

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

**COLORANTE AZOICO E122 (AZORUBINA):
PROPRIETÀ SINTESI E TOSSICOLOGIA**

Relatore: Prof. Fernando Formaggio

Laureando: Riccardo Pertile (1216607)

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1. INTRODUZIONE	2
2. STRUTTURA CHIMICA E PROPRIETÀ	3
2.1 Proprietà ottiche	4
2.2 Analisi UV-Vis	5
2.3 Acidità	6
3. DETERMINAZIONE	6
3.1 Riduzione catodica	6
3.2 Ossidazione anodica	7
4. SINTESI	8
4.1 Diazotazione/Copulazione	8
4.2 Accoppiamento ossidativo	9
4.3 Dimerizzazione di aril azidi	10
4.4 Accoppiamento riduttivo di nitrobenzeni	10
5. TOSSICOLOGIA	11
5.1 Drosophila melanogaster	11
5.2 Allium cepa	12
5.3 Pesce zebra	12
6. INDAGINE EFSA	12
7. CONCLUSIONI	13

1.INTRODUZIONE

I coloranti azoici (azobenzeni) sono caratterizzati dalla presenza di uno, o più, doppi legami -N=N- e rappresentano la classe di coloranti organici più utilizzati in campo alimentare, farmaceutico e cosmetico. La loro regolamentazione, per quanto riguarda l'industria alimentare, è affidata all'EFSA che rappresenta l'autorità europea per la sicurezza alimentare. Infatti, uno dei compiti dell'EFSA è determinare la non nocività degli additivi indicando la dose che ogni genere alimentare può contenere^[1].

Questo elaborato si focalizzerà sullo studio del colorante azoico E122, azorubina (o carmoisina), uno dei coloranti rossi. L'impiego di questa sostanza ha generato controversie nel corso degli anni e sono stati eseguiti numerosi studi per verificare la sicurezza di questo colorante. Ad oggi le norme europee per l'E122 richiedono che la purezza, calcolata nel sale sodico, debba essere superiore all'85% mentre la rimanente porzione di materia può essere composta da NaCl, da Na₂SO₄, da sostanze coloranti sussidiarie (<2%) e da una piccola porzione di composti che derivano dalla sintesi industriale (<0.5%)^[2]; la dose giornaliera accettabile (DGA), indicata da EFSA, è pari a 4 mg/kg peso corporeo^[3].

L'assunzione di azorubina avviene prevalentemente con il consumo di bevande non alcoliche (ginger, succhi di frutta), frutta rossa confezionata, dessert e prodotti da forno, biscotti, salse e spezie (curry)^[2]. È stata stabilita la concentrazione massima di questo colorante che può essere contenuta nei vari generi alimentari, in figura 1 ne sono riportati alcuni.

Beverages	Maximum permitted level (mg/L)
Non-alcoholic flavoured drinks	50
Liquid food supplements/dietary integrators	
Americano	100
Bitter soda, bitter vino	
Spirituos beverages	
Aromatized wines, aromatized wine-based drinks and aromatized wine-product cocktails	200
Fruit wines, cider and perry	
Foodstuffs	Maximum permitted level (mg/kg)
Confectionery	
Fine bakery wares	
Edible ices	
Desserts including flavoured milk products	
Complete formulae for weight control intended to replace total daily food intake or an individual meal	50
Complete formulae and nutritional supplements for use under medical supervision	
Soups	
Flavoured processed cheese	
Fish paste and crustaceans paste	
Smoked fish	100
Savoury snack products and savoury coated nuts	
Meat and fish analogues based on vegetable proteins	
Candied fruit and vegetables, Mostarda di frutta	200
Preserves of red fruits	
Extruded or expanded savoury snack products	
Pre-cooked crustaceans	250
Mustard	
Fish roe	300
Solid food supplements/dietary integrators	
Decorations and coatings	
Sauces, seasonings, pickles, relishes, chutney and piccalilli	
Salmon substitutes	500
Surimi	

Figura 1: concentrazione massima di azorubina, dati EFSA.

2.STRUTTURA CHIMICA e PROPRIETÀ

L'azorubina (carmoisina) (figura 2) è un colorante azoico con formula bruta $C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$. Il nome IUPAC è disodio 4-idrossi-2-[(E)-(4-solfonato-1-naftil) diazenil] naftalene-1-solfonato e la sua massa molecolare vale 502.432 u.

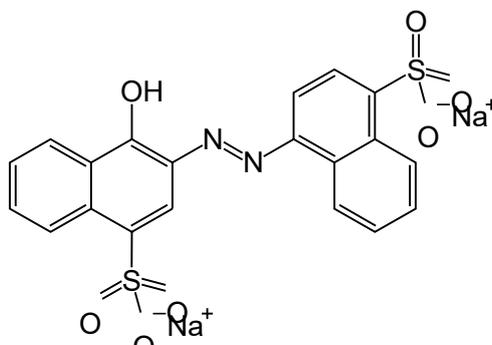


Figura 2: formula di struttura dell'azorubina (E122).

I coloranti azoici vengono classificati in base al numero di legami $-N=N-$ presenti nella molecola (monoazo, diazo, triazo...). Questo gruppo funzionale prende il nome di gruppo “azo” e la sua funzione è quella di creare un sistema delocalizzato esteso che comprende sia il gruppo funzionale stesso sia i sostituenti aromatici^[4]. Tale legame può inoltre ruotare e dare origine ad isomeri cis e trans^[5].

E122 presenta, nella struttura, due gruppi solfonati che le conferiscono una buona solubilità in acqua e le consentono di essere usata come colorante anche per liquidi^[6].

2.1 PRORPIETÀ OTTICHE

Tra le proprietà ottiche della molecola ritroviamo: l'indice di rifrazione, la suscettibilità elettrica e l'anisotropia.

In figura 3 si nota come l'indice di rifrazione del colorante aumenti con l'aumentare della concentrazione, mentre diminuisca con l'aumentare della temperatura; questa diminuzione è associata alla maggiore mobilità termica delle molecole in soluzione. Il calo dell'indice di rifrazione risulta essere accentuato in soluzioni più concentrate; ciò è spiegato dalla presenza di un numero maggiore di molecole e quindi da una maggiore varianza delle loro mobilità^[6].

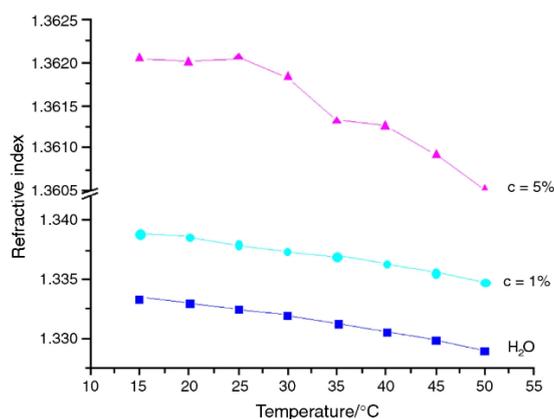


Figura 3: indice di rifrazione in funzione della temperatura per soluzioni acquose di azorubina con concentrazioni di 1% e 5% e, rispettivamente, per H₂O

Il grafico che descrive la suscettività elettrica, descritto dalla figura 4, si presenta con un andamento quasi lineare nel caso di soluzioni poco concentrate (1%), mentre per soluzioni più concentrate (5%) vi è una deviazione causata dal fatto che il sistema raggiunge una condizione di equilibrio al di sotto della temperatura ambiente^[6].

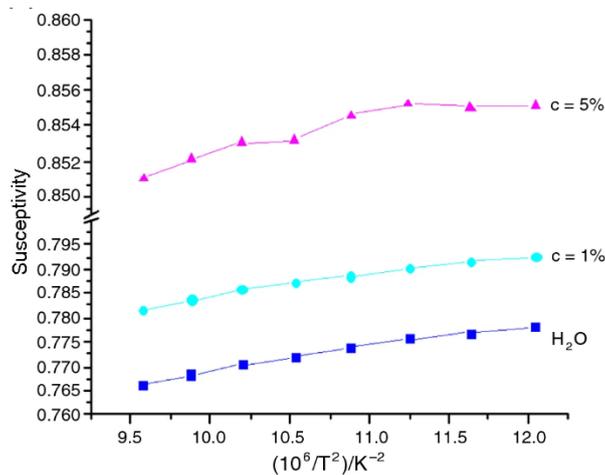


Figura 4: suscettività elettrica in funzione dell'inverso del quadrato della temperatura per le soluzioni acquose di azorubina con concentrazioni di 1% e 5%, e, rispettivamente, per H₂O

Osservando i cristalli di azorubina sotto un microscopio con luce polarizzata si vede che le proprietà che dipendono dalla luce incidente non hanno una disposizione spaziale uniforme. Si deduce che questo colorante sia anisotropo^[6].

2.2 ANALISI UV-Vis

Nello spettro UV-Vis (figura 5) si vede il picco di assorbanza a 516,41 nm, regione del verde. Ciò comporta che il colore della sostanza sia rosso^[6].

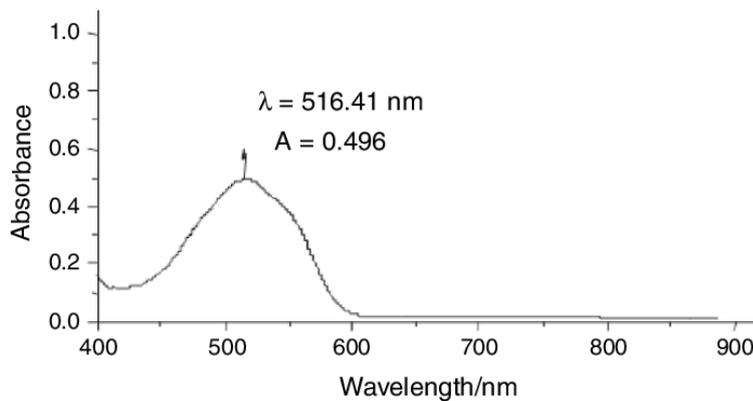


Figura 5: spettro UV-vis azorubina

2.3 ACIDITÀ

Utilizzando come riferimento acqua distillata, si sono prese le misure di pH in funzione della temperatura. La concentrazione della soluzione è dell'1% e la temperatura è stata presa in un range tra i 24 e i 55°C.

A temperatura ambiente si registra un pH di 7.14^[6], e raggiunge un valore di 6.70 ad una temperatura di 55°C^[6]. La concentrazione di ioni $[H^+]$ aumenta con l'aumentare della temperatura, perciò, se liquidi o cibi che contengono azorubina vengono scaldati il loro pH risulterà essere leggermente più acido^[7].

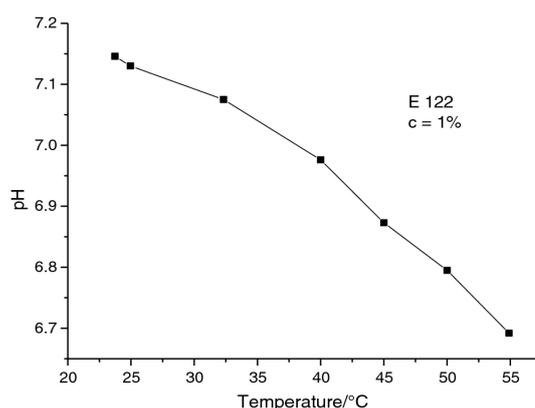


Figura 6: misure di pH in funzione della temperatura per una soluzione all'1% di azorubina in acqua distillata

3. DETERMINAZIONE

La rigorosa legislazione a cui è sottoposta l'azorubina ha portato all'ottimizzazione di metodi analitici sempre più sensibili e precisi. Tra i vari metodi impiegati si segnalano quelli elettroanalitici in quanto presentano alta selettività, minor tempo di reazione, capacità di determinare più sostanze contemporaneamente e costi più bassi. La presenza di un gruppo azoico e di un gruppo idrossi permette l'analisi elettrochimica sia in termini di riduzione catodica che di ossidazione anodica^[8].

3.1 RIDUZIONE CATODICA

La riduzione avviene in due passaggi: in un primo momento il gruppo azo si riduce a gruppo idrazo dopo aver ottenuto due elettroni e due protoni, successivamente, con l'aggiunta di altri due protoni e due elettroni il composto si divide in due ammine aromatiche; in ambiente acido i due passaggi avvengono contemporaneamente^[8].

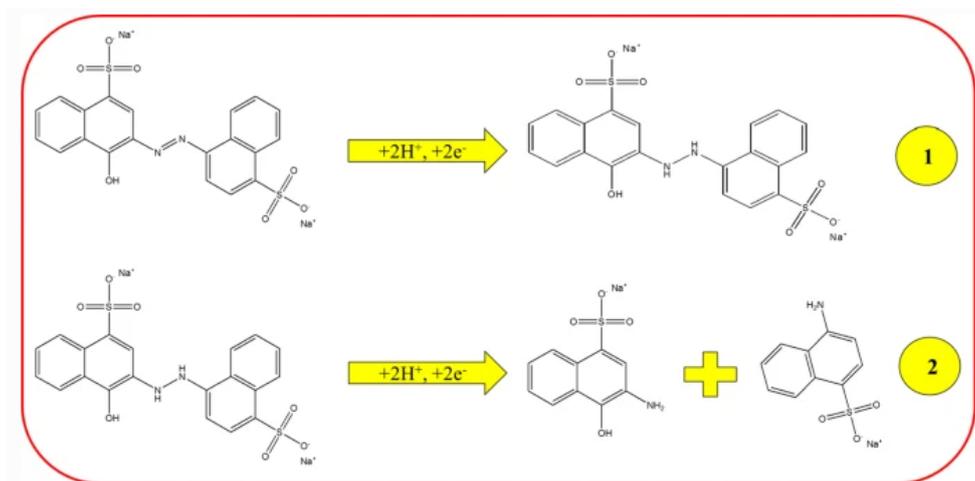


Figura 7: meccanismo proposto per la riduzione catodica dell'azorubina

Gli elettrodi studiati per l'analisi in queste condizioni sono l'elettrodo di mercurio e l'elettrodo al bismuto. L'elettrodo di mercurio ha numerosi vantaggi, quali: alta sensibilità, ripetibilità, elevata sovratensione per la riduzione di idrogeno e un elevato rapporto tra superficie e volume; tuttavia, i suoi effetti tossici e nocivi per l'ambiente ne limitano l'utilizzo^[9].

L'elettrodo a bismuto offre un'alternativa più ecologica ma con delle problematiche. Gli elettrodi a bismuto si possono dividere in due gruppi; gli elettrodi bulk (BiBE) che presentano una sensibilità ridotta e gli elettrodi a film (BiFE) con una sensibilità maggiore ma con una durata minore^[10].

3.2 OSSIDAZIONE ANODICA

La carmoisina può essere determinata anche nella regione anodica, il gruppo idrossi può essere ossidato elettrochimicamente perdendo un elettrone e un protone.

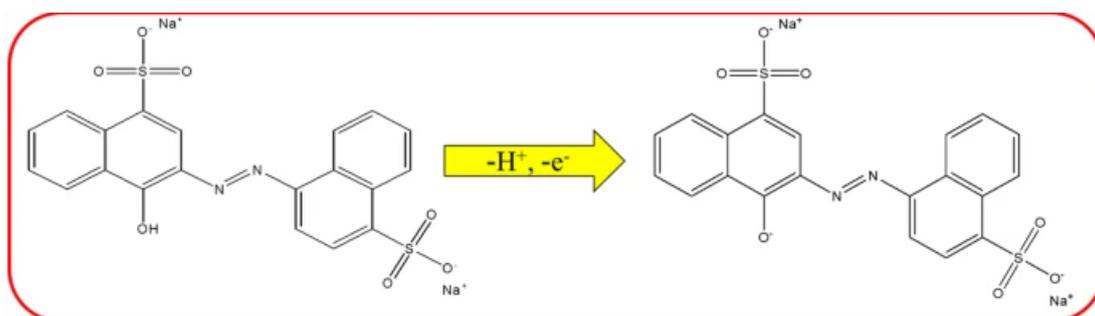


Figura 8: meccanismo proposto per l'ossidazione anodica dell'azorubina

Per l'analisi anodica si utilizza un elettrodo a pasta di carbonio che si realizza miscelando della grafite conduttiva, un modificatore (generalmente silice) e un legante liquido^[11]. Questo elettrodo

presenta numerosi vantaggi: facile preparazione, costo ridotto, ampia finestra di potenziale nella regione anodica e un ottimo rapporto superficie/volume^[12].

3. SINTESI

L'ampia gamma di applicazioni in cui sono richiesti gli azobenzeni ha fatto sì che la loro domanda nel mercato subisse una crescita.

La sintesi di questi composti può procedere secondo diverse vie. La prima citata qui di seguito (diazotazione/copulazione) è la più utilizzata, ma anche altre vie di sintesi sono state proposte:

- diazotazione/copulazione;
- accoppiamento riduttivo di nitrobenzeni;
- accoppiamento ossidativo deidrogenativo di aniline;
- dimerizzazione di aril azidi.

3.1 DIAZOTAZIONE/COPULAZIONE

La diazotazione è una reazione che coinvolge un composto aromatico contenente un gruppo amminico e acido nitroso o nitrito di sodio con l'obiettivo di formare un sale di diazonio che fungerà da intermedio per la sintesi del composto azoico. HNO_2 è instabile, deve essere formato in situ utilizzando una soluzione di nitrito di sodio e un acido minerale; a causa della natura del gruppo N_2^+ che si forma è necessario sintetizzare il sale ad una temperatura di 0°C ed utilizzarlo immediatamente. Il secondo passaggio per la formazione degli azobenzeni consiste nella reazione di copulazione che prevede la condensazione del sale di diazonio con un composto aromatico; la reazione procede con un meccanismo di sostituzione elettrofila aromatica in cui un substrato molto nucleofilo come un fenolo o un'anilina attacca il sale di diazonio povero di elettroni, la sostituzione avviene preferibilmente in posizione para, nel caso in cui questa sia già occupata il substrato potrà legarsi in posizione meta, la reazione non avviene nel caso in cui l'unica posizione libera sia quella orto. Nella figura sottostante (figura 7) sono riportati i passaggi principali e le condizioni per le reazioni di diazotazione, prima, e copulazione, poi.

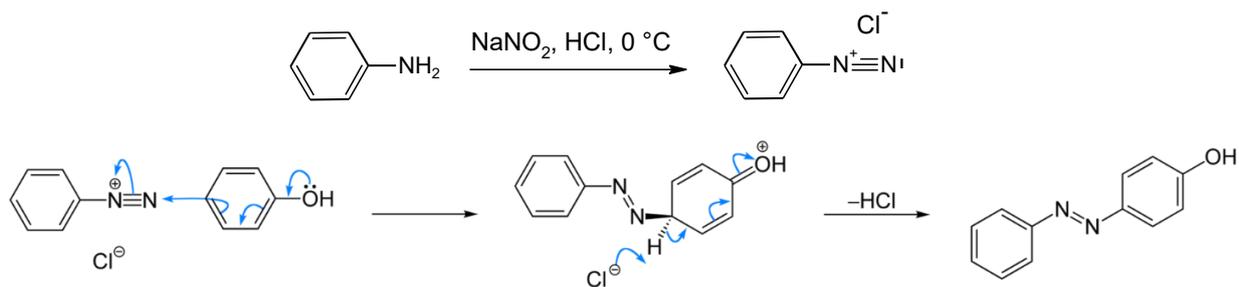


Figura 9: formazione del sale di diazonio (sopra) e suo meccanismo di copulazione (https://en.wikipedia.org/wiki/Azo_coupling) con un aromatico ricco di elettroni (fenolo).

3.2 ACCOPPIAMENTO OSSIDATIVO

Nella sintesi degli azobenzeni mediante accoppiamento ossidativo vi sono alcune problematiche, quali: bassa conversione dell'anilina al prodotto desiderato, alti costi di reazione se si usa un catalizzatore eterogeneo e impossibilità di riciclo del catalizzatore se si usa un catalizzatore omogeneo.

La strategia fotocatalitica (PEC) sfrutta l'energia solare come energia chimica, con questo metodo l'anilina ha una conversione dell'88% ad azobenzene con una selettività del 99%.

La reazione procede con un meccanismo di accoppiamento ossidativo: l'anilina viene adsorbita sui buchi fotogenerati di BiVO_4 e si ossida a catione radicale, successivamente, mediante deprotonazione catalizzata dagli ioni OH^- presenti, viene trasformata in un catione radicale amminico; due radicali amminici si accoppiano spontaneamente per formare intermedi idrazobeneze che forniranno azobenzeni a seguito di una deprotonazione^[13]. Con lo scopo di massimizzare l'impiego energetico e l'economia elettronica questa strategia propone una co-produzione di azobenzeni, infatti, mentre all'anodo avviene l'accoppiamento ossidativo di anilina, al catodo si opera l'accoppiamento riduttivo di nitrobenzene su fosforo di cobalto (CoP). Dalla reazione al catodo è risultato possibile ottenere azossibenzeno con una selettività del 99% e una resa del 90.9%. In figura 8 si illustra sinteticamente il decorso della reazione.

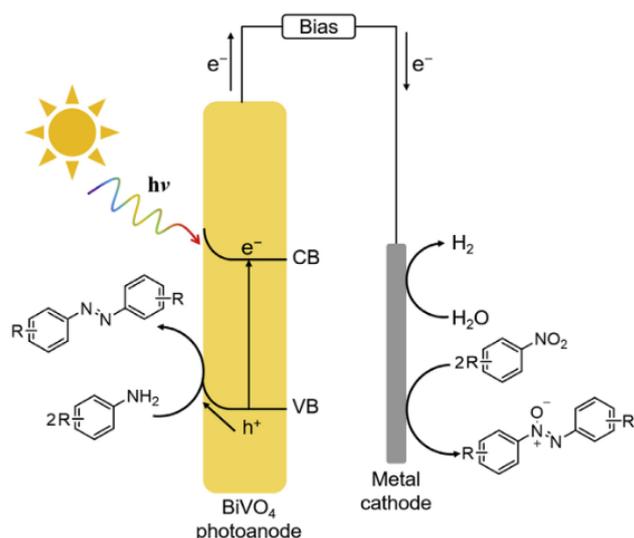


Figura 10: meccanismo strategia PEC

3.3 DIMERIZZAZIONE DI ARIL AZIDI

Le sintesi mediante dimerizzazione di azidi sono poco considerate in quanto gli azobenzene si ottengono come prodotto secondario. Tuttavia, tra le procedure segnalate, quella che sfrutta Co(II) porfirina, catalizzatore efficace nel promuovere l'attivazione dell'aril azide, risulta essere interessante^[14]. In figura 9 è rappresentato il meccanismo della reazione di dimerizzazione.

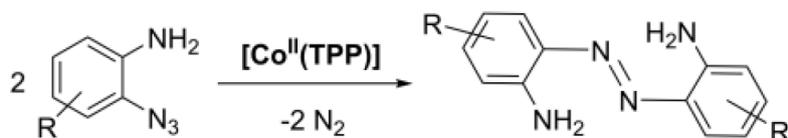


Figura 11: meccanismo dimerizzazione.^[12]

3.4 ACCOPPIAMENTO RIDUTTIVO DI NITROBENZENI

Si è analizzato un sistema riducente basato su InBr₃ ed Et₃SiH a refluxo con CHCl₃ e la conversione da nitrobenzene ad azobenzene è risultata scarsa, la causa di questa problematica è stata attribuita alla polarità del solvente e ai leganti dell'indio. Dopo alcune prove si è concluso che il sistema riducente basato su In(OTf)₃, Et₃SiH in DMF è il migliore per la sintesi di azobenzene^[15]. In figura 10 si rappresentano le condizioni di reazione e i prodotti ottenuti.

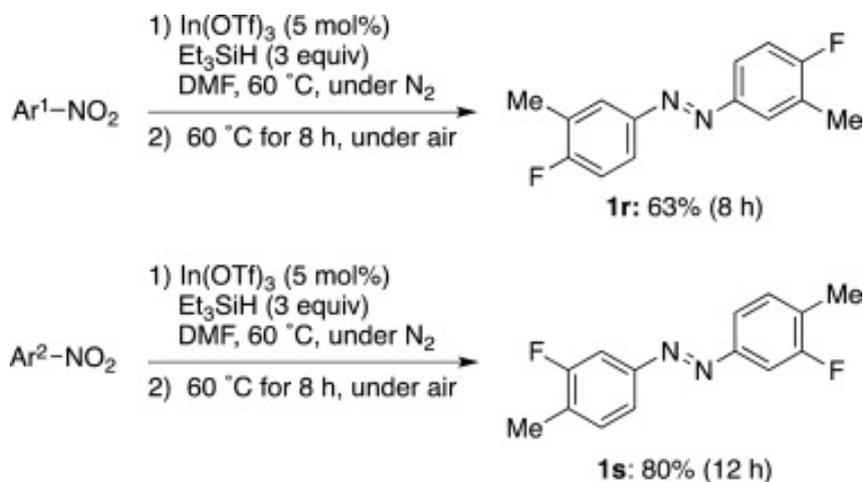


Figura 12: condizioni di reazione

4.TOSSICOLOGIA

I coloranti azoici vengono utilizzati in campo alimentare e farmaceutico quindi i loro effetti sulla salute umana sono stati causa di dibattito; EFSA, infatti, continua ad incentivare ricerche su questi composti e, in caso, provvede a modificare la lista di quelli permessi.

Gli studi sui coloranti si basano principalmente sul capire il meccanismo che hanno sul corpo, quali organi vengono attaccati e quali effetti provocano.

Sono stati condotti studi su piante e animali (*drosophila melanogaster*, cipolla, pesce zebra) e sono state analizzate le risposte fisiologiche a seguito di un'assunzione di azorubina maggiore di quella accettabile.

4.1 DROSOFILA MELANOGASTER

Lo studio in questione ha mirato ad osservare gli effetti di un'assunzione combinata di alluminio e azorubina andando a concentrare le analisi sugli effetti genotossici che le sostanze hanno avuto su *drosophila melanogaster*.

L'analisi quantitativa PCR ha evidenziato effetti di stress-ossidativo nel caso in cui le sostanze venissero assunte separatamente mentre, in caso di co-esposizione si rileva un aumento ulteriore dei livelli mRNA di enzimi antiossidanti^[16].

4.2 ALLIUM CEPA

Lo studio effettuato su allium cepa (cipolla) si è concentrato sulle aberrazioni cromosomiche che azorubina può portare.

La pianta viene trattata con diverse concentrazioni di sostanza e lasciata in esposizione per 24 e 48h in modo da osservare la risposta delle cellule meristematiche.

I dati di questo esperimento hanno evidenziato un'inibizione dell'indice mitotico e un aumento delle aberrazioni cromosomiche.

L'anomalia causata dal colorante è legata sia dal tempo di esposizione sia alla concentrazione di sostanza quindi, a dosaggi ridotti azorubina non risulta avere problemi di genotossicità^[17].

4.3 PESCE ZEBRA

Un recente studio si è proposto di valutare gli effetti dell'esposizione all'azorubina sui pesci zebra in fase embrionale prestando interesse soprattutto sul sistema morfologico, molecolare, comportamentale, circolatorio e metabolica. L'esposizione è durata 96h e le concentrazioni hanno un range da 4ppm a 2000ppm.

L'indagine ha rivelato che l'esposizione ad alte dosi di carmoisina ha ridotto il tasso di schiusa e ha provocato diverse malformazioni fisiche, tra cui, curvatura spinale o dimensioni ridotte degli occhi e della coda, sono anche insorte delle complicazioni al cuore, è stato riscontrato edema pericardico e un abbassamento della frequenza cardiaca.

L'organismo risponde a questa situazione aumentando la concentrazione di molecole antiossidanti come glutatione, N-acetil-istidina e agenti neuroprotettivi come la guanosina^[18].

5. INDAGINE EFSA

Nel 2015 EFSA ha condotto un'indagine autonoma sull'azorubina, inizialmente ha effettuato un'analisi su vari alimenti andando ad individuare per ognuno di essi la quantità di colorante che contenevano.

È stato poi preso in esame un campione di popolazione che si differenziava per età (infanti, bambini, adolescenti, adulti e anziani) e per provenienza (varie nazioni UE), è stata valutata la dieta di ognuno dei soggetti e si è andato a calcolare il consumo giornaliero di azorubina.

L'indagine ha rivelato che la massima esposizione al colorante si aggira tra i 2.9 e i 3.2mg/Kg, perciò, nessuno dei soggetti campionati assume una dose giornaliera maggiore di 4mg/Kg, a seguito dello studio l'ente ha confermato la sicurezza di questa sostanza in campo alimentare^[3].

6. CONCLUSIONI

Azorubina, uno dei coloranti azoici di colore rosso, risulta essere un composto sintetico molto utile all'industria alimentare e farmaceutica.

Questo elaborato ha voluto esporne le proprietà e le metodologie di sintesi, andando anche ad evidenziare la sua sicurezza.

Dagli studi condotti su piante e animali si evince che un dosaggio elevato potrebbe provocare danni all'organismo. Tuttavia, l'indagine di EFSA ci rassicura sul fatto che sia particolarmente complicato assumere quantità elevate di azorubina.

Attualmente il colorante è ritenuto sicuro, ma saranno necessari studi periodici per garantire la sicurezza delle persone.

BIBLIOGRAFIA

1. EFSA, autorità europea per la sicurezza alimentare.
2. J.L.C.M. Dorne, E. Aiassa, J. Alexander, B. Bottex, Q. Chaudhry, A. Germini, B. Nørrung, J. Schlatter, D. Verloo, T. Robinson. Scientific Opinion on the re-evaluation of Azorubine/Carmoisine (E 122) as a food additive. *EFSA journal*, 7, 11, (2009).
3. A. Hardy, J.L.C.M. Dorne, E. Aiassa, J. Alexander, B. Bottex, Q. Chaudhry, A. Germini, B. Nørrung, J. Schlatter, D. Verloo, T. Robinson. Refined exposure assessment for Azorubine/Carmoisine (E 122). *EFSA journal*, 13, 3, (2015).
4. S. Bibi, M. Khan, S. ur-Rehman, M. Yaseen, S. Muhammed, R. Nadeem, N. jahan, S. Noreen. Investigation analysis of optoelectronic and structural properties of cis- and trans-structures of azo dyes: density functional theory study. *Journal of physical organic chemistry* 34, 6, (2020).
5. G.M. Mamardashvili, E. Yu Kaigorodova, I.S. Lebedev, N.Z. Mamardashvili. Axial complexes of Sn(IV)-tetra(4-sulfophenyl)porphyrin with azorubine in aqueous media: Fluorescent probes of local viscosity and pH indicators. *Journal of molecular liquids*, 120277 (2020).
6. M. Leulescu, A. Rotaru, A. Moanță, G. Iacobescu, I. Pălărie, N. Cioateră, M. Popescu, M. Cătălin Criveanu, E. Morîntale, M. Bojan, P. Rotaru. Azorubine: physical, thermal and bioactive properties of the widely employed food, pharmaceutical and cosmetic red azo dye material. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 143, 3945-3967 (2021).
7. J.H. Herrero, M.J. Frutos, Effect of concentrated plum juice on physicochemical and sensory properties of yoghurt made at bench top scale. *International journal of diary technology*, 34, 123-128 (2013).
8. M.R.J. Servestani, Z. Doroudi. A Comprehensive Review on Electroanalytical Methodologies for the Determination of Carmoisine. *Food analytical methods*, 15, 1565-1574 (2022).
9. R. Porada, K. Jedlinska, J. Lipinska, B. Bas. Review-voltammetric sensors with literally placed working electrodes: a review. *Journal of electrochemical society*, 037536 (2020).
10. O.I. Lipskikh, E.I. Korotkova, Y.P. Khristunova, J. Barek, B. Kratochvil. Sensors for voltammetric determination of food azo dyes: a critical review. *Electrochimica acta*, 260, 974-985 (2018).
11. A. Chebotarev, A. Koicheva, K. Bevziuk, K. Pliuta, D. Snigur. Simultaneous determination of sunset yellow and tartrazine in soft drinks on carbon-paste electrode modified by silica

- impregnated with cetylpyridinium chloride. *Journal of food measurements and characterization*, 13, 1964-1972 (2019).
12. I. Švancara , K. Vytrás , K. Kalcher , A. Walcarius , J. Wang. Carbon paste electrodes in fact, numbers and notes: a review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. *Electroanalysis*, 21, 7-28 (2009).
 13. L. Lou, Y. Liu, W. Chen, X. Xue, S.M. Xu, L. Min, H. Zhou, L. Ma, M. Xu, X. Kong, M. Shao, Z. Li, H. Duan. Photoelectrocatalytic synthesis of aromatic azo compounds over porous nanoarrays of bismuth vanadate. *Chem Catalysis*, 100472 (2023).
 14. M. Goswami, B. De Bruin. Porphyrin Co(III)-Nitrene Radical Mediated Pathway for Synthesis of o-Aminoazobenzenes. *Molecules*, 1052 (2018).
 15. N. Sakai, S. Asama, S. Anai, T. Konakahara. One-pot preparation of azobenzenes from nitrobenzenes by the combination of an indium-catalyzed reductive coupling and a subsequent oxidation. *Tetrahedron*, 70, 2027-2033 (2014).
 16. Z.B. Doganlar, O. Doganlar, G. Ongoren, P.A. Mimioglu, O. Kahraman, A. Soykan, A. Sari. Single and combined toxicity of aluminum and azorubine: Physiological and genetic responses of *Drosophila melanogaster*. *Fresenius environmental bulletin*, 26, 2936-2946 (2017).
 17. S. Khan, M. Niamat Ali, R. Hamid, S.A. Ganie. Genotoxic effect of two commonly used food dyes metanil yellow and carmoisine using *Allium cepa* L. as indicator. *Toxicology report*, 7, 370-375 (2020).
 18. T. Kiziltan, A. Baran, M. Kankaynar, O. Şenol, E. Sulukan, S. Yildirim, S.B. Ceyhun. Effects of the food colorant carmoisine on zebrafish embryos at a wide range of concentration. *Archives of toxicology*, 96,1089-1099 (2022)