

DETERMINAÇÃO DE 4-METILIMIDAZOL EM CORANTE CAMELO: ESTUDO COMPARATIVO DE TÉCNICA DE EXTRAÇÃO *

Walkyria H. LARA **
Mickiko Y. TAKAHASHI **

RIALAG/486

LARA, W. H. & TAKAHASHI, M. Y. — Determinação de 4-metilimidazol em corante caramelo: estudo comparativo de técnica de extração. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(2):155-159, 1979.

RESUMO: Corante caramelo obtido industrialmente pode apresentar de 50 a 700 mg/kg de 4-metilimidazol (4-MeI). O estudo e avaliação toxicológica realizados pela Comissão de Peritos de Aditivos da FAO/WHO levaram ao estabelecimento de um limite máximo admissível de 200 mg de 4-MeI por kilo de corante caramelo, na base de intensidade de cor igual a 20.000 unidades EBC (Convenção Européia de Cervejeiros). A fim de estabelecer um método para análises de controle, foram estudados dois métodos de extração. A extração em coluna de Celite com mistura clorofórmio etanol mostrou ser melhor que a extração direta da amostra em solução aquosa, a 10%, de carbonato de sódio. A cromatografia em camada delgada de Sílica-gel GF254, mistura de éter-clorofórmio-metanol (80:20:20), como solvente e revelador composto de nitrito de sódio e ácido sulfanílico permitem a identificação de até 0,2 mg de 4-meI.

DESCRITORES: 4-metilimidazol em corante caramelo, determinação; corante caramelo, determinação de 4-metilimidazol; aditivos, corante caramelo.

INTRODUÇÃO

O corante caramelo, para fins alimentícios, é um aditivo intencional empregado em vários tipos de alimentos.

Na realidade, não é um composto único e o termo se aplica a uma grande série de produtos complexos, não bem definidos, obtidos por modificação térmica de carboidratos. Industrialmente ele é obtido a partir de dextrose ou sacarose ou lactose ou amido hidrolisado, por aquecimento controlado, e em presença de pequenas quantidades de amônia ou de compostos de amônio, com ou sem outros agentes técnicos, no processo conhecido como processo amônio.

O que ocorre nessa modificação térmica tem sido investigado e se acredita que de maior importância seja a reação de aldoses

com compostos aminados (reação de Maillard) levando à formação de melanoidinas. Há evidências de várias outras reações e muita atenção tem sido dada à possibilidade de formação de compostos heterocíclicos com nitrogênio⁵.

A ocorrência de 4-metilimidazol (4-MeI) em produtos de reação de glicose e amônia levou a investigações, inclusive nos caramelos obtidos pelo processo amônia⁴.

Há reações que envolvem degradação alcalina da glicose, formando gliceraldeído e dihidroxiacetona. Gliceraldeído dá origem a formaldeído e hidroxietanaldeído pela reação reversa de aldol. Dihidroxiacetona rapidamente passa a aldeído pirúvico e poderá resultar mais formaldeído pela quebra alcalina desse aldeído. A condensação de aldeído pirúvico,

* Realizado na Seção de Aditivos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

formaldeído e amônia leva à formação de 4-metilimidazol².

As informações disponíveis revelam que o teor de 4-MeI em caramelos do processo amônia varia de 50 a 700 mg/kg, de acordo com a técnica de fabricação.

De outro lado, observações feitas em animais que apresentaram fenômenos de convulsões e histeria, após a administração de rações suplementadas com melaços, levaram a atribuir esses efeitos à presença de imidazóis ou derivados pirazínicos nas rações⁷.

A Comissão de Peritos de Aditivos da FAO/OMS durante os últimos anos tem se preocupado com o problema e, em publicação recente⁸, coloca entre as especificações de identidade e pureza do corante caramelo (processo amônio) o limite de 200 mg de 4-MeI por kg de corante caramelo. Como a intensidade de cor é variável, o cálculo é feito baseado num produto de intensidade de cor igual a 20.000 unidades EBC*, que corresponde a uma absorção de 0,076 a 610 nm de uma solução a 0,1% em célula de 1 centímetro.

Os métodos adequados para a determinação de 4-MeI foram desenvolvidos inicialmente no "Battelle's Columbus Laboratories", por WILKS *et alii*⁹. BEGG & GRIMETT¹ apresentaram um método de separação e identificação de imidazóis por cromatografia gasosa. Os métodos baseiam-se na extração do 4-MeI e determinação por cromatografia em camada delgada ou cromatografia gasosa. Há diferenças na extração e purificação. Em um deles, a extração é feita em funil de separação, sem a purificação em coluna, com uma mistura de clorofórmio. O extrato obtido é tratado com H₂SO₄ 0,05 N e posteriormente concentrado. O outro método é o da extração em coluna de Celite. A eluição é feita com mistura clorofórmio-etanol e depois tratamento com H₂SO₄ 0,05 N e posterior concentração.

Com a finalidade de estabelecer método de análise a ser empregado na Seção de Aditivos do Instituto Adolfo Lutz, fizemos um estudo comparativo dos resultados obtidos por aqueles dois métodos de extração.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Amostras de corante caramelo obtidas pelo processo amônio a partir do xarope de glicose, recebidas para análise prévia no I.A.L.

* European Brewer Convention.

Equipamento

Colunas cromatográficas de 25 x 250 mm, com torneira de teflon

Placas para cromatografia em camada delgada

Evaporador rotatório a pressão reduzida

Reagentes

Celite 545

Sílica Gel GF 254

Lã de vidro

NaOH 2N

Nitrito de sódio a 0,5%

Ácido sulfanílico a 0,5% em ácido clorídrico a 2%

Éter-clorofórmio-metanol (80:20:20) v/v

Clorofórmio-etanol (80:20) v/v

Cloreto de metileno

Ácido sulfúrico 0,05 N

Bicarbonato de sódio a 8%

Carbonato de sódio a 20%

Soluções-padrões de 4-metilimidazol

Preparar uma solução estoque de 1000 ppm de 4-MeI em H₂SO₄ 0,1 N. Manter essa solução em refrigerador. A partir dessa solução estoque, preparar alíquotas contendo: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800 ppm de 4-MeI.

Tratar essas soluções em Na₂CO₃ sólido até que as mesmas fiquem alcalina (pH=9) somente na hora de usar.

Preparação de placas

Preparar placas de vidro com uma mistura de uma parte de sílica gel GF 254 e duas partes de solução aquosa de bicarbonato de sódio a 8%. Secar as placas ao ar livre e colocá-las em estufa a 120°C, durante 2 horas.

Revelador

Misturar, imediatamente antes de usar, uma parte de solução de nitrito de sódio a 0,5% e uma parte de ácido sulfanílico a 0,5% em ácido clorídrico a 2%.

Procedimento

a) Extração em coluna de Celite

Colocar um tampão de lã de vidro no fundo da coluna cromatográfica. Sobre a mesma colocar uma mistura de 3 g de Celite e 2 ml de NaOH 2N. Esta deve ficar firme e uniformemente compactada. Pesar 10 g de

caramelo num béquer e adicionar 6,0 g da solução aquosa de Na_2CO_3 , a 20%, misturando bem. Adicionar 10,0 g de Celite, homogeneizando bem. Colocar todo o conteúdo sobre o empacotamento da coluna. Limpar o béquer com um grama de Celite e transferir para a coluna. Colocar um tampão de lã de vidro no topo da coluna. (A coluna deve estar firmemente compactada, sem rachaduras).

Eluir a coluna com a mistura clorofórmio-etanol, com uma vazão de aproximadamente 5 ml/min. até obter 125 ml do eluído. Se necessário, usar vácuo nessa operação. Transferir o eluído para um funil de separação de 125 ml e extrair com 25 ml de H_2SO_4 0,05 N e depois com mais 10 ml.

Transferir os extratos obtidos para o frasco do evaporador rotatório e concentrar até 5 ml aproximadamente. Controlar a temperatura do banho para que não exceda de 55°C. A parte final da concentração deve ser cuidadosamente controlada a fim de que não haja carbonização. Transferir o concentrado para um balão volumétrico de 10 ml, lavando o frasco com várias porções de 1 ml de água destilada e completar o volume.

b) Extração em funil de separação

Pesar 10 g da amostra em um béquer, diluir com 10 g de solução aquosa, a 10%, de carbonato de sódio e transferir para um funil de separação de 250 ml. Adicionar 200 ml de clorofórmio-etanol (80:20) v/v. Agitar enérgica e cuidadosamente o funil durante 1 minuto. Deixar decantar durante 15 minutos para separar as camadas. Transferir a camada inferior para um frasco Erlenmeyer de 500 ml, com tampa, e adicionar 20 g de K_2CO_3 , fechando hermeticamente.

Fazer uma segunda extração da camada aquosa do funil de separação com uma porção de 100 ml de clorofórmio-etanol (80:20) e reunir ao extrato anterior. Agitar vigorosamente, durante 10 minutos.

Filtrar em filtro rápido e lavar o resíduo 4 ou 5 vezes com pequenas porções de cloreto de metileno reunindo as soluções de lavagens com o filtrado de modo a obter um volume final de 250 ml. Transferir para um funil de separação e

extrair com 25 ml de H_2SO_4 0,05 N e depois com mais 10 ml.

Reunir os extratos obtidos no frasco do evaporador rotatório e concentrar para aproximadamente 5 ml, com os mesmos cuidados que os descritos em a.

c) Cromatografia em camada delgada

Na hora de aplicar sobre a placa, tratar a solução obtida em a ou b com pequenas porções de Na_2CO_3 sólido até que não dê mais efervescência e a solução esteja alcalina (pH=9). Aplicar sobre a placa 2 microlitros da solução da amostra e 2 microlitros das soluções padrões de 4-MeI, contendo 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800 ppm. Desenvolver o cromatograma com a mistura éter-clorofórmio-metanol até que o solvente tenha percorrido aproximadamente 15 cm.

Retirar a placa, secar a temperatura ambiente e vaporizar com o revelador. Comparar a intensidade da cor da mancha amarelo-alaranjada obtida com as manchas dos padrões de concentração conhecida. As manchas permanecem estáveis por 30 min., clareando em seguida.

RESULTADOS

Foram feitas as determinações de 4-MeI pelos dois processos em nove amostras, cujas determinações usuais estão reunidas na tabela 1.

Os resultados para a determinação de 4-MeI estão reunidos na tabela 2. Esses resultados estão dentro do limite máximo admissível pela legislação em vigor no Brasil².

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Na cromatografia em camada delgada observou-se que os extratos obtidos no procedimento b apresentam numerosas manchas interferentes, o que explica os resultados maiores das amostras 1, 5, 6, 7 e 8.

Pelo fato de o método ser de menor precisão, recomendamos a adoção do método com coluna de celite.

TABELA 1

Determinações usuais em amostras de corante caramelo

Amostra	Cor UEBC *	pH eletrométrico	Densidade	Substâncias Voláteis a 105°C % p/p	Cinzas insolúveis em água % p/p	Alcalinidade das cinzas sol. em NaOH % p/p	P ₂ O ₅ % p/p	As ppm	Pb ppm	Cu ppm
1	18.750	2,95	1,350	37,26	0,23	0,010	0,0019	0,0	0,0	1,6
2	18.750	2,90	1,350	38,30	0,12	0,067	0,0008	0,0	0,0	1,3
3	18.750	2,90	1,349	37,41	1,03	0,032	0,0003	0,0	0,0	2,0
4	18.750	3,10	1,356	36,53	0,33	0,014	0,0007	0,0	0,0	3,5
5	32.500	4,90	1,352	34,06	0,02	0,006	0,0000	0,0	0,0	0,0
6	18.750	2,90	1,351	27,04	1,52	0,015	0,0007	0,0	0,0	0,0
7	32.500	4,85	1,362	33,72	0,06	0,004	0,0000	0,0	0,0	0,0
8	32.500	4,90	1,363	32,94	0,00	0,005	0,0001	0,0	0,0	0,0
9	21.250	3,50	1,310	34,13	0,02	0,013	0,0000	0,0	0,0	0,0

* Unidades EBC de cor.

TABELA 2

Determinação de 4-MeI em corante caramelo

Amostras	Processo de extração em coluna ppm	Processo de extração em funil de separação ppm
1	53	128
2	106	96
3	106	106
4	106	106
5	123	153
6	160	106
7	184	246
8	184	246
9	141	141

RIALA6/486

LARA, W. H. & TAKAHASHI, M. Y. — Comparative study of methods for extraction of methylimidazole in caramel dye samples. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(2):155-159, 1979.

SUMMARY: Methods for the control of 4-methylimidazole (4-MeI) in industrial samples of caramel colour were studied. FAO/WHO established a maximum content of 200 mg of 4-MeI per kg of caramel dye, under a color intensity of 20.000 EBC units. Extraction in Celite column with chloroform-ethanol mixture was found to be better than direct extraction from the sample with 10% sodium carbonate solution. Thin-layer chromatography with silica gel GF-254, ether-chloroform-metanol (80:20:20) as solvent, and sodium nitrite and sulphanylic acid solutions as spray, allowed detection until 0.2 mg of 4-methylimidazole.

DESCRIPTORS: 4-methylimidazole in caramel dye, determination; caramel dye, determination of 4-dethylimidazole; food additives, caramel dye.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEGG, C. G. & GRIMETT, M. R. — The separation and identification of imidazoles by gas-liquid and thin-layer chromatography. *J. Chromat.*, 73:238-42, 1972.
2. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução n.º 11/78. *Diário Oficial*, Brasília, 4 jul. 1978. Seção 1, pt. 1, p. 10269. Modifica o item 2.5 da Resolução n.º 44/77 do Decreto-Lei n.º 986 de 21 out. 1969.
3. CARNEVALE, J. — An improved method for the determination of 4-methylimidazole in caramel. *Fd Technol.*, Aust., 27(4): 165-6, 1975.
4. EVANS, J. G.; BUTTERWORTH, K. R.; GAUNT, I. F. & GRASSO, P. — Long-term toxicity study in the rat on a caramel produced by the open-half closed pan ammonia process. *Fd. cosmet. Toxicol.*, 15:523-31, 1977.
5. GAUNT, I. F.; LLOYD, A. G.; GRASSO, P.; GANDOLLI, S. D. & BUTTERWORTH, K. R. — Short-term study in the rat on two caramels produced by variations of the ammonia process. *Fd. cosmet. Toxicol.*, 15:509-521, 1977.
6. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. Rome, 1974. *Specifications for the identity and purity of some food colours flavour enhancers, and certain food additives*. 18th report. Geneva, WHO, 1976. p. 35. (WHO food additives series n.º 7)
7. NISHIE, K.; WAISS, A. C. & KEYL, A. C. — Toxicity of methylimidazoles. *Toxic. appl. Pharmac.*, 14:301-7, 1969.
8. WILKS, R. A.; SHINLER, A. J. & THURMAN, L. S. — The isolation of 4-methylimidazole from caramel color and its determination by thin-layer and gas-liquid chromatography *J. Chromat.*, 87:411-8, 1973.

Recebido para publicação em 23 de março de 1979

