No Brasil apenas um único corante (Eritrosina) dessa categoria é permitido, assim como nos Estados Unidos, na União Europeia, no Reino Unido e no Canadá. (PRADO; GODOY, 2003)

É usado em pós para gelatinas, laticínios, refrescos, geleias. Pode ser fototóxico e contém uma quantidade significativa de iodo, com uma concentração de 557 miligrama por grama de produto. Se consumido em excesso, pode causar um aumento nos níveis de hormônio tireoidiano no sangue, o que pode levar a uma condição conhecida como hipertireoidismo. Há também estudos inconclusivos de uma possível associação com tumores na tireoide (FEITOSA, 2016).

Com base em sua estrutura química, possível observar na Figura 4, conclui-se que é insolúvel em meio ácido, mas é bastante estável em ambiente alcalino. Além disso, ele apresenta forte fluorescência (PRADO; GODOY, 2003).

Figura 4 – Estrutura química do eritrosina (E-127). Fonte: (SPELLMEIER; STÜLP, 2009).



2.1.4 Corantes indigoides

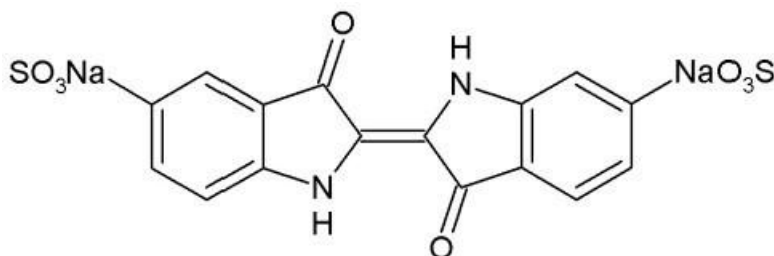
Apenas um corante desse tipo é permitido no Brasil, assim como na União Europeia, Japão, Estados Unidos e Reino Unido (PRADO; GODOY, 2003).

É comumente utilizado em gomas de mascar, iogurtes, balas, caramelos e em pós para refrescos artificiais. No entanto, o consumo excessivo pode levar a sintomas como náuseas, vômitos e hipertensão. Além disso, algumas pessoas podem desenvolver alergias, que podem causar coceira e problemas respiratórios (FEITOSA, 2016).

Esse corante é obtido da tinta do alcatrão do carvão, é uma versão sintética melhorada do corante antigo denominado indigotina (extraído da folha das plantas *Indigofera*, *Tinctoria*, *Indigofera suffruticosa* ou *Indigofera arrecta*). Tem como característica a baixa

estabilidade frente à temperatura, calor, ácido, e descolore na presença de SO₂. É possível ver na Figura sua estrutura química (BRITO et al.,).

Figura 5 – Estrutura química do azul de indigotina (E-132). Fonte: (ZANONI; YAMANAKA, 2016).



2.2 Métodos de determinação

Os métodos analíticos usados com frequência para determinação de corantes alimentícios incluem espectrometria na região do visível, cromatografia de camada delgada (TLC), electroforese capilar e, principalmente, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Em geral, HPLC de fase reversa e HPLC com pareamento iônico são as técnicas escolhidas para uma determinação rápida de corantes aditivos em bebidas, especialmente quando não há necessidade de tratamento da amostra e com a possibilidade de detecção por espectrometria na região do visível (ANDRADE et al., 2014).

HPLC é um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel (FM), eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade. Suas principais vantagens são: tempo reduzido de análise, alta resolução, boa análise qualitativa, resultados quantitativos, boas detectabilidade, versatilidade, mecanização. Entretanto, apresenta suas limitações, sendo elas: alto custo a instrumentação, alto custo de operação, falta de um detector universal, necessidade de experiência no seu manuseio (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Sistemas de HPLC de fase reversa consistem em uma fase estacionária (FE) de menor polaridade e uma FM de maior polaridade, enquanto a fase normal tem as polaridades invertidas (TONHI et al., 2002). Já HPLC com pareamento iônico é usada na separação de espécies facilmente ionizáveis ou iônicas utilizando uma coluna de fase reversa (OLIVEIRA, 2012).

Quando se fala das técnicas de determinação anteriores tem que levar em consideração suas limitações, e principalmente, o seu custo. Dessa forma, uma técnica de determinação alternativa seria a cromatografia de papel (CP). A CP foi aperfeiçoada por

Consden, Gordon e Mertin em 1944, é uma técnica simples, acessível economicamente, relativamente rápida e requer menos equipamentos para ser realizada (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

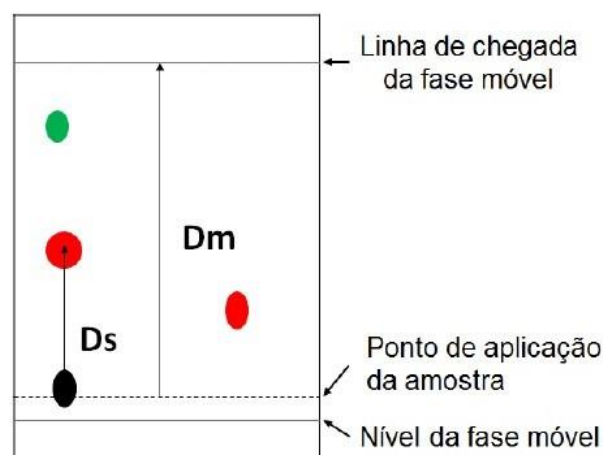
Essa técnica é uma forma de cromatografia líquida-líquida em papel, a separação dos componentes de uma mistura relaciona-se com as diferentes solubilidades relativas desses componentes nas FM e estacionária. Os componentes menos solúveis na FE têm uma movimentação mais rápida ao longo do papel, enquanto os mais solúveis serão seletivamente retidos no papel, tendo uma movimentação mais lenta. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006)

É importante aplicar uma quantidade controlada da amostra a fim de evitar excesso ou diluição insuficiente. A extremidade inferior da tira de papel é marcada por uma linha onde a amostra é aplicada e, em seguida, a tira é colocada na cuba cromatográfica contendo o solvente. No entanto, isso deve ser feito sem permitir que a amostra entre em contato direto com o solvente. O solvente se move através da tira de papel por capilaridade, arrastando os componentes da amostra com ele. À medida que o solvente percorre o papel, os diferentes componentes da amostra se deslocam em velocidades distintas, dependendo da sua afinidade relativa pelo papel e pelo solvente. Isso resulta na separação dos componentes ao longo da tira de papel (PERES, 2002).

Quando o solvente atinge uma altura específica na tira de papel, chamada de linha de chegada da FM, a tira é removida do recipiente e deixada para secar ao ar antes de ser analisada. Após a separação, são realizados processos de revelação para evidenciar a posição das bandas cromatográficas e a observação visual tornar-se possível (PERES, 2002).

É possível ver um esquema ilustrativo do desenvolvimento cromatográfico em CP na Figura 6.

Figura 6 – Esquema ilustrativo do desenvolvimento cromatográfico em CP. Fonte: (MACHADO, 2019).



O parâmetro empregado na análise por CP que permite a identificação das diferentes substâncias é chamado de o fator de retenção (Rf). O Rf é determinado como a relação entre a distância percorrida pela mancha do componente e a distância percorrida pelo solvente após a eluição cromatográfica. Portanto, esse fator depende diretamente da FM utilizada e é expresso por meio da equação 4.1

$$Rf = \frac{D_s}{D_m} \quad (2.1)$$

Onde:

D_s = distância percorrida pela substância.

D_m = distância percorrida pela FM.

O valor do Rf é considerado constante, para o mesmo composto, submetido às mesmas condições de separação (MACHADO, 2019).

Quando a FM atinge a linha de chegada, retira-se o papel da cuba cromatográfica e seca-se com o auxílio de ar frio ou quente de um secador de cabelos. Quando a substância é colorida, sua presença é notada facilmente, mas, em geral, as substâncias são incolores ou invisíveis à luz ordinária, necessitando de artifícios externos para serem observadas. Empregam-se métodos químicos, físicos, biológicos ou enzimáticos para detectar as substâncias separadas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Existem algumas formas de obter uma determinação quantitativa em CP. As principais formas são diretamente no papel, sendo elas: comparação da intensidade das cores reveladas, área da mancha, análise densitométrica (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Nesse trabalho foi proposto uma análise da intensidade das cores reveladas por meio do uso de imagens digitais. Esse conteúdo será melhor abordado na próxima seção.

Na literatura, a análise por CP já foi utilizada como ferramenta investigativa da condição do solo (FRANCISCON,); monitoramento do progresso da reação de transesterificação durante a produção de biodiesel (ROCHA; ROYO; MENEZES, 2016). O termo cromatografia pode ser atribuído ao botânico russo Mikhael Semenovich Tswett que, em 1906, o empregou para descrever o processo utilizado para separar os pigmentos de folhas de plantas (OLIVEIRA; SILVA, 2017).

2.3 Uso de imagens digitais em química analítica

O uso de imagens digitais tem origem no século passado durante o desenvolvimento dos primeiros computadores. Um marco histórico importante ocorreu em 1920, quando uma imagem foi compartilhada entre a Inglaterra e os Estados Unidos por meio de um cabo submarino, na área do jornalismo (GONZALEZ; WOODS, 2002).

O uso de imagens digitais em análises químicas é um método bastante novo. Imagens de amostras, se processadas corretamente, podem obter informações valiosas sobre sua composição. Dentre os dispositivos para a obtenção de imagens, as câmeras hiperespectrais estão sendo muito populares em análises de quantificação na indústria alimentícia, mas essas são sofisticadas, caras e é necessário, em geral, um procedimento complexo de pré-tratamento de imagem (VIDAL et al., 2018).

Já as obtidas com smartphones ou scanners provavelmente fornecem menos informações sobre a amostra em estudo, mas têm apresentado um bom desempenho em inúmeras aplicações com menor esforço no processamento de dados e baixo custo. Exemplos de seu uso são em determinações de adulteração em alimentos (REILE et al., 2020), análise de cocaína (SOUZA et al., 2022), análise de alcalinidade de águas (GAIAO et al., 2006), entre outros. Entretanto, há poucos estudos sobre o uso de imagens digitais para a determinação de corantes (VIDAL et al., 2018).

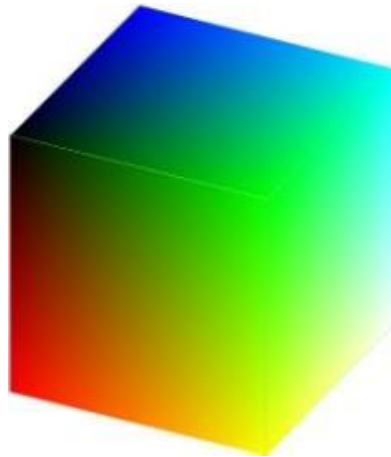
A detecção na cromatografia em papel utilizando imagens digitais é comumente realizada por meio de scanners, câmeras digitais e, mais recentemente, celulares. No entanto, é fundamental garantir um controle rigoroso da iluminação da placa cromatográfica, uma vez que variações na iluminação podem resultar em variações nas cores das imagens capturadas e, conseqüentemente, nos resultados analíticos obtidos (MACHADO, 2019).

A iluminação adequada da placa é essencial para obter imagens precisas e consistentes. Isso requer uma fonte de luz estável e uniforme, bem como um ambiente controlado para minimizar interferências externas, como reflexos e sombras. Também é importante garantir uma calibração adequada dos dispositivos e uma configuração consistente para cada amostra analisada. Isso ajuda a minimizar possíveis variações nas cores resultantes das imagens, permitindo uma análise mais confiável e precisa dos resultados cromatográficos (MACHADO, 2019).

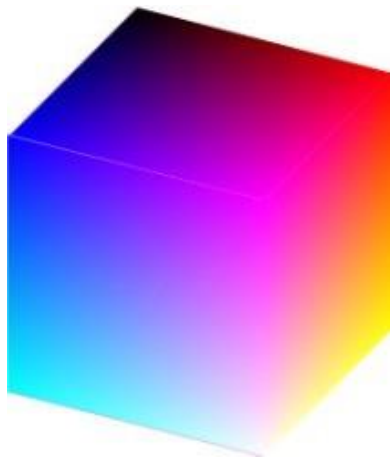
As imagens digitais são compostas por pixels, sendo que cada pixel (menor unidade da imagem) está associado a valores numéricos que representam as cores. Existem diferentes sistemas de cores utilizados, sendo o mais comum o sistema RGB (*Red, Green and Blue*) (SACHS, 1999).

O sistema RGB funciona especificando as cores de acordo com os valores variando de 0 a 255 de seus componentes vermelho (*Red*), verde (*Green*) e azul (*Blue*) (FIRDAUS et al., 2014). Esses três valores definem um espaço de cores tridimensional e pode ser visualizado como um cubo com o vermelho variando ao longo de um eixo, o verde variando ao longo do segundo eixo e o azul variando ao longo do terceiro eixo. Dessa forma, cada cor pode ser criada pela mistura dessas cores primárias, localizada em algum lugar no interior do cubo (SACHS, 1999). A Figura 7 mostra a parte externa do cubo RGB vista de duas direções diferentes:

Figura 7 – Vistas de um cubo RGB. Fonte: (SACHS, 1999).



(a) Cubo RGB vista 1.



(b) Cubo RGB vista 2.

3 Materiais e Métodos

No presente capítulo são apresentados os materiais e os métodos utilizados para o desenvolvimento do projeto.

3.1 Aparatos

Para a aquisição das imagens digitais foi utilizada uma webcam da marca Logitech® modelo C920 full HD. Para impressão com cera sobre o papel cromatográfico foi utilizada uma impressora Xerox® Colorqube modelo 8580. Uma laminadora Menno® modelo A4-2401 foi empregada na plastificação de uma das faces do papel cromatográfico como será descrito mais adiante. Estruturas 3D, em ácido polilático (PLA), foram fabricadas empregando-se uma impressora de filamento Biqu® B1.

3.2 Cabine para aquisição das imagens

Fabricou-se a cabine mostrada na Figura 8A por impressão 3D, para permitir a aquisição dos cromatogramas baseados em imagens digitais em um ambiente de iluminação controlada à base de LEDs brancos.

A base desta cabine pode ser vista na Figura 8B e consiste em uma moldura quadrada com 12 cm de lado na qual foi adaptada uma fita de LED com 24 emissores, sendo que 6 emissores ficam dispostos em cada lado. Para alimentação elétrica dos LEDs, foi empregada uma fonte de corrente contínua de 12 V e 1 A e um módulo de pulso com modulação (PWM) para ajuste da intensidade luminosa dos emissores, o que é feito girando-se o potenciômetro no painel do sistema.

Figura 8 – Cabine para aquisição de imagens. (A) Cabine montada (B) Base da cabine.
Fonte: Acervo pessoal.



Ainda na base foram utilizadas três placas plásticas para espalhamento e reflexão da radiação. Estas placas foram retiradas de um painel de LED utilizado para iluminação residencial e dispostas, no instrumento proposto, na mesma ordem recomendada pelo fabricante. Como mostra a Figura 9A, uma placa incolor e texturizada foi colocada entre uma placa branca translúcida e uma película reflexiva branca, proporcionando uma iluminação uniforme da região interna da moldura, como mostra a Figura 9B.

Figura 9 – Placas plásticas utilizadas na base da cabine (A) Placas plásticas (B) Base da cabine montada. Fonte: Acervo pessoal.



Sobre a base foi fixado, com o auxílio de parafusos, um suporte para a webcam. Este suporte mantém a câmera a 12 cm de distância da base iluminada com LEDs e possui uma tampa removível, como é possível ver na Figura 10A, com um orifício central de 15 mm de diâmetro, o qual serve de janela de observação para as leituras cromatográficas. Para as medidas, o usuário abre a tampa do suporte, posiciona o papel cromatográfico, recém utilizado na separação dos corantes e devidamente seco, sobre a base iluminada, como pode ser visto na Figura 10B. Fechando a tampa, inicia-se a medição das corridas cromatográficas com o auxílio do programa de computador (descrito na seção 3.4).

Figura 10 – Suporte fixado na base da cabine (A) Cabine com tampa (B) Suporte. Fonte: Acervo pessoal.

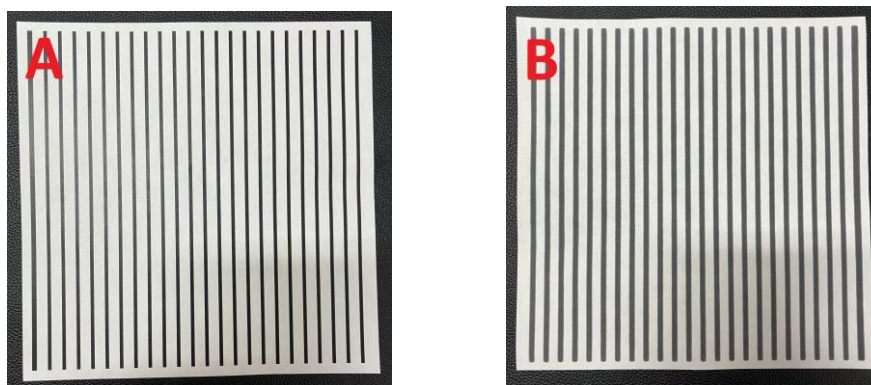


3.3 Preparação do papel cromatográfico com trilhas de separação

Para a realização das medidas com o programa de computador proposto, foi necessário fabricar um dispositivo de papel em que várias amostras/padrões pudessem ser aplicadas e separadas simultaneamente em diferentes trilhas.

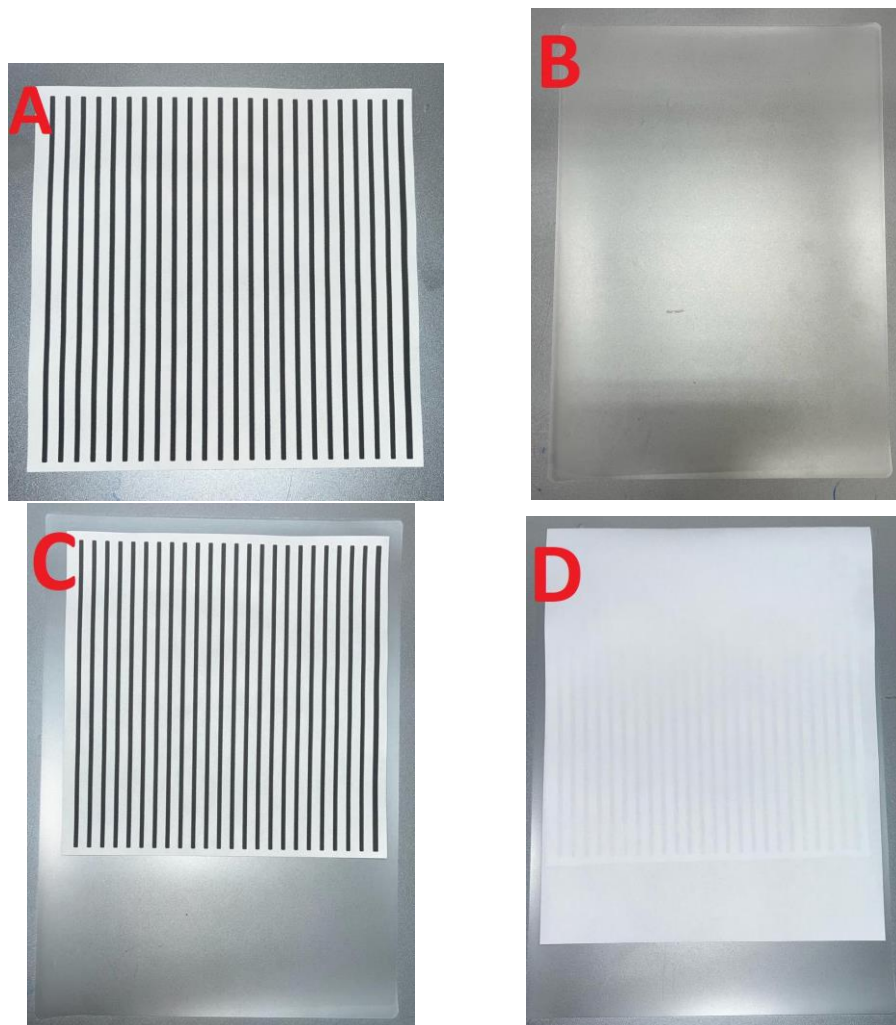
Sendo assim, optou-se pela produção dos dispositivos por impressão das trilhas com cera. Para isso, utilizou-se o software Microsoft® PowerPoint para desenhar o arranjo ilustrado na Figura 11, em que cada trilha (listras brancas) com 6 mm de largura é delimitada lateralmente por faixas negras com 2 mm de largura, totalizando 23 trilhas por papel. Com o desenho pronto, realizou-se a impressão, e, em seguida, o papel foi colocado em uma estufa por 5 minutos a 80 °C, permitindo a fusão da cera e sua penetração nos poros do papel. De fato, durante este processo, a cera sofre um espalhamento lateral, deixando as trilhas em branco mais estreitas (5 mm) do que o projetado no desenho (6 mm).

Figura 11 – Papel cromatográfico (A) Antes da fusão da cera (B) Depois da fusão da cera.
Fonte: Acervo pessoal.



Finalizada essa etapa, o papel tem uma de suas superfícies seladas com filme de plastificação de documentos (*pouch film*) em uma laminadora operando a 150 °C. Conforme mostra a Figura 12, o papel cromatográfico é posicionado sobre o filme plástico e a superfície que não deve ser plastificada é protegida com uma folha de papel sulfite antes de ser inserido na laminadora.

Figura 12 – Preparação para a plastificação do papel cromatográfico (A) Papel cromatográfico (B) Plástico para a plastificação (C) Papel cromatográfico com o plástico (D) Papel cromatográfico com o plástico e o papel sulfite para proteção. Fonte: Acervo pessoal.



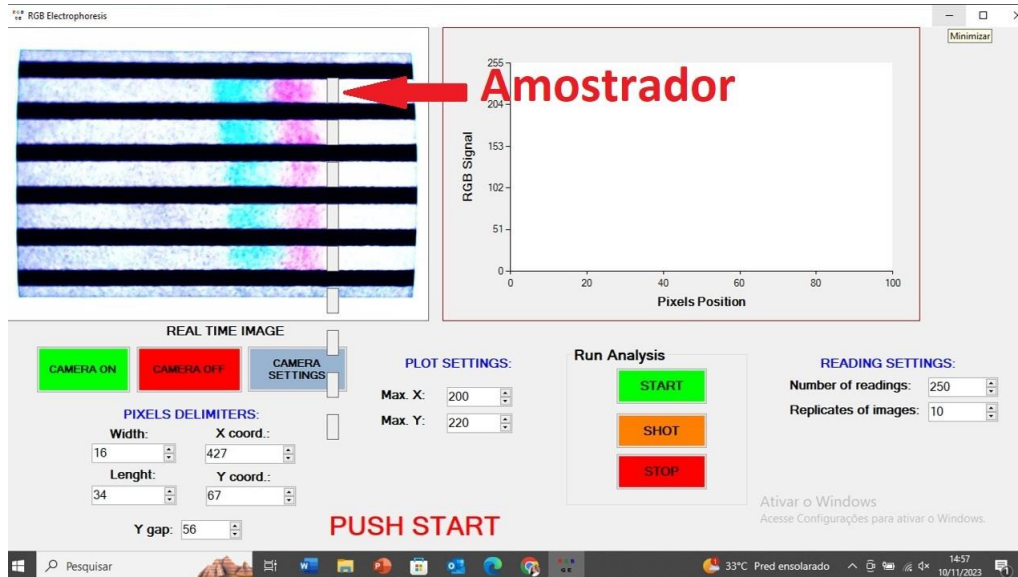
Posteriormente, o papel cromatográfico plastificado é recortado em dispositivos menores com o auxílio de um estilete. Nos estudos, empregou-se dispositivos com oito trilhas (7 x 9 cm) ou com cinco trilhas (5 x 9 cm).

3.4 Programa de computador para aquisição dos cromatogramas

Um software recentemente desenvolvido por (NETO; RODRIGUES; FONSECA, 2021), foi escrito em Visual Basic 2013 para permitir a aquisição de cromatogramas baseados em imagens digitais e sistema de cor RGB. A imagem obtida pela câmera é exibida em tempo real juntamente com nove amostradores, esses sendo retângulos de tamanhos variáveis que definem as regiões da imagem, onde é determinada a média de sinais por pixels, contidas em seus interiores. Para realizar medidas, o usuário precisa definir a lar-

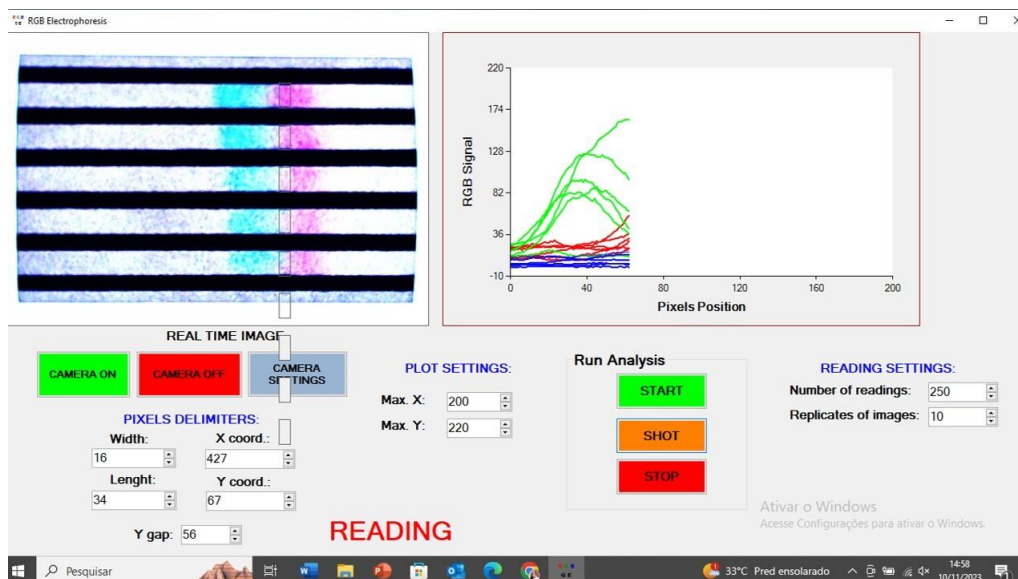
gura e comprimento dos amostradores de pixels e os colocar imediatamente antes das bandas separadas, o mais próximo possível da zona de aplicação. Essas definições podem ser vistas na Figura 13.

Figura 13 – Programa antes da leitura. Fonte: Acervo pessoal.



Durante as leituras, esses amostradores movem pixel a pixel seguindo a direção migratória das espécies, enquanto os valores de RGB são plotados segundo as regiões selecionadas, registrando 27 eletroferogramas (respostas R, G e B para cada amostrador nas 9 zonas de separação) como pode ser visto na Figura 14.

Figura 14 – Programa durante da leitura. Fonte: Acervo pessoal.



Para melhorar o sinal, os parâmetros de imagem foram ajustados, como podem ser vistos nas Tabelas 2 e 3, antes da obtenção do sinal, para que as bandas cromatográficas possam ser observadas com maior qualidade. Esses parâmetros devem ser ajustados de acordo com a câmera e a luz usada.

Tabela 2 – Configuração dos parâmetros da câmera (Vídeo Proc Amp).

Parâmetro	Ajuste
Brilho	255
Contraste	255
Saturação	255
Nitidez	255
Proporção de Branco	6350
Comp. Luz de Fundo	1
Ganho	5

Tabela 3 – Configuração dos parâmetros da câmera (Controle de câmera).

Parâmetro	Ajuste
Zoom	175
Foco	0
Exposição à Luz	-6
Panorâmica	0
Inclinação	0

3.5 Reagentes e soluções

Para a preparação de Fase Móvel (FM) de cloreto de sódio (NaCl) 0,1 %, pesou-se 0,25 g de NaCl e dissolveu-se essa massa com 250 mL de água desmineralizada por osmose reversa em um balão de 250 mL.

Graças a uma doação de corantes da empresa Nova Amora para o laboratório de química, foi possível obter uma solução estoque dos corantes amarantho 500 e azul brilhante 250 foi preparada pela dissolução de 0,125 g de amarantho e 0,025 g de azul brilhante em 250 mL de água. A partir dessa solução, prepararam-se padrões com 20 ppm a 100 ppm de azul brilhante e padrões com 50 a 250 de amarantho utilizando balões volumétricos de 10 mL de acordo com as Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Volumes adicionados das soluções estoque de amarantho em balão de 10 mL para a preparação dos padrões desse corante.

Concentração	50 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm	250 ppm
Amarantho	1mL	2mL	3mL	4mL	5mL

Tabela 5 – Volumes adicionados das soluções estoque de azul brilhante em balão de 10 mL para a preparação dos padrões desse corante.

Concentração	20 ppm	40 ppm	60 ppm	80 ppm	100 ppm
<i>Azul Brilhante</i>	0,8mL	1,6mL	2,4mL	3,2mL	4mL

Para a preparação da amostra, pesou-se 1 g de suco em pó de sabor uva da marca Tang® e adicionou a essa quantidade 50 mL de água desmineralizada por osmose reversa, dentro de um balão de 50 mL.

3.6 Procedimento para as medidas

No papel cromatográfico foi aplicado 1,5 microlitro de cada padrão e da amostra, sendo que a cada aplicação foi realizada a secagem imediata da gota por meio de um secador de cabelo, com a maior intensidade de vento e a menor temperatura. Em seguida, o papel cromatográfico foi fixado em uma placa de acrílico com o auxílio de um clipe, como pode ser visto na Figura 15. Posteriormente, o papel é colocado no interior de um béquer de 50 mL, juntamente com um certo volume de FM no fundo do recipiente e tampado por uma placa de Petri. Assim, permite-se que a corrida cromatográfica ocorra-se nas melhores condições e por um tempo de aproximadamente 5-10 min.

Figura 15 – Papel colocado em uma placa de acrílico com o auxílio de um clipe. Fonte: Acervo pessoal.



Antes de realizar a análise com o software, é necessário secar novamente o papel com o auxílio do secador de cabelo, sendo que esse esteja nas mesmas condições usadas anteriormente.

4 Resultados e Discussão

4.1 Escolha de eluente

Durante a realização da parte experimental, foi usado como FM o cloreto de sódio (NaCl) 0,1 %. Essa escolha foi baseada na literatura (SCIENTIFIC, 2016) (MARKOW, 1988), por ser um eluente que consegue a melhor separação do azul brilhante e do vermelho 40. Entretanto, foi usado o amaranto como o corante vermelho, porém por também ser um azo corante, manteve-se o uso de NaCl. Além de ser um eluente de fácil acesso e com fácil preparar em grande volume.

4.2 Papel

Inicialmente, realizou-se testes com 3 tipos de papel cromatográfico para determinar qual seria a melhor opção. Esses foram: Whatman® 1 CHR, Whatman® 3MM CHR e Macherey-Nagel® 260. Determinou-se que não ocorria diferenças significativas das corridas entre os papéis, então optou-se pelo Whatman® 1 CHR, por ser o que tinha em maior quantidade no laboratório.

Avaliou-se, primeiramente, a possibilidade de recortar o papel com uma gravadora a Laser de forma a compor o chamado papel ranhudo (VOGEL, 1992) em que tiras de papel de mesmas dimensões são separadas por espaços vazios. É necessário realizar esse processo para que cada corrida siga um único caminho e, assim, não afete as corridas vizinhas. Após algumas tentativas, o papel cromatográfico se mostrou incapaz de se manter alinhado e firme durante a corrida cromatográfica. Prejudicando o resultado final da separação dos corantes.

Pensando nisso, optou-se por selar umas das superfícies do papel com filme de plastificação em uma laminadora, de forma a manter o papel mais rígido. A questão sobre a sua estabilidade durante a realização da corrida cromatográfica foi resolvida com essa técnica. Entretanto, a fuligem produzida durante o recorte com o Laser deixava o papel amarelado, atrapalhando obtenção adequada dos sinais RGB pelos marcadores.

Desse modo, optou-se por utilizar a impressão das trilhas com cera, porque não ocorrem interferências nas corridas por conta da cor do papel que não sofre influência da fuligem. Depois da impressão, selou-se uma das faces do papel cromatográfico, para auxiliar na sua estabilidade durante o processo de separação, e ainda acrescentou o uso de uma pequena placa de acrílico para auxiliar mais a sua firmeza.

4.3 Obtenção de imagem

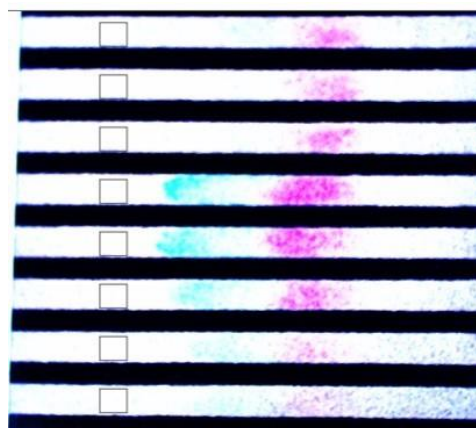
Durante o procedimento experimental foi preciso verificar qual seria a melhor estratégia de obtenção da imagem digital do papel cromatográfico. Inicialmente, foi realizado testes sem utilizar a cabine de luz controlada, ou seja, utilizando-se apenas a luz ambiente, os ajustes da câmera. Entretanto, essa imagem adquirida não apresentou-se boa para obtenção dos cromatogramas, como pode ser vista na Figura 16. Em vista disso, os amostradores de RGB não eram capazes de distinguir com clareza as diferentes intensidades das cores azul e vermelho, gerando cromatogramas pouco claros e com muitos ruídos.

Figura 16 – Imagem do papel cromatográfico com interferências externas. Fonte: Acervo pessoal.



Portanto, optou-se pela produção de um equipamento, sendo esse melhor descrito na seção 3.2, para ser possível obter uma imagem do papel cromatográfico com clareza e sem a interferências externas, como é possível ver na Figura 17, e conseqüentemente adquirir melhores cromatogramas.

Figura 17 – Imagem do papel cromatográfico obtida com o auxílio da cabine. Fonte: Acervo pessoal.

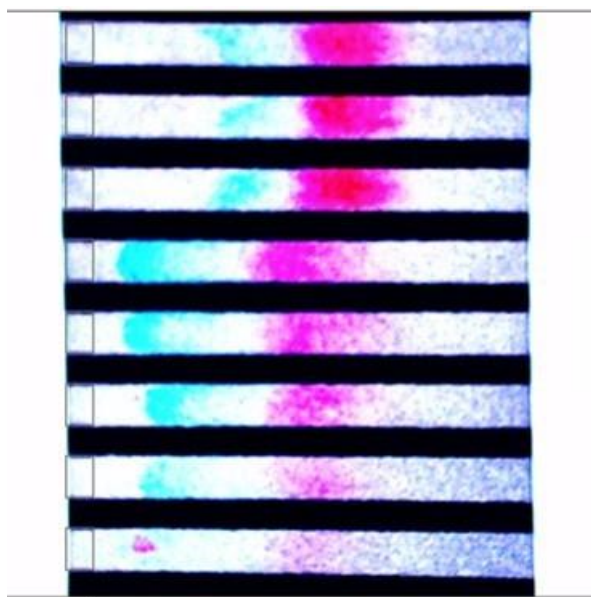


4.4 Corridas cromatográficas para amostras

Foram realizados dois tipos de corridas cromatográficas. O primeiro tipo foi de 5 trilhas, em que cada trilha foi aplicado diferentes concentrações dos padrões, como pode ser visto nas Tabelas 4 e 5 da seção 3.5. O segundo tipo foi de 8 trilhas, sendo que as primeiras 5 trilhas seguiram sendo as aplicações dos padrões em diferentes concentrações e as 3 finais foram aplicações das amostras em mesma concentração. Entretanto, como poder ser visto na Figura 18, a separação dos corantes na amostra não ocorre de forma ideal, o corante vermelho 40 não foi separado adequadamente do amaranto. Isso acontece por conta das influências dos outros componentes presentes no refresco em pó, como açúcar (KUCHARSKA; GRABKA, 2010).

Na literatura (SOROURADDIN; SAADATI; MIRABI, 2015), há registros de como preparar a amostra antes da realização da corrida cromatográfica, para retirar esses interferentes e ao final permanecer apenas os corantes desejados. O método mais eficiente para a preparação da amostra envolve a fervura de uma solução de ácido acético com a amostra e lã branca. Posteriormente, a lã é submetida a uma lavagem com água para eliminar impurezas. Os corantes são retirados do tecido por meio de fervura com amônia diluída. A seguir, o extrato resultante, evaporado até quase a completa secura, é submetido à corrida cromatográfica. Em diversas publicações, é possível encontrar várias modificações desse método, como a substituição da lã por fibra de poliamida. Entretanto, não houve tempo o suficiente para realizar testes destes métodos de preparo de amostra.

Figura 18 – Corrida cromatográfica de 8 trilhas. Fonte: Acervo pessoal.



4.5 Ensaio com os padrões

• Formas de aplicação

De modo a avaliar a repetibilidade do método, houve a necessidade de determinar qual tipo de pipetagem, normal ou reversa (MARQUES-RAMOS, 2019), seria a mais vantajosa. Pensando assim, realizou-se duas corridas cromatográficas, em cada papel foi aplicado o 2 microlitros de padrão de concentração 150 ppm de amaranço e 60 ppm de azul brilhante em 5 trilhas. Na Figura 19 é possível ver ambas corridas no papel e na Figura 20 tem-se o cromatograma.

Figura 19 – Repetibilidade pipetagem (A) Normal (B) Reversa. Fonte: Acervo pessoal.

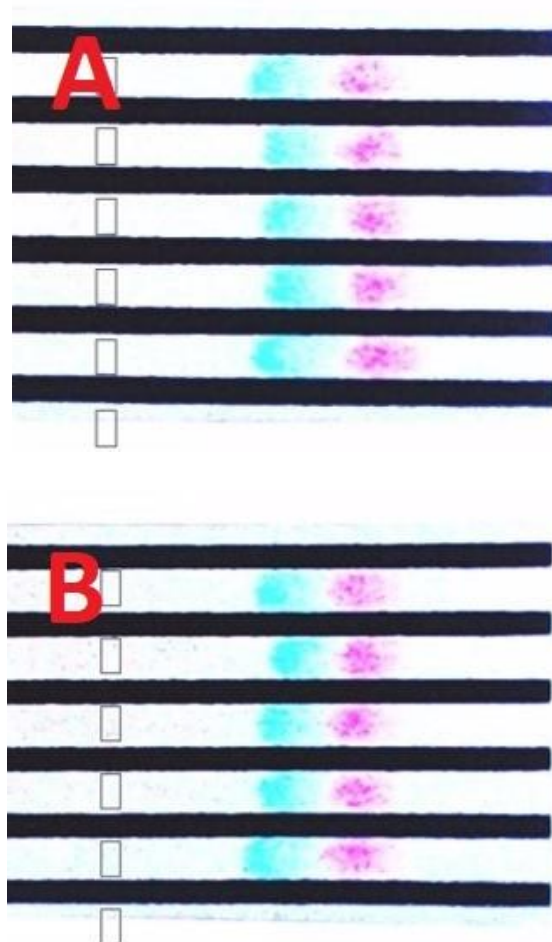
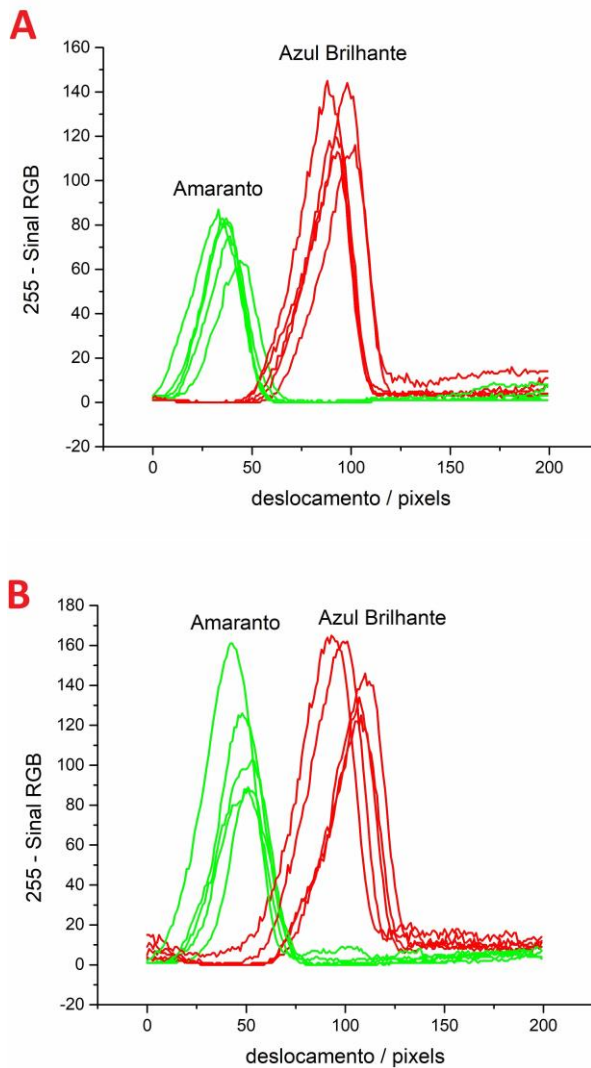


Figura 20 – Cromatograma repetibilidade pipetagem. (A) Normal (B) Reversa. Fonte: Acervo pessoal.



Nas Tabelas 6 e 7 é possível visualizar as diferenças nos coeficientes de variação das medidas de pipetagem normal e reversa, obtidos pelos valores do sinal RGB, assim determinando que a pipetagem normal é a melhor escolha.

Tabela 6 – Medidas pipetagem normal

	Amaranto	Azul Brilhante
Sinal médio	78	127,6
Desvio padrão	9,95	15,63
CV (%)	12,75	12,25

Tabela 7 – Medidas pipetagem reversa

	Amaranto	Azul Brillhante
Sinal médio	113,4	146,4
Desvio padrão	30,71	17,33
CV (%)	27,08	11,84

• **Influência da secagem**

Também ocorreu outro teste, sendo esse para determinar qual maneira de secagem do papel cromatográfico seria mais benéfica. Dessa maneira, com o auxílio de um secador de cabelo comum, secou-se um papel imediatamente após cada aplicação e o outro ao final de todas as aplicações. Na Figura 21, observa-se que a secagem imediata é a mais apropriada e na Figura 22 tem-se o cromatograma da secagem.

Figura 21 – Repetibilidade secagem. (A) Ao final (B) Imediata individual. Fonte: Acervo pessoal.

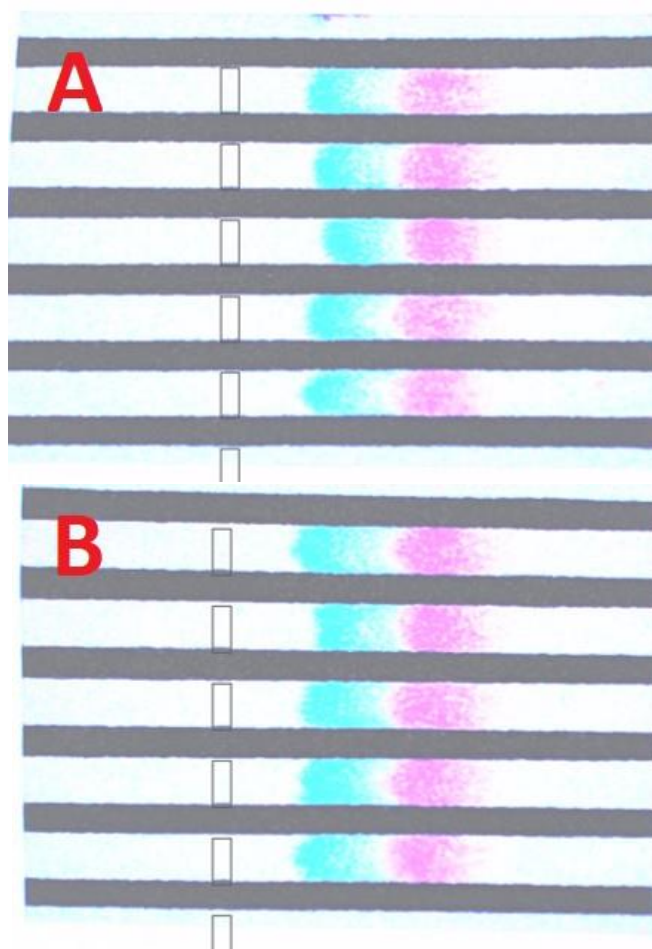
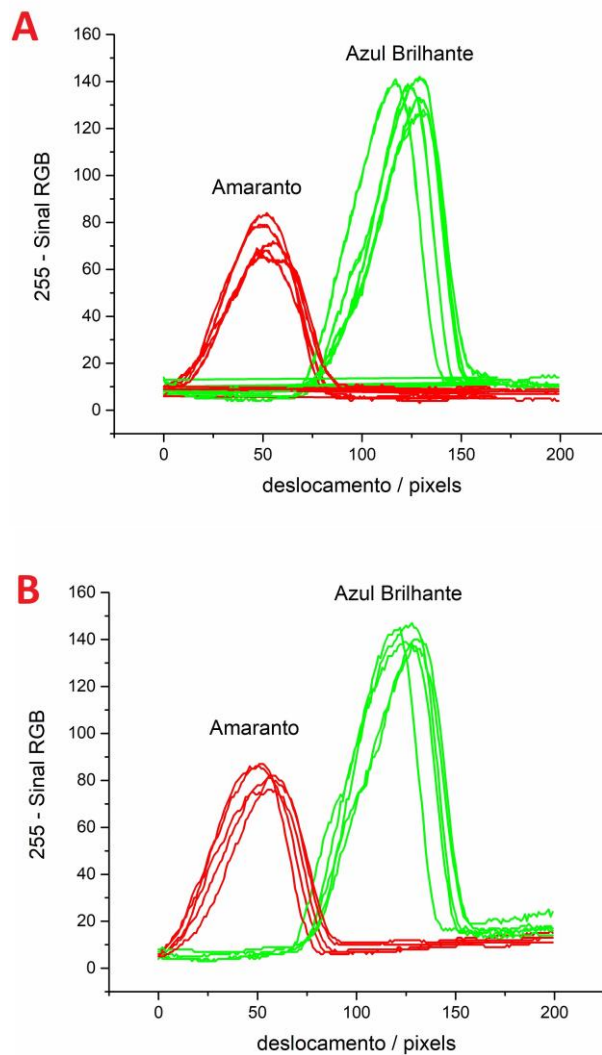


Figura 22 – Cromatograma repetibilidade secagem (A) Ao final (B) Imediata individual.
 Fonte: Acervo pessoal.



As Tabelas 8 e 9 mostram os coeficientes de variação das medidas ao realizar a secagem ao final e imediatamente individual, dessa forma mostrando que a secagem imediatamente individual é a melhor opção.

Tabela 8 – Medidas secagem ao final

	Amaranto	Azul Brillhante
Sinal médio	73,6	136
Desvio padrão	7,63	5,23
CV (%)	10,37	4,06

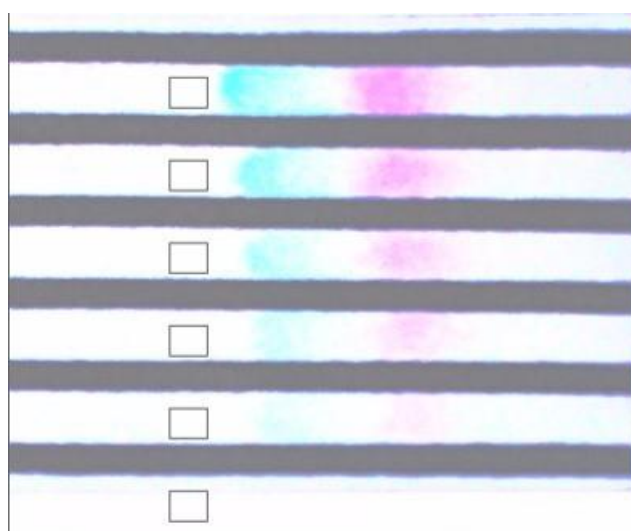
Tabela 9 – Medidas secagem imediata individual

	Amaranto	Azul Brillhante
Sinal médio	82,6	141,8
Desvio padrão	4,33	3,96
CV (%)	5,25	2,79

• Construção das curvas analíticas

Foram construídas curvas analíticas para a determinação dos corantes amaranth e azul brilhante com as soluções dos padrões descritos na seção 3.5. Realizaram-se diversos testes a fim de determinar qual seria a melhor concentração dos padrões para a obtenção de picos crescentes de sinal no cromatograma, até chegar aos valores usados. Sendo possível ver esses na Tabela 4 e 5. Na Figura 23 é possível ver o papel cromatográfico após a realização de uma corrida com as 5 diferentes concentrações dos padrões.

Figura 23 – Imagem do papel cromatográfico após corrida com os padrões. Fonte: Acervo pessoal.



Foi necessário realizar ajustes na forma de interpretar o sinal RGB para gerar sinais analíticos corrigidos em todas as medições, os quais deveriam aumentar conforme a concentração do padrão aumentasse. Em termos simples, para um papel totalmente branco, o sinal da componente de interesse (R, G ou B) deveria ser zero, pois, não há cor para os amostrados obterem sinal. Em contrapartida, o sinal para uma amostra ou padrão com cor diferente de branco deveria ser maior que zero e, idealmente, crescer com a concentração.

No entanto, é importante notar que o aumento na intensidade de cor devido ao aumento da concentração do padrão em uma reação colorimétrica resultaria no declínio da componente RGB mais próxima da cor complementar ao produto, estabelecendo assim uma relação inversamente proporcional entre a concentração do analito e a resposta da

componente RGB. Por exemplo, se o produto colorimétrico for rosa, a componente G (verde), complementar à cor rosa, experimentaria uma diminuição significativa em sua intensidade com o aumento da concentração do analito.

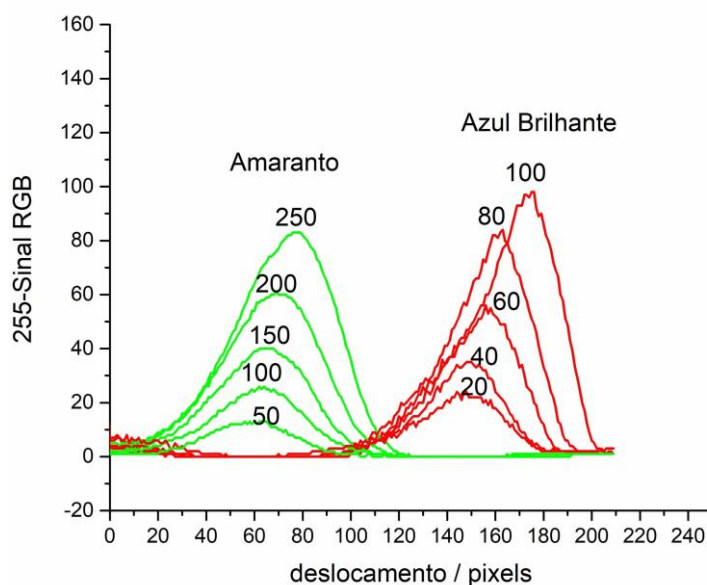
Assim sendo, o sinal de cor (SC) utilizado nos estudos foi calculado, por meio de programação, da seguinte maneira:

$$SC = 255 - \text{sinal RGB} \quad (4.1)$$

Onde 255 representa o valor máximo que as componentes R, G ou B podem atingir, e sinal RGB é o sinal bruto da componente de interesse (R, G ou B), sendo o SC proporcional ao aumento da concentração.

Assim, com papel cromatográfico visto na Figura 23 foi realizado a sua leitura pelo programa e obtido o cromatograma visto na Figura 24.

Figura 24 – Cromatograma. Fonte: Acervo pessoal.



A partir desse cromatograma foi possível obter uma curva analítica para cada um dos corantes. Sendo que primeiro, foi obtido as curvas por meio da altura dos picos dos sinais, como pode ser vista na Figura 25 e 26 e depois pela a área dos sinais, como pode ser visto na Figura 27 e 28.

A curva analítica obtida pela altura dos picos apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,985 para o amaranto e de 0,979 para o azul brilhante. O que demonstra um comportamento linear adequado para a faixa de concentração estudada, em ambos os casos.

Figura 25 – Curva analítica para a determinação de amaranço obtida pela altura dos picos. Fonte: Acervo pessoal.

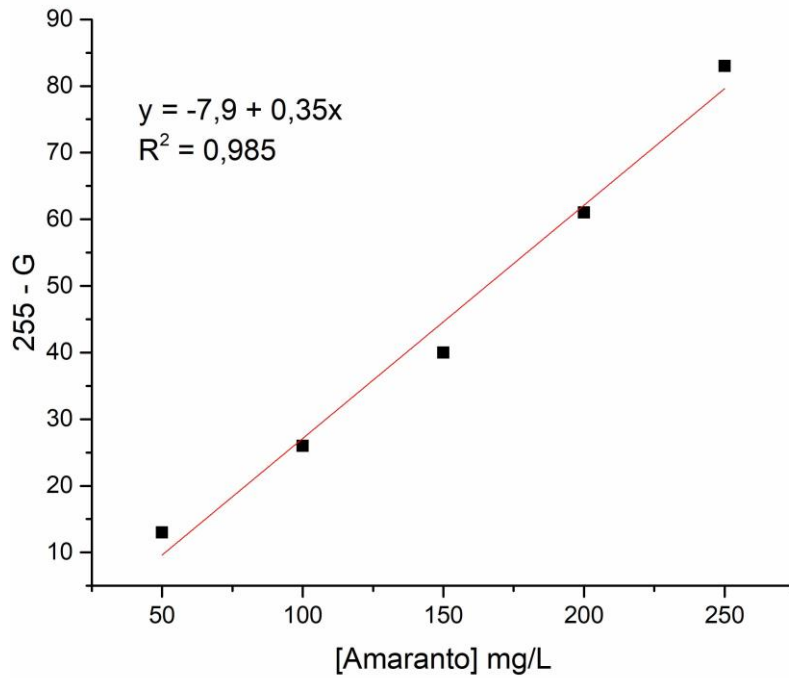


Figura 26 – Curva analítica para o azul brilhante obtida pela altura dos picos. Fonte: Acervo pessoal.

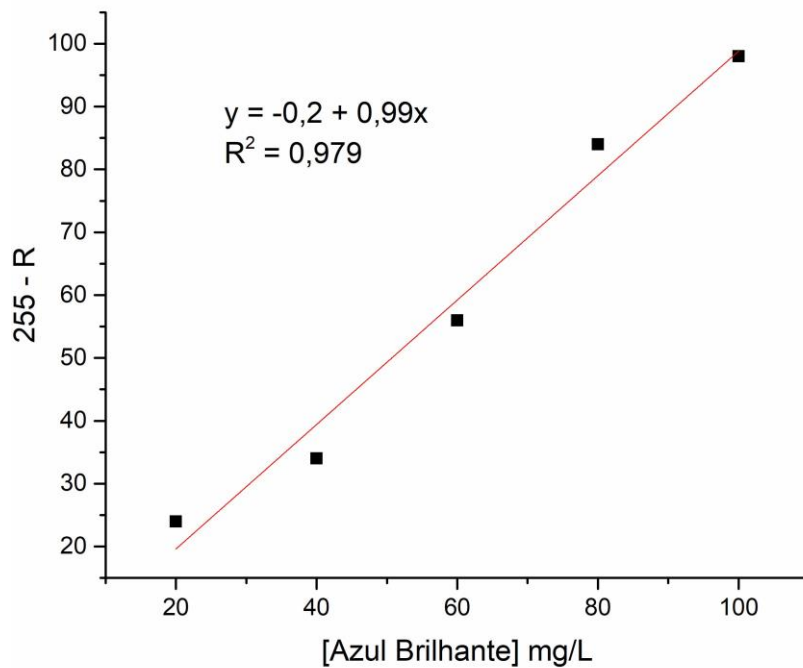


Figura 27 – Curva analítica para o amaranço obtida pela área dos sinais. Fonte: Acervo pessoal.

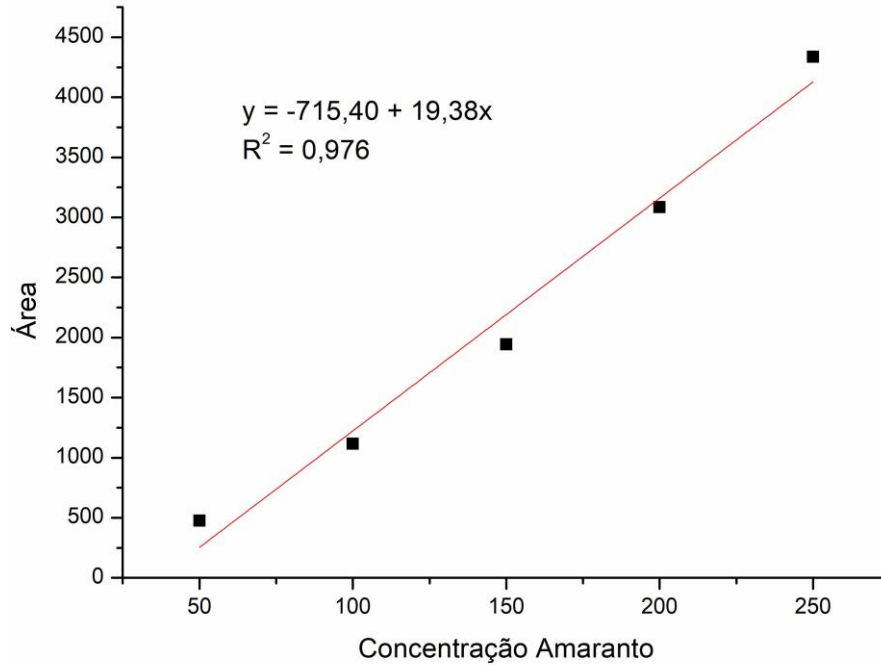
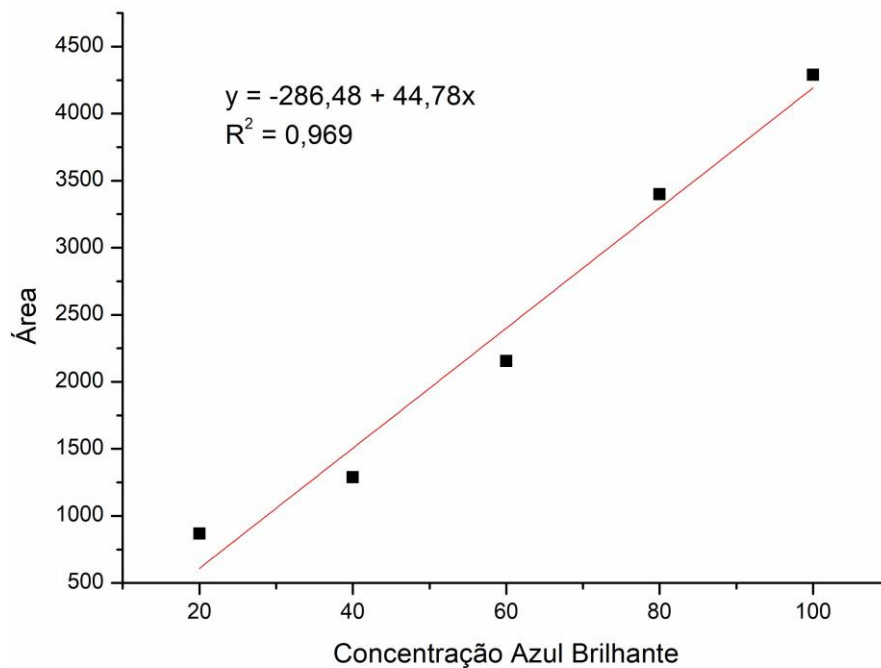


Figura 28 – Curva analítica para o azul brilhante obtida pela área dos sinais. Fonte: Acervo pessoal.



Entretanto, as curvas analíticas adquiridas pelas áreas dos sinais, resultaram diferentes coeficientes de determinação em relação às curvas pela altura dos picos. Esses valores foram R^2 de 0,976 para o amarantho e R^2 de 0,969 para o azul brilhante. Evidenciando, que há diferença entre os dois métodos de obtenção das curvas, mas que ambos obtiveram resultados promissores.

5 Conclusão

Pode-se concluir que a avaliação de corantes alimentícios sintéticos através de cromatografia em papel e imagens digitais representa uma alternativa promissora, econômica e simples para a quantificação desses corantes.

Este estudo proporciona a abertura de possibilidades para sua aplicação em outras análises que demandem rapidez e eficiência, e, eventualmente, poderá ser implementado como uma solução portátil, visto que a captura de imagem e a obtenção de medidas podem ser facilmente realizadas por meio de smartphones no futuro.

Referências

- ANDRADE, F. I. de et al. Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by tlc and ion-pair hplc. *Food chemistry*, Elsevier, v. 157, p. 193–198, 2014. Citado na página 20.
- ANVISA. *Informe Técnico nº 30*. 2007. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/alimentos/informes/copy_of_30de2007>. Acesso em: abril de 2023. Citado na página 17.
- BRITO, A. K. de B. et al. Corantes artificiais permitidos no brasil: principais características e efeitos toxicológicos. Citado 3 vezes nas páginas 16, 18 e 20.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. In: *Fundamentos de cromatografia*. [S.l.: s.n.], 2006. p. 453–453. Citado 3 vezes nas páginas 20, 21 e 22.
- CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 20, n. 2, 2002. Citado na página 14.
- FEITOSA, L. C. A. Estimativa de ingestão do corante artificial amarelo crepúsculo e quantificação em alimentos consumidos pela população brasileira. 2016. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 19.
- FIRDAUS, M. L. et al. Determination of chromium and iron using digital image-based colorimetry. *Procedia Environmental Sciences*, Elsevier, v. 20, p. 298–304, 2014. Citado na página 23.
- FRANCISCON, H. O uso da cromatografia de papel como ferramenta investigativa das. Citado na página 22.
- GIAIO, E. da N. et al. Digital image-based titrations. *Analytica Chimica Acta*, Elsevier, v. 570, n. 2, p. 283–290, 2006. Citado na página 23.
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. Digital image processing. upper saddle river. *J.: Prentice Hall*, 2002. Citado na página 22.
- KUCHARSKA, M.; GRABKA, J. A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. *Talanta*, Elsevier, v. 80, n. 3, p. 1045–1051, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 14 e 35.
- MACHADO, T. R. Um novo método alternativo para análises quantitativas por cromatografia planar usando detecção por imagens digitais. 2019. Citado 4 vezes nas páginas 9, 21, 22 e 23.
- MARKOW, P. G. The ideal solvent for paper chromatography of food dyes. *Journal of Chemical Education*, ACS Publications, v. 65, n. 10, p. 899, 1988. Citado na página 33.
- MARQUES-RAMOS, A. Workshop de pipetagem. 2019. Citado na página 36.

- MEDICINE, N. L. of. *PubChem*. 2005. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: setembro de 2023. Citado 2 vezes nas páginas 9 e 18.
- NETO, G. F. da S.; RODRIGUES, M. L. de A.; FONSECA, A. A new quantitative gel electrophoresis method with image-based detection for the determination of food dyes and metallic ions. *Talanta*, Elsevier, v. 221, p. 121602, 2021. Citado na página 28.
- OLIVEIRA, G. A.; SILVA, F. C. Cromatografia em papel: reflexão sobre uma atividade experimental para discussão do conceito de polaridade. *Química nova na escola, São Paulo*, v. 39, n. 2, p. 162–169, 2017. Citado na página 22.
- OLIVEIRA, G. K. d. Determinação e avaliação da concentração de ânions por cromatografia líquida de alta eficiência com pareamento iônico em águas superficiais. 2012. Citado na página 20.
- PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. *Biológico, São Paulo*, v. 64, n. 2, p. 227–229, 2002. Citado na página 21.
- PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v. 14, n. 2, p. 237–250, 2003. Citado 4 vezes nas páginas 14, 17, 18 e 19.
- PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Contents of synthetic dyes in foods determined by high performance liquid chromatography. *Química Nova, SciELO Brasil*, v. 30, p. 268–273, 2007. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 18.
- REILE, C. G. et al. Qualitative and quantitative analysis based on digital images to determine the adulteration of ketchup samples with sudan i dye. *Food chemistry, Elsevier*, v. 328, p. 127101, 2020. Citado na página 23.
- ROCHA, J. A.; ROYO, V. D. A.; MENEZES, E. V. Produção de biodiesel e análise de cromatografia em papel no ensino de química orgânica. *Periódico Tchê Química*, v. 13, n. 26, 2016. Citado na página 22.
- SÁ, F. P. de et al. Fotodescoloração dos corantes alimentícios vermelho eritrosina e azul brilhante por fotólise direta. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 7, p. 46707–46718, 2020. Citado 2 vezes nas páginas 9 e 18.
- SACHS, J. Digital image basics. *Digital Light & Color*, v. 1996, 1999. Citado 3 vezes nas páginas 9, 23 e 24.
- SANTOS, N. S.; SILVA, F. L. A. T. da; NETA, M. T. S. L. Corantes naturais: importância e fontes de obtenção. *RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN 2675-6218*, v. 3, n. 3, p. e331165–e331165, 2022. Citado 2 vezes nas páginas 14 e 18.
- SCIENTIFIC, F. *Food Dye Chromatography*. 2016. Disponível em: <<https://www.flinnsci.com/food-dye-chromatography/dc11173/>>. Acesso em: agosto de 2023. Citado na página 33.
- SHARMA, V.; MCKONE, H. T.; MARKOW, P. G. A global perspective on the history, use, and identification of synthetic food dyes. *Journal of Chemical Education, ACS Publications*, v. 88, n. 1, p. 24–28, 2011. Citado na página 14.

- SOROURADDIN, M.-H.; SAADATI, M.; MIRABI, F. Simultaneous determination of some common food dyes in commercial products by digital image analysis. *Journal of food and drug analysis*, Elsevier, v. 23, n. 3, p. 447–452, 2015. Citado na página 35.
- SOUZA, D. M. de et al. Scott test associated with multivariate image analysis: A more selective alternative for cocaine research in forensic laboratories. *Forensic Science International*, Elsevier, v. 335, p. 111277, 2022. Citado na página 23.
- SPELLMEIER, J. G.; STÜLP, S. Avaliação da degradação e toxicidade dos corantes alimentícios eritrosina e carmim de cochonilha através de processo fotoquímico. *Revista Acta Ambiental Catarinense*, v. 6, n. 1/2, p. 65–83, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 9 e 19.
- TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (clae-fr) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Química Nova*, SciELO Brasil, v. 25, p. 616–623, 2002. Citado na página 20.
- VIDAL, M. et al. Simultaneous determination of color additives tartrazine and allura red in food products by digital image analysis. *Talanta*, Elsevier, v. 184, p. 58–64, 2018. Citado na página 23.
- VOGEL, A. *Análise quantitativa inorgânica*. [S.l.]: Livros Técnicos e Científicos: Rio de Janeiro, 1992. Citado na página 33.
- ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. *Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento*. [S.l.]: Ed. Cultura Acadêmica: São Paulo, 2016. Citado 4 vezes nas páginas 9, 16, 17 e 20.