

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA SIMULTÂNEA DE CORANTE AMARELO TARTRAZINA E AMARELO CREPÚSCULO VIA REGRESSÃO POR COMPONENTES PRINCIPAIS

SIMULTANEOUS SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF TARTRAZINE AND SUNSET YELLOW VIA PRINCIPAL COMPONENT REGRESSION

Mara Eliza dos Santos¹, Noemi Nagata²

¹ Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Departamento de Engenharia de Alimentos, Campus em Uvaranas, Ponta Grossa, PR

² Autor para contato: Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Departamento de Química, Campus em Uvaranas, Ponta Grossa, PR, Brasil; (42) 3220-3062; e-mail: noeminagata@uepg.br

Recebido para publicação em 04/10/2004

Aceito para publicação em 22/11/2004

RESUMO

A indústria alimentícia utiliza amplamente corantes para conferir, restaurar ou intensificar a cor dos alimentos e para garantir a eles um aspecto padronizado frente aos consumidores, que usualmente associam a cor à qualidade do alimento. Em função desses aspectos, e do potencial toxicológico que alguns corantes podem apresentar, o controle de qualidade desses compostos é de fundamental importância. Muitos métodos analíticos podem ser empregados. Dentre os mais usuais destacam-se os métodos cromatográficos e espectrofotométricos. A espectroscopia UV-Vis apresenta alta sensibilidade, baixo custo e simplicidade operacional, mas sua baixa seletividade tem feito com que vários pesquisadores busquem processos matemáticos para resolver os constantes problemas de interferência espectral. Neste trabalho foi estudado o potencial da metodologia matemática multivariada de Regressão por Componentes Principais (PCR) na determinação espectrofotométrica simultânea de dois corantes alimentícios: amarelo crepúsculo e tartrazina. Um conjunto de calibração contendo o espectro de 29 misturas sintéticas na faixa de concentração de 1,0 mg/L a 16,0 mg/L para amarelo crepúsculo e de 2,0 mg/L a 22,0 mg/L para amarelo tartrazina foram processados no programa PLS-Toolbox 1.5, operado em ambiente MATLAB empregando-se procedimento de validação cruzada. O modelo PCR otimizado necessitou de 02 componentes principais responsáveis pela explicação de 99,15% da variância dos dados. Cinco soluções com concentrações conhecidas e contendo a mistura dos corantes estudados foram utilizadas para validar o modelo construído. O erro relativo médio na determinação do amarelo crepúsculo e da tartrazina foi de 1,75 e 4,37% respectivamente.

Palavras-chave: calibração multivariada, PCR, corantes sintéticos, espectrofotometria UV-Vis

ABSTRACT

Synthetic food dyes are usually added to food to give or enhance the desired esthetic quality of industrialized products. This aspect, as well as the toxicological evidence of these compounds justify the quality control and the development of methodologies to quantify these additives. A large variety of analytical methodologies can be employed, for example chromatographic and spectrophotometric methods. UV-Vis spectroscopy presents high sensibility, low cost and operational simplicity, but its low selectivity has asked for the development of mathematical processes to resolve the spectral interference problems. In this work, the potential multivariate methodology of Principal Component Regression (PCR) was studied in the simultaneous spectrophotometric determination of two food colorants: Tartrazine and Sunset Yellow. The calibration model was based on the absorption spectral for a set of 29 different mixtures containing the colorants with concentrations varying between 1.0 mg/L and 16.0 mg/L of Sunset Yellow and 2.0 mg/L and 22.0 mg/L of Tartrazine. The PCR model was optimized by the use of a cross validation process, and needed 2 principal components to explain 99.15% of variance data. The prevision capacity of this model was verified by the use of 5 synthetic samples (external validation). The typical relative errors observed in the analyses of Sunset Yellow and Tartrazine were 1.75% and 4.37 %, respectively.

Key words: multivariate calibration, PCR, synthetic colorants, UV-Vis spectrophotometry

Introdução

A prática da coloração dos produtos alimentícios remonta aos tempos mais antigos. Até meados do século XIX, os únicos corantes disponíveis eram de origem animal, vegetal ou mineral e nessa mesma época os pigmentos naturais foram progressivamente sendo substituídos por corantes sintéticos, submetidos às disposições legais próprias de cada país.

Os corantes, sejam naturais ou sintéticos, estão presentes na quase totalidades dos alimentos que chegam à mesa. Isso é decorrente da cor ser uma das primeiras qualidades sensoriais pela qual os alimentos são julgados (Berzas Nevado *et al.*, 1995). Mais importante que este fato é a associação que o consumidor faz entre qualidade, sabor e estado de conservação, com a cor do alimento (Mascrenhas *et al.*, 1999). De acordo com Queija *et al.* (2001), a cor é tão fundamental, que é capaz de aumentar o prazer de consumir um determinado alimento.

Os corantes também são utilizados para confe-

rir, restaurar ou intensificar a cor dos alimentos (ANVISA, 1977 e Berzas *et al.*, 1999), de tal modo que haja garantia de que os produtos industrializados tenham uma aparência próxima à do produto natural, um aspecto padronizado e seu número e variedade possam ser aumentados.

Em função da sua incontestável importância, o uso de corantes como aditivos alimentícios tem sido amplo na indústria de processamento de sucos, balas, guloseimas, gelatinas, refrigerantes, laticínios (Kapor *et al.*, 2001).

Recentemente, os aditivos alimentícios têm despertado o interesse dos pesquisadores não somente pelas suas características benéficas ao processamento e venda de um determinado produto, mas também pelo seu potencial tóxico, podendo ocasionar desde alergias a câncer (Gennaro *et al.*, 1994). Estudos demonstram que as evidências toxicológicas para corantes sintéticos são consideravelmente maiores que para corantes naturais, devido a sua complexidade química (Berzas *et al.*, 1999). Por esse motivo, os aditivos

utilizados na alimentação devem estar sujeitos a um controle rigoroso para provar sua inocuidade.

A Tabela 1 apresenta alguns corantes alimentí-

cios sintéticos com seus respectivos códigos E, FD&C (Federal Food, Drug and Cosmetic Act) e INS (International Numbering System), e a Dose Diária Admitida (DDA).

Tabela 1 - Lista de corantes alimentícios sintéticos.

Código	Nome/Cor	DDA*
E102; FD&C yellow nº5; INS 102	Tartrazina / Amarela	0-7,5
E104	Amarelo de Quinolina	0-0,75
E110; FD&C yellow nº6; INS 110	Amarelo Crepúsculo FCF	0-2,5
E122; INS 122	Vermelho Azorubina	0-2,0
E123; FD&C red nº 2	Vermelho Amaranto	0-0,5
E124; INS 124	Vermelho de Ponceau 4R	0-0,125
E127; FD&C Red nº 3	Eritrosina / Vermelho	0-2,5
E129; FD&C Red nº 40; INS 129	Allura Red / Vermelho Allura	0-7
E131	Azul Patente V	0-2,5
E132; FD&C Blue nº 2; INS 132	Índigo Carmim / Azul	0-5,0
E133; FD&C Blue nº 1; INS 133	Erioglaucina Azul Brilhante FCF	0-12,5
E142; FD&C Green nº 3	Verde Ácido Brilhante FCF	0-5,0
E151	Negro Brilhante BN	0-0,75

* mg/Kg de peso corporal

O controle de qualidade e/ou toxicológico dos corantes tem sido usualmente realizado por métodos cromatográficos ou espectrofotométricos (Kapoor *et al.*,

2001), mas outros métodos menos usuais também podem ser utilizados, conforme pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2- Metodologias usuais na análise de corantes alimentícios.

Método	Autores	Amostras	Corantes
Métodos Cromatográficos (HPLC)	Gennaro <i>et al.</i> , (1997)	Açúcares usados em confeitaria	E122, E123, E124
	Bailey Jr. e Travis (1985)	Pureza do corante comercial	E132
Eletroforese Capilar	Pérez-Urquiza e Beltrán, (2000)	Bebidas, geléias e xaropes	E102, E110, E123, E124, E131, E129
	Del Giovine e Bocca (2003)	Sorvetes	E110, E122, E124
	Huang <i>et al.</i> , (2003)	Refrigerantes, leites e geléias	E133, E129, E132 e ácido carmínico
Métodos Eletroanalíticos • Voltametria • Polarografia	Kapor <i>et al.</i> , (2001)	Suco artificial em pó e balas	E132, E102
	Combeau <i>et al.</i> , (2002)	Refrigerante.	E122, E129, E124
Métodos Espectrofotométricos	Zeng <i>et al.</i> , (1993)	Balas, geléias e refrigerantes	E123, E124, E102, E110, E132, E133
	Berzas Nevado <i>et al.</i> , (1995)	Gelatinas e Bebidas	E123, E124, E120
	Ni <i>et al.</i> , (2001)	Balas e Bebidas	E102, E110, E124
	Altinöz e Toptan, (2002)	Alimentos com sacarose e ácido cítrico	E102, E124

No caso dos métodos cromatográficos, características como alto custo e envolvimento de várias etapas de extração dificultam a obtenção de uma análise rápida. Já os métodos espectrofotométricos, embora mais acessíveis, apresentam limitada seletividade.

A deficiência de seletividade do método espectrofotométrico, decorrente das interferências espectrais que resultam em faixas de absorção amplamente sobrepostas (Peralta-Zamora *et al.*, 1998), pode ser contornada com a utilização de métodos de calibração multivariada através da obtenção de um modelo matemático (Ferreira *et al.*, 1999 e Beebe;

Kowalski, 1987). Esse modelo descreve a relação entre as respostas (absorbâncias) e as concentrações dos componentes das amostras (corantes), minimizando custo e tempo da análise.

A base da calibração multivariada é estabelecer uma relação entre duas matrizes ou blocos de dados químicos, quando houver uma dependência entre as propriedades que descreve cada uma delas. A calibração multivariada consiste basicamente de duas fases: a calibração e a previsão. Quando o estudo é espectroscópico, na fase de calibração, “n” espectros para um conjunto de amostras com composição co-

nhcedida são obtidos em “p” valores de comprimento de onda diferentes, formando uma matriz **X**, com “n” linhas e “p” colunas. Também uma matriz **Y** pode ser formada, contendo “n” linhas, com os valores de concentração correspondendo às diferentes amostras, “q” colunas, indicando o número de diferentes analitos presentes nas amostras. O próximo passo é desenvolver um modelo matemático apropriado (determinando o vetor dos coeficientes de regressão – **b**), que melhor possa reproduzir **Ycal**, a partir dos dados da matriz **Xcal** (Eq.01). Esse modelo é utilizado na fase de previsão (com um conjunto teste), para estimar as concentrações (**Yprev**) dos constituintes de novas amostras, a partir de seus espectros (**Xteste**) (Eq.02).

Como essas metodologias trabalham com matrizes de dados, o processo de isolar o fator **Y** da Eq.01 para obtenção da Eq.02 implica na utilização da matriz transposta de **X**, ou seja, (**Xteste**)^t.

$$\mathbf{Xcal} = \mathbf{b} * \mathbf{Ycal} \quad (1)$$

$$\mathbf{Yteste} = (\mathbf{Xteste})^t * \mathbf{b} \quad (2)$$

Os dados para a calibração multivariada podem ser organizados conforme demonstrado na Figura 1. Os valores de absorbância (ABS) dos espectros, a cada valor de comprimento de onda (nm), são as variáveis independentes, e as concentrações dos analitos nas amostras, as variáveis dependentes (Nagata *et al.*, 2001).

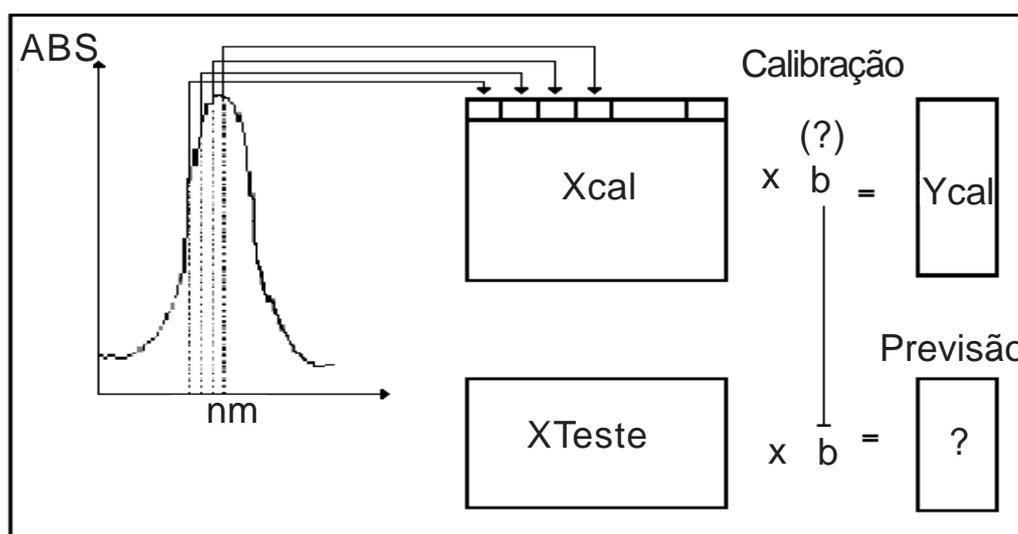


Figura 1 - Organização dos dados para a modelagem por calibração multivariada.

A aplicação dessas metodologias multivariadas em corantes de interesse da indústria alimentícia também tem se mostrado propícia, conforme foi evidenciado por diversos autores (Lopez-de-Alba *et al.*, 1996; Berzas Nevado *et al.*, 1999; Berzas *et al.*, 1999 e Ni; Gong, 1997).

Em função da importância dos problemas encontrados no controle de qualidade desses compostos e dos aspectos positivos descritos em estudos similares, este trabalho tem por objetivo desenvolver uma metodologia rápida e de baixo custo para análise de dois corantes sintéticos amplamente utilizados pela indústria alimentícia: amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina. O método proposto utiliza a técnica de espectrofotometria UV-Vis acoplado à Regressão por

Componentes Principais (PCR).

Material e métodos

Reagentes e Soluções

Os padrões de corantes sintéticos foram gentilmente cedidos pela Kerry do Brasil, Ltda e Allimentus Engenharia & Tecnologia Ltda.

As soluções-estoque dos corantes Amarelo Tartrazina e Amarelo Crepúsculo foram preparadas pela pesagem do padrão em balança analítica e posterior dissolução e diluição com água destilada, para obtenção de soluções contendo 1000 mg L⁻¹.

A partir das soluções-estoque; foram prepara-

das por diluição com água destilada, as soluções-trabalho contendo as misturas dos corantes de interesse.

Instrumentação

As medidas espectrofotométricas foram realizadas empregando-se uma cubeta de quartzo e num espectrofotômetro UV-VIS SCINCO (modelo S1150). Os dados espectrais registrados na faixa de 200-800 nm, com resolução de 1 nm, foram inicialmente transformados em ASCII e processados em um microcomputador Pentium dotado do programa PLS-Toolbox 1.5, operado em ambiente MATLAB for Windows versão 4.0.

Resultados e discussão

A metodologia de calibração multivariada foi

conduzida via processos de Regressão por Componentes Principais (PCR). A etapa de calibração envolveu o desenvolvimento de um modelo a partir dos espectros UV-Vis de 29 misturas sintéticas dos corantes Amarelo Tartrazina e Amarelo Crepúsculo com suas respectivas concentrações. A faixa de concentração estudada variou entre 1,0 e 16,0 mg/L para o Crepúsculo e entre 2,0 e 22,0 mg/L para o Tartrazina.

A Figura 2 apresenta o conjunto de espectros UV-Vis obtidos a partir das 29 soluções padrão dos corantes estudados. A faixa utilizada para o processamento dos dados compreende a região entre 340-600 nm. Em função da baixa seletividade da técnica UV-Vis, é possível observar uma alta interferência espectral na região do visível entre os dois corantes alimentícios (Crepúsculo com absorção máxima em $\lambda=480$ nm e Tartrazina com absorção máxima em $\lambda=428$ nm).

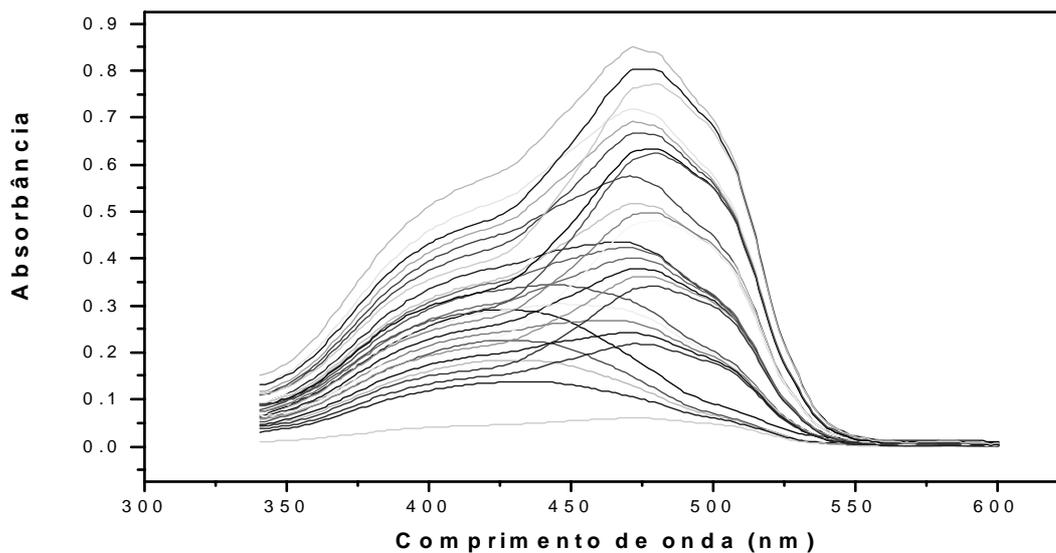


Figura 2- Espectros de absorção das 29 misturas sintéticas dos corantes Amarelo Tartrazina e Crepúsculo na região entre 340-600 nm.

O modelo PCR foi otimizado, utilizando-se dados espectrais na sua forma original, centrados na média e procedimento de validação cruzada. Neste último procedimento, a calibração pode ser repetida n vezes (n = número de amostras), sendo que em cada oportunidade, uma das amostras do conjunto de calibração é retirada e utilizada como amostra de pre-

visão. Uma vez que todas as amostras tenham sido tratadas como objetos de previsão, é possível estimar a Soma dos Quadrados dos Erros de Previsão (PRESS), dada pela Eq. 3 e escolher o número de componentes principais necessários para obtenção do menor PRESS.

$$\text{PRESS} = \sum (C_{\text{REAL}} - C_{\text{PREVISTA}})^2 \quad (3)$$

A Figura 3 mostra que, a partir do procedimento de validação cruzada, foi possível minimizar o PRESS e também a dimensionalidade dos dados para

02 componentes principais, sem perder informação analítica relevante (explicação de 99,15% da variância dos dados).

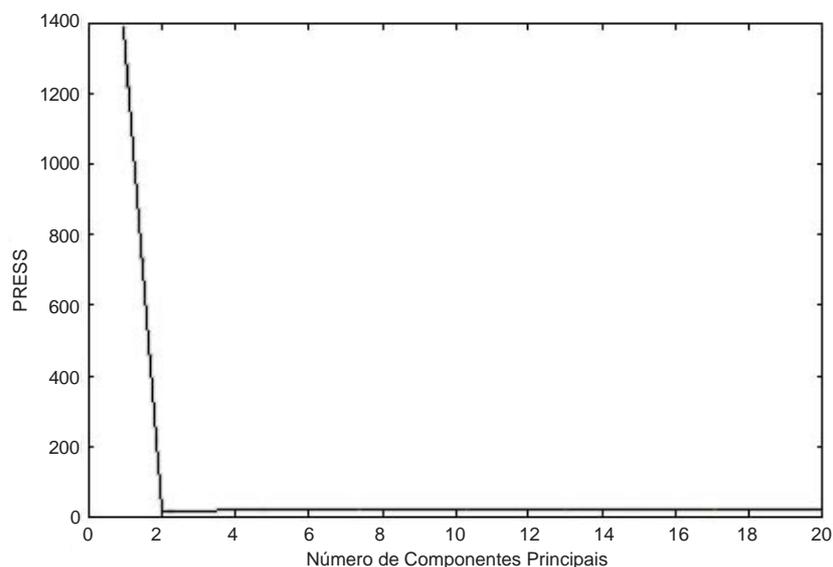


Figura 3- PRESS em função do número de componentes principais, para o modelo PCR na análise dos corantes.

Esse modelo otimizado apresentou altos coeficientes de regressão em variáveis em que são muito similares as bandas de absorção dos corantes estudados (Figura 4). Esse gráfico expressa a importância que cada variável estudada tem para a construção do modelo de calibração. É possível observar que o primeiro componente principal construída possui influên-

cia positiva na região de absorção máxima do corante amarelo tartrazina, passando a ter uma influência negativa na região referente à absorção máxima do corante amarelo crepúsculo. No caso do segundo componente principal, influências significativas (positivas) são observáveis basicamente na região de absorção máxima do corante amarelo crepúsculo.

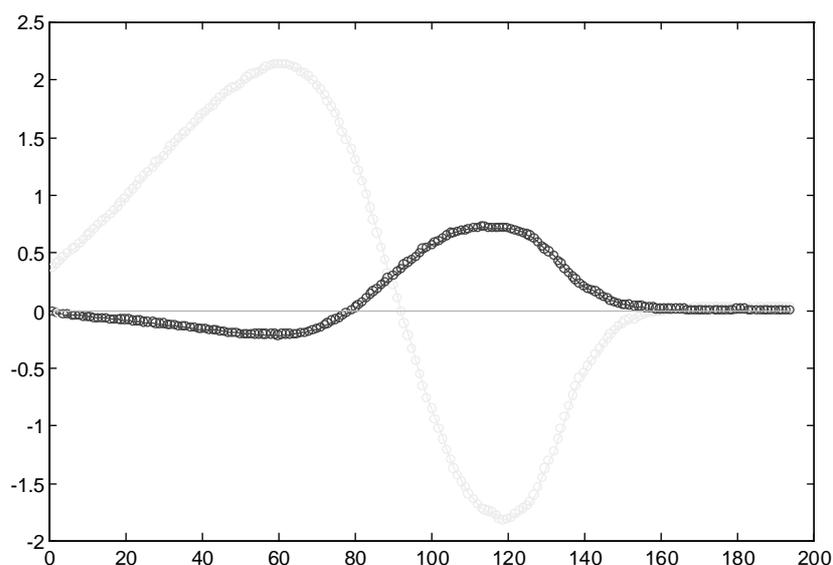


Figura 4- Coeficientes de regressão do modelo PCR para a análise dos corantes.

A Figura 5 mostra que as concentrações previstas pelo modelo são muito próximas às concentrações reais dos padrões de calibração. Não foi constatada a presença de amostras anômalas, e todos os padrões

utilizados apresentaram-se dentro dos limites aceitáveis de *resíduos studentizados* e *leverage* (medida de influência de uma amostra no modelo de regressão).

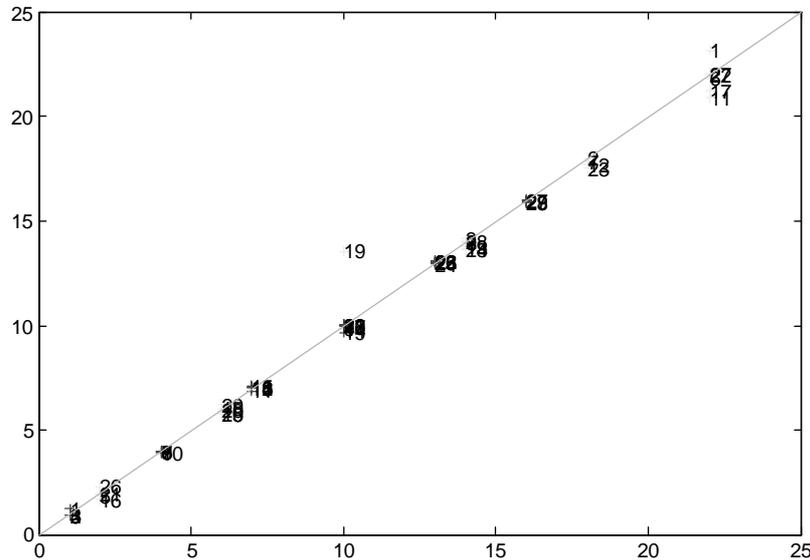


Figura 5 - Valores reais vs valores previstos pelo modelo otimizado PCR para análise dos corantes.

Esse modelo PCR otimizado simultaneamente para os corantes de interesse foi validado, empregando-se 05 misturas sintéticas de concentrações diferentes daquelas utilizadas na fase de calibração. A

Tabela 3 apresenta os resultados e erros relativos na análise dos corantes Amarelo Tartrazina e Crepúsculo, através da aplicação do modelo descrito anteriormente.

Tabela 3 - Resultados de previsão para o conjunto de validação externa contendo a mistura de Amarelo Tartrazina e Amarelo Crepúsculo.

Amarelo Tartrazina			Amarelo Crepúsculo		
Concentração real (mg L ⁻¹)	Previsão (mg L ⁻¹)	Erro relativo (%)	Concentração real (mg L ⁻¹)	Previsão (mg L ⁻¹)	Erro relativo (%)
6.0	5.93	-1.17	1.0	0.92	-8.00
2.0	1.68	-16.0	4.0	3.97	-0.75
18.0	17.5	-2.78	10.0	10.0	0.0
10.0	9.81	-1.90	13.0	13.0	0.0
18.0	18.0	0.0	16.0	16.0	0.0
Média do erro relativo		-4.37	Média do erro relativo		-1.75

O conjunto de validação externa mostrou que o modelo construído apresenta menor exatidão na análise de Tartrazina quando comparada à de Crepúsculo. Fatores que justificariam tal comportamento estão relacionados às influências de absorção (positivas e/ou negativas) evidenciadas no gráfico dos coeficientes de regressão (Figura 4), e as diferenças na absorvidade molar dos compostos estudados (a análise de amarelo crepúsculo apresenta maior sensibilidade que o corante tartrazina).

Embora os erros relativos sejam pequenos, outro aspecto que merece destaque está relacionado à tendência do modelo PCR prever concentrações de Tartrazina menores que os valores reais. A possibilidade de um erro determinado está descartada, uma vez que tanto o conjunto de calibração quanto o conjunto de validação foram construídos a partir das mesmas soluções estoque e sob as mesmas condições, impossibilitando que apenas as amostras do conjunto de validação estivessem comprometidas com a inserção de erro. Isto indica que o modelo multivariado não consegue compensar totalmente as influências que o corante Crepúsculo tem sobre o Tartrazina.

Conclusão

O método proposto apresentou resultados satisfatórios para os dois corantes estudados. O erro relativo médio na determinação do amarelo crepúsculo foi de -1,75% e para o amarelo tartrazina foi de -4,37%. De acordo com este estudo, o método de Regressão por Componentes Principais (PCR) aplicado à determinação de misturas binárias desses corantes apresenta grande potencial na determinação simultânea desses aditivos em amostras de alimentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à UEPG pela infra-estrutura, à CAPES, pela bolsa de mestrado concedida e à Fundação Araucária, pelo financiamento do projeto (Chamada 04/2001, Protocolo 1017).

REFERÊNCIAS

- 1 ALTINÖZ, S.; TOPTAN, S. Determination of Tartrazine and Ponceau-4R in Various Food Samples by Vierordt's Method and Ratio Spectra First-Order Derivative UV Spectrophotometry. **Journal of food composition and analysis**, v. 15, p.667-683, 2002.
- 2 ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/44_77.htm. Acesso em: 22 agosto 2003.
- 3 BAILEY Jr., J. E.; TRAVIS, J. Synthesis and Purification of Trisulphoindigo and Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Determination of Trisulphoindigo in FD & C Blue No. 2. **Dyes and Pigments**, v.6, p.135-154, 1985.
- 4 BEEBE, K. R.; KOWALSKI, B.R. An Introduction to Multivariate Calibration and Analysis. **Analytical Chemistry**, v.59, n.17, p.1007-1017, set. 1987.
- 5 BERZAS, J.J.; RODRÍGUES FLORES, J.; VILLASEÑOR LLERENA, M.J.; RODRÍGUEZ FARIÑAS, N. Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of Tartrazine, Patent Blue V and Indigo Carmine in commercial products. **Analytica Chimica Acta**, v.391, p. 353-364, 1999.
- 6 BERZAS NEVADO, J.J.; RODRÍGUES FLORES, J.; VILLASEÑOR LLERENA, M.J.; RODRÍGUEZ FARIÑAS, N. Simultaneous spectrophotometric determination of tartrazine, patent blue V, and indigo carmine in commercial products by partial least squares and principal component regression methods. **Talanta**, v.48, p.895-903, 1999.
- 7 BERZAS NEVADO, J.J.; GUIBERTEAU CABANILLAS, C.; CONTENTO SALCEDO, A.M. Simultaneous spectrophotometric determination of three food dyes by using the first derivative of ratio spectra. **Talanta**, v.42, p.2043-2051, 1995.
- 8 COMBEAU, S.; CHATELUT, M.; VITTORI, O. Identification and simultaneous determination of Azorubin, Allura red and Ponceau 4R by differential pulse polarography: application to soft drinks. **Talanta**, v.56, p.115-122, 2002.
- 9 DEL GIOVINE, L.; BOCCA, A. P. Determination of synthetic dyes in ice-cream by capillary electrophoresis. **Food Control**, v.14, p.131-135, 2003.
- 10 FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.5, p.724-731, 1999.
- 11 GENNARO, M.C.; ABRIGO, A.; CIPOLLA, G. High-performance liquid chromatography of food colours and its relevance in forensic chemistry. **Journal of Chromatography A**, v.674, p.281-299, 1994.

- 12 GENNARO, M.C.; GIOANNINI, E.; ANGELINO, S.; AIGOTTI, R.; GIACOSA, D. Identification and determination of red dyes in confectionery by ion-interaction high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.767, p.87-92, ago. 1997.
- 13 HUANG, H.Y.; CHIU, C.W.; SUE, S.L.; CHENG, C.F. Analysis of food colorants by capillary eletrophoresis with large-volume sample stacking. **Journal of Chromatography A**, v.995, p.29-36, 2003.
- 14 KAPOR, M. A.; YAMANAKA, H.; CARNEIRO, P. A.; ZANONI, M. V. B. Eletroanálise de corantes alimentícios: determinação de índigo carmim e tartrazina. **Eclética Química**, São Paulo, v.26, p.53-68, 2001.
- 15 LOPEZ-DE-ALBA, P.L.; WRÓBEL-KACZMARCZYK, K.; WRÓBEL, K.; LÓPEZ-MARTINEZ, L.; AMADOR HERNÁNDEZ, J. Spectrophotometric determination of Allura Red (R40) in soft drink powders using the universal calibration matrix for partial least squares multivariate method. **Analytica Chimica Acta**, v.330, p.19-29, 1996.
- 16 MASCRENHAS, J. M. O.; STRINGHETA, P. C.; LARA, J. L.; PINHEIRO, F. R. Preferência de cor nos alimentos entre os alunos da pós-graduação, professores funcionários da Universidade Federal de Viçosa – MG. Disponível em: <<http://www.viax.com.br/sbcn/preferencia.htm>> Acesso em 1 maio 2003.
- 17 NAGATA, N.; BUENO, M.A.M.S.; PERALTA-ZAMORA, P.G. Métodos matemáticos para correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raios-x. **Química Nova**, v.24, n.4, p.531-539, 2001.
- 18 NI, Y.; GONG, X. Simultaneous spectrophotometric determination of mixtures of food colorants. **Analytica Chimica Acta**, v.354, p.163-171, 1997.
- 19 NI, Y.; QI, M.; KOKOT, S. Simultaneous spectrophotometric determination of ternary mixtures of tartrazine, sunset yellow, and ponceau 4R by H-point standard addition method. Yongnian NI; Ming QI; Serge KOKOT. **Analytical Letters**, 34 (14) p. 2585-2596, 2001.
- 20 PERALTA-ZAMORA, P.; KUNZ, A.; NAGATA, N.; POPPI, R. J. Spectrophotometric determination of organic dye mixtures by using multivariate calibration. **Talanta**, (47) p.77-84, 1998.
- 21 PÉREZ-URQUIZA, M.; BELTRÁN, J.L. Determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.898, p.271-275, ago. 2000.
- 22 QUEIJA, C. da; QUEIRÓS, M. A.; RODRIGUES, L. M. A cor dos alimentos. **Química-Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, 80, 6-11, 2001.
- 23 ZENG, W.; WANG, P.; ZHANG, H.; TONG, S. Qualitative and quantitative analyses of synthetic pigments in foods by using the branch and bound algorithm. **Analytica Chimica Acta**, v.284, p. 445-451, 1993.