



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE CORANTES ARTIFICIAIS EM
CEREAIS MATINAIS: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA E CONTRIBUIÇÃO PARA AVALIAR A EXPOSIÇÃO
DE CRIANÇAS DE 2 A 8 ANOS**

LUANA LIMOEIRO FERRÃO

Sob a orientação da Professora
Shirley de Mello Pereira Abrantes

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ
Janeiro de 2013

664.06
F373a
T

Ferrão, Luana Limoeiro, 1982-
Avaliação do teor de corantes artificiais em cereais matinais: validação de metodologia analítica e contribuição para avaliar a exposição de crianças de 2 a 8 anos / Luana Limoeiro Ferrão - 2013.
96 f.: il.

Orientador: Shirley de Mello Pereira Abrantes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2013.

Bibliografia: f. 75-85.

1. Alimentos - Aditivos - Teses. 2. Cereais - Análise - Teses. 3. Corantes - Teses. 4. Crianças - Nutrição - Teses. 5. Avaliação de riscos - Teses. 6. Análise cromatográfica - Teses. 7. Tecnologia de alimentos - Teses. I. Abrantes, Shirley de Mello Pereira, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

LUANA LIMOEIRO FERRÃO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28 / 01 / 2013

Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes. INCQS-FIOCRUZ
(Orientadora)

Dra. Simone Pereira Mathias. UFRRJ

Dra. Eliana Rodrigues Machado. INCQS - FIOCRUZ

DEDICATÓRIA

Antes de tudo ao meu pai Oxalá, que ilumina sempre o meu caminho e não me desampara nunca. Aos meus Guias Espirituais e Protetores que são companheiros das batalhas diárias, me dando força, paciência, inspiração, resignação e intercedendo sempre a meu favor.

Ao meu amado marido e companheiro Sérgio, que com sua interminável paciência me apoiou e me apoia incondicionalmente em todos os meus projetos, por ter entendido minhas ausências e falhas durante este período e por ter tomado conta do nosso bem mais precioso: Rafaela e Gabriela. Às minhas filhas Rafaela e Gabriela pela compreensão de minha ausência em alguns momentos.

Aos meus pais Delsio e Jamira que sempre acreditaram e apoiaram o meu sucesso profissional, em especial à minha mãe por ser exemplo de mulher batalhadora e guerreira, que nunca desiste de seus objetivos e me ensinou a ser igual a ela. Às minhas queridas irmãs Janaína e Niara, companheiras de vida e ao meu irmão Raphael, que tenho um carinho muito especial, como um filho.

Ao meu anjo da guarda Mel, que administra meu lar e cuida de minhas filhas. Sem você não teria como terminar este projeto de vida.

A todos os meus familiares e amigos que torcem por mim e pelo meu crescimento, seja profissional ou pessoal.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e à Coordenação e Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) pela oportunidade de realizar esse projeto, em especial à Coordenadora Professora Dra. Simone e a Secretária Lucimar pelo apoio fundamental na reta final.

À orientadora Professora Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes pela orientação e confiança em desenvolver esse projeto. Agradeço a atenção, dedicação, paciência, compreensão e pelos conhecimentos sobre o assunto, que foram fundamentais no meu crescimento científico e profissional. Espero que tenhamos outras oportunidades de trabalharmos juntas novamente.

A todos os componentes da banca examinadora, que prontamente aceitaram o convite para participar desta importante etapa do projeto.

À professora de todas as horas, amiga, mãe e orientadora para todos os momentos Hilda Duval Barros, por ter me adotado na época de faculdade, me orientado desde quando eu era sua aluna e até os dias de hoje, sendo fundamental na minha formação profissional. Agradeço por sempre me estimular a crescer profissionalmente, a acreditar no meu potencial e pelas críticas, que foram, em alguns momentos, a grande alavanca para o meu aprendizado. Você é minha mestra.

Ao técnico Fábio Bazílio Silvestre, do Laboratório de Alimentos e Contaminantes, do Departamento de Química do INCQS, pela valiosa ajuda e orientação, pela paciência e apoio. Aos companheiros de laboratório que fizeram com que minha passagem pelo INCQS fosse maravilhosa: Iaralice, Rodrigo, Ângela, Ana Cláudia, Maria Clara e Marcus. Muito obrigada pelo auxílio e pela amizade.

Às minhas grandes amigas de turma Isabela e Marcela, pelos momentos inesquecíveis, ajudas incomensuráveis, desabafos, apoios, críticas, elogios, enfim, por terem se tornado neste período mais do que amigas, verdadeiras irmãs para o resto da vida.

Aos meus companheiros de turma de mestrado que tive o prazer de cruzar o caminho e que tenho certeza que levarei muitos como amigos para a vida.

Ao professor Sérgio Silva, da qualidade do INCQS, pelo auxílio na reta final do projeto. Não tenho como agradecer tamanha dedicação e paciência. Sua ajuda foi fundamental para o término deste trabalho.

Ao Instituto de Nutrição da UERJ, seus professores, alunos e funcionários que fazem parte da minha história acadêmica e profissional, pela oportunidade de ter sido aluna e hoje professora desta Instituição. Agradeço o acolhimento e o incentivo de buscar sempre o meu crescimento profissional.

Enfim, a todos que de forma direta ou indiretamente participaram, participam e continuarão a participar da minha caminhada.

"Na vida não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós."

(Chico Xavier)

RESUMO

FERRÃO, Luana Limoeiro. **Projeto “Avaliação do teor de corantes artificiais em cereal matinal: validação de metodologia analítica e contribuição para avaliar a exposição de crianças de 2 a 8 anos”**. 2013. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013.

Com o aumento do consumo de alimentos industrializados, a ingestão de aditivos alimentares utilizados no processamento tecnológico deste tipo de alimento se apresenta como um risco para a saúde humana, principalmente da população infantil. Os corantes são os aditivos utilizados apenas com a finalidade de conferir ou restaurar a cor do alimento, sem oferecer nenhum valor nutritivo ao mesmo. Estudos vêm demonstrando a ocorrência de reações adversas a curto e longo prazo associadas ao consumo de alimentos que possuem em sua composição os corantes artificiais. Estas reações variam desde alergias e alterações comportamentais à carcinogenicidade e mutagenicidade. O objetivo do presente trabalho foi determinar a concentração de corantes artificiais em cereais matinais, contribuindo para avaliar a exposição de crianças entre 2 a 8 anos, além de elaborar e validar a metodologia de determinação de corantes artificiais nos cereais matinais. Foi elaborado um questionário sobre a frequência e quantidade consumida de cereais matinais pelas crianças, sendo o mesmo respondido pelos responsáveis. O consumo foi classificado em escore e avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis utilizando como ferramenta o programa Microsoft Office Excel 2007. Após esta análise verificou-se que as crianças estavam divididas em dois grandes grupos, sendo o primeiro de idade entre 2 e 5 anos, com consumo de escore 1 e o segundo grupo com idade entre 6 e 8 anos, com consumo de escore 2. Em relação ao sabor do cereal consumido 65% ingerem o cereal tradicional, 25% o sabor chocolate e 10% o sabor de frutas, sendo que apenas os dois últimos possuem em sua composição os corantes artificiais. A validação foi realizada para os corantes permitidos pela legislação para uso em cereais matinais, sendo: amarelo crepúsculo, vermelho 40 e azul brilhante. Todo o processo de validação desta pesquisa para determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizado de acordo com o preconizado por Thompson et al. (2002), utilizando as recomendações contidas no documento do INMETRO DOQ-CGCRE-08 (2011) e no Guia harmonizado IUPAC, avaliando as seguintes figuras de mérito: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, seletividade, repetitividade, precisão intermediária e exatidão (recuperação). A faixa linear encontrada para o amarelo crepúsculo foi 15 a 45 mg/L, para o vermelho 40 e azul brilhante foi 5 a 35 mg/L. O LD e o LQ foi, respectivamente de 3 mg/L e 6 mg/L para o amarelo crepúsculo e de 2mg/L e 4 mg/L para o vermelho 40 e azul brilhante. O percentual de recuperação foi de 82 a 97% para o amarelo crepúsculo, 82 a 87% para o vermelho 40 e de 81 a 86% para o azul brilhante. Os valores calculados para repetitividade, como desvio padrão, foram de: 0,455 mg/L para o amarelo crepúsculo, de 0,375 mg/L para o vermelho 40 e de 0,542 mg/L para o azul brilhante. Por fim, os valores calculados da razão de Horwitz ($RSD_{\text{experimental}}/RSD_{\text{Horwitz}}$) para a determinação da precisão intermediária foram de 0,393 para o amarelo crepúsculo, de 0,090 para o vermelho 40 e de 0,040 para o azul brilhante. O método mostrou-se preciso, exato, linear em ampla faixa de concentração e sua determinação não é influenciada pela matriz alimentar. Além disso, a metodologia mostra-se interessante uma vez que não existem métodos oficiais para a determinação de corantes artificiais em cereais matinais. Em uma amostra, dentre os cereais analisados, identificou-se o corante tartrazina, o qual não é permitido o uso neste tipo de produto. Nos demais, todos estavam de acordo com a legislação, inclusive em relação à

IDA (ingestão diária aceitável) estabelecida para cada corante. Vale ressaltar que esse é apenas um tipo de alimento colorido artificialmente consumido pelas crianças, porém em sua dieta diária a criança ingere vários alimentos que contêm essa substância, como por exemplo, sucos em pó, doces diversos, biscoitos, gelatinas, confeitos, refrigerantes, o que sinaliza a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre o consumo diário de corantes artificiais por crianças. O fato de uma amostra conter tartrazina, corante não permitido para uso neste tipo de alimento, alerta sobre a necessidade de uma fiscalização sanitária eficaz em relação aos produtos coloridos artificialmente.

Palavras-chave: método analítico, validação, corantes artificiais, escolares, frequência alimentar, cromatografia líquida de alta eficiência

ABSTRACT

FERRÃO, Luana Limoeiro. **Project “Evaluation of the content of artificial coloring in breakfast cereal: validation of analytical methodology and contribution to evaluate the exposure of children aged 2 to 8 years”**. 2013. 113 p. Dissertation (Master Science in Food Science and Technology). Institute of Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013.

With the increased consumption of industrialized food, the ingestion of food additives used in the technological processing of this kind of food reveals itself as a threat to the human health, mainly of the child population. The dyes are the additives applied only with the meaning of giving or restoring the color of the foodstuffs, without offering any nutritional value to it. Studies have been demonstrating the occurrences of adverse reactions at short or long term associated with the ingestion of food that have in their composition the artificial dyes. Those reactions range since allergies and behavior alterations to carcinogenicity and mutagenicity. The goal of this study was determine the concentration of industrialized dyes in matinal cereal, contributing to evaluate the exposure of children between 2 to 8 years old, and also formulate the methodology of determination of artificial dyes on matinal cereal. It was elaborated a questionnaire about the frequency and quantity consumed of matinal cereal by the infants, being the same answered by their responsables. The ingestion was classified in score and evaluated by the Kruskal-Wallis test, applying as a tool the Microsoft Office Excel 2007 software. After this analysis, it was verified that the children were split in two big groups, being the first with ages between 2 and 5 years old, with consumption of score 1, and the second group with ages between 6 and 8 years old, with consumption of score 2. Concerning the flavor of the consumed cereal, 65% ingest the traditional cereal, 25% the chocolate flavor and 10% the fruits flavor, with only the last two flavors bringing in their composition artificial dyes. The validation was made to the dyes allowed by the legislation of use in matinal cereal, and they are: sunset yellow, allura red AC and brilliant blue. All the process of validation in this research was made under the recommended by Thompson et al. (2002), using the advices present in the INMETRO DOO-CGCRE-08 (2011) document and in IUPAC harmonized guidelines, measuring the following method performance: Limit of detection (LD), limit of quantification (LQ), linearity, selectivity, repeatability, intermediate precision and recovery. The linear range found to Sunset Yellow was 15 to 45 mg/L, to Allura Red AC and Brilliant Blue was 5 to 35 mg/L. The LD and LQ were, respectively 3 mg/L and 6 mg/L for Sunset Yellow and 2 mg/L and 4 mg/L for allura red AC and brilliant blue. The recovery percentage was 82 to 97% for sunset yellow, 82 to 87% for allura red AC and 81 to 86% for brilliant blue. The calculated values for repeatability as standard deviation were 0.455 mg/L for sunset yellow, 0.375 mg/L for allura red AC and 0.542 mg/L for Brilliant Blue. Finally, the measures calculated from Horwitz ratio ($RSD_{\text{experimental}}/RSD_{\text{Horwitz}}$) to the determination of intermediate precision found were 0.393 for Sunset Yellow, 0.090 for allura red AC and 0.040 for brilliant blue. The method showed itself precise, exact, linear in a wide range of concentration and your determination is not influenced by the alimentary matrix for determination by HPLC. Besides, the methodology turns out interesting since there are no official methods for the determination of industrialized dyes in matinal cereal. In a sample, among the analyzed cereals, it was identified tartrazine dye, which is not allowed to be used o this kind of product. In the others, all were according to the legislation, even respecting the IDA established for each dye. It is worth noting that it is only a single kind of

artificially colored food consumed by youngsters, however in its daily diet, a child ingest many foods which contain these substances, such as powder juice, many candies, cookies, gelatin, comfit, sodas, what points the need of a further study about the daily consumption of artificial dyes by children. The fact that one sample contains tartrazine, forbidden dye for this kind of food, alert about the necessity of an effective sanitary supervision about the artificially colored products.

Key Word: analytical method, validation, artificial colors, school age, food frequency, high performance liquid chromatography

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Principais características dos corantes naturais	08
Tabela 02: Principais sintomas associados a alergias alimentares	13
Tabela 03: Composição da mistura de corante A usada na pesquisa de McCann et al.	17
Tabela 04: Composição da mistura de corante B usada na pesquisa de McCann et al.	17
Tabela 05: Principais corantes sintéticos artificiais	21
Tabela 06: Propriedades dos corantes artificiais mais utilizados no Brasil	22
Tabela 07: Corantes artificiais permitidos em diferentes categorias de alimentos	24
Tabela 08: Relação dos corantes artificiais permitidos em cereais matinais no Brasil ..	25
Tabela 09: Adesão das escolas em relação aos questionários distribuídos e respondidos	35
Tabela 10: Distribuição de sexo e idade dos questionários respondidos	36
Tabela 11: Distribuição da Frequencia de Escore/Idade	38
Tabela 12: Medidas caseiras, em gramas, obtidas laboratorialmente	40
Tabela 13: Avaliação estatística ($\alpha=0,05$) do efeito matriz dos corantes analisados	62
Tabela 14: Repetitividade dos corantes analisados	63
Tabela 15: Reprodutibilidade parcial dos corantes	64
Tabela 16: Concentração dos Corantes Artificiais no Cereal Matinal A, sabor fruta	69
Tabela 17: Concentração dos Corantes Artificiais no Cereal Matinal B, sabor fruta	70
Tabela 18: Concentração dos Corantes Artificiais nos Cereais Matinais Sabor Chocolate	71
Tabela 19: Exposição das crianças ao corante artificial presente nos cereais matinais	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Estrutura química da clorofila	06
Figura 02: Estrutura química dos carotenos	06
Figura 03: Estrutura química dos principais flavonóides.....	07
Figura 04: Estrutura química dos galotaninos	07
Figura 05: Estrutura química da betalaína	07
Figura 06: Estrutura química do corante amarantho	19
Figura 07: Estrutura química do corante porceau 4R	19
Figura 08: Estrutura química do corante vermelho 40	19
Figura 09: Estrutura química do corante azorrubina	19
Figura 10: Estrutura química do corante tartrazina	19
Figura 11: Estrutura química do corante amarelo crepúsculo	19
Figura 12: Estrutura química do corante azul patente V	20
Figura 13: Estrutura química do corante verde rápido	20
Figura 14: Estrutura química do corante azul brilhante	20
Figura 15: Estrutura química do corante azul de indigotina	20
Figura 16: Estrutura química do corante eritrosina	20
Figura 17: Avaliação da linearidade da curva padrão do corante amarelo crepúsculo ..	44
Figura 18: Análise estatística, LD e LQ da curva padrão do corante amarelo crepúsculo	45
Figura 19: Avaliação da linearidade da curva padrão do corante vermelho 40	45
Figura 20: Análise estatística, LD e LQ da curva padrão do corante vermelho 40	46
Figura 21: Avaliação da linearidade da curva padrão do corante azul brilhante	46
Figura 22: Análise estatística, LD e LQ da curva padrão do corante azul brilhante	47
Figura 23: Cromatograma do amarelo crepúsculo na concentração de 15 mg/L	48
Figura 24: Cromatograma do amarelo crepúsculo na concentração de 30 mg/L	48
Figura 25: Cromatograma do amarelo crepúsculo na concentração de 45 mg/L	49
Figura 26: Cromatograma do corante vermelho 40 na concentração de 5 mg/L	49
Figura 27: Cromatograma do corante vermelho 40 na concentração de 20 mg/L	50
Figura 28: Cromatograma do corante vermelho 40 na concentração de 35 mg/L	50
Figura 29: Cromatograma do corante azul brilhante na concentração de 5 mg/L	51
Figura 30: Cromatograma do corante azul brilhante na concentração de 20 mg/L	51
Figura 31: Cromatograma do corante azul brilhante na concentração de 35 mg/L	52

Figura 32: Avaliação da linearidade da curva do efeito matriz do amarelo crepúsculo	.55
Figura 33: Análise estatística, LD e LQ da curva do efeito matriz do amarelo crepúsculo55
Figura 34: Avaliação da linearidade da curva do efeito matriz do vermelho 4056
Figura 35: Análise estatística, LD e LQ da curva do efeito matriz do vermelho 4056
Figura 36: Avaliação da linearidade da curva do efeito matriz do azul brilhante57
Figura 37: Análise estatística, LD e LQ da curva do efeito matriz do azul brilhante57
Figura 38: Cromatograma efeito matriz do amarelo crepúsculo concentração de 15 mg/L58
Figura 39: Cromatograma efeito matriz do amarelo crepúsculo concentração de 30 mg/L58
Figura 40: Cromatograma efeito matriz do amarelo crepúsculo concentração de 45 mg/L59
Figura 41: Cromatograma efeito matriz do vermelho 40 concentração de 5 mg/L59
Figura 42: Cromatograma efeito matriz do vermelho 40 concentração de 20 mg/L60
Figura 43: Cromatograma efeito matriz do vermelho 40 concentração de 35 mg/L 60
Figura 44: Cromatograma efeito matriz do azul brilhante concentração de 5 mg/L61
Figura 45: Cromatograma efeito matriz do azul brilhante concentração de 20 mg/L61
Figura 46: Cromatograma efeito matriz do azul brilhante concentração de 35 mg/L62
Figura 47: Lista de Ingredientes do Cereal Matinal A65
Figura 48: Designação do Cereal Matinal A65
Figura 49: Lista de Ingredientes do Cereal Matinal B65
Figura 50: Designação do Cereal Matinal B66
Figura 51: Lista de Ingredientes do Cereal Matinal C66
Figura 52: Designação do Cereal Matinal C66
Figura 53: Lista de Ingredientes do Cereal Matinal D66
Figura 54: Designação do Cereal Matinal D67
Figura 55: Lista de Ingredientes do Cereal Matinal E67
Figura 56: Designação do Cereal Matinal E67
Figura 57: Lista de Ingredientes do Cereal Matinal F67
Figura 58: Designação do Cereal Matinal F68
Figura 59: Cromatograma em solução do corante tartrazina na concentração de 25 mg/L68
Figura 60: Cromatograma da análise do Cereal Matinal A, cor amarelo69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01: Adesão das escolas, em relação ao percentual de questionários respondidos	35
Gráfico 02: Distribuição etária dos questionários respondidos, em percentual	36
Gráfico 03: Distribuição percentual, por sexo, dos questionários respondidos	37
Gráfico 04: Distribuição percentual sexo/idade	37
Gráfico 05: Distribuição dos escores de acordo com a idade	39
Gráfico 06: Sabor do cereal consumido pelas crianças entrevistadas	40
Gráfico 07: Curva analítica do corante amarelo crepúsculo	42
Gráfico 08: Curva analítica do corante vermelho 40	42
Gráfico 09: Curva analítica do corante azul brilhante	43
Gráfico 10: Gráfico de resíduos do corante amarelo crepúsculo	43
Gráfico 11: Gráfico de resíduos do corante vermelho 40	43
Gráfico 12: Gráfico de resíduos do corante azul brilhante	44
Gráfico 13: Curva analítica do efeito matriz do amarelo crepúsculo	53
Gráfico 14: Curva analítica do efeito matriz do vermelho 40	53
Gráfico 15: Curva analítica do efeito matriz do azul brilhante	53
Gráfico 16: Gráfico de resíduos do efeito matriz do amarelo crepúsculo	54
Gráfico 17: Gráfico de resíduos do efeito matriz do vermelho 40	54
Gráfico 18: Gráfico de resíduos do efeito matriz do azul brilhante	54

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - percentual
°C - Graus Celsius
µg/g - Micrograma por grama
µL – Microlitro
µm – Micrometro
AA - Ácido ascórbico
ABIA - Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação
ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG - Cromatografia Gasosa
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNNPA - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
CRE - Coordenadoria Regional de Educação
CV% - Coeficiente de variação
DP - Desvio padrão
DSM - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EC - Eletroforese Capilar
FAO - Food and Agriculture Organization
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
FSA - Food Standard Agency
g – Gramas
g/100 g - Grama por cem gramas
g/mês - Grama por mês
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA - Ingestão Diária Aceitável
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia
INS - International Numbering System
ISO - International Standard Organization
IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA - Joint Expert Committee on Food Additives
kg – Quilograma
LD - Limite de detecção
LQ - Limite de quantificação
mg – Miligrama
mg/kg - Miligrama por quilograma
mg/L - Miligrama por litro
mL – Mililitro
mm – Milímetro
MS - Ministério da Saúde
NEEM - Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular
nm – Nanômetro

PA - Para análise
POP - Procedimento Operacional Padronizado
rpm - Rotação por minuto
SO₂ - Dióxido de enxofre
SVS - Secretaria de Vigilância Sanitária
TDAH - Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
UE - União Europeia
US-FDA - United States Food and Drug Administration
UV/vis - Ultravioleta visível
v/v - Volume por volume
WHO - World Health Organization
λ – Lâmbda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	2
2	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1	Histórico do Uso de Corantes em Alimentos	4
2.2	Os Hábitos Alimentares na Infância.....	9
2.3	Cereais Matinais	12
2.4	Consumo de Corantes Artificiais X Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade Infantil.....	13
2.5	A Química do Corante Artificial	18
2.6	Regulamentação do Uso de Corantes Artificiais em Alimentos	23
2.7	Princípios Básicos de Validação de Métodos Analíticos	25
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo Geral	29
3.2	Objetivos Específicos	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	Estudo Seccional.....	30
4.1.1	Avaliação do Consumo.....	30
4.1.2	Amostra do Consumo	30
4.1.3	Protocolo do Estudo Seccional.....	31
4.1.4	Escore Alimentar	31
4.1.5	Análise de Dados.....	31
4.2	Estudo Analítico.....	31
4.2.1	Alimentos analisados.....	31
4.2.2	Vidrarias	32
4.2.3	Equipamentos	32
4.2.4	Padrões e Reagentes	32
4.2.5	Condições Cromatográficas.....	33
4.2.6	Preparo da Amostra	33
4.2.6.1	Extração dos Corantes Contidos na Amostra	33
4.2.6.2	Tratamento do Cartucho Sep-Pack [®] C ₁₈	33
4.2.6.3	Isolamento do Corante.....	33
4.2.7	Validação do Método para Cereais Matinais.....	34
4.2.8	Análise Estatística.....	34

5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
5.1	Estudo Seccional.....	35
5.2	Validação Intralaboratorial da Metodologia.....	40
5.2.1	Faixa de Trabalho	41
5.2.2	Linearidade	41
5.2.3	Efeito Matriz.....	52
5.2.4	Repetitividade.....	63
5.2.5	Precisão Intermediária	63
5.2.6	Recuperação	64
5.3	Análise dos Corantes Artificiais nos Cereais Matinais.....	64
5.4	Exposição das Crianças aos Corantes Artificiais Presentes nos Cereais Matinais.....	71
6	CONCLUSÃO.....	74
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
8	ANEXOS	86
8.1	Anexo 1	86
8.2	Anexo 2 – Questionário.....	87
8.3	Anexo 3 - POP	88

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a mudança nos hábitos alimentares da população aponta para um empobrecimento da dieta, com o aumento do consumo de alimentos industrializados e a diminuição dos alimentos “*in natura*”, inclusive no público infantil. Essa mudança possui uma determinante multicausal, que engloba a entrada da mulher no mercado de trabalho, ampliação e diversidade da oferta de alimentos industrializados e a crescente comercialização de produtos alimentícios em grandes redes de mercado.

O hábito alimentar é formado durante a infância e sofre influências multicausais para a sua perduração na vida adulta. Desta forma, muitos acreditam que uma orientação nutricional é o primeiro e importante passo para que no futuro tenhamos adultos saudáveis.

O crescimento da indústria de alimentos e a necessidade de fabricação de alimentos seguros e de vida de prateleira longa levaram a um aumento no uso de aditivos alimentares. Esse uso crescente gera questionamentos quanto à segurança do aditivo alimentar em relação à toxicidade, principalmente em relação aos corantes artificiais.

Essa preocupação tem como base vários estudos publicados, os quais relacionam os aditivos causando reações adversas no organismo humano, sejam agudas ou crônicas, como por exemplo, reações desencadeantes de alergias, de alterações no comportamento e até mesmo com neoplasias.

Sob esse aspecto, as crianças constituem um grupo de risco a reações indesejáveis, pois ainda não atingiram a sua maturidade fisiológica. Além disso, muitos alimentos destinados ao consumo infantil são coloridos artificialmente com a finalidade de se tornarem mais atrativos para o consumo. Sob outro ponto de vista, as crianças também são consumidoras de produtos que normalmente são destinados ao consumo de adultos, como por exemplo, iogurtes, refrigerantes, gelatinas, que por consequência também possuem grande quantidade de corantes artificiais.

O controle deste consumo elevado de corantes artificiais pela população infantil, atualmente, é um enorme desafio para a Saúde Pública. São necessários vários estudos relacionando os riscos toxicológicos ao consumo dessas substâncias, a fim de prevenir agravos à saúde infantil. Esse controle é necessário, pois a atual legislação aborda a Ingestão Diária Aceitável (IDA) apenas para a população adulta, o que subestima o consumo em relação às crianças que possuem um menor peso corporal e um metabolismo mais acelerado quando comparados aos adultos.

Como os corantes artificiais são complexas moléculas químicas, estudos aprofundados sobre suas estabilidades e implicações tecnológicas e toxicológicas se fazem necessários para a busca da segurança alimentar em todos os seus aspectos. Para alcançar esse patamar seguro de uso é imprescindível o desenvolvimento de metodologias analíticas que possam detectar e quantificar de forma rápida e precisa esses corantes nas mais diversas matrizes alimentares. Hoje, no Brasil, ainda são escassas as metodologias validadas para quantificação de corantes artificiais.

Outra vertente na atuação da Saúde Pública no que concerne sobre a fiscalização do uso de corantes artificiais está a importância de legislações atualizadas e condizentes ao cenário mundial, que aponta para uma tendência cada vez maior do uso de corantes naturais em detrimento aos corantes artificiais. Mas, como quimicamente os corantes naturais são mais instáveis ao processamento, muitas pesquisas têm que ser desenvolvidas nesta área.

Muitos corantes artificiais já possuem o seu uso proibido em vários países. O Japão, apesar de possuir legislação que permite o uso de corantes artificiais, as indústrias de alimentos preferem não utilizar este tipo de substância, pois o seu público consumidor não aceita muito bem os produtos que possuem. Conforme os anos vão se passando e os estudos toxicológicos vão se aprofundando, mais corantes artificiais vão saindo das listas de permissão.

Sob o ponto de vista do controle analítico destas substâncias químicas, o desenvolvimento de métodos e a validação de metodologia analítica é uma importante ferramenta para assegurar a aplicabilidade e a abrangência de um método analítico na rotina laboratorial, estabelecendo os limites dos parâmetros de qualidade das medidas instrumentais e da confiabilidade estatística, através da estimativa das figuras de mérito estabelecidas através de documentos oficiais.

Sendo assim, este projeto justifica-se pela necessidade de uma pesquisa sobre o uso de corantes artificiais em alimentos destinados ao público infantil, abrangendo os riscos acarretados pelo consumo destes, sendo este um dos grandes desafios da Saúde Pública e da Vigilância Sanitária. Além da necessidade do desenvolvimento de novas metodologias analíticas mais precisas e específicas, de forma a gerar dados consistentes para a ação da Vigilância Sanitária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico do Uso de Corantes em Alimentos

Aditivo alimentar é definido pela *Food and Agriculture Organization / World Health Organization* (FAO/WHO, 1974), como sendo:

“toda substância, que não apresenta valor nutritivo, adicionada ao alimento com a finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor e sabor; modificar ou manter seu estado físico geral, ou exercer qualquer ação exigida para uma boa tecnologia de fabricação do alimento”.

Os aditivos são inofensivos à saúde, desde que sejam seguidos os limites máximos de ingestão estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e/ou pelo *Codex Alimentarius* (PRADO; GODOY, 2007). Esses órgãos estabelecem para cada aditivo uma ingestão diária aceitável (IDA), que é definida pela FAO/WHO como a quantidade de substância que ingerida diariamente e por toda a vida pelo homem, não oferece riscos à saúde humana, à luz dos conhecimentos tecnológicos atuais, expressa em mg/kg de peso corpóreo.

Todos os corantes artificiais permitidos pela Legislação Brasileira já possuem valores de IDA estabelecidos, porém os mesmos estão sujeitos a contínuas alterações, dependendo dos resultados de estudos toxicológicos. O Comitê Conjunto FAO/WHO de Peritos em Aditivos Alimentares, JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives) recomenda, no âmbito mundial, que cada país verifique periodicamente o consumo total de cada aditivo, com base em inquéritos alimentares, assegurando que o consumo destas substâncias químicas não ultrapasse a IDA recomendada (PRADO; GODOY, 2007).

Dentre os aditivos alimentares, os corantes correspondem a um grande e importante grupo, pois a aceitação do produto alimentício pelo consumidor possui uma estreita relação com a sua cor. Esta característica sensorial, mesmo sendo subjetiva, induz a sensação global resultante das outras características, como aroma, sabor e textura. Sendo assim, a aparência do alimento exerce efeito estimulante ou inibidor do apetite (GONÇALVES; SCHUMANN; POLÔNIO, 2008; QUEIJA; QUEIRÓS; RODRIGUES, 2001).

As indústrias alimentícias fazem grande uso dos corantes com o intuito de compensar a cor natural do alimento e que é perdida ou alterada de intensidade ao longo do processo produtivo, devido a variantes como luminosidade, oxigênio, temperatura excessiva, umidade e até mesmo as condições de armazenamento. Além disso, alguns alimentos que não passam por nenhum processo produtivo têm sua cor natural realçada com corantes, como, por exemplo, a laranja que dependendo da época do ano pode apresentar variações de coloração. (HENRY, 1996; NETTO, 2009; ROLLEMBERG; VIDOTTI, 2006). Sob o ponto de vista tecnológico é de suma importância o uso de corantes em produções de larga escala, para garantir a uniformidade do produto, conferir identidade aos alimentos e proteger *flavors* e vitaminas dos danos causados pela luz (ABRANTES et al., 2007; NETTO, 2009).

Porém a prática de colorir os alimentos não é recente. A diferença é que com o avanço da tecnologia, os corantes naturais de origem animal, vegetal e mineral que eram utilizados até meados do século XIX foram sendo substituídos pelos corantes artificiais. Em 1856, o químico britânico William Henry Perkin sintetizou o primeiro corante, a mauveína, quando realizava um estudo sobre a oxidação da fenilalanina com o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e foi lavar os resíduos da precipitação desta reação com álcool e observou o aparecimento de uma coloração avermelhada (NETTO, 2009; WALFORD, 1980).

Até então os corantes eram extraídos de fontes naturais, como por exemplo, o índigo (pigmento azul) extraído da planta índigo feratinctória e a alizarina extraída da raiz da planta européia madder. Outros corantes naturais, também muito utilizados desde o século XV até os dias atuais, são cúrcuma, páprica e açafrão, que eram utilizados juntamente com os sais de alumínio e ferro para aumentar o seu poder tintorial (MASCARENHAS, 1998; NETTO, 2009; RENHE, 2008).

O uso dos corantes nos alimentos é um assunto muito controverso e polêmico. Hoje existem, basicamente, três linhas de pensamento: uma que não condena o uso de corantes artificiais, uma que propõem a substituição dos corantes artificiais pelos naturais e há ainda os que defendem a linha da não necessidade de uso de corantes em alimentos. Porém, o que se observa atualmente é a busca de alimentos que sejam considerados mais saudáveis, inclusive por parte dos consumidores, o que está levando as indústrias alimentícias a uma substituição gradual dos corantes artificiais pelos naturais. Inclusive alguns países já aboliram o uso de corantes na maioria dos alimentos produzidos, seja de forma natural, como ocorreu no Japão ou através de legislações mais rigorosas, como é o caso da Suíça e da Noruega (PRADO; GODOY, 2003; RENHE, 2008).

De acordo com a Resolução n.º 44/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), do Ministério da Saúde, os corantes de uso permitido em alimentos e bebidas podem ser classificados da seguinte forma:

- Corante orgânico natural: aquele obtido a partir do vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado;
- Corante orgânico sintético: aquele obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado. Pode ser subdividido em:
 - Corante artificial: é o corante orgânico sintético, não encontrado em produtos naturais.
 - Corante orgânico sintético idêntico ao natural: é o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural.
- Corante inorgânico: aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento;
- Caramelo: corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão;
- Caramelo (processo amônia): é o corante orgânico sintético idêntico ao natural obtido pelo processo amônia, desde que o teor de 4-metil-imidazol não exceda no mesmo a 200 mg/kg (duzentos miligramas por quilograma).

Os corantes naturais são divididos em três grandes grupos de acordo com sua estrutura química: os compostos heterocíclicos com estrutura tetrapirrólica (clorofila, hemo e bilinas); compostos de estrutura isoprenóide (carotenóides) e os compostos heterocíclicos contendo oxigênio (flavonóides). Além desses grandes grupos, existem dois grandes grupos de corantes que são encontrados exclusivamente em espécies vegetais que são as betalaínas (compostos nitrogenados) e os taninos (NETTO, 2009).

As estruturas químicas destes corantes podem ser observadas nas Figuras 01 a 05 a seguir:

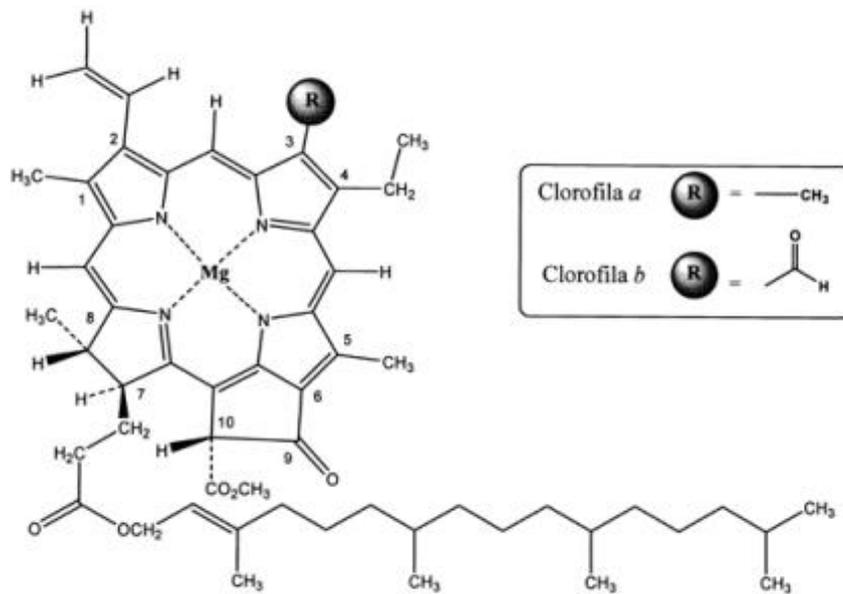


Figura 01
Estrutura química da clorofila (Fonte: STREIT et al., 2005)

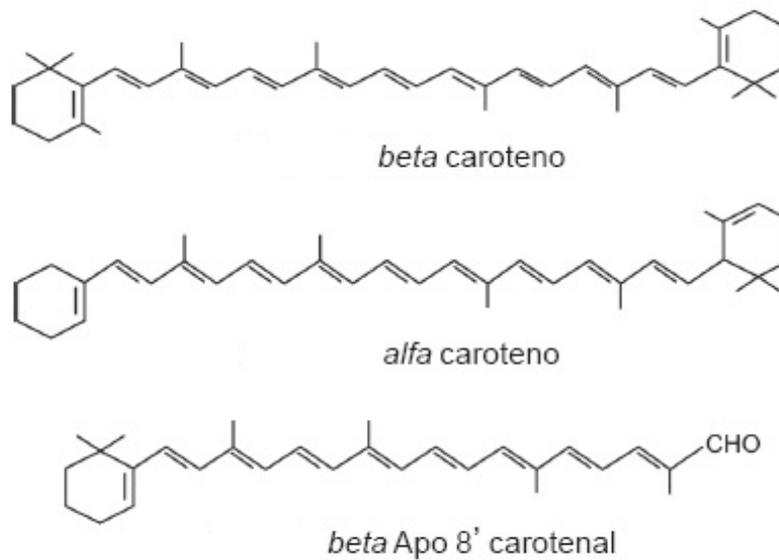


Figura 02
Estrutura química dos carotenos (Fonte: UENOJO; MARÚSTICA; PASTORE, 2005)

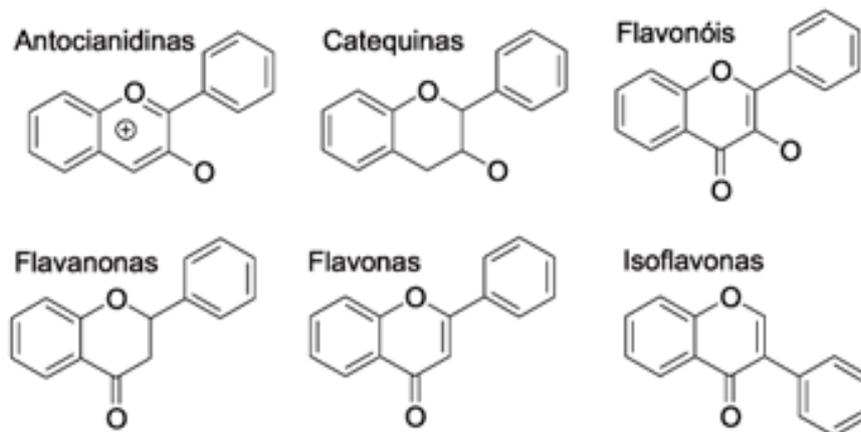


Figura 03

Estrutura química dos principais flavonóides (Fonte: MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008)

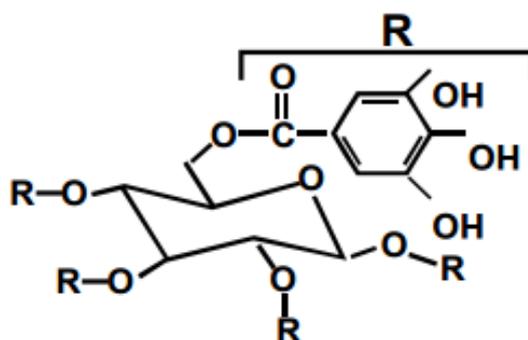
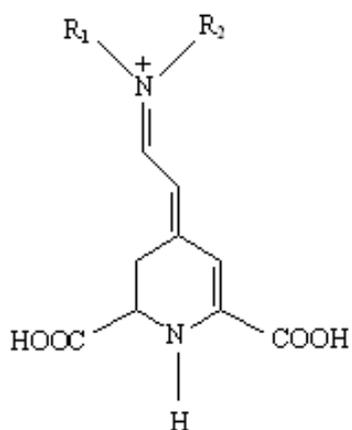


Figura 04

Estrutura química dos galotanninos (Fonte: BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004)



Estrutura básica das
Betalainas

Figura 05

Estrutura química da betalaína (Fonte: BELTRÃO; STRINGHETA; SANDI, 2002)

Os corantes naturais possuem relativa desvantagem em relação aos corantes artificiais, devido a fatores considerados primordiais para o seu uso, como a estabilidade (luz, oxigênio, calor e pH), uniformidade na cor conferida, poder tintorial, contaminação microbiológica e custo de produção/extração (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2011). As principais características dos corantes naturais, mais utilizados, podem ser visualizadas na Tabela 01.

Tabela 01 Principais características dos corantes naturais

Nome do Corante	Cor	Fonte	Estabilidade	Solubilidade
Extrato de Urucum	Amarelo Alaranjado	Semente da <i>Bixaorellana, L.</i>	Alta suscetibilidade ao oxigênio, à luz e à temperatura	Lipossolúvel (norbixina) Hidrossolúvel (sal de norbixina)
Carmim de cochonilha	Vermelho ¹	Fêmea dessecada de insetos da espécie <i>Dactylopius coccus</i>	Estável ao calor, luz e oxidação. Não sofre alteração significativa pela ação do dióxido de enxofre	Hidrossolúvel Baixa solubilidade em pH alcalino
Curcumina	Amarelo Limão ou Laranja ²	Rizomas de <i>Curcuma longa</i>	Sensível à luz Estável ao aquecimento	Insolúvel em água ³
Antocianinas	Infinidade de cores ⁴	Amplamente distribuído em flores, frutos e demais plantas superiores	Estáveis somente em solução bastante ácida	Depende da sua estrutura química
Betalainas	Do amarelo ao vermelho	Nos vegetais da ordem <i>Centrospermeae</i>	Boa estabilidade na faixa de pH de 4-5 Razoável estabilidade na faixa de pH de 3-4 e 5-7 Instável na presença de luz e calor Destruída a altas temperaturas Atividade de água interfere na estabilidade	Alta solubilidade em água

¹ Depende do pH do meio: pH em torno de 4 - vermelho / pH maior que 10 - azul

² Depende do pH do meio: pH ácido - amarelo-limão / pH básico - laranja

³ Para uso em alimentos tem que ser misturada a solventes e emulsificantes de grau alimentício

⁴ Cores entre laranja, vermelho, púrpura e azul, dependendo do meio em que se encontra. Cor influenciada pelas condições de pH, concentração do corante, tipo de solvente e temperatura

FONTE: NETTO, 2009.

Dentre os corantes naturais, o caramelo se destaca por ser um dos mais antigos a serem utilizados em alimentos para conferir uma coloração no produto final que pode variar do amarela-palha ao marrom escuro (quase negra). Este corante representa cerca

de 90%, em peso, de todos os corantes adicionados em alimentos e bebidas consumidos no mundo (ABIA, 2001; NETTO, 2009).

O JECFA define corante caramelo como (FAO/WHO, 1974):

"uma complexa mistura de componentes, alguns dos quais na forma de agregados coloidais, obtidos através do aquecimento de carboidratos que ora, podem ou não, receber ácidos, álcalis ou sais de grau alimentício."

Sendo assim, de acordo com o reagente utilizado para sua fabricação, o corante caramelo recebe a seguinte classificação:

- Classe I - Caramelo simples
- Classe II - Caramelo sulfito cáustico
- Classe III - Caramelo amônia
- Classe IV - Caramelo sulfito amônia

Este corante é utilizado em uma infinidade de produtos industrializados e, de forma geral, os da Classe I são utilizados em bebidas alcoólicas de alta titulação, os da Classe II em bebidas alcoólicas e licores contendo certos extratos vegetais, os da Classe III em cervejas, molhos e outras misturas e os da Classe IV em refrigerantes. A quantidade e nível de uso dependem da tonalidade desejada e de características legais da identidade e qualidade de cada produto alimentício (NETTO, 2009).

2.2 Os Hábitos Alimentares na Infância

Entende-se por hábito como um ato, uso e costume, ou um padrão de reação adquirido por frequente repetição da atividade, através do aprendizado. Sob este aspecto, o hábito alimentar se caracteriza pelos alimentos ou tipo de alimentação que os indivíduos consomem no seu cotidiano, rotineiramente e repetidamente. No entanto, existem infinitos fatores intrínsecos e extrínsecos ao indivíduo que influenciam a aquisição e perpetuação destes hábitos alimentares (RAMOS; STEIN, 2000).

Não apenas sob o aspecto biológico, mas também nos âmbitos sociais, psicológicos e econômicos, a alimentação e o ato de comer é uma das necessidades mais importantes para o desenvolvimento do ser humano (MATTOS et al., 2010). Assim, a comida e o comer assumem um papel central no aprendizado social, que embora seja rotineira possui essa natureza vital e essencial. Logo, o comportamento que cada indivíduo desenvolve perante a comida acaba revelando a cultura em que ele está inserido (MINTZ, 2001).

Muitos estudos e autores defendem o fato de que os hábitos alimentares saudáveis adquiridos durante a infância e que conseguem se perpetuar durante a vida adulta contribui eficientemente para a prevenção primária de doenças não-transmissíveis, como, por exemplo, *diabetes mellitus*, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e câncer (COLUCCI; PHILIPPI; SLATER, 2004; MENDES et al., 2006; MOLINA et al., 2010; POLLA; SCHERER, 2011; TUMA et al., 2005; ZANFERRARI; DIAS, 2010). Dessa forma, o conhecimento sobre a situação nutricional da população infantil de um país se torna essencial para acompanhar a evolução das condições de saúde e de vida da população em geral, onde órgãos governamentais possam, considerando o caráter multicausal, atuar na prevenção das doenças crônicas não transmissíveis (TUMA; COSTA; SCHMITZ, 2005). Para estudos nutricionais, consideram-se crianças as pessoas com faixa etária entre 02 e 08 anos (PADOVANI et al., 2006).

Sabe-se que os hábitos alimentares de um indivíduo começam a se formar desde o nascimento, sendo a família a pioneira na introdução de alimentos e, assim, os principais responsáveis pela formação alimentar do indivíduo. Porém, como vivemos em sociedade, existem outros aspectos que interferem nessa formação, como é o caso da

escola, que desempenha um papel fundamental, juntamente com a família, em promover hábitos saudáveis entre as crianças, principalmente entre a idade de 02 a 08 anos, idade esta onde a criança tem o primeiro contato com a maioria dos alimentos. Os pais tendem a oferecer aos filhos apenas alimentos de sua própria preferência, interferindo assim na disponibilidade de alimentos para as crianças, fato este que influencia diretamente no desenvolvimento do hábito alimentar do pré-escolar (AIRES et al., 2011).

Schmits et al. (2008) propõem metodologias de capacitação para educadores e donos de cantinas escolares para a promoção de hábitos alimentares saudáveis, por acreditar que a escola é um setor estratégico para a concretização de iniciativas de promoção de saúde, pois neste ambiente encontra-se a figura do educador, que trabalha como um facilitador, usando várias estratégias de ensino e contribuindo para a melhoria da alimentação das crianças. O ambiente de ensino, quando está aliado a uma prática de educação nutricional proporciona um aprendizado interativo da criança com os alimentos (AIRES et al., 2011).

Esse tipo de trabalho representa uma necessidade nos dias atuais, pois o Brasil tem registrado, assim como ocorre nos países desenvolvidos, a progressão da transição nutricional, caracterizada pela redução na prevalência dos déficits nutricionais e ocorrência mais expressiva do sobrepeso e da obesidade, tanto nos adultos, mas principalmente em crianças e adolescentes. O consumo alimentar relacionado à obesidade ocorre não somente em relação ao aumento do volume de alimentos consumidos na dieta diária, mas principalmente pela composição e qualidade desta dieta, onde se observa baixo consumo de frutas e hortaliças e aumento da ingestão de guloseimas e refrigerantes (POLLA; SCHERER, 2011; TRICHES; GIUGLIANI, 2005).

Porém, existe uma diferença significativa entre o comer e o nutrir. Entende-se por comer um ato social, influenciado pelo meio sociocultural em que o indivíduo está inserido e nutrir como uma atividade biológica, essencial para o desenvolvimento orgânico do ser humano. Essa é uma questão que compreende as mais diversas áreas de conhecimento acerca da ciência Nutrição (BLEIL, 1998).

Para a diminuição dos índices de obesidade, acredita-se na importância dos conhecimentos das pessoas acerca da alimentação e nutrição, promovendo assim hábitos mais saudáveis. Sob este aspecto, pesquisas relatam o sucesso da educação nutricional como uma das estratégias de intervenção, relatando melhoras nos conhecimentos nutricionais, atitudes e comportamento alimentar de crianças, chegando até a influenciar os hábitos alimentares familiares (MULLER et al., 2001; PÉREZ-RODRIGO; ARANCETA, 2001).

A nutrição adequada na infância, construída através de hábitos alimentares mais saudáveis, é de fundamental importância para garantir crescimento e desenvolvimento dentro dos padrões estabelecidos pelos Órgãos Governamentais como sendo normais, sendo este estágio da vida um dos biologicamente mais vulneráveis, devido à imaturidade fisiológica das crianças e ao seu metabolismo acelerado, facilitando a metabolização de substâncias químicas pelo organismo (AIRES et al., 2011).

A demanda de alimentos industrializados no Brasil, segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação (ABIA, 2001) e do Instituto de Pesquisa AC Nielsen (1997), aumentou consideravelmente nos últimos anos, principalmente após a abertura econômica, principalmente as preparações prontas para o consumo. Outros fatores também contribuem para um aumento constante de alimentos industrializados e sua manutenção nos hábitos alimentares, como, por exemplo, a crescente participação da mulher no mercado de trabalho, a praticidade e rapidez de preparo deste tipo de alimento, além da durabilidade e da boa aceitação que estes produtos possuem (AQUINO; PHILIPPI, 2002; MAESTRO; SILVA, 2004).

A diversidade dos alimentos industrializados, assim como o aumento da sua oferta nas prateleiras dos mercados, pode influenciar nos padrões alimentares da população como um todo, principalmente no público infantil, já que este é o período de formação dos hábitos alimentares (FAO, 1992; WHO, 1990).

Nestlé (1993) defende que este crescimento da indústria de alimento pode melhorar a qualidade nutricional dos alimentos produzidos e ofertados, com o aumento do acesso a alimentos modificados e que sejam fontes alimentares e/ou enriquecidos com determinados nutrientes, contribuindo, assim, com uma melhora do valor nutritivo da dieta, inclusive da dieta infantil.

Porém, ainda é difícil estabelecer a extensão desse impacto do consumo de alimentos industrializados pela população infantil devido à falta de recomendações específicas para esse grupo em questão, tanto na identificação da quantidade quanto na frequência destes na dieta. Na verdade, o que falta é um estudo sistemático e específico do consumo de alimentos industrializados, principalmente durante a infância, gerando assim dados comparativos entre os estudos (AIRES et al., 2011; AQUINO; PHILIPPI, 2002).

Em pesquisa sobre o Orçamento Familiar 2008-2009 (IBGE, 2010), nas áreas metropolitanas do nosso país evidenciou um declínio em relação aos alimentos básicos e tradicionais da dieta dos brasileiros, como, por exemplo, o arroz e o feijão e, em contrapartida, um aumento de até 400% no consumo de produtos industrializados.

Sob este aspecto, o consumo de cereais matinais cresce de 15 a 20% ao ano, pois a população está buscando alimentos mais saudáveis, ricos em fibras e nutrientes. Os cereais matinais são excelentes fontes de carboidratos e ainda têm vitaminas, fibras e minerais, como o ferro, associados com baixo teor de gordura. Esse tipo de alimento é recomendado para pessoas de todas as idades, inclusive crianças (MONTEIRO et al., 2010). Como se trata de um alimento industrializado, não está livre da presença de corantes artificiais. Em um estudo recente, Mattos et al. (2010), através da aplicação de inquérito alimentar em relação ao consumo de alimentos por crianças e adolescentes verificou que 13% dos entrevistados consomem cereal matinal/barra de cereal uma vez ou mais por dia.

Existem vários estudos sobre a influência da mídia no comportamento alimentar das crianças, demonstrando que o hábito da criança de assistir à televisão é diretamente relacionado com os seus pedidos, compras e consumo de produtos alimentícios anunciados (MATTOS et al., 2010). Reforçando essa persuasão das propagandas sobre o público infantil alia-se entretenimento aos objetos de consumo, sendo que as indústrias de alimentos utilizam bastante este artifício, conhecido como *eatertainment* (comida+diversão). Assim as empresas acabam levando o seu produto e/ou serviço para o mundo de seus potenciais clientes, as crianças, que é um mundo da diversão, da brincadeira e do entretenimento (ASSOLINI, 2008).

Como muitos produtos industrializados destinados ao público infantil possuem uma baixa qualidade nutricional, a ANVISA deu um importante passo para a regulamentação da publicidade de alimentos não saudáveis com a publicação da resolução RDC 24/2010 que passa a exigir que “qualquer publicidade de alimentos com conteúdo excessivo de açúcar, sódio, gordura saturada ou gordura trans seja acompanhada de advertências sobre os prejuízos que o consumo em grandes quantidades destes alimentos pode trazer à saúde”.

Empresas transnacionais produtoras de bebidas e alimentos processados, dentre elas, Coca-Cola, PepsiCo, Nestlé, Kellogg, Kraft Foods, Unilever e Burger King, assinaram acordos coletivos, onde se comprometem junto aos países da União Europeia e dos Estados Unidos, a adotar medidas de restrição da publicidade dirigida ao público

infantil. Porém, em outros países, inclusive no Brasil, não existe nenhum tipo de acordo entre estas indústrias e os Governos (GOMES; CASTRO; MONTEIRO, 2010).

2.3 Cereais Matinais

Segundo a Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005, da ANVISA, que aprova o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos, entende-se por cereais processados os produtos obtidos a partir de cereais laminados, cilindrados, rolados, inflados, flocados, extrudados, pré-cozidos e ou por outros processos tecnológicos considerados seguros para produção de alimentos, podendo conter outros ingredientes desde que não descaracterizem os produtos. Podem apresentar cobertura, formato e textura diversos.

Os cereais matinais são produtos extrudados e que possuem em sua composição nutricional um alto teor de proteína, carboidratos e fibras, podendo ser enriquecidos com vitaminas e sais minerais aumentando seu valor nutritivo (TAKEUCHI; SABADINI; CUNHA, 2005). Sob o aspecto tecnológico, entende-se por extrusão termoplasmática o processo contínuo, onde o cisalhamento mecânico se combina com o calor, com a finalidade de gelatinizar o amido e desnaturar a matéria protéica, resultando em uma plastificação e reestruturação para obtenção de produtos com diversas texturas e formas (EMBRAPA, 2006).

Esse processo teve origem na indústria de plásticos, onde muitos modelos e teorias foram desenvolvidos com polímeros. Porém, em 1935, o método foi aplicado para a extrusão contínua de massas alimentícias, sendo o seu uso, desde então, aumentado significativamente nas indústrias alimentícias, principalmente naqueles processos tecnológicos que necessitam de um cozimento ou gelatinização do amido, como por exemplo, na fabricação de "snacks" e cereais matinais (HARPER, 1981).

O extrusor de alimentos é descrito como um reator de fluxo contínuo, que funciona com uma combinação de altas temperaturas e pressão variada com a força de cisalhamento e, com conteúdos de umidade relativamente baixos, sendo assim, capaz de processar biopolímeros e misturar ingredientes diversos (CHEN et al., 1991). Para o controle deste processo, existem as variáveis que são independentes, que compreendem aspectos como os ingredientes, umidade da matéria-prima, geometria e velocidade do parafuso, configuração da matriz, temperaturas das jaquetas, pré-condicionamento e taxa de alimentação. Além dessas, existem as variáveis dependentes, que incluem a viscosidade, taxa de cisalhamento, taxa de fluxo, pressão, energia, tempo de residência, temperatura e características do produto. Por possuir inúmeras variáveis o seu controle é complexo (EMBRAPA, 2006).

Sob o aspecto nutricional, os cereais matinais possuem como principal componente o amido. Durante o processo de extrusão, os grânulos de amido são gelatinizados e/ou retrogradados e influem diretamente na qualidade do produto final, principalmente na textura. Os conteúdos de amilose e amilopectina do amido são conhecidos por terem um efeito direto na expansão do extrudado, sendo que os cereais que possuem quantidades reduzidas de amilose possuem propriedades de expansão superiores aos ricos em amilose (CAMIRE et al., 1990).

Em relação ao conteúdo protéico, observa-se um aumento na digestibilidade da proteína de cereais extrudados, devido à desnaturação, principal modificação físico-química. O valor nutricional dos lipídios pode ser afetado durante a extrusão, devido às reações que esta molécula pode sofrer, como, por exemplo, oxidação, hidrogenação, isomerização ou polimerização (EMBRAPA, 2006).

2.4 Consumo de Corantes Artificiais X Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade Infantil

Recentemente, debates acerca da segurança alimentar para a saúde do homem a cerca dos ingredientes e das tecnologias empregadas pelas indústrias de alimentos têm se tornados comuns. Como exemplo, podem-se citar, as controvérsias sobre o uso de irradiação no processamento de alimentos, riscos de contaminação de resíduos de embalagens plásticas em alimentos e bebidas, uso de antibióticos e hormônios nas indústrias de carnes e o desenvolvimento de alimentos geneticamente modificados (KLEINMAN; BROWN; CUTTER, 2011).

Dentro dessa realidade de produção alimentícia, impulsionada pelo avanço no consumo de alimentos industrializados, o uso de aditivos, com o intuito de deixar o produto mais seguro e mais agradável sensorialmente ao consumidor, também gera controvérsias no âmbito científico. Mesmo por que, a ingestão de alimentos é a principal via de exposição humana a diferentes substâncias químicas que hoje são encontradas em diversos alimentos. Muitas substâncias que estão presentes nos alimentos, tanto as adicionadas quanto às produzidas através de reações ao longo do processo produtivo, já foram testadas quanto à toxicidade e possíveis relação com alergias e mutagenicidade, além de estar relacionado com o aparecimento de transtorno do déficit de atenção e hiperatividade em crianças (ANTUNES; ARAÚJO, 2000; POLLOCK; WARNER, 1990; POLONIO; PERES, 2009; SCHAB; TRINH, 2004, ZEIGER, 1993).

Um levantamento feito pela Autoridade de Saúde de Wycombe, uma cidade da Inglaterra, sobre os principais sintomas das reações alimentares, comparados às médias nacionais pode ser visualizado na Tabela 02. Esse fato foi relacionado ao tipo de população que foi selecionada para ambos os estudos. Porém, Altman e Chiaramonte (1996) defendem a ideia de que os hábitos sociais e culturais interferem na prevalência dos sintomas relatados em casos de alergias alimentares.

Tabela 02 Principais sintomas associados a alergias alimentares

Sintomas	Wycombe (%)	Inglaterra (%)
Prurido	16,2	14,9
Eczema	17,9	14,7
Urticária	7,8	6,2
Angioedema	8,0	6,3
Asma	14,9	14,4
Febre	28,6	24,8
Dor no estômago	7,7	9,2
Dor nas articulações	15,0	16,3
Desordens comportamentais	13,0	14,2
Enxaqueca	20,5	20,1

Fonte: YOUNG et al., 1994

Assim, a inocuidade dos alimentos tem que ser testada, com o intuito de regulamentar o seu uso. Logo existem Órgãos Governamentais especializados na avaliação sistemática do potencial tóxico, de mutagenicidade e de carcinogenicidade

dos aditivos usados em alimentos, recomendando, ou não, após os resultados encontrados, o uso de determinados aditivos em alimentos específicos. Mais adiante, tal assunto será esclarecido com uma maior profundidade. (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

O primeiro registro da toxicidade de corantes alimentares ocorreu em meados de 1950, em um caso de diarreia em crianças depois do consumo de uma bala preta e laranja que foi distribuída entre esta população na época do Halloween nos Estados Unidos. Investigações da *US Food and Drug Administration* apontaram o efeito tóxico da bala com o corante Orange nº1, um corante do grupo azo. Desde então, a FAO/WHO começaram a testar a composição química destes corantes e sua toxicologia, diminuindo consideravelmente a lista de corantes artificiais que são permitidos o uso em alimentos (RADOMSKI, 1974).

Sob este aspecto das reações adversas que os aditivos podem apresentar no organismo humano, a população infantil representa o grupo mais vulnerável, e por isso, o foco da maioria das pesquisas hoje é esse. Essa vulnerabilidade ocorre pelo fato da ingestão destas substâncias ser maior, quando comparada ao peso corporal, na criança do que no adulto. Sem contar que, como o público infantil está no período de alto metabolismo, imaturidade fisiológica e desenvolvimento das suas defesas orgânicas naturais, essas substâncias químicas são metabolizadas de forma mais rápida e dificulta a excreção destas substâncias. Outro fato que ocorre, fazendo com que esse público seja mais susceptível, é a não capacidade de autocontrole no consumo de alimentos industrializados que sejam ricos em aditivos (POLONIO; PERES, 2009; SCHUMANN; POLÔNIO; GONÇALVES, 2008).

Uma pesquisa desenvolvida na Austrália por Williams, Stirling e Keynes (2004) sobre a percepção dos adultos sobre os principais perigos para a qualidade e segurança dos alimentos, o uso de aditivos e pesticidas na produção alimentar aparece com 28%, seguida da higiene dos alimentos e sua contaminação com 14% e os alimentos geneticamente modificados também com 14%. Esse fato demonstra que a população está cada vez mais preocupada com a segurança alimentar e o impacto do consumo de alimentos na sua saúde.

Os estudos dos efeitos carcinogênicos induzidos por substâncias químicas em humanos muitas vezes acabam sendo determinados através de estudos epidemiológicos, os quais possuem como característica o fato de serem realizados em longo prazo, com custo elevado e possuir um relativo baixo poder estatístico. Como alternativa a este estudo, ou muitas vezes usados de forma a complementar esses dados, estudos toxicológicos em animais de laboratório são realizados a fim de descobrir as propriedades químicas e carcinogênicas no organismo. Esses estudos possuem um alto custo e a contradição que o organismo humano pode não responder desta mesma forma. Além do fato de que, nos dias atuais, os estudos com animais não são uma unanimidade (ZEIGER, 1993).

Os estudos laboratoriais com espécies animais são realizados com o intuito de avaliar as respostas às quantidades elevadas da substância em teste, a velocidade e extensão do modo de desintoxicação, a tendência de acúmulo orgânico além das reações não tóxicas, como: hipersensibilidade, intolerância, idiosincrasia e carcinogênese. Há também a necessidade de investigação em pelo menos três espécies de animais para saber a possibilidade de toxicidade aguda e investigações no período de gravidez, a fim de descartar os efeitos teratogênicos (SALINAS, 2002).

O transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) se caracteriza pelo padrão persistente de desatenção e/ou hiperatividade / impulsividade. Seu diagnóstico não pode ser fechado caso os sintomas ocorram exclusivamente na presença de transtorno invasivo do desenvolvimento, esquizofrenia, outros transtornos psicóticos ou

se forem mais bem elucidados por algum outro transtorno mental que o paciente possa vir a apresentar (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1995).

Para que o diagnóstico de TDAH seja concluído, a recomendação mundial é o uso do questionário estabelecido pela American Psychiatric Association, conhecido como DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders). Esse diagnóstico tem como base o relato de múltiplos informantes, em especial pais e professores, pessoas estas que estão em contato com a criança em diferentes ambientes sociais. Como esse preenchimento ocorre de forma subjetiva e alguns estudos apontam para diferenças significativas em algumas respostas dos pais e professores, linhas de estudo defendem a necessidade e um julgamento clínico objetivo para a decisão diagnóstica (AMARAL; GUERREIRO, 2001; COUTINHO et al., 2007).

O DSM-IV subdivide os pacientes diagnosticados com TDAH em três diferentes grupos, a saber: o TDAH tipo predominantemente desatento, o TDAH tipo predominantemente hiperativo e o TDAH tipo combinado (COUTINHO et al., 2007; KLEINMAN; BROWN; CUTTER, 2011; VASCONCELOS et al., 2003). Mattos et al. (2005) validou a versão em português deste questionário para diagnosticar TDAH, o qual pode ser visualizado no Anexo 1.

Independentemente do subtipo do TDAH, esse transtorno é reconhecidamente a mais freqüente desordem comportamental durante a infância, sendo sua prevalência estimada de 2 a 12%, em todo o mundo, das crianças em idade escolar, sendo mais freqüente em crianças do sexo masculino e o seus sintomas são mais facilmente detectados a partir dos 7 anos de idade (AMARAL; GUERREIRO, 2001; KLEINMAN; BROWN; CUTTER, 2011; PELSSE; BUITELAAR; SAVELKOUL, 2009).

Outra questão relevante sobre o TDAH está sobre a associação deste transtorno com o diagnóstico de co-morbidades, como, por exemplo, transtorno desafiador opositivo, transtorno de conduta, transtorno de ansiedade, transtorno de humor e dificuldades de aprendizagem. Os tratamentos mais comuns para o TDAH incluem a terapia, a farmacoterapia e o uso de psicoestimulantes. Em 2003, cerca de 2,5 milhões de crianças nos Estados Unidos tomaram remédios para tratamento de TDAH. Como este número está crescendo nos últimos anos e, com base nos estudos que vêm sendo desenvolvidos, a indicação do tratamento dietético, com a diminuição da ingestão de corantes artificiais, vem sendo defendida pelos pesquisadores, pois assim ocorreria uma diminuição no consumo de medicamentos e, por consequência, em todos os efeitos colaterais dos mesmos, que incluem insônia, perda de apetite e até mesmo efeitos cardíacos (PELSSE; BUITELAAR; SAVELKOUL, 2009; SCHAB; TRINH, 2004; STEVENS et al., 2010).

No Brasil, vários estudos de prevalência de TDAH em escola vêm sendo desenvolvidos, sendo que Fontana et al. (2007) encontraram prevalência de 13% e Vasconcelos et al. (2003) uma prevalência de 17,1%, sendo que este último também realizou a classificação entre os três tipos de TDAH que existem, encontrando assim 39,1% do tipo predominantemente desatento, 23,2% do tipo predominantemente hiperativo e 37,7% do tipo combinado. Neste estudo, assim como já apontado no cenário mundial, a prevalência encontrada foi em crianças do sexo masculino e com idade entre 7 e 8 anos. Porém, vários estudos já demonstraram que estes percentuais podem sofrer influência da idade da amostra analisada, dos instrumentos e critérios de diagnóstico e, principalmente, da fonte das informações obtidas durante o processo de avaliação diagnóstica. Além disso, as taxas de prevalência tendem a ser mais elevadas quando estes estudos epidemiológicos são realizados apenas em amostras escolares, quando comparadas em amostras de comunidades.

Desde a década de 70, muitos estudos vêm sendo realizados para determinar a relação entre a ingestão de corantes artificiais e o aparecimento de hiperatividade, principalmente entre o público infantil. A maioria dos estudos é dividida basicamente em dois tipos: a eliminação de agentes da dieta que podem interferir no consumo; ou nos estudos farmacológicos. Os estudos que controlam a dieta são de condução mais complexa, uma vez que é muito difícil o controle de dieta de crianças, além do tempo de estudo de consumo ser muito extenso e a mensuração das respostas qualitativas e subjetivas (BATEMAN et al., 2004; ROSE, 1978; SCHAB; TRINH, 2004; SILBERGELD; ANDERSON, 1982).

Porém, a efetividade destas dietas especiais no tratamento de distúrbios comportamentais em crianças é bastante controversa, pelo fato dos alimentos serem matrizes de complexas substâncias químicas, como carboidratos, proteínas, gorduras, vitaminas, minerais e outras que podem ser adicionadas, como os aditivos, e que podem interferir de alguma forma no resultado esperado da pesquisa (CARTER et al., 1993; WENDER, 1986). Alguns estudos demonstram melhora no quadro clínico da hiperatividade em crianças submetidas a uma dieta isenta dessas substâncias, mas é preciso aprofundar os estudos nessa área, a fim de evitar que crianças sejam submetidas, sem necessidade, a uma dieta de exclusão muito rigorosa (POLONIO; PERES, 2009).

Vários estudos mostram uma IDA acima do recomendado para corantes artificiais por crianças. Esse fato é de bastante relevância devido aos efeitos deletérios à saúde, como neoplasias, mutagenicidade e alergias alimentares, a que essas substâncias estão relacionadas, conforme explanado na revisão desta pesquisa (POLONIO; PERES, 2009; TOLEDO; GUERCHON; RAGAZZI, 1992). No Brasil, são poucos os estudos sobre a toxicidade desses corantes, principalmente no público infantil.

Em um estudo recente, McCann et al. (2007) conseguiram correlacionar a ingestão de corantes artificiais por crianças de 3, 8 e 9 anos com o aumento dos sintomas de TDAH, salientando a importância de uma fiscalização mais eficiente e de uma necessidade de legislação específica para alimentos infantis que utilizem corantes artificiais. Neste estudo as crianças foram divididas em três grupos: o controle, o que consumiu uma mistura A de corantes (amarelo crepúsculo, azorrubina, tartrazina, ponceau 4R e benzoato de sódio) e o que consumiu uma mistura B de corantes (amarelo crepúsculo, azorrubina, amarelo quinoleína, vermelho 40 e benzoato de sódio). As crianças do estudo foram acompanhadas e avaliadas, sendo que as que consumiram as misturas de corantes apresentavam sintomas de hiperatividade em contrapartida às crianças do grupo controle que não apresentavam. A composição de cada mistura de corante administrada nos grupos pode ser observada nas Tabelas 03 e 04 para a mistura A e a mistura B, respectivamente.

Tabela 03 Composição da mistura de corante A usada na pesquisa de McCann et al. (2007)

MISTURA A		
Corante	Grupo de 3 anos	Grupo de 8 e 9 anos
Amarelo Crepúsculo	5,00 mg	6,25 mg
Azorrubina	2,50 mg	3,12 mg
Tartrazina	7,50 mg	9,36 mg
Ponceau 4 R	5,00 mg	6,25 mg
Massa Total dos Corantes Artificiais	20 mg	24,98 mg

FONTE: PINHEIRO, 2012

Tabela 04 Composição da mistura de corante B usada na pesquisa de McCann et al. (2007)

MISTURA B		
Corante	Grupo de 3 anos	Grupo de 8 e 9 anos
Amarelo Crepúsculo	7,50 mg	15,60 mg
Azorrubina	7,50 mg	15,60 mg
Amarelo de Quinoleína	7,50 mg	15,60 mg
Vermelho 40	7,50 mg	15,60 mg
Massa Total dos Corantes Artificiais	30 mg	62,40 mg

FONTE: PINHEIRO, 2012

Em um estudo feito no Brasil, Schumann, Polônio e Gonçalves (2008) avaliaram o consumo de corantes artificiais por lactentes, pré-escolares e escolares, com a aplicação de um questionário de frequência de consumo de alimentos, onde observou que muitos alimentos consumidos pelas crianças não eram destinados para este público especificamente e ricos em corantes artificiais, como, por exemplo, a gelatina. Nesta pesquisa foi feita uma estimativa de ingestão diária dos corantes amarelo crepúsculo e amaranto, observando que a maioria das crianças estaria excedendo a IDA para o amaranto e 20% excederia para o amarelo crepúsculo.

Hussain et al. (2006) também pesquisaram a exposição de crianças aos corantes artificiais no Kuwait, onde foi passado um recordatório de 24 horas de consumo de alimentos e elegeram os mais comumente ingeridos como as amostras de pesquisa de corantes artificiais, sendo os alimentos que mais frequentemente apareceram foram os biscoitos, bolos, sorvetes, balas, chips e snacks, chocolates, sucos, chicletes, jujubas e pirulitos. Destas amostras, 90% possuíam corantes artificiais permitidos pelas autoridades nacionais no Kuwait. Apenas uma pequena percentagem das amostras possuía corantes não permitidos, como, por exemplo, eritrosina e laranja G, sendo estes corantes identificados nas amostras de bala. Neste estudo também foi observado que a

IDA foi ultrapassada para os seguintes corantes: tartrazina, amarelo crepúsculo, azorrubina e vermelho rápido.

Na Índia, Rao et al. (2003) analisaram 1000 amostras de alimentos industrializados, sendo 700 na área urbana e 300 na área rural. Destas amostras, 93% e 95% das áreas urbana e rural, respectivamente, possuíam corantes artificiais permitidos pela legislação nacional, e 7% e 5% de corantes artificiais não permitidos. Os corantes não permitidos detectados nesta pesquisa foram o vermelho 40, amaranço e laranja II sendo detectados principalmente nas balas e produtos de confeitaria.

Sendo assim, é de suma importância um trabalho multidisciplinar para a detecção e tratamento do TDAH, passando por um acompanhamento da dieta desta criança, de forma que seja o mais pobre o possível em corante artificial (KLEINMAN; BROWN; CUTTER, 2011). Sob este aspecto, os estudos de consumo de aditivos alimentares podem servir de base para a elaboração de estratégias para a Vigilância Alimentar e Nutricional da população infantil, com a finalidade de reduzir o consumo dessas substâncias e promover hábitos alimentares saudáveis. Também se coloca o desafio de conhecer profundamente os riscos da ingestão continuada de aditivos alimentares para a saúde. Desafios imprescindíveis para o campo da saúde coletiva (POLONIO; PERES, 2009).

2.5 A Química do Corante Artificial

Os corantes artificiais fornecem ampla gama de cores, proporcionando todas as tonalidades do espectro visível de cores. Além disso, a maioria desse tipo de corante apresenta alta estabilidade, uniformidade na cor conferida, alto poder tintorial, isenção de contaminação microbiológica e custo de produção relativamente baixo (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2011).

Os corantes artificiais são divididos em quatro diferentes grupos, de acordo com as suas propriedades físicas e químicas: azo, trifenilmetanos, indigóides e xantenos. Dos corantes artificiais permitidos pela legislação brasileira, a divisão destes grupos fica da seguinte forma (PRADO; GODOY, 2003):

- Corantes do grupo AZO: amaranço, ponceau 4R, vermelho 40, azorrubina, tartrazina, amarelo crepúsculo;
- Corantes trifenilmetanos: azul patente V, verde rápido, azul brilhante;
- Corantes indigóides: azul de indigotina;
- Corantes xantenos: eritrosina

Aproximadamente 50% do total de corantes artificiais produzidos mundialmente pertencem à classe dos corantes azo, que possuem como característica marcante o fato de serem intensamente coloridos. Quimicamente, a característica comum destes corantes artificiais, como o próprio nome já diz, é a presença do grupo azo ($-N=N-$), grupamento químico este que permite a conjugação entre os anéis aromáticos, fornecendo assim um sistema estendido de deslocalização eletrônica, permitindo a absorção da luz na região do visível (NETTO, 2009).

Na maioria dos casos, a estrutura cromófora dos corantes azo possui um anel naftaleno ligado a um anel benzeno ou outro anel naftaleno, através da ligação azo ($Ar-N=N-Ar$), sendo estes grupos aromáticos responsáveis por características importantes como a solubilidade e a coloração. Esses anéis podem conter um ou mais grupos sulfônicos, que conferem hidrosolubilidade, além de promover uma melhor interação entre o corante e o produto no qual está sendo adicionado (DRAKE, 1975).

Os corantes do grupo Azo são derivados nitrosos reconhecidos como uma substância capaz de causar reações alérgicas como asma e urticária, e tem sido alvo de estudos de mutagênese e carcinogênese por produzir amina aromática e ácido

sulfanílico quando é metabolizado pela microflora intestinal, principalmente em crianças (ANGELUCCI, 1988). Essa característica carcinogênica é devido à formação do amino-azobenzeno, formada pela degradação do grupo azo. Assim, tentou-se eliminar essa característica introduzindo na estrutura química destes corantes grupamentos carboxílicos (COOH) ou sulfonados (SO₃H) em substituição aos grupamentos funcionais amina. Além de diminuir a ação carcinogênica, essa substituição tornava o corante mais hidrossolúvel, o que auxilia na eliminação deste pelo organismo, ficando o mesmo retido no organismo por menos tempo (LEDERER, 1990).

Para um melhor entendimento da estabilidade e da instabilidade dos corantes azo é preciso compreender sua estrutura química, para assim determinar qual a forma tautomérica ela se encontra. Acreditava-se que ambas as formas, tanto a azo, quanto a hidrazo coexistem em equilíbrio, porém estudos recentes realizados pelo Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular (NEEM) da Universidade Federal de Juiz de Fora, mostram evidências que os tradicionais corantes azo encontram-se sob a forma do tautômero hidrazo, sendo esta a forma mais estável (NETTO, 2009). As estruturas químicas dos corantes do grupo azo podem ser visualizadas a seguir (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2011).

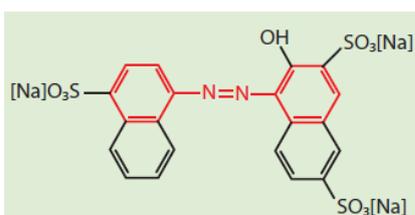


Figura 06 Estrutura química do corante amarantho

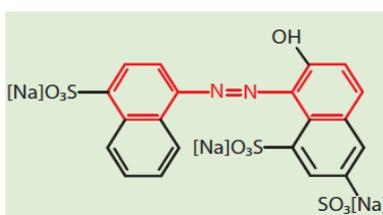


Figura 07 Estrutura química do corante ponceau 4R

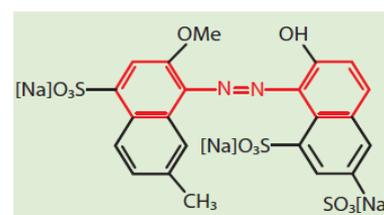


Figura 08 Estrutura química do corante vermelho 40

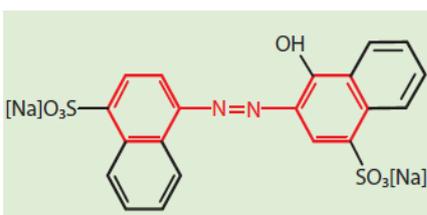


Figura 09 Estrutura química do corante azorrubina

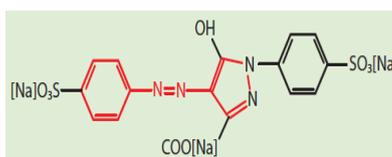


Figura 10 Estrutura química do corante tartrazina

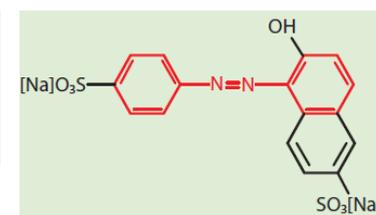


Figura 11 Estrutura química do corante amarelo crepúsculo

Os corantes trifenilmetanos se caracterizam por apresentar uma estrutura básica de três radicais arila, de forma geral grupos fenólicos, ligados a um átomo de carbono central. Além disso, apresentam grupos sulfônicos, os quais conferem a característica de alta solubilidade (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2011; NETTO, 2009; PRADO; GODOY, 2003). As estruturas químicas deste grupo de corantes artificiais são as seguintes (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2011):

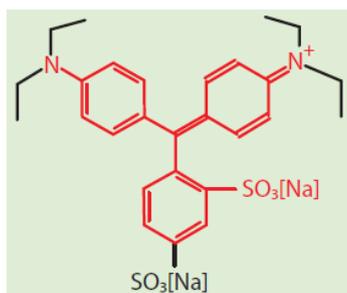


Figura 12 Estrutura química do corante azul patente V

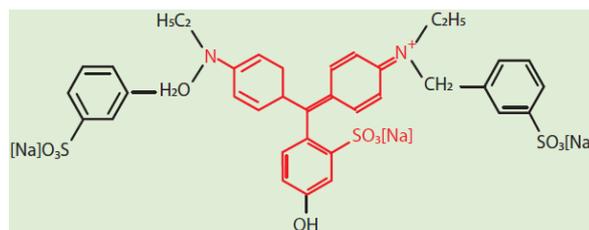


Figura 13 Estrutura química do corante verde rápido

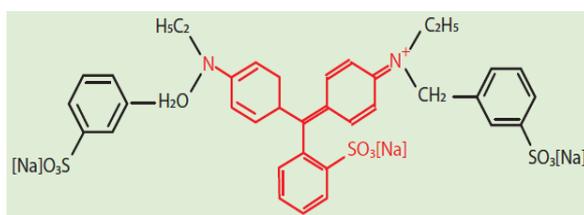


Figura 14 Estrutura química do corante azul brilhante

O único corante indigóide permitido o uso no Brasil é o azul de indigotina, que se caracteriza por possui uma estrutura tetrapólo como o sistema cromóforo desta classe (Figura 15). E por fim a eritrosina, único representante dos corantes xantenos permitido o uso no Brasil. O sistema cromóforo deste corante possui quatro anéis, sendo que um deles possui uma molécula de oxigênio, conforme pode ser visto na Figura 16 (ADITIVOS & INGREDIENTS, 2011; PRADO; GODOY, 2003).

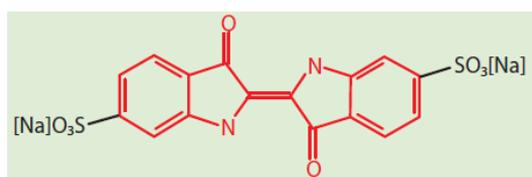


Figura 15 Estrutura química do corante azul de indigotina

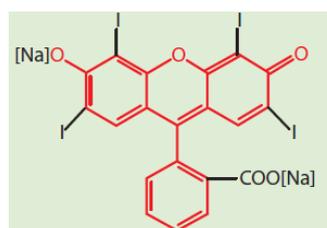


Figura 16 Estrutura química do corante eritrosina

Os principais corantes sintéticos artificiais são apresentados de forma sistematizada na Tabela 05.

Tabela 05 Principais corantes sintéticos artificiais

Corante	Origem	Estabilidade	Aplicação	Efeitos Adversos
Amarelo Crepúsculo	Sintetizado a partir da tinta do alcatrão de carvão e tintas azóicas	Boa estabilidade à luz, calor e ácido Descoloração na presença de AA e SO ₂	Cereais, balas, caramelos, coberturas, xaropes, laticínios, gomas de mascar	Alergia, urticária, angioedema e problemas gástricos
Azul Brilhante	Sintetizado a partir da tinta do alcatrão de carvão	Razoável estabilidade à luz, calor e ácido Baixa estabilidade oxidativa	Laticínios, balas, cereais, queijos, recheios, gelatinas, licores, refrescos	Hiperatividade em crianças, eczema e asma. Deve ser evitado por pessoas sensíveis à purina
Amaranto	Sintetizado a partir da tinta do alcatrão de carvão	Boa estabilidade à luz, calor e ácido Descoloração na presença de AA e SO ₂	Cereais, balas, laticínios, gelados, recheios, xaropes, preparados líquidos	Deve ser evitado por pessoas sensíveis à aspirina. Apresentou toxicidade em alguns estudos
Eritrosina	Tinta do alcatrão de carvão	Insolúvel em pH<5	Pós para gelatinas, laticínios, refrescos, geléias	Pode ser fototóxico. Em excesso pode causar hipertireoidismo
Indigotina	Tinta do alcatrão de carvão	Baixa estabilidade à luz, calor e ácido Baixa estabilidade oxidativa Descoloração na presença de AA e SO ₂	Goma de mascar, iogurte, balas, caramelos, pós para refrescos artificiais	Náuseas, vômitos, hipertensão, ocasionalmente alergia, prurido e problemas respiratórios
Ponceau 4R	Tinta do alcatrão de carvão	Boa estabilidade à luz, calor e ácido Descoloração parcial na presença de AA e SO ₂	Frutas em calda, laticínios, xaropes de bebidas, balas, cereais, refrescos, refrigerantes, sobremesas	Deve ser evitado por pessoas sensíveis à aspirina e asmáticos. Anemia e doença renal
Tartrazina	Tinta do alcatrão de carvão	Excelente estabilidade à luz, calor e ácido Descoloração na presença de AA e SO ₂	Laticínios, licores, fermentados, produtos de cereais, fruta, iogurtes	Reações alérgicas em pessoas sensíveis à aspirina e asmáticos. Insônia em crianças.
Vermelho 40	Sintetizado quimicamente	Boa estabilidade à luz, calor e ácido Corante vermelho mais estável na presença de AA	Alimentos à base de cereais, balas, laticínios, recheios, sobremesas, xaropes para refrescos, refrigerantes, geléias	Hiperatividade em crianças, eczema e dificuldades respiratórias
Azorrubina	----	Boa estabilidade à luz, calor e ácido	Alimentos fermentados, geléias, conservas, balas	Associado ao aparecimento de câncer
Azul Patente	----	Excelente estabilidade à luz, calor e ácido Descoloração na presença de AA e SO ₂	Bebidas isotônicas, gelatinas, balas, chicletes	Pode causar reações alérgicas, cocietas, náuseas, hipertensão
Verde Rápido	----	Razoável estabilidade à luz, calor e ácido Baixa estabilidade oxidativa	Bebidas à base de chá verde, balas, chicletes, ervilhas em conserva, gelatinas, molhos	Em testes biológicos apresentou efeitos carcinogênicos e mutagênicos. Também é irritante para os olhos, pele, trato digestivo e respiratório

AA = Ácido Ascórbico

SO₂ = Dióxido de Enxofre

FONTE: BARROS; BARROS, 2010; NETTO, 2009.

As características, físicas e químicas, dos principais corantes artificiais mais usados, permitidos no Brasil, são apresentadas, de forma resumida, na Tabela 06.

Tabela 06 Propriedades dos corantes artificiais mais utilizados no Brasil

Nome usual	Tartrazina	Amarelo Crepúsculo	Azorrubina	Amaranto	Ponceau 4R	Eritrosina	Vermelho 40	Azul Patente V	Azul Indigotina	Azul Brillhante	Verde rápido
Nome Químico	Sal trisódico 5-hidroxi-1(4-sulfofenil)-4[(4-sulfofenil)azo]-pirazole-3-carboxilato	Sal disódico 6-hidroxi-5-[(4-sulfofenil)azo]-naftaleno-2-sulfonato	Sal disódico 4-hidroxi-3-[(4-sulfo-1-naftil)azo]-naftaleno-1-sulfonato	Sal trisódico do ácido 3-hidroxi-4-(4-sulfo-1-naftilazo)-naftaleno-2,7-disulfonato	Sal trisódio 7-hidroxi-8-(4-sulfo-1-naftilazo)-naftaleno-1,3-disulfonato	Sal disódico 2,4,5,7-tetraiodo fluoresceína	Sal disódico de 1-(2-metoxi-5-metil-4-sulfofenil - azo)-2-naftol-6-sulfonato	Sal de cálcio di-4[dietilamino ciclohexa-2,5-dienilideno-(4-dietilaminofenil) metil]-6-hidroxibenzeno-1,3-di-sulfonato	Sal disódico do ácido 5,5'-indigotino sulfonato	Sal trisódico de 4',4''-di(n-etil-3-sulfonatobenzil amino)-trifenil metil-2-sulfonato	Sal trisódico 4-[4-(n-etil-p-sulfobenzil amino)-fenil]-(4-hidroxi-2-sulfofenil-metileno)-1-(n-etil-n-p-sulfobenzil)-Δ2,5-ciclohexa dienimina trifenilmetano
Classe	monoazo	monoazo	monoazo	monoazo	Monoazo	xanteno	monoazo	trifenilmetano	indigóide	trifenilmetano	trifenilmetano
Fórmula	C ₁₆ H ₉ N ₄ Na ₃ O ₉ S ₂	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	C ₂₀ H ₁₂ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	C ₂₀ H ₆ L ₄ Na ₂ O ₅	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ S ₂	C ₂₇ H ₃₁ N ₂ Na ₂ O ₆ S ₂	C ₁₆ H ₈ N ₂ Na ₂ O ₈ S ₂	C ₃₇ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₉ S ₃	C ₃₇ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₁₀ S ₃
Massa Molar	534,35781	452,36374	502,42354	604,46361	604,46361	879,86194	496,41674	566,66147	466,34734	792,84314	808,84254
CAS Number	1934-21-0	2783-94-0	3567-69-9	915-67-3	2611-82-7	16423-68-0	25956-17-6	3536-49-0	860-22-0	3844-45-9	2353-45-9
Color Index	19140	15985	14720	16185	16255	45430	16035	42051	73015	42090	42053
Código Brasil	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-127	E-129	E-131	E-132	E-133	E-143
Absorção Máxima	λ _{MAX} =426nm	λ _{MAX} =480nm	λ _{MAX} =515nm	λ _{MAX} =523nm	λ _{MAX} =505nm	λ _{MAX} =526nm	λ _{MAX} =502nm	λ _{MAX} =635nm	λ _{MAX} =610	λ _{MAX} =629nm	λ _{MAX} =625nm
Absortividade (em água)	E _{1cm} ^{1%} =527 Água 20	E _{1cm} ^{1%} =551 Água 19	E _{1cm} ^{1%} =545	E _{1cm} ^{1%} =438 Água 8	E _{1cm} ^{1%} =431 Água 25	E _{1cm} ^{1%} =1154 Água 9	E _{1cm} ^{1%} =556 Água 22	E _{1cm} ^{1%} =2000	E _{1cm} ^{1%} =498 Água 1,6	E _{1cm} ^{1%} =1637 Água 20	E _{1cm} ^{1%} =1560
Solubilidade (g/100 mL) a 25°C	Glicerina 18 Propileno 7 Etanol < 0,1	Glicerina 20 Propileno 2,2 Etanol < 0,1	Água 5-10 g/100mL a 19°C	Glicerina 1,5 Propileno 0,4 Etanol < 0,1	Glicerina 1,4 Propileno 1,4 Etanol 0,02	Glicerina 20 Propileno 20 Etanol 1	Glicerina 3 Propileno 1,5 Etanol 0,001	Água < 10	Glicerina 1 Propileno 0,1 Etanol < 0,1	Glicerina 20 Propileno 20 Etanol 0,15	Água < 10
IDA (mg/kg peso corpóreo)	7,5	2,5	4,0	0,5	4,0	0,1	7,0	15,0	5,0	10,0	10,0
Sinônimos	Tartrazine, FD&C Yellow N°5, Food Yellow N°4	Sunst yellow FCF, FD&C Yellow N°6, Food Yellow N°5	Carmoisine, Food Red 3, Acid ed 14	Amaranth, Food Red N°2, Bordeaus S	New coccine, Food Red 7, Food Re N°102	Erythrosine B, Food Red 14, Acid Red 18	Allura Red AC, Food Red 17	Acid blue 3, Patent Blue V, Food Blue 5	Indigo carmine, FD&C Blue N°2, Food Blue N°2	FD&C Blue N°1, Food Blue 2, Brilliant blue FCF	Fast green FCF, FD&C Green N°3, Food Green 3

FONTE: PRADO; GODOY, 2007.

2.6 Regulamentação do Uso de Corantes Artificiais em Alimentos

Sabe-se que o uso de aditivos químicos, inclusive dos corantes artificiais, é um dos mais polêmicos avanços da indústria de alimentos, devido a todos os aspectos toxicológicos relacionados a estas substâncias. Com o aumento da utilização dos aditivos, os países começaram a estabelecer legislações para controlar o seu uso, estabelecendo especificações e critérios de utilização (NETTO, 2009).

O primeiro registro regulatório para o uso de corantes ocorreu em 1906 nos Estados Unidos. Essa necessidade se deu pelo fato de que no início do século XX mais de 700 substâncias com poder corante existiam, sendo esta quantidade reduzida para 9 permitidos, sendo destes 2 de uso restrito (DOWNHAM; COLLINS, 2000; FALLICO et al., 2010; WALDORF, 1984). No Japão permite-se o uso de 11 corantes artificiais sintéticos, porém uma tendência neste país é a não utilização deste tipo de substância, onde já se observa que, apesar da permissão legal, muitas indústrias de alimentos optam por não utilizar esses corantes (PRADO; GODOY, 2003).

Já na União Européia (UE), após a sua criação, houve a necessidade de unificar o uso dos corantes permitidos pelas indústrias de alimentos nos diferentes países. Assim, chegou-se a uma lista de 17 corantes artificiais permitidos nos países membros. Porém alguns países, como a Noruega e a Suécia, proíbem o uso de corantes artificiais nos alimentos produzidos nestes (REYES; PRADO, 2001). A Agência de Alimentos do Governo Britânico, a Food Standard Agency (FSA), elaborou um documento onde defende que a UE proíba o uso de seis corantes artificiais (amarelo crepúsculo, tartrazina, ponceau 4R, azorrubina, vermelho 40 e amarelo quinoleína) devido à publicação da pesquisa de McCann et al. (2007), onde os corantes foram associados à hiperatividade infantil (CALDAS e MORAIS, 2010; FALLICO, et al., 2010).

No Brasil, a utilização de corantes artificiais foi regulamentada pela Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (SVS/MS). Assim, em 1977, essa Secretaria publicou a Resolução CNNPA nº 44, a qual estabelece as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos e bebidas. O Brasil internaliza a legislação nacional com base nos instrumentos harmonizados no Mercosul relacionados a aditivos alimentares, os quais podemos citar a Resolução GMC nº 19/93 (Lista Geral Harmonizada de Aditivos – Mercosul), Resolução GMC nº 14/93 (Lista Geral Harmonizada de Corantes – Mercosul), Resolução GMC nº 101/94 (Lista de Aditivos Alimentares com suas Classes Funcionais) e a Resolução GMC nº 38/01 (Incorporação de Aditivos nas Listas Harmonizadas). Assim, as legislações estão em constante aperfeiçoamento com base nas evoluções dos estudos e novas descobertas tecnológicas.

A SVS/MS aprovou em 1997 a Portaria nº 540, que estabelece o Regulamento Técnico para aditivos alimentares, com as devidas definições, classificação e emprego, os aditivos autorizados para o uso humano são divididos em 23 grupos, dentre estes se encontram os corantes artificiais. Esta portaria permite o uso dos seguintes corantes:

- Amarelo crepúsculo – INS 110
- Amarelo quinoleína – INS 104
- Azorrubina – INS 122
- Azul brilhante – INS 133
- Azul patente – INS 131
- Amaranto – INS 123
- Eritrosina – INS 127
- Indigotina – INS 132
- Marrom HT – INS 155

- Negro brilhante – INS 151
- Ponceau 4R – INS 124
- Tartrazina- INS 102
- Vermelho 40 – INS 129
- Verde sólido FCF – INS 143

O Sistema Internacional de Numeração (International Numbering System - INS) de Aditivos Alimentares foi elaborado pelo Comitê do Codex sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes de Alimentos para estabelecer um sistema numérico internacional de identificação dos aditivos alimentares nas listas de ingredientes como alternativa à declaração do nome específico do aditivo.

Em 5 de agosto de 1999, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o uso de aditivos alimentares estabelecendo suas funções e seus limites máximos para os diferentes grupos de alimentos, com a publicação das Resoluções nº 382, 383, 384, 385, 387 e 388. Os corantes artificiais permitidos em cada grupo de alimentos destas Resoluções podem ser visualizados na Tabela 07. A Resolução nº 386 aprova o regulamento técnico sobre aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções.

Tabela 07 Corantes artificiais permitidos em diferentes categorias de alimentos

Resolução	Categoria de Alimentos	Corantes Artificiais Permitidos
Resolução nº382/99	Molhos e Condimentos	Tartrazina – apenas para mostarda preparada com sinapis Alba
Resolução nº383/99	Produtos de Panificação e Biscoitos	Tartrazina, amarelo crepúsculo, azorrubina, ponceau 4R, vermelho 40, indigotina, azul brilhante, verde rápido
Resolução nº384/99	Gelados Comestíveis	Tartrazina, amarelo crepúsculo, azorrubina, ponceau 4R, vermelho 40, indigotina, azul brilhante, verde rápido
Resolução nº385/99	Cereais e Produtos de ou a Base de Cereais	Tartrazina, amarelo crepúsculo, ponceau 4R, eritrosina, vermelho 40, azul patente, indigotina, azul brilhante, verde rápido
Resolução nº387/99	Balas, Confeitos, Bombons, Chocolates e Similares	Tartrazina, amarelo crepúsculo, azorrubina, ponceau 4R, vermelho 40, indigotina, azul brilhante, verde rápido
Resolução nº388/99	Sobremesas	Tartrazina, amarelo crepúsculo, azorrubina, ponceau 4R, vermelho 40, indigotina, azul brilhante, verde rápido

FONTE: RDC 382/99, RDC 383/99, RDC 384/99, RDC 385/99, RDC 387/99 e RDC 388/99 (BRASIL, 1999).

Apesar do uso desses corantes serem permitidos pela legislação, não é descartada a possibilidade de efeitos adversos à saúde humana. Ainda não existe concordância em seu uso entre os países onde, por exemplo, nos Estados Unidos é proibido o uso de amaranço, azorrubina, ponceau 4R e azul patente enquanto na União Européia o uso de verde rápido não é permitido (ALISON; COLLINS, 2000).

Para fins de legislação e ação da Vigilância Sanitária, entende-se Dose Máxima de Uso como sendo a mais alta concentração de uso de aditivo alimentar que a Comissão do *Codex Alimentarius* tem determinado como sendo funcionalmente eficaz em um alimento ou categoria de alimentos, e que seja considerada inócua em relação ao consumo por seres humanos. Normalmente se expressa como miligrama de aditivo por quilograma de peso do alimento.

Com base nos constantes avanços nas pesquisas sobre os efeitos dos corantes sintéticos, a ANVISA, em 2007, aprovou a Resolução nº 60, que modifica alguns corantes permitidos para uso em cereais e produtos de ou a base de cereais. Na Tabela 08 estão descritos os nomes comerciais, os códigos de identificação utilizados no Brasil, a cor referente a cada corante, as IDA e os limites de restrição dos corantes para os cereais matinais:

Tabela 08 Relação dos corantes artificiais permitidos em cereais matinais no Brasil

Nome	Código	Cor	IDA (mg/kg de peso corpóreo)	Limite Máximo (g/100g)
Amarelo crepúsculo	E110	Laranja	2,50	0,03
Vermelho 40	E129	Vermelho alaranjado	7,00	0,02
Azul brilhante	E133	Azul turquesa	10,00	0,02

FONTE: RDC, 60/07 (BRASIL, 2007)

Outro aspecto legal de suma importância é a questão da rotulagem de alimentos embalados, aprovada no Brasil pela Resolução RDC 259/02 da ANVISA (BRASIL, 2002), a qual define parâmetros obrigatórios que devem constar nos rótulos de alimentos que são disponibilizados para o consumidor, de forma que o consumidor seja totalmente esclarecido sobre o produto que está adquirindo para o seu consumo.

Dentre as informações obrigatórias abordadas pela RDC 259/02 estão: denominação de venda do alimento; lista de ingredientes; conteúdos líquidos; identificação da origem; nome ou razão social e endereço do importador (caso o produto seja importado), identificação do lote, prazo de validade e instruções sobre o preparo e uso do alimento quando pertinente.

Em relação aos aditivos alimentares os mesmo deverão vir declarados como parte da lista de ingredientes, ao final da mesma, constando da função principal do aditivo e seu nome completo e/ou seu número INS. No caso de corantes artificiais, a embalagem deve apresentar, logo abaixo da designação do produto, a expressão: “colorido artificialmente”.

2.7 Princípios Básicos de Validação de Métodos Analíticos

O aumento do comércio de produtos alimentícios leva a uma crescente necessidade de desenvolvimento de métodos de análises que sejam, cada vez mais, confiáveis, eficientes e rápidos. Para os corantes artificiais não basta, simplesmente,

detectar a cor, mas cada corante, ou mistura desses, deve ser detectado e quantificado individualmente, o que tem sido dificultado, principalmente, pela falta de metodologias analíticas adequadas (PRADO; GODOY, 2003). Além disso, a regulamentação dos corantes e a necessidade do controle de qualidade do Governo sobre as empresas têm corroborado também para o desenvolvimento de novas técnicas analíticas capazes de responder a demanda do número de análises. Sendo assim, várias técnicas de separação, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG) e Eletroforese Capilar (EC) estão sendo usados para determinar qualitativa e quantitativamente os corantes artificiais (PRADO; GODOY, 2007). No Brasil muito ainda precisa ser feito para a validação de novos métodos analíticos para determinação de corantes artificiais em alimentos.

Para garantir a confiabilidade do método analítico, este deve sofrer uma avaliação também conhecida como validação. Segundo a Norma ISO/IEC 17025 (2005) validação:

“é a confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional”.

A validação assegura a aplicabilidade e a abrangência de um método analítico na rotina laboratorial, estabelecendo os limites dos parâmetros de qualidade das medidas instrumentais e da confiabilidade estatística, através da estimativa das figuras de mérito (RIBEIRO et al., 2008). Uma validação bem definida e documentada fornece às agências reguladoras evidências substanciais de que o método e os sistemas se adéquam ao uso desejado (PRESTES et al., 2007)

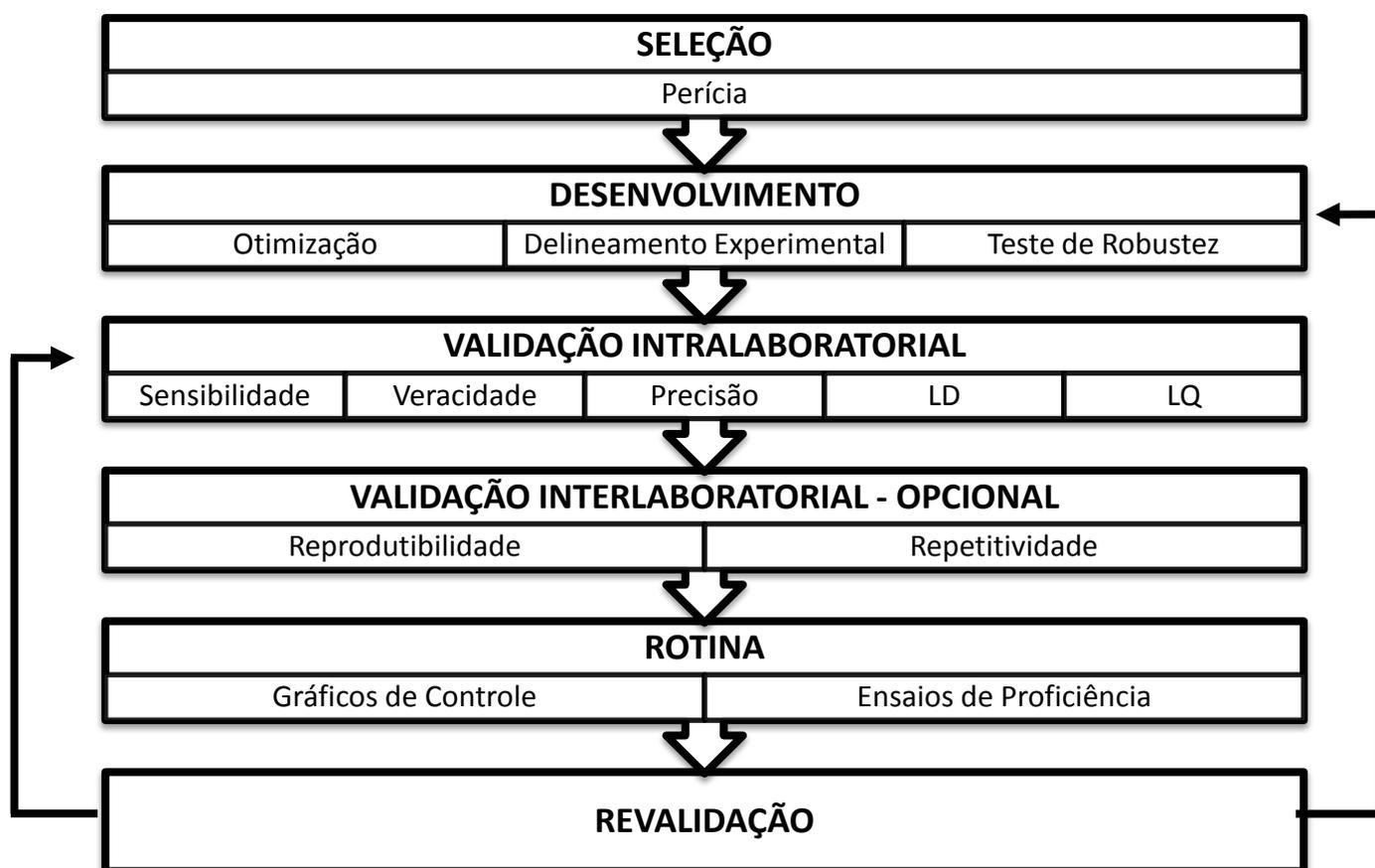
Com a finalidade de padronização destes procedimentos, as agências reguladoras dos Estados Unidos, Japão e União Europeia passaram a organizar, a partir da década de 90, a Conferência Internacional sobre Harmonização (International Conference on Harmonization – ICH), estabelecendo padrões nos procedimentos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Também na década de 90 a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) publica um guia de validação em química analítica (DANZER; CURRIE, 1998). Sob este contexto a ICH elabora um guia sobre validação de métodos (ICH, 1995; ICH, 1996). Dentre os órgãos internacionais que também possuem documentos técnicos que definem guias para validação de métodos analíticos podemos citar a IUPAC, AOAC (Association of Official Analytical Chemists), ISO (International Standard Organization) e US-FDA (United States Food and Drug Administration) (ANTIGNAC et al., 2003; GILBERT; ANKLAN, 2002; RIBANI ET AL, 2004).

Para que os laboratórios tenham capacidade técnica para executar um ensaio analítico devem se submeter a uma acreditação de agências credenciadoras, sejam estas de órgãos nacionais ou internacionais. No Brasil, hoje, essa acreditação é responsabilidade do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), o qual utiliza como ferramenta a orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008 de julho de 2011. A ANVISA também possui a Resolução ANVISA RE nº 899 de 29 de maio de 2003 como guia para o procedimento de validação de métodos analíticos.

A validação da metodologia analítica pode ocorrer de duas formas distintas: a validação intralaboratorial e a validação interlaboratorial. A validação intralaboratorial é indicada com a finalidade de validação de métodos novos que tenham sido

desenvolvidos no próprio laboratório ou para verificar a aplicação de método analítico adotado por outras fontes. Neste tipo de validação todas as figuras de mérito são mensuradas, com exceção da reprodutibilidade (THOMPSON et al., 2002). Já a validação interlaboratorial avalia todos os parâmetros de desempenho analítico, obtidos pelo estudo colaborativo, o qual envolve vários laboratórios acreditados (SOARES, 2001).

A validação de um método analítico é um processo constante e dinâmico. Todo o processo de validação tem que ser bem definido e documentado, resultando assim em documentos que forneçam evidências objetivas e contundentes de que a metodologia de medição desenvolvida ou adaptada está adequada ao uso pretendido. Assim, a validação deve ser bem planejada para poder ter, assim, uma execução satisfatória. Sob este contexto, Feinberg (2007) propõe o seguinte esquema para o que ele denomina como ciclo de vida de um método analítico:



Fonte: Feinberg, 2007

De acordo com o documento do INMETRO DOQ-CGCRE-08 (2011) os parâmetros que devem ser determinados no processo de validação variam de acordo com o tipo de ensaio. Para uma análise quantitativa de elementos menores e traços, há a necessidade de calcular a precisão, a seletividade, a recuperação, a robustez, a linearidade, a faixa de trabalho, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ).

Para que ocorra a validação propriamente dita se faz necessário o cumprimento de alguns parâmetros de desempenho analítico, conhecidos também como figuras de

mérito. Para definição destes parâmetros, de acordo com os guias dos órgãos citados, entende-se:

- Seletividade – é a capacidade de avaliar, identificar e distinguir um determinado analito na presença de componentes que podem interferir com a determinação em uma amostra complexa. Deve ser estudada em várias amostras, desde soluções padrão a mistura de elementos considerados interferentes. É o primeiro passo na validação de um método
- Linearidade – é a capacidade do método em fornecer resultados que seja diretamente proporcional à substância analisada, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Na maioria das vezes esta relação é expressa com a equação da reta e a confecção de uma curva analítica
- Precisão – representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, sob condições definidas, sejam repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões. Em validação é avaliada de três formas diferentes:
 - Repetitividade – representa a concordância entre resultados de medições sucessivas de um mesmo método e que sejam realizadas nas mesmas condições, como, por exemplo, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo local, mesmo instrumento de detecção
 - Precisão intermediária – representa a variabilidade dos resultados em um único laboratório devido ao efeito de variações, como, por exemplo, analista diferente, equipamento diferente, temperatura do ambiente diferente
 - Reprodutibilidade – é a concordância dos resultados de medição realizados por diferentes laboratórios. É o estudo de colaboração interlaboratorial
- Exatidão – é o grau de concordância entre os resultados obtidos em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro para aquela substância pesquisada
- Limite de Detecção (LD) – representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada
- Limite de Quantificação (LQ) – representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida utilizando determinada metodologia analítica
- Robustez – mede a sensibilidade que o método possui frente a pequenas variações

Ao final de todo procedimento de validação foi elaborado um Procedimento Operacional Padronizado (POP) (Anexo3), com todas as etapas que devem ser cumpridas para a determinação de corantes artificiais em cereais matinais. O POP se caracteriza pelo fato de ser o procedimento escrito e autorizado, introduzido na rotina de trabalho, fornecendo as instruções detalhadas para realização da determinação. Apresenta descrição detalhada de todas as operações necessárias para a realização de um determinado procedimento, ou seja, é um roteiro padronizado para realizar uma atividade.

A elaboração do POP de validação tem como objetivo proporcionar a compreensão da importância de todos os procedimentos e etapas, além de prover as informações necessárias ao estabelecimento desses procedimentos. Assim, o POP possui a importância no âmbito de garantia, mediante padronização, dos resultados esperados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente projeto tem como objetivo determinar a concentração de corantes artificiais em cereais matinais, contribuindo para avaliar a exposição de crianças entre 2 e 8 anos, além de elaboração e validação de metodologia para determinação de corantes artificiais nos cereais matinais.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar levantamento bibliográfico aprofundado sobre a toxicidade, uso e regulamentação dos corantes artificiais em cereais matinais;
- Realizar estudo de campo, com aplicação de Inquérito Alimentar para verificar a quantidade de cereais matinais consumidas pelas crianças, fazendo uma relação com risco de exposição aos corantes artificiais;
- Elaborar e validar metodologia analítica para determinação de teores de corantes artificiais em cereais matinais através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Determinar os teores de corantes artificiais nos produtos da pesquisa;
- Gerar dados para contribuir com a avaliação da exposição de crianças aos corantes artificiais;
- Elaboração do POP de procedimento da metodologia analítica proposta.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estudo Seccional

Para o delineamento populacional foi realizada uma pesquisa de campo, onde foi utilizado como ferramenta, para o estudo seccional em questão, um questionário de consumo, com a finalidade de se obter a frequência alimentar de cereal matinal, em uma amostra de conveniência.

4.1.1 Avaliação do Consumo

Para avaliação da quantidade de cereal matinal foi adaptado um questionário de consumo de alimentos validado por Collucci, Philippi e Slater (2004). Esse instrumento de avaliação apresenta como vantagens o fato de ser um instrumento de baixo custo e fácil de ser aplicado, podendo assim ser utilizado em estudos com grande número de indivíduos (Anexo 2).

A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (FIOCRUZ), e o projeto foi aprovado pelo referido comitê e registrado sob o número CAAE 0045.0.009.000-11. A participação das crianças estará condicionada à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento por seus pais e/ou responsáveis. O questionário deverá ser respondido pelos pais das crianças.

Obteve-se, através do questionário, a frequência do consumo e a quantidade ingerida pelas crianças do referido alimento pesquisado, foi calculada a IDA para os corantes encontram-se dentro do preconizado pela lei e então avaliou o risco ao qual as crianças encontravam-se expostas.

Para a inclusão ou exclusão dos inqueritos que foram utilizados na pesquisa foi observado o completo preenchimento da ficha distribuída aos responsáveis das crianças. Além disso, os critérios de aceitação do questionário observaram se o aluno está matriculado na referida escola, se possui a faixa etária descrita no projeto, à qualidade das respostas obtidas e o consentimento do responsável devidamente assinado.

4.1.2 Amostra de Conveniência

A amostra coletada foi uma amostra de conveniência, onde a avaliação do consumo foi realizada com crianças matriculadas na rede particular da cidade do Rio de Janeiro, que estavam dentro da faixa etária da pesquisa, que foi de 2 a 8 anos. O número total de crianças matriculadas na cidade, dentro da faixa etária do estudo, era de 434.818, sendo entrevistadas 895 crianças, sendo escolhido o sexo e a idade aleatoriamente, para posterior tabulação dos resultados obtidos.

O plano de amostragem utilizado na pesquisa foi elaborado de acordo com o preconizado na ISO 2859-1 para amostragem por inspeção por atributo (ISO, 1999).

Para o recrutamento em escolas particulares o projeto foi apresentado para a diretora/responsável pelo estabelecimento de ensino, onde foi elucidada a importância da participação das crianças e dos seus responsáveis para a pesquisa em questão. Posteriormente a direção da escola assinou uma autorização para que a pesquisa fosse realizada naquele local. Após a autorização concedida, foi anexado à agenda escolar do aluno o questionário, o qual os responsáveis dos alunos preencheram e devolveram à Direção. Posterior a isto, os questionários respondidos foram recolhidos e os resultados tabulados.

A faixa de idade entre 2 e 8 anos foi escolhida devido à orientação de Padovani et al. (2006), considerando crianças, para estudos nutricionais, os seres humanos que compreendem essa faixa etária.

4.1.3 Protocolo do Estudo Seccional

O estudo seccional teve início em janeiro de 2012, com a elaboração dos questionários, através de pesquisas de estudos publicados na área. A abordagem das escolas escolhidas para participarem do estudo ocorreu a partir de abril de 2012, assim que o Comitê de Ética aprovou a pesquisa, findando no mês de agosto, quando foi atingida a quantidade de questionários respondidos adequadamente.

Os formulários foram tabulados e classificados em escore alimentar de acordo com a frequência respondida pelo responsável da criança, por pontuações que variavam de 0 a 6 pontos (BARROS, 2010; FONSECA; CHOR; VALENTE, 1999).

4.1.4 Escore Alimentar

O escore alimentar constitui uma medida-resumo das frequências de consumo de diferentes alimentos, e por este motivo vêm sendo utilizados para caracterizar hábitos alimentares em estudos seccionais. Assim, por intermédio do escore, podendo agrupar indivíduos do estudo em semelhantes segmentos e classificá-los em relação ao risco em que ele pode estar exposto (FONSECA; CHOR; VALENTE, 1999).

Nesta pesquisa, o escore foi desenvolvido tomando como base o questionário de frequência alimentar dos cereais matinais, onde cada grupo foi tratado como variável ordinal e recebeu os seguintes valores: zero ponto, quando o indivíduo relatou que nunca consome; um ponto para o consumo menor de uma vez por mês; dois pontos para consumo entre uma vez e três vezes por mês; três pontos para o consumo de uma vez por semana; quatro pontos para consumo de duas a quatro vezes por semana; cinco pontos para consumo de uma vez ao dia; seis pontos para consumo de duas ou mais vezes por dia.

4.1.5 Análise dos Dados

Para a análise da frequência do consumo do cereal matinal pelo grupo de crianças de 2 a 8 anos foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis no nível de significância $\alpha = 0,05$, utilizando planilha do programa Excel-Windows® (SIEGEL; CASTELLAN JR, 2006).

4.2 Estudo Analítico

Todo o material utilizado na parte experimental laboratorial encontrava-se calibrado, em conformidade com a NBR/ISO/IEC/17025 (ABNT, 2005).

4.2.1 Alimentos analisados

Para determinação dos alimentos que foram utilizados nesta pesquisa foi realizado um trabalho de campo, em julho de 2011, com a leitura de rótulos dos cereais matinais presentes no comércio varejista. Então, logo após a pesquisa de campo, foram selecionados os cereais matinais que são voltados para o público infantil, que possuem declarados em rótulo, a presença de corantes artificiais, sendo dois sabores de frutas e

quatro sabores de chocolate. Os mesmos foram adquiridos em três mercados diferentes, nas regiões onde foram escolhidas as escolas para responderem os questionários.

Para a determinação da concentração dos corantes artificiais nos alimentos em questão foram adquiridos no mercado três diferentes lotes, de cada produto, para análise.

4.2.2 Vidrarias

- Balões volumétricos de 10, 100 e 1000 mL;
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3 e 20 mL;
- Microseringas de 100 e 1000 µL;
- Seringas hipodérmicas de 5 e 10 mL;
- Tubo de vidro graduado de 15 mL;
- Reservatório para fase móvel;
- Provetas de 50, 100, 250 e 1000 mL;
- Béquer de 100 mL;
- Tubos de polipropileno de 50 mL;
- Vials de vidro de 1 mL.

4.2.3 Equipamentos

- Balança analítica com resolução de 0,01 mg;
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) com modo de operação em gradiente;
- Detector UV/vis WATERS – 2487 (variável e com duplo comprimento de onda);
- Coluna de fase reversa SYMETRY[®] C₁₈ (dimensões: 150 mm X 3,9 mm – 4 µm D.I.);
- Coluna de guarda C₁₈;
- Cartucho de extração em fase sólida SEP-PACK[®] C₁₈;
- Cartucho contendo membrana filtrante hidrofílica de 0,45 µm (Millex[®]);
- Membrana filtrante hidrofílica de 0,45 µm;
- Banho ultrassônico;
- Banho-maria;
- Bomba de pressão a vácuo;
- Bloco de evaporação;
- Injetor automático WATERS 717 PLUS AUTOSAMPLER;
- Centrífuga;
- Banho maria até 100°C.

4.2.4 Padrões e Reagentes

- Amarelo Crepúsculo (90,00% de pureza);
- Vermelho 40 (80,00% de pureza);
- Azul Brilhante (65,00% de pureza);
- Ácido acético P.A.;
- Metanol grau cromatográfico;
- Acetato de amônio P.A.;
- Álcool iso-propílico P.A.;
- Hidróxido de amônio P.A.;

- Etanol 96%;
- Água desionizada tipo Milli – Q[®].

4.2.5 Condições Cromatográficas

A fase móvel foi constituída de uma solução de água / metanol 70:30 (v/v) e a fase de acondicionamento foi constituída de solução de acetato de amônio 0,08 M em água/metanol (70:30 v/v). Ambas foram filtradas em membrana hidrofílica de 0,45 µm e degaseificadas antes do uso. As análises foram efetuadas a uma temperatura de 25°C com fluxo de 0,5 mL/minuto e o volume de injeção de 20 µL. As análises foram fixadas em 20 minutos de duração, empregando detecção no ultravioleta a 475 e 600 nm.

4.2.6 Preparo da Amostra

A determinação dos corantes artificiais foi realizada pela extração do corante presente no alimento com solução alcoólica de amônia 10% (v/v) à ebulição repetidas vezes, seguida de centrifugação desta solução de corante obtida com posterior filtragem em membrana hidrofílica e o isolamento através da eluição de solução aquosa de álcool iso-propílico 60% (v/v) em cartuchos SEP-PACK[®] C₁₈. Após evaporação completa do álcool iso-propílico do eluato e diluição em água a amostra é analisada por CLAE.

4.2.6.1 Extração dos corantes contidos na amostra

Pesar 30 g da amostra, o equivalente a uma porção do cereal, separado por cores, triturar até obter um pó fino. Pesar 5 g da amostra homogeneizada, adicionar 20 mL de água desionizada e homogeneizar com o auxílio de um bastão de vidro. Adicionar 40 mL de solução alcoólica de hidróxido de amônio 10% e levar ao banho-maria, em ebulição, por 10 minutos. Retirar do banho-maria e deixar em repouso, até separar o precipitado, passar o líquido sobrenadante, vagarosamente, para outro béquer. Lavar o precipitado repetidas vezes, em banho-maria, de forma a completar o volume para 90 mL do filtrado ou até não sair mais cor no líquido sobrenadante. Centrifugar o líquido sobrenadante a 5000 rpm, por 20 minutos a fim de separar as fases e filtrar a parte líquida em membrana filtrante hidrofílica 0,45 µm. Avolumar o filtrado para 100 mL com água desionizada, em um balão volumétrico calibrado. Tomar 20 mL, em pipeta volumétrica calibrada, e levar para o tubo de ensaio graduado e evaporar a secura, avolumando a 5 mL com água desionizada. Levar ao ultrassom por 10 minutos a 27°C, para garantir a completa solubilização do corante na água.

4.2.6.2 Tratamento do cartucho SEP-PAK[®] C₁₈

Tratar o cartucho SEP-PAK[®] C₁₈ com 2 mL de álcool iso-propílico PA e em seguida com 5 mL de solução aquosa de ácido acético 1% (v/v).

4.2.6.3 Isolamento do corante

Passar os 5 mL da solução de extração do corante da amostra no cartucho SEP-PACK[®] C₁₈ tratado e, posteriormente extrair o corante que ficou retido com 10 mL de solução aquosa de álcool iso-propílico 60%. Evaporar todo o álcool, completar o volume de 10 mL com água desionizada e levar ao ultrassom por 10 minutos a 27°C, para garantir a completa solubilização do corante na água. Por fim, filtrar em cartucho contendo membrana filtrante hidrofílica de 0,45µm (Millex[®]) e analisar no cromatógrafo.

Por se tratar de uma matriz alimentar rica em fibra, e por esse nutriente ter a característica higroscópica, absorvendo assim a água, a extração dos corantes presentes nos cereais matinais foi realizada em meio alcoólico, levando a uma precipitação das moléculas de carboidrato e proteínas, quando submetida ao aquecimento em banho-maria, entre 60°C e 100°C (GARCIA; LINFANTE; RIVERA, 1997; MCCLEARY, 2003).

4.2.7 Validação do Método para Cereais Matinais

Todo o processo de validação desta pesquisa foi realizado de acordo com o procedimento operacional padronizado (POP) n.º 65.3120.126 (INCQS/FIOCRUZ, 2009), obedecendo as seguintes etapas:

1. Confecção a Curva Analítica;
2. Avaliação da Curva Analítica;
3. Seletividade (Efeito Matriz) – Desvio no resultado de uma medição analítica causada por interferência da matriz;
4. Repetitividade e Homogeneidade;
5. Precisão Intermediária – dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas;
6. Recuperação.

4.2.8 Análise Estatística

Os dados para validação da metodologia analítica proposta foram analisados seguindo o preconizado no POP n.º 65.3120.126 e para determinação da linearidade e dos limites de detecção e quantificação foi utilizada a planilha eletrônica desenvolvida por Bazílio et al (2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

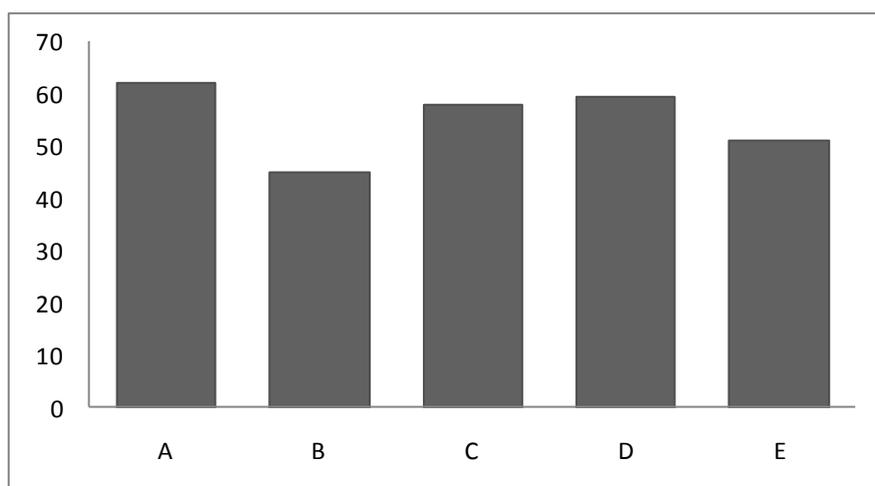
5.1 Estudo Seccional

Para a avaliação do perfil de consumo de cereal matinal foram distribuídos 1677 questionários, em cinco diferentes escolas de três distintas Coordenadoria Regional de Educação (CRE) da cidade do Rio de Janeiro, sendo avaliadas escolas localizadas na CRE 1, CRE 2 e CRE 3, dos quais 895 foram utilizados na tabulação dos resultados desta pesquisa por obedecerem a todos os critérios de aceite, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente assinado pelo responsável. Assim, tivemos 53% de adesão global dos questionários distribuídos. Na Escola A obteve-se 62% de adesão e comprometimento da escola na participação em distribuir e recolher os questionários, 45% na Escola B, 58% na Escola C, 60% na Escola D e 51% na escola E, conforme observado na Tabela 09. A representação gráfica da adesão das escolas pode ser observada no Gráfico 01.

Tabela 09 Adesão das escolas em relação aos questionários distribuídos e respondidos

Escola	Questionários Distribuídos		Questionários Respondidos	
	N	% do Total	n	% de Válidos
A	258	15	160	62
B	465	28	209	45
C	150	09	87	58
D	332	20	198	60
E	472	28	241	51
Total	1677	100	895	53

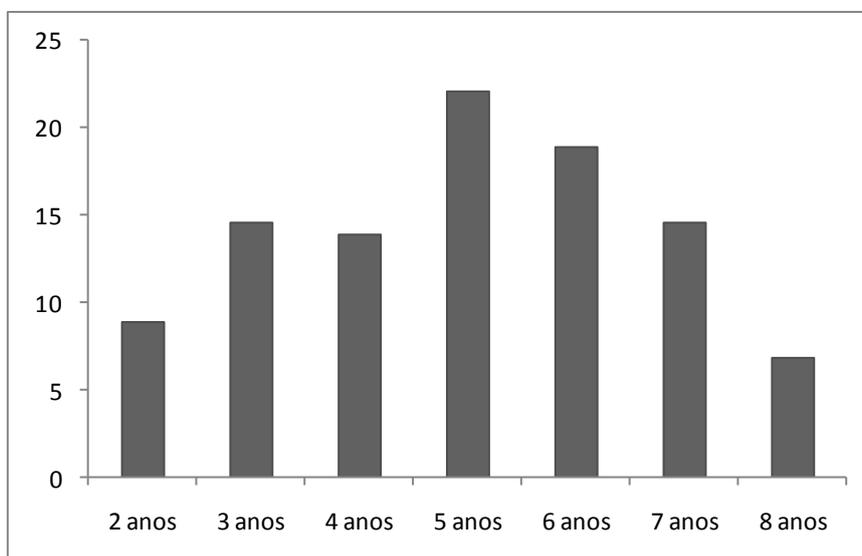
Gráfico 01 Adesão das escolas, em relação ao percentual de questionários respondidos



Em relação aos questionários respondidos, a divisão de idades do público pesquisado ficou da seguinte forma: 80 crianças (9%) com 2 anos; 131 crianças (15%) com 3 anos; 125 crianças (14%) com 4 anos; 198 crianças (22%) com 5 anos; 169

crianças (19%) com 6 anos; 131 crianças (15%) com 7 anos e 61 crianças (7%) com 8 anos. A representação gráfica desta distribuição etária pode ser observada no Gráfico 02.

Gráfico 02 Distribuição etária dos questionários respondidos, em percentual



Das 895 crianças que responderam corretamente os questionários, 422 eram do sexo feminino e 473 do sexo masculino, o que representa, respectivamente, 47% e 53%. Essa distribuição de acordo com o sexo apresenta uma pequena diferença quando estratificada em relação à idade, sendo que dentre as crianças de 2 anos a distribuição entre os sexos ficou em 50% feminino e 50% masculino; entre as crianças de 3 anos 43% feminino e 57% masculino; entre as crianças de 4 anos 47% feminino e 53% masculino; entre as crianças de 5 anos 46% feminino e 54% masculino; entre as crianças de 6 anos 46% feminino e 54% masculino; entre as crianças de 7 anos 50% feminino e 50% masculino; e entre as crianças de 8 anos 51% feminino e 49% masculino, conforme Tabela 10. A representação gráfica destes dados pode ser observada nos Gráficos 03 e 04.

Tabela 10 Distribuição de sexo e idade dos questionários respondidos

Idade	Feminino		Masculino	
	N	%	n	%
2 anos	40	50	40	50
3 anos	56	43	75	57
4 anos	59	47	66	53
5 anos	92	46	106	54
6 anos	78	46	91	54
7 anos	66	50	65	50
8 anos	31	51	30	49
TOTAL	422	47	473	53

Gráfico 03 Distribuição percentual, por sexo, dos questionários respondidos

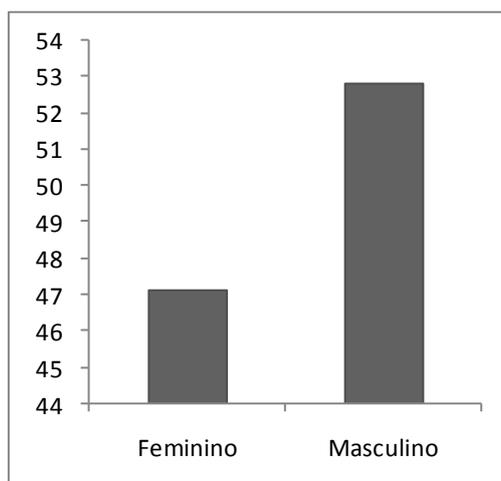
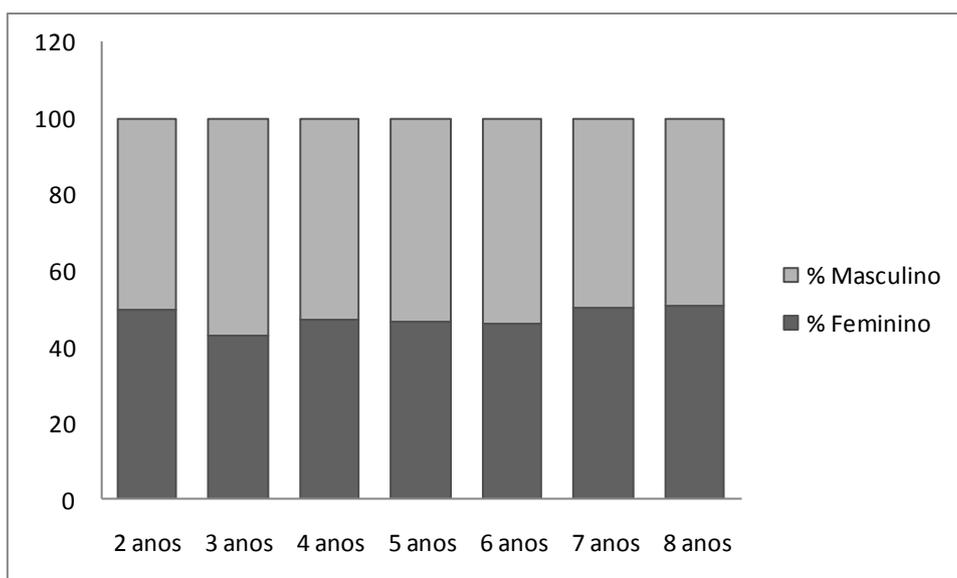


Gráfico 04 Distribuição percentual sexo \ idade



O consumo do cereal entre as crianças entrevistadas foi analisado de acordo com os escores descritos na metodologia desta pesquisa, separando-as por idade, conforme pode ser observada na Tabela 11.

Tabela 11 Distribuição da frequência de escore / idade

Idade (anos)	Frequência de Escore						
	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Escore 4	Escore 5	Escore 6
2	35	19	10	04	04	04	04
3	59	24	22	08	14	04	0
4	46	26	19	20	12	02	0
5	68	48	35	13	19	13	02
6	49	23	39	15	28	10	05
7	3	28	27	11	24	07	04
8	18	9	18	01	12	01	02

Assim, após a tabulação dos escores por idade, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, ao nível de significância $\alpha = 0,05$, onde se obteve um valor de qui-quadrado $\chi^2 = 28,4613$ e um valor de $p = 7,691E-05$, utilizando-se G. L. (grau de liberdade) 6, utilizando como ferramenta o Programa Excel[®] para análise dos resultados, conforme a seguinte fórmula:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{(R_j)^2}{n_j} - 3(N+1)$$

Onde:

N = número total de observações

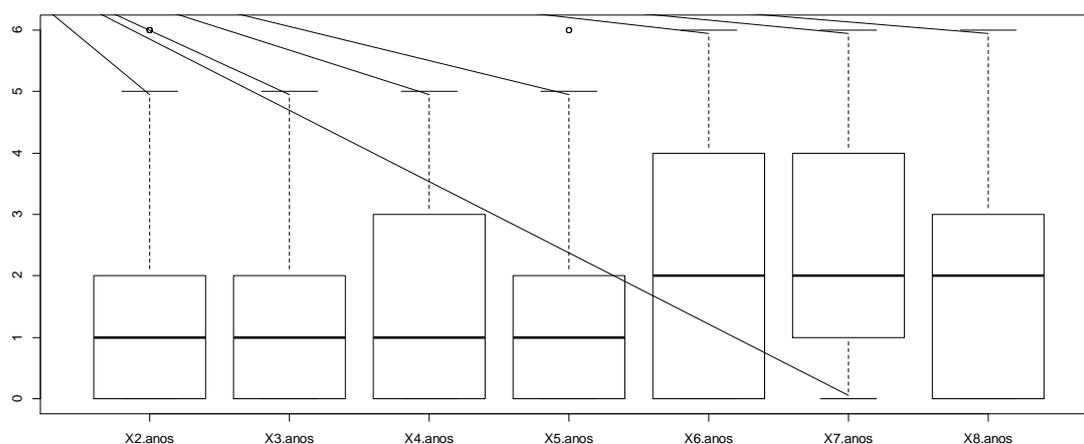
k = número de amostras

n_j = número de observações na j-ésima amostra

R_j = soma dos postos da j-ésima amostra

Sendo assim, o teste aponta que existe diferença entre a frequência das diferentes idades, uma vez que o valor de χ^2 tabelado é de 12,592, rejeitando-se H_0 . Essa distribuição de consumo por idade pode ser observada no Gráfico 05.

Gráfico 05 Distribuição dos escores de acordo com a idade



Após a aplicação deste teste não-paramétrico pode-se observar a distribuição de consumo em dois grandes grupos, sendo o primeiro grupo compreendido pelo consumo das crianças de 2 a 5 anos e o segundo grupo pelas crianças de 6 a 8 anos, onde a frequência de consumo do primeiro grupo é compreendido pelo escore 1 e a frequência de consumo do grupo 2 é compreendido pelo escore 2. Assim, foi aplicado novamente o teste de Kruskal-Wallis, ao nível de significância $\alpha = 0,05$, entre as idades de 2 a 5 anos, onde foi observado um valor $\chi^2 = 3,8121$ e um valor de $p = 0,2825$, utilizando-se G.L. 3, estando esse abaixo do χ^2 tabelado de 7,815, comprovando que não há diferença significativa entre a frequência de consumo deste grupo de idade.

O mesmo tratamento estatístico foi feito para o segundo grupo, o qual compreende as crianças de idade entre 6 e 8 anos, onde foram encontrados os valores de $\chi^2 = 0,6227$ e um valor de $p = 0,7325$, utilizando-se G.L. 2, estando esse abaixo do χ^2 tabelado de 5,991, comprovando que também não há diferença significativa entre a frequência de consumo deste grupo de idade.

Para a determinação da porção ingerida, em gramas, do cereal matinal em cada consumo da criança, foi estabelecido, laboratorialmente em triplicata, o peso das medidas caseiras utilizadas no questionário, assim como o desvio padrão e o coeficiente de variação. As porções propostas para o consumo do cereal foram: 1 xícara de chá cheia, ½ xícara de chá, 1 tigela, 1 prato raso, 1 prato fundo. Essa pesagem foi realizada no Laboratório de Técnica Dietética do Instituto de Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Nestas pesagens obteve-se a média de 34 gramas para a xícara de chá cheia; 18 gramas para a medida de ½ xícara de chá; 53 gramas para 1 tigela; 46 gramas para 1 prato raso; e 76 gramas para 1 prato fundo. Com essas medidas em grama foi possível calcular o consumo médio, em gramas, para, enfim correlacionar com o risco de exposição da criança ao corante artificial de acordo com a quantidade de corante artificial determinado analiticamente neste estudo. Todas estas medidas obtiveram um coeficiente de variação até 5%, conforme pode ser observado na Tabela 12.

Tabela 12 Medidas caseiras, em gramas, obtidas laboratorialmente

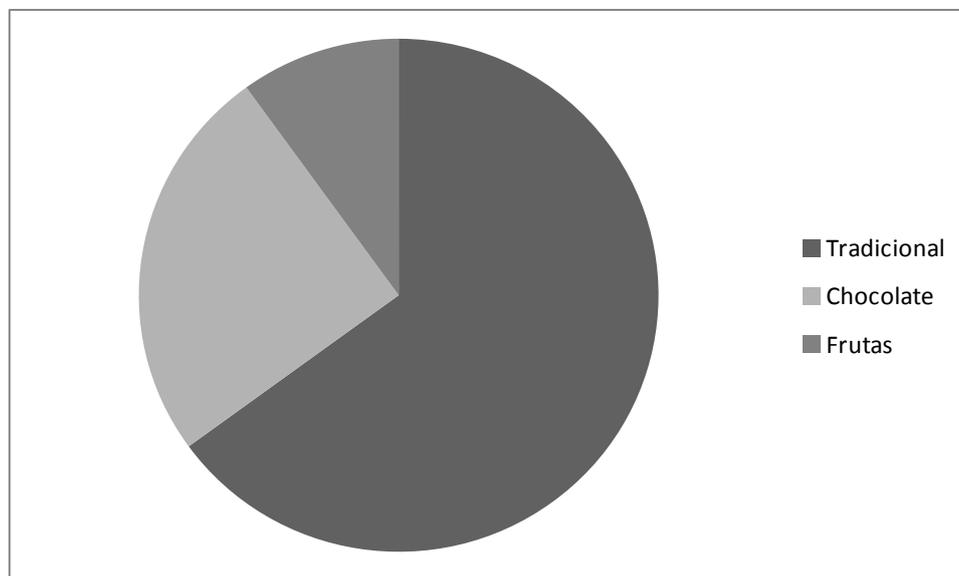
Pesagem	1 xícara de chá cheia	½ xícara de chá	1 tigela	1 prato raso	1 prato fundo
Peso 1 (g)	35,04	17,00	51,89	47,17	74,53
Peso 2 (g)	32,35	18,62	54,10	45,48	77,63
Peso 3 (g)	35,44	16,96	53,24	44,96	76,79
Média	34,28	17,53	53,08	45,87	76,32
DP	1,68	0,95	1,11	1,16	1,60
CV%	5	5	2	3	2

DP = desvio padrão

CV% = coeficiente de variação das medidas

Em relação ao sabor do cereal consumido pelas crianças entrevistadas, dentre as opções que existem no mercado, que são sabor tradicional, sabor chocolate e sabor frutas, obteve-se, respectivamente, 65%, 25% e 10%. Vale salientar que o cereal matinal sabor tradicional não utiliza para sua formulação os corantes artificiais, sendo compostos, de acordo com a declaração em rótulo, apenas do floco de milho extrudado e adoçado. Essa distribuição do sabor do cereal consumido pode ser observada no Gráfico 06.

Gráfico 06 Sabor do cereal consumido pelas crianças entrevistadas



5.2 Validação Intralaboratorial da Metodologia

A validação da metodologia ocorreu conforme o descrito no POP 65.3120.126 (INCQS/FIOCRUZ, 2009). Os resultados obtidos são descritos a seguir para os corantes permitidos pela Resolução n.º 60/2007 da ANVISA (BRASIL, 2007), a qual regulamenta que para cereais matinais é permitido o uso dos corantes amarelo

crepúsculo, vermelho 40 e azul brilhante. Logo, foi realizada a validação para estes três tipos de corantes.

5.2.1 Faixa de trabalho

Uma das premissas da validação é que o método deverá ser aplicável ao analito específico, à matriz específica e aos níveis máximos e mínimos específicos. Assim, a faixa aplicável mínima do método depende do nível específico (LM) que será avaliado, podendo ser expressa em termos de desvio padrão de reprodutibilidade (S_R) calculado pela equação de Horwitz (1995) e Thompson et al. (2002) ou em termos de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) (Codex Alimentarius, 2011). Para a validação do método analítico em questão foi calculada a faixa aplicável mínima, a partir do limite de restrição de cada corante, segundo recomendação da ANVISA descrita na Resolução 60/07, de 0,03g/100g do produto para o amarelo crepúsculo e de 0,02g/100g do produto para os corantes vermelho 40 e azul brilhante, levando em consideração o procedimento analítico proposto e a alíquota de análise em questão. Assim, a faixa aplicável mínima foi determinada através da seguinte fórmula:

$$LM \pm 0,06LM \times (LM)^{-0,1505}$$

A escolha desta fórmula se deu pelo fato da concentração final do analito em questão se encontrar acima de 0,1 mg/kg.

A próxima etapa do desenho experimental foi determinar o LD e o LQ. Entende-se por limite de detecção (LD) como a menor concentração do analito presente em uma amostra que está sendo analisada que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificada, nas condições experimentais estabelecidas (INMETRO, 2011). Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão nas condições experimentais estabelecidas. Para a determinação destes dois valores foram utilizadas as seguintes equações:

$$LD \leq \frac{1}{10} \times LM$$

$$LQ \leq \frac{1}{5} \times LM$$

A partir da determinação destes parâmetros foi determinada a faixa de trabalho para cada corante, sendo esta de 15 a 45 mg/L para o corante amarelo crepúsculo e de 05 a 35 mg/L para os corantes vermelho 40 e azul brilhante.

5.2.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade do método analítico, dentro de uma determinada faixa, de obter resultados que são proporcionais à concentração do analito na amostra, seja diretamente ou através de cálculos matemáticos (USPC, 1999). Assim, a linearidade do método analítico desenvolvido foi verificada a partir da elaboração de três curvas, com sete níveis de concentração, para cada corante, conforme metodologia proposta por Souza e Junqueira (2005). A partir dos valores achados para a faixa aplicável mínima foram estabelecidos os sete pontos de concentração da curva analítica, de forma que os mesmos fossem equidistantes. A partir do preparo da solução estoque, em triplicata para cada corante, tomou-se alíquotas para a confecção das soluções de trabalho nas concentrações específicas de cada corante logo, cada solução

estoque foi diluída, em água desionizada, a fim de se obter concentrações aproximadas de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 mg/L para o corante amarelo crepúsculo e concentrações aproximadas de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 mg/L para os corantes vermelho 40 e azul brilhante. Todas as soluções finais foram filtradas em membrana hidrofílica 0,45 µm. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (Souza; Junqueira, 2005) obtendo-se assim, a curva analítica de cada corante analisado. As curvas analíticas de cada corante podem ser observadas nos Gráficos 07, 08 e 09 para os corantes amarelo crepúsculo, vermelho 40 e azul brilhante, respectivamente.

Gráfico 07 Curva analítica do corante amarelo crepúsculo

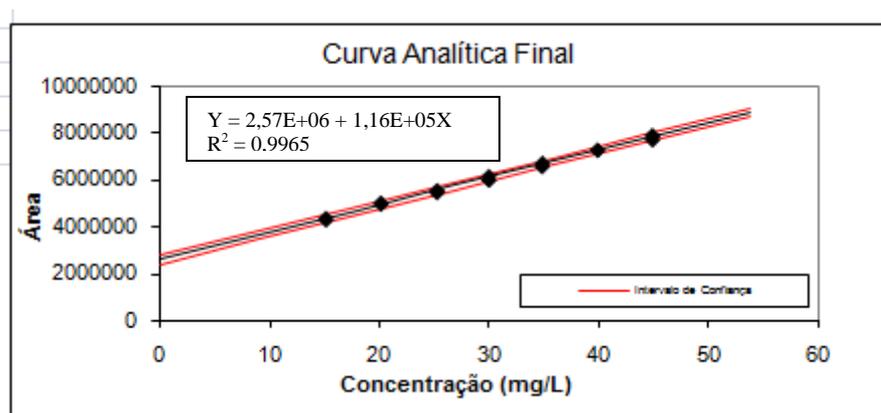


Gráfico 08 Curva analítica do corante vermelho 40

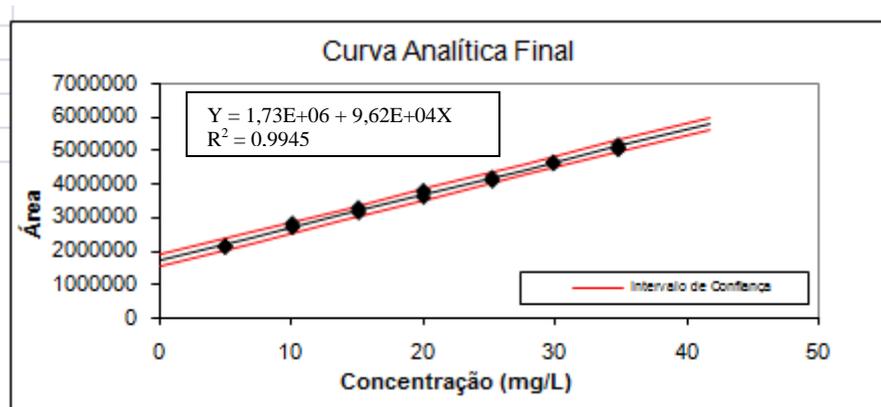
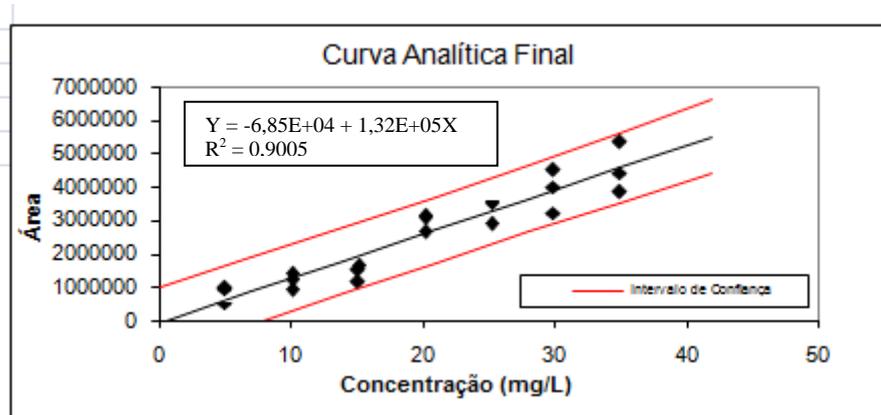


Gráfico 09 Curva analítica do corante azul brilhante



A representação gráfica dos resíduos pode ser observada nos gráficos 10, 11 e 12 para os corantes amarelo crepúsculo, vermelho 40 e azul brilhante, respectivamente.

Gráfico 10 Gráfico de resíduos do corante amarelo crepúsculo

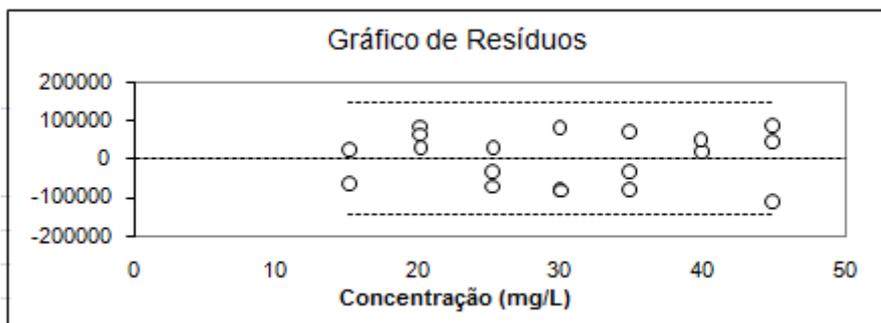


Gráfico 11 Gráfico de resíduos do corante vermelho 40

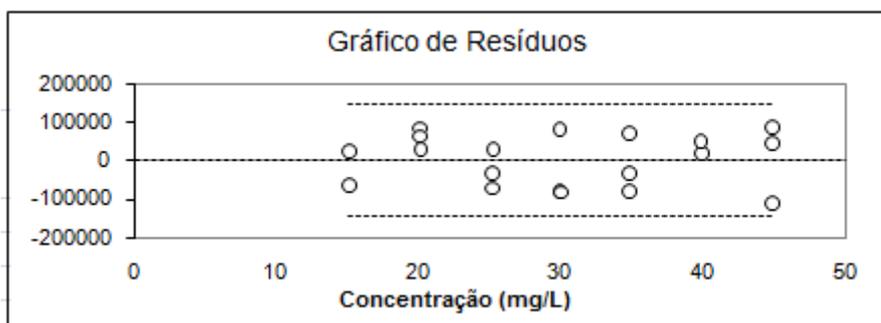
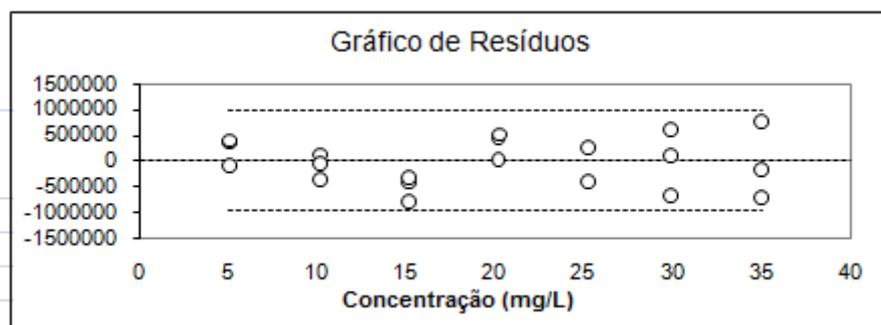


Gráfico 12 Gráfico de resíduos do corante azul brilhante



As curvas foram avaliadas quanto à linearidade conforme os testes estatísticos descritos na metodologia. Todos os testes realizados para a confecção da curva analítica, assim como os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), podem ser observados nas Figuras 17 e 18 para o corante amarelo crepúsculo, nas Figuras 19 e 20 para o corante vermelho 40 e nas Figuras 21 e 22 para o corante azul brilhante.

Foi realizado o teste de Jack-Knife para avaliação dos valores aberrantes, sendo que no caso do corante amarelo crepúsculo tiveram 2 dados rejeitados, porém não ultrapassou o limite estabelecido por Horwitz (1995) de 22,2% de dados rejeitados. Na avaliação de valores aberrantes dos corantes vermelho 40 e azul brilhante, não houve nenhum valor encontrado que fosse considerado aberrante.

Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner)	
Req	0,96
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95
Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson)	
d (calculado)	1,97
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,18
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,40
Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe)	
Variância Combinada	5,60E+09
t_L calculado	-5,63E-02
$t_{\text{tabelado}} (\alpha = 0,05)$	2,11E+00
p	9,56E-01

Figura 17 Avaliação da linearidade da curva padrão do corante amarelo crepúsculo

FONTE: BAZÍLIO et al., 2012

Estadísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)			
Coeficiente Angular (b):	1,1577E+05	Coeficiente Linear (a):	2,5682E+06
r	0,9982	R ²	0,9965
N	19	Graus de Liberdade	17

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)			
Limite de Detecção	1,59E+00	Limite de Quantificação	4,72E+00

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	2,32E+13	2,32E+13	4,82E+03	2,62E-22
resíduos	17	8,18E+10	4,81E+09		
Ajuste	5	1,77E+10	3,53E+09	6,62E-01	6,59E-01
erro puro	12	6,41E+10	5,34E+09		
total	18	2,33E+13			

Figura 18 Análise estatística, LD e LQ da curva padrão do corante amarelo crepúsculo
 FONTE: BAZÍLIO et al., 2012

Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner)	
Req	0,98
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson)	
d (calculado)	2,03
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,22
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,42

Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe)	
Variância Combinada	5,42E+09
t _L calculado	7,75E-01
t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$)	2,09E+00
p	4,48E-01

Figura 19 Avaliação da linearidade da curva padrão do corante vermelho 40
 FONTE: BAZÍLIO et al., 2012

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)			
Coeficiente Angular (b):	9,6213E+04	Coeficiente Linear (a):	1,7295E+06
r	0,9973	R ²	0,9945
N	21	Graus de Liberdade	19

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)			
Limite de Detecção	1,81E+00	Limite de Quantificação	5,38E+00

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	1,93E+13	1,93E+13	3,46E+03	5,80E-23
resíduos	19	1,06E+11	5,58E+09		
Ajuste	5	3,88E+10	7,76E+09	1,62E+00	2,19E-01
erro puro	14	6,72E+10	4,80E+09		
total	20	1,94E+13			

Figura 20 Análise estatística, LD e LQ da curva padrão do corante vermelho 40
 FONTE: BAZÍLIO et al., 2012

Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner)	
Req	0,99
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson)	
d (calculado)	1,91
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,22
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,42

Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe)	
Variância Combinada	2,17E+11
t _L calculado	-4,93E-01
t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$)	2,09E+00
p	6,28E-01

Figura 21 Avaliação da linearidade da curva padrão do corante azul brilhante
 FONTE: BAZÍLIO et al., 2012

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)					
Coefficiente Angular (b):	1,3241E+05	Coefficiente Linear (a):	-6,85E+04		
r	0,9490	R ²	0,9005		
N	21	Graus de Liberdade	19		
Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)					
Limite de Detecção	8,12E+00	Limite de Quantificação	2,37E+01		
ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,66E+13	3,66E+13	1,72E+02	5,70E-11
resíduos	19	4,04E+12	2,13E+11		
Ajuste	5	1,27E+12	2,55E+11	1,29E+00	3,24E-01
erro puro	14	2,77E+12	1,98E+11		
total	20	4,07E+13			

Figura 22 Análise estatística, LD e LQ da curva padrão do corante azul brilhante
 FONTE: BAZÍLIO et al., 2012

De acordo com a análise dos dados utilizados na confecção da curva analítica dos corantes em questão, observa-se que os dados seguem a distribuição normal, havendo homocedasticidade, a regressão é significativa e sem desvio da linearidade além de não haver autocorrelação dos resíduos. Sendo assim, o método de quantificação, de todos os três corantes, segue um modelo linear.

Podemos observar os cromatogramas de três pontos utilizados para a confecção da curva analítica, sendo escolhido para demonstração o ponto de menor concentração, o ponto central e o de maior concentração. No caso da determinação da curva analítica do amarelo crepúsculo, essa concentração equivale às concentrações de 15 mg/L, de 30 mg/L e de 45 mg/L, respectivamente, as quais são representadas pelas Figuras 23, 24 e 25. Já para os corantes vermelho 40 e azul brilhante estas concentrações equivalem às concentrações de 5 mg/L, de 20 mg/L e de 35 mg/L, respectivamente, e que estão representadas pelas Figuras 26, 27 e 28 para o vermelho 40 e pelas Figuras 29, 30 e 31 para o azul brilhante.

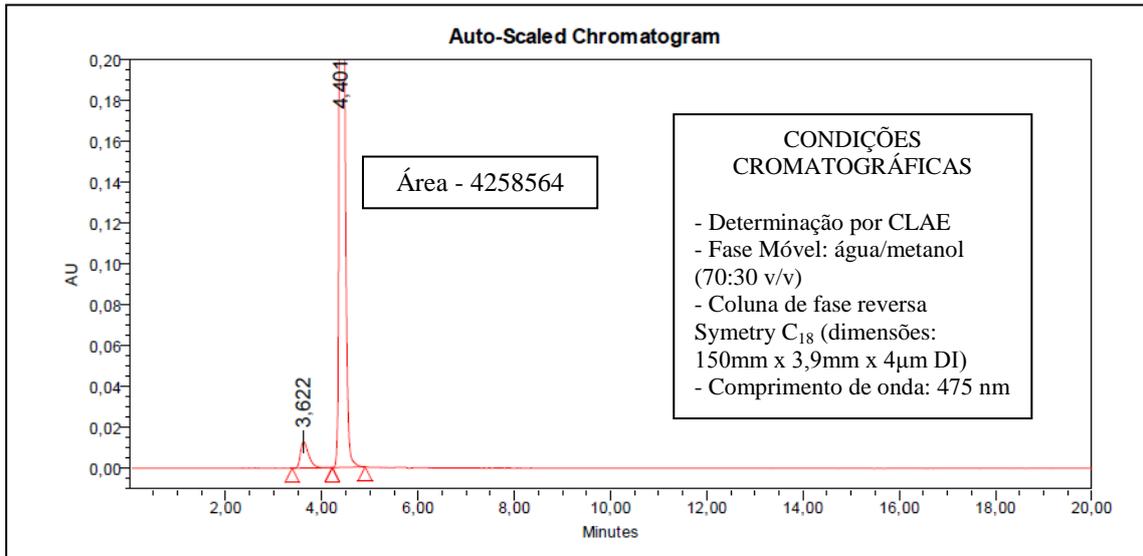


Figura 23 Cromatograma do amarelo crepúsculo na concentração de 15 mg/L

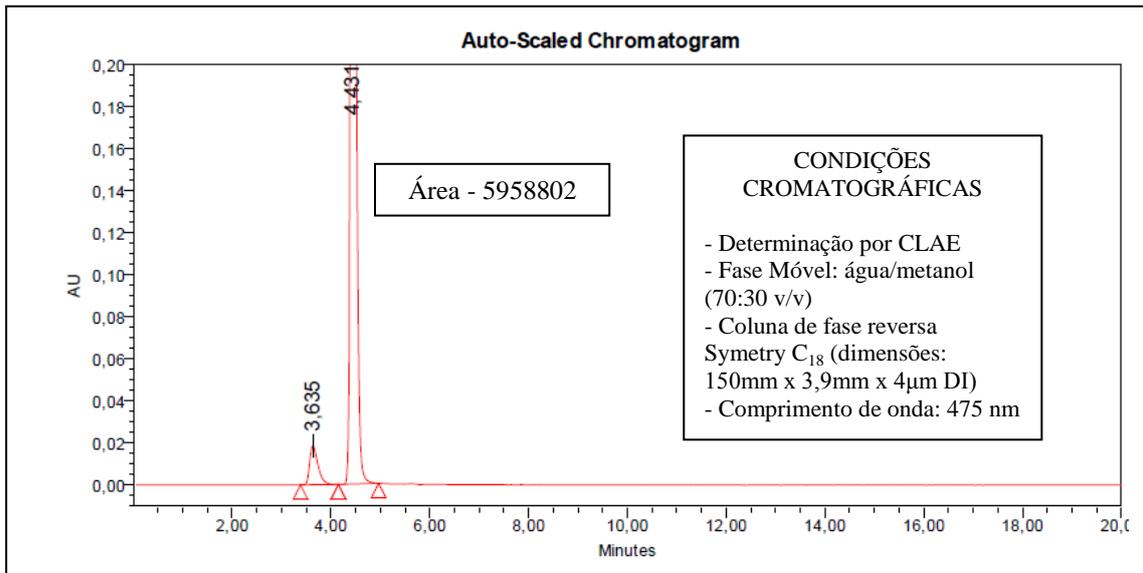


Figura 24 Cromatograma do amarelo crepúsculo na concentração de 30 mg/L

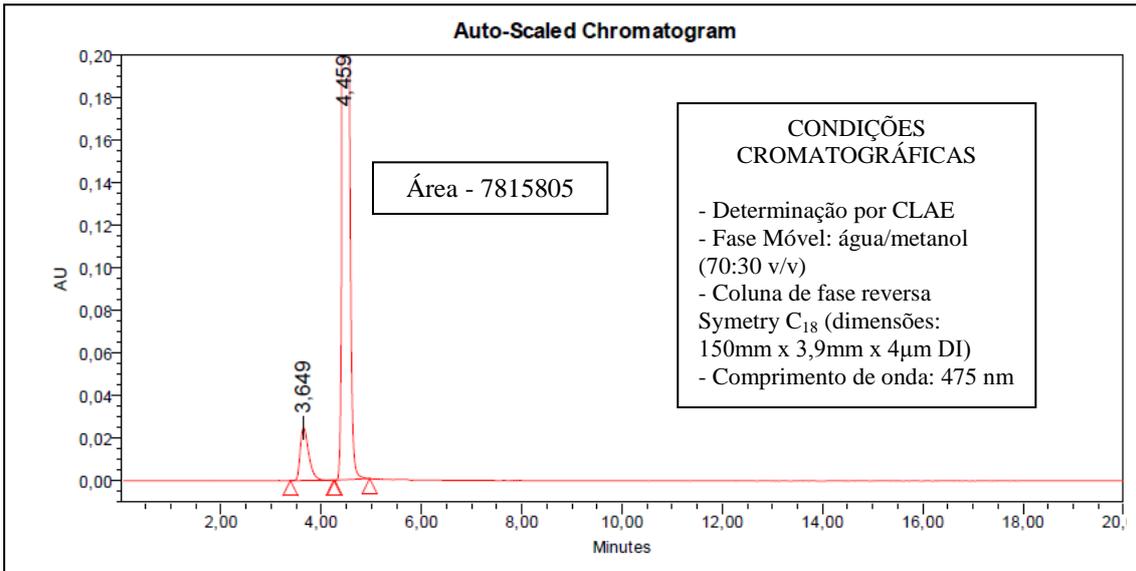


Figura 25 Cromatograma do amarelo crepúsculo na concentração de 45 mg/L

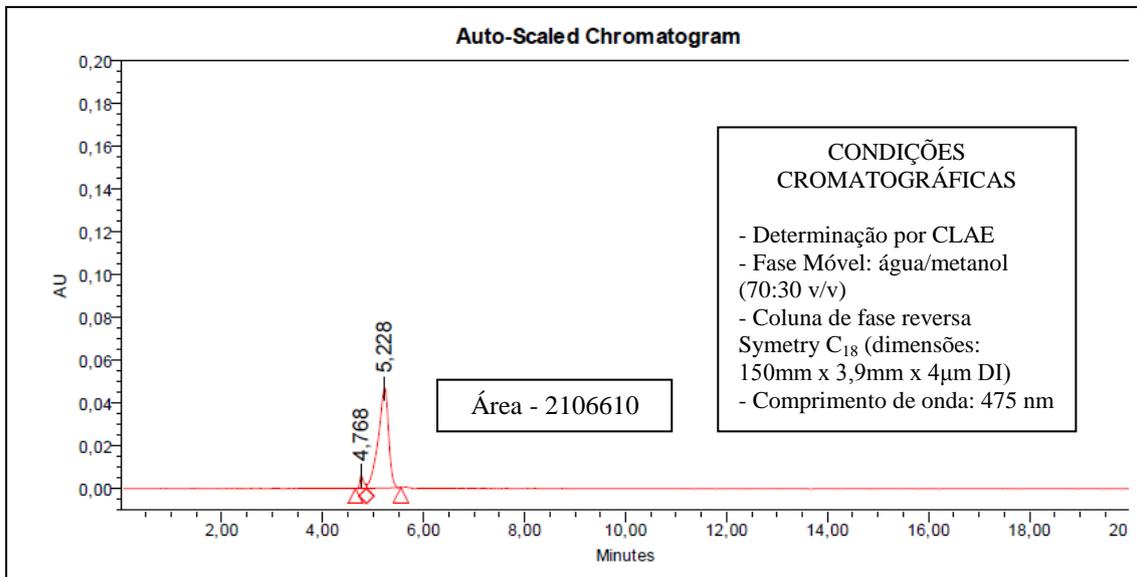


Figura 26 Cromatograma do corante vermelho 40 na concentração de 5 mg/L

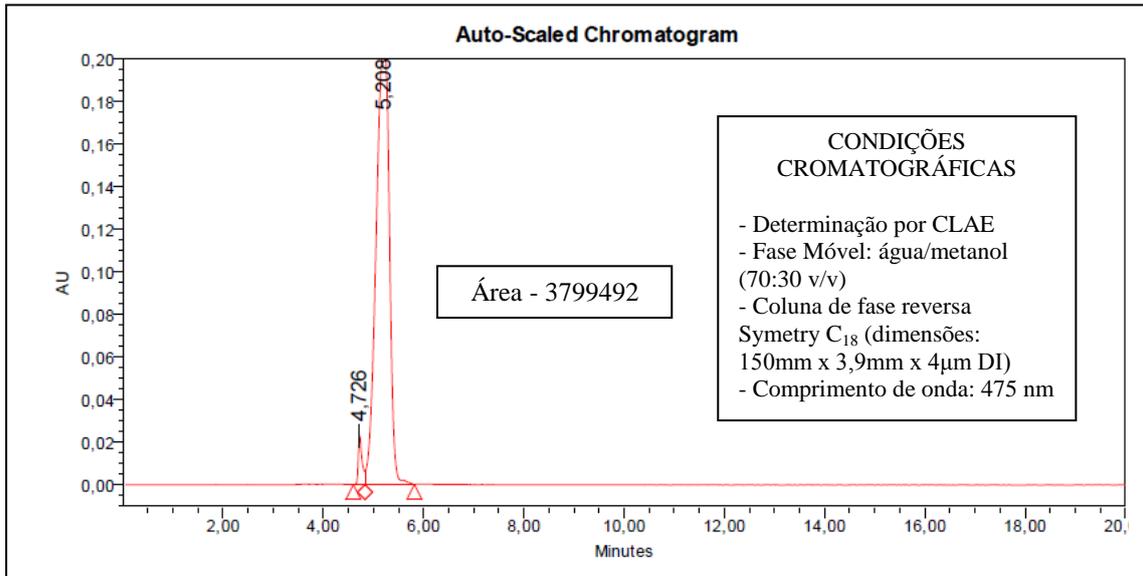


Figura 27 Cromatograma do corante vermelho 40 na concentração de 20 mg/L

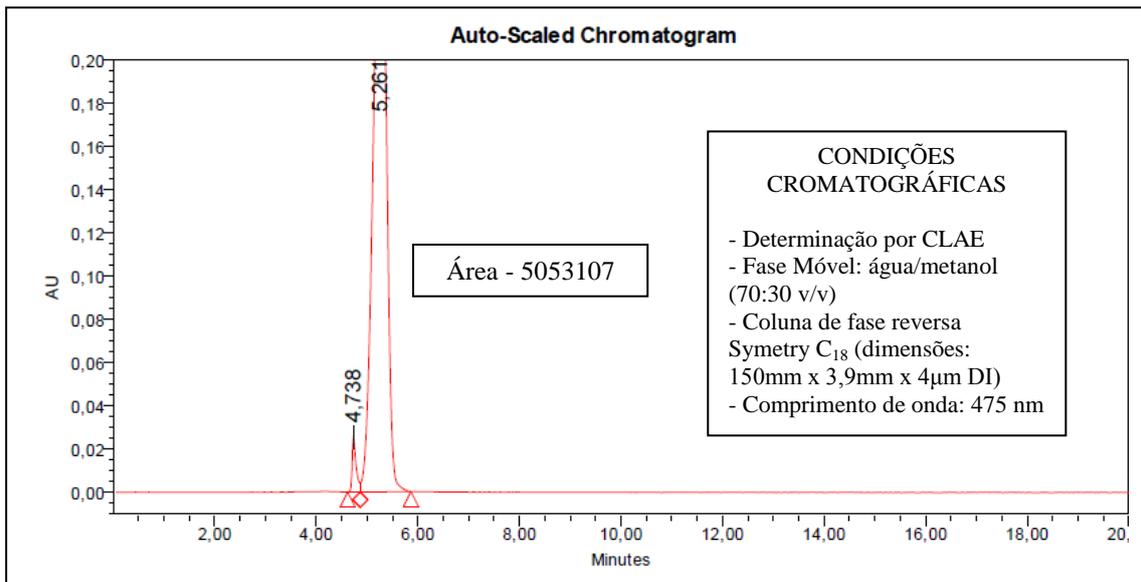


Figura 28 Cromatograma do corante vermelho 40 na concentração de 35 mg/L

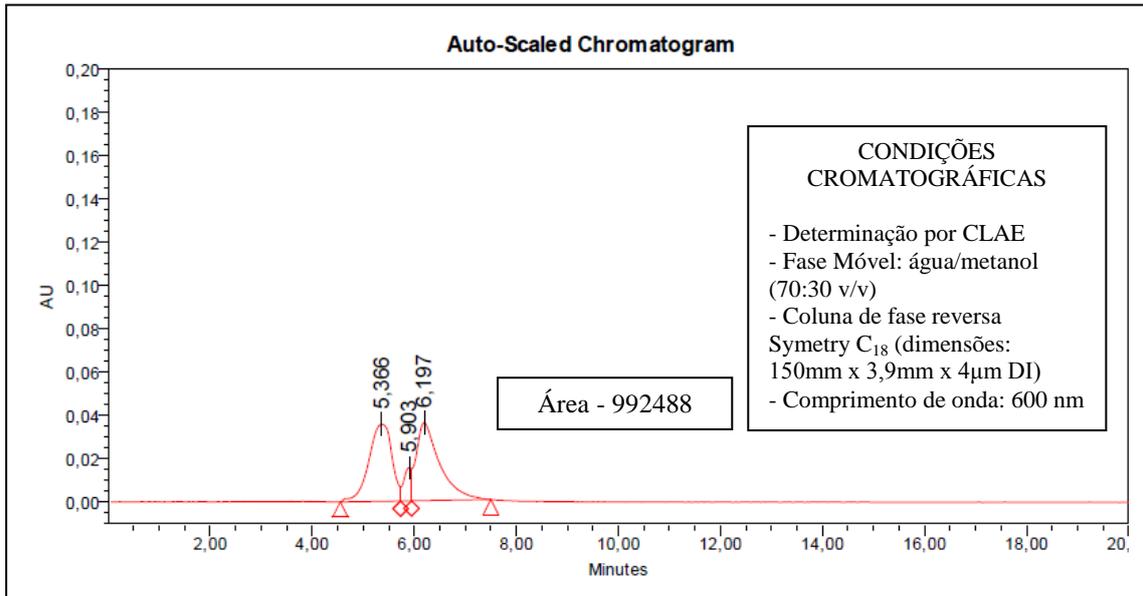


Figura 29 Cromatograma do corante azul brilhante na concentração de 5 mg/L

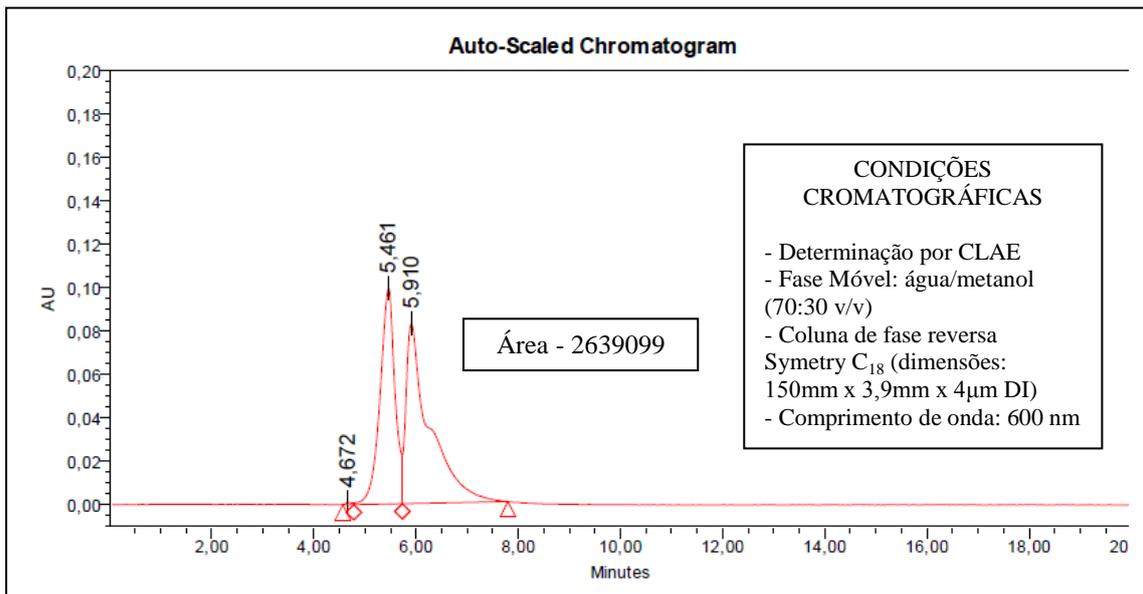


Figura 30 Cromatograma do corante azul brilhante na concentração de 20 mg/L

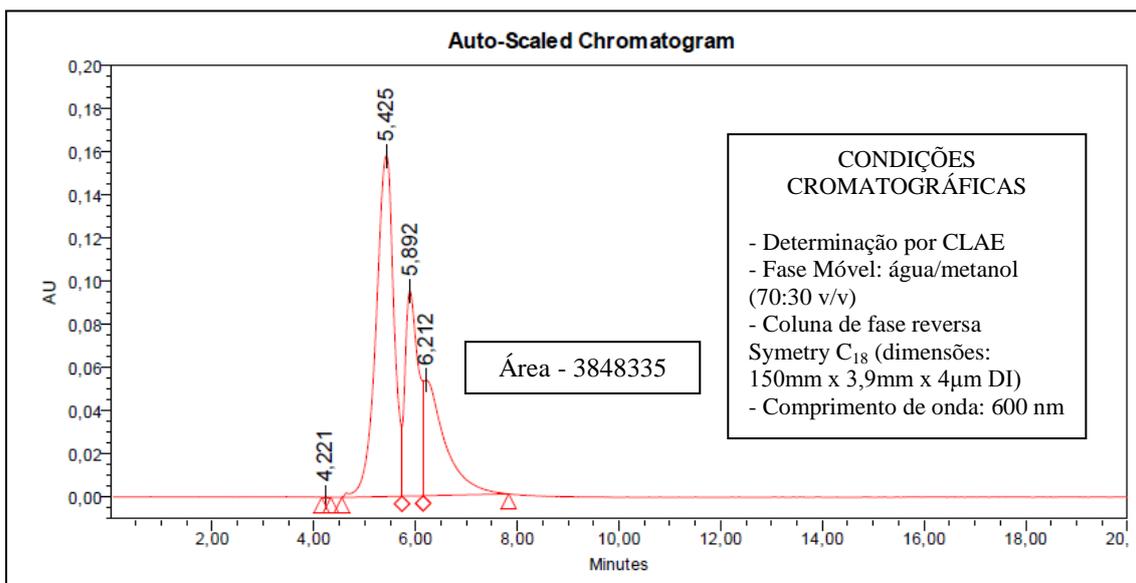


Figura 31 Cromatograma do corante azul brilhante na concentração de 35 mg/L

5.2.3 Efeito Matriz

A validação, de forma geral, é realizada em soluções simples do analito. No entanto, a amostra é passível de interferência de possíveis substâncias presentes na matriz provenientes do material da amostra. Devido a este motivo, uma ferramenta muito útil na validação para testar estas interferências é a determinação do efeito matriz. Para a verificação da ocorrência ou não do efeito matriz, é preciso preparar curvas analíticas na matriz, nas mesmas concentrações utilizadas na determinação da curva analítica preparada no solvente, em uma alíquota de extração proveniente do tratamento de uma amostra alimentar com a composição química igual ou muito parecida com o objeto de estudo e que não possui corantes artificiais em sua composição (GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007). Após este procedimento é elaborada uma curva analítica em matriz e a mesma é comparada com a curva analítica obtida em solução aquosa através do Teste *t Student* para a verificação da equivalência nas curvas e por fim determinar se a matriz interfere na determinação do analito (BOMFIM E ABRANTES, 2010).

A representação gráfica destas curvas pode ser observada no Gráfico 13 para o efeito matriz do corante amarelo crepúsculo, no Gráfico 14 o efeito matriz do corante vermelho 40 e no Gráfico 15 o efeito matriz do corante azul brilhante.

Gráfico 13 Curva analítica do efeito matriz do amarelo crepúsculo

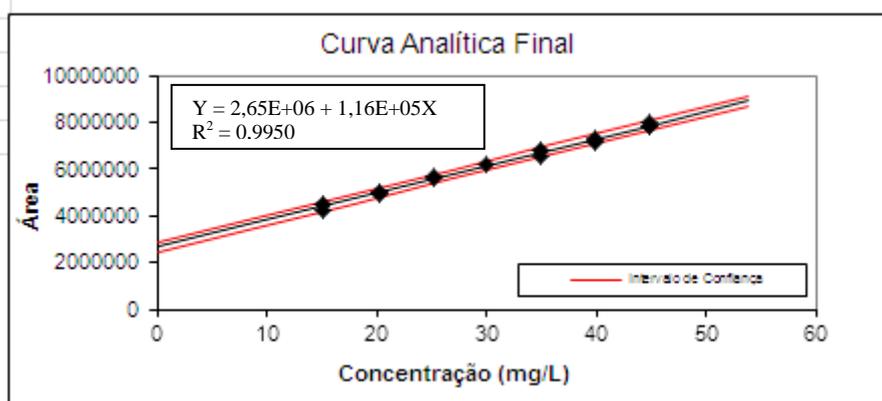


Gráfico 14 Curva analítica do efeito matriz do vermelho 40

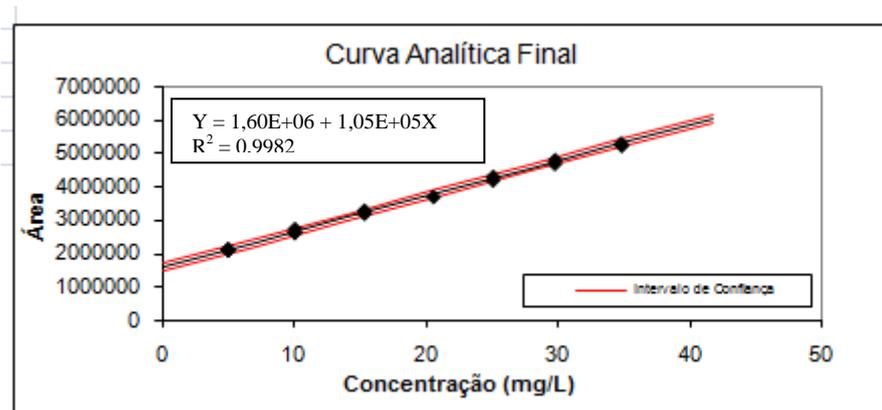
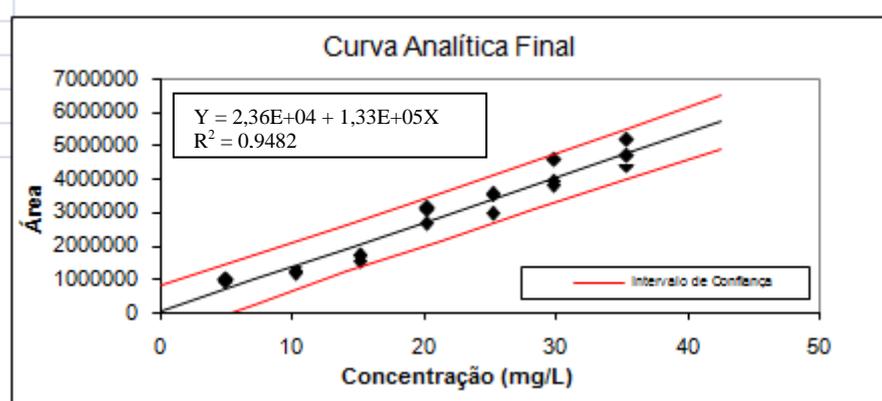


Gráfico 15 Curva analítica do efeito matriz do azul brilhante



Assim como na curva analítica do corante em solução, foi realizado o teste de Jack-Knife para avaliação dos valores aberrantes, sendo que no caso do efeito matriz

para o corante amarelo crepúsculo tiveram 3 dados rejeitados e no vermelho 40 4 dados rejeitados, porém, assim como na confecção da curva analítica em solução para o corante, não ultrapassou o limite estabelecido por Horwitz (1995) de 22,2% de dados rejeitados. Os dados da curva do corante azul brilhante em matriz não geraram nenhum valor aberrante.

A representação gráfica dos resíduos pode ser observada nos gráficos 16, 17 e 18 para os corantes amarelo crepúsculo, vermelho 40 e azul brilhante, respectivamente.

Gráfico 16 Gráfico de resíduos do efeito matriz do amarelo crepúsculo

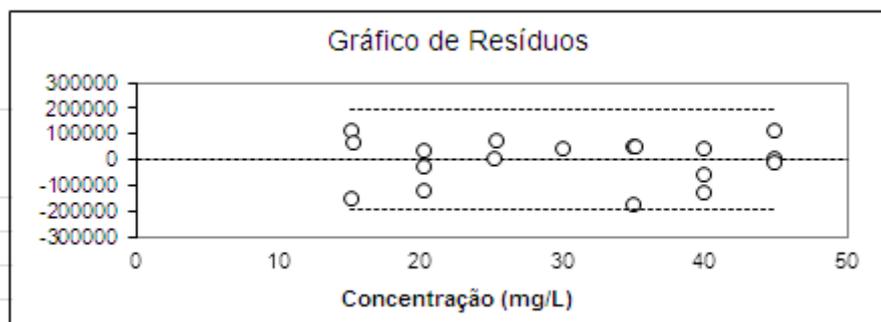


Gráfico 17 Gráfico de resíduos do efeito matriz do vermelho 40



Gráfico 18 Gráfico de resíduos do efeito matriz do azul brilhante



As curvas do efeito matriz, assim como a curva em solvente, foram avaliadas quanto à linearidade conforme os testes estatísticos descritos na metodologia. Todos os testes realizados para a confecção da curva analítica, assim como os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O resultado de todos os testes estatísticos realizados pode ser observado nas Figuras 32 e 33 para o corante amarelo crepúsculo, nas Figuras 34 e 35 para o corante vermelho 40 e nas Figuras 36 e 37 para o corante azul brilhante.

Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner)	
Req	0,96
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson)	
d (calculado)	2,16
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,16
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,39

Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe)	
Variância Combinada	9,13E+09
t_L calculado	-6,38E-02
$t_{\text{tabelado}} (\alpha = 0,05)$	2,12E+00
p	9,50E-01

Figura 32 Avaliação da linearidade da curva do efeito matriz do amarelo crepúsculo
 FONTE: BAZÍLIO et al., 2012

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)			
Coefficiente Angular (b):	1,1584E+05	Coefficiente Linear (a):	2,6550E+06
r	0,9975	R^2	0,9950
N	18	Graus de Liberdade	16

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)			
Limite de Detecção	2,07E+00	Limite de Quantificação	6,12E+00

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	2,71E+13	2,71E+13	3,21E+03	7,28E-20
resíduos	16	1,35E+11	8,45E+09		
Ajuste	5	2,07E+10	4,13E+09	3,97E-01	8,41E-01
erro puro	11	1,14E+11	1,04E+10		
total	17	2,72E+13			

Figura 33 Análise estatística, LD e LQ da curva do efeito matriz do amarelo crepúsculo
 FONTE: BAZÍLIO et al., 2012

Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner)	
Req	0,97
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,94

Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson)	
d (calculado)	2,86
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,11
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,37

Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe)	
Variância Combinada	3,06E+09
t_L calculado	-4,67E-01
$t_{\text{tabelado}} (\alpha = 0,05)$	2,14E+00
p	6,48E-01

Figura 34 Avaliação da linearidade da curva do efeito matriz do vermelho 40
 FONTE: BAZÍLIO et al., 2012

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)			
Coefficiente Angular (b):	1,0513E+05	Coefficiente Linear (a):	1,60E+06
r	0,9991	R^2	0,9982
N	16	Graus de Liberdade	14

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)			
Limite de Detecção	1,12E+00	Limite de Quantificação	3,34E+00

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	1,84E+13	1,84E+13	7,72E+03	1,34E-20
resíduos	14	3,34E+10	2,38E+09		
Ajuste	5	7,64E+09	1,53E+09	5,34E-01	7,46E-01
erro puro	9	2,57E+10	2,86E+09		
total	15	1,84E+13			

Figura 35 Análise estatística, LD e LQ da curva do efeito matriz do vermelho 40
 FONTE: BAZÍLIO et al., 2012

Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner)	
Req	0,98
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson)	
d (calculado)	1,60
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,22
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,42

Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe)	
Variância Combinada	1,10E+11
t_L calculado	2,57E-02
$t_{\text{tabelado}} (\alpha = 0,05)$	2,09E+00
p	9,80E-01

Figura 36 Avaliação da linearidade da curva do efeito matriz do azul brilhante
 FONTE: BAZÍLIO et al., 2012

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)			
Coeficiente Angular (b):	1,3315E+05	Coeficiente Linear (a):	2,36E+04
r	0,9737	R^2	0,9482
N	21	Graus de Liberdade	19

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)			
Limite de Detecção	5,75E+00	Limite de Quantificação	1,69E+01

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,75E+13	3,75E+13	3,48E+02	1,14E-13
resíduos	19	2,05E+12	1,08E+11		
Ajuste	5	9,43E+11	1,89E+11	2,38E+00	9,18E-02
erro puro	14	1,11E+12	7,91E+10		
total	20	3,96E+13			

Figura 37 Análise estatística, LD e LQ da curva do efeito matriz do azul brilhante
 FONTE: BAZÍLIO et al., 2012

De acordo com a análise dos dados utilizados na confecção da curva analítica do efeito matriz dos corantes amarelo crepúsculo, vermelho 40 e azul brilhante, observa-se que os dados seguem a distribuição normal, havendo homocedasticidade, a regressão é significativa e sem desvio da linearidade além de não haver autocorrelação dos resíduos. Sendo assim, este também é um método de quantificação segue um modelo linear.

Assim como na curva analítica dos corantes em solução, podemos observar os cromatogramas de três pontos utilizados para a confecção da curva analítica do efeito matriz do corante amarelo crepúsculo nas Figuras 38 a 40, obedecendo ao critério do ponto de menor concentração 15 mg/L, o ponto central de 30 mg/L e o de maior concentração de 45 mg/L. Para os corantes vermelho 40 e azul brilhante estes pontos são representados pelas concentrações de 5 mg/L, 20 mg/L e 35 mg/L, que podem ser visualizados nas Figuras 41 a 43 para o vermelho 40 e 44 a 46 para o azul brilhante.

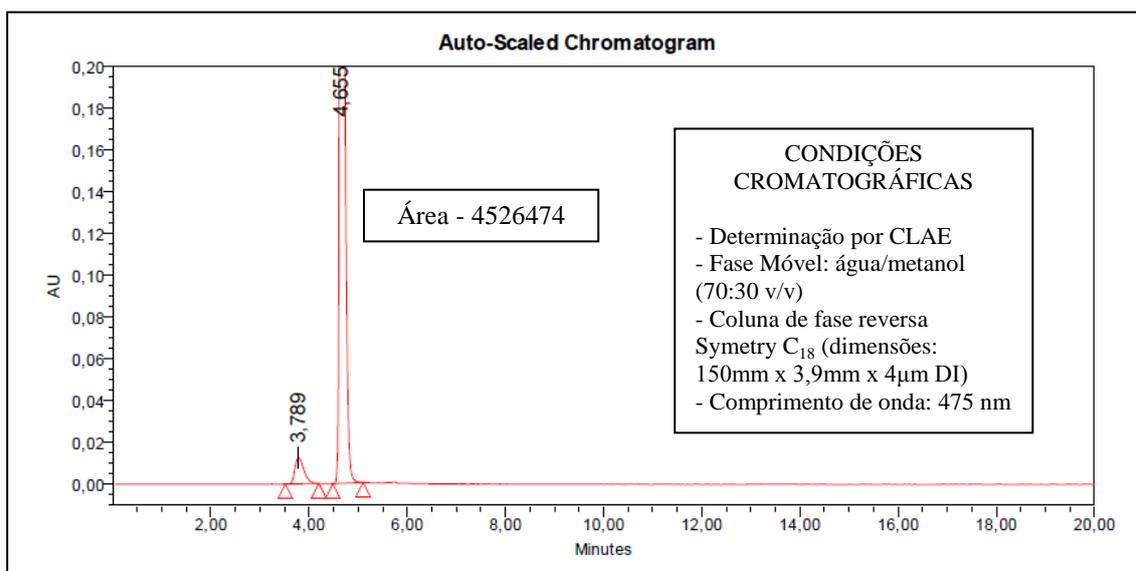


Figura 38 Cromatograma efeito matriz do amarelo crepúsculo concentração de 15 mg/L

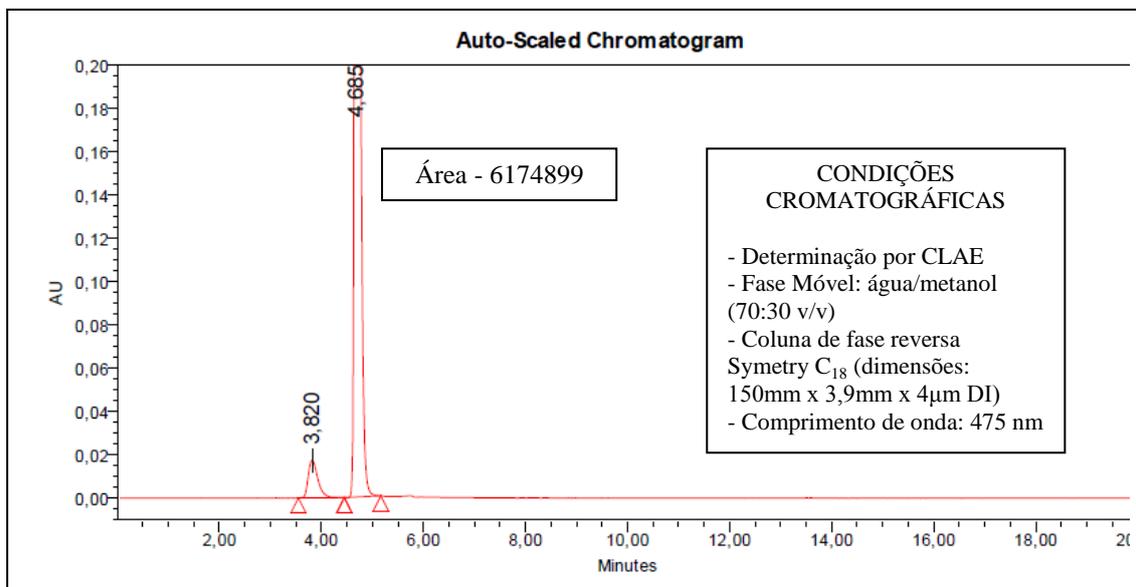


Figura 39 Cromatograma efeito matriz do amarelo crepúsculo concentração de 30 mg/L

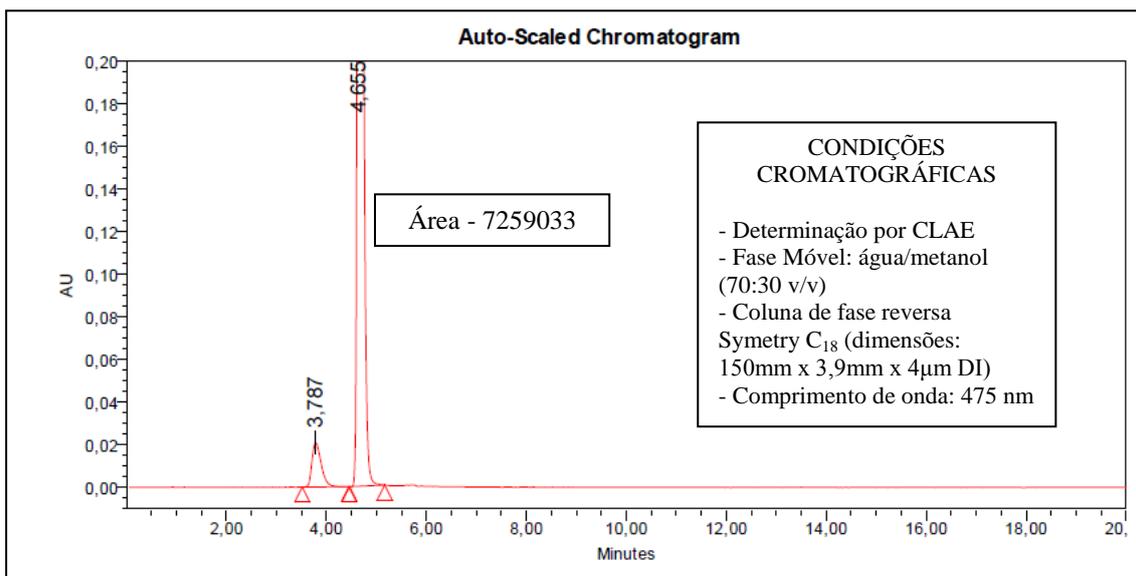


Figura 40 Cromatograma efeito matriz do amarelo crepúsculo concentração de 45 mg/L

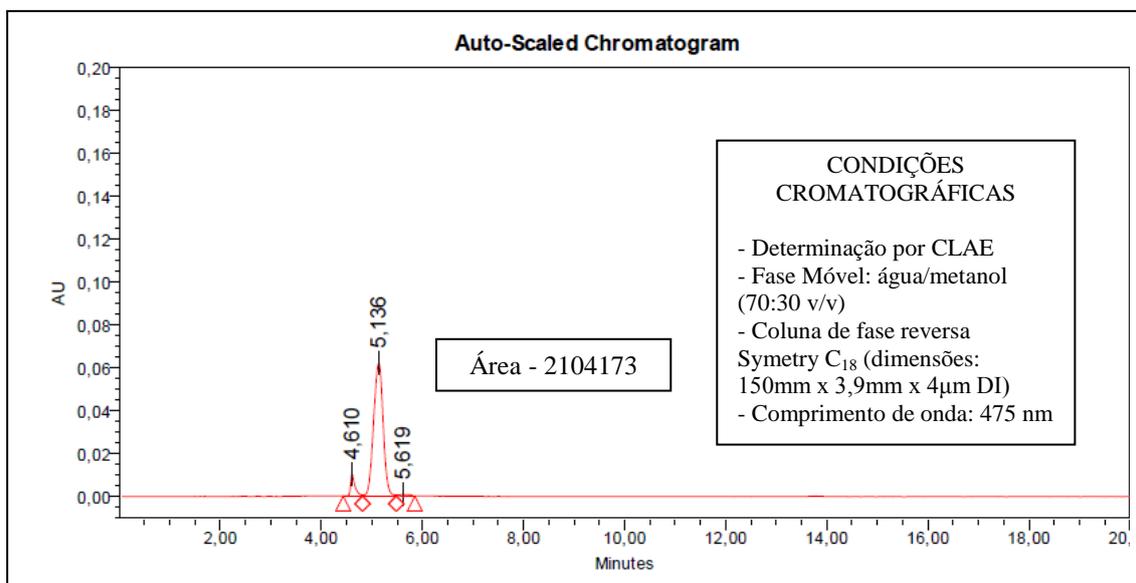


Figura 41 Cromatograma efeito matriz do vermelho 40 concentração de 5 mg/L

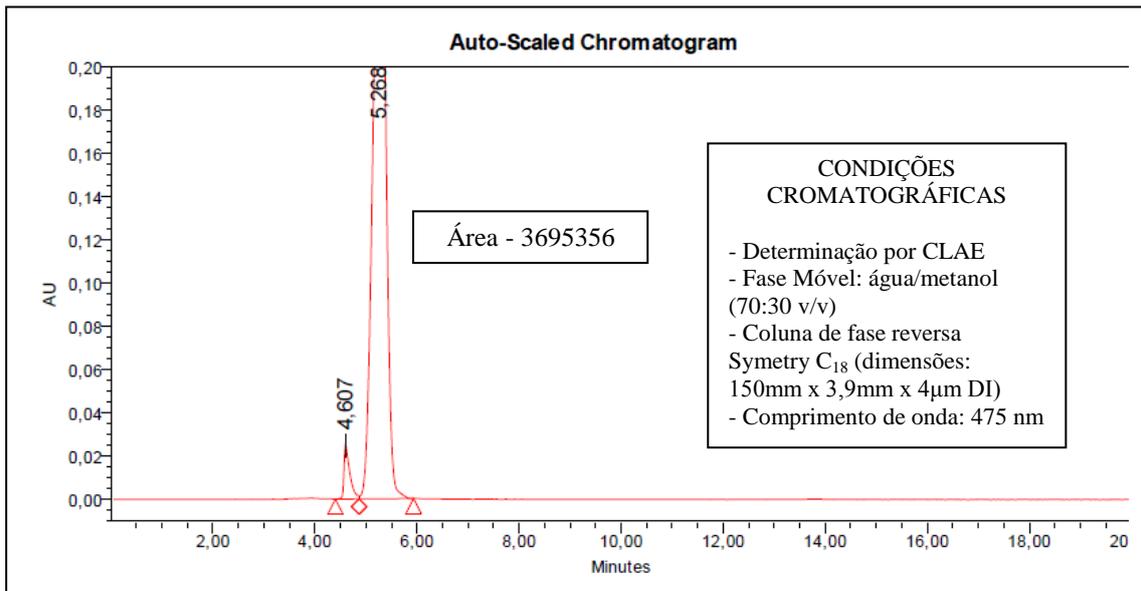


Figura 42 Cromatograma efeito matriz do vermelho 40 concentração de 20 mg/L

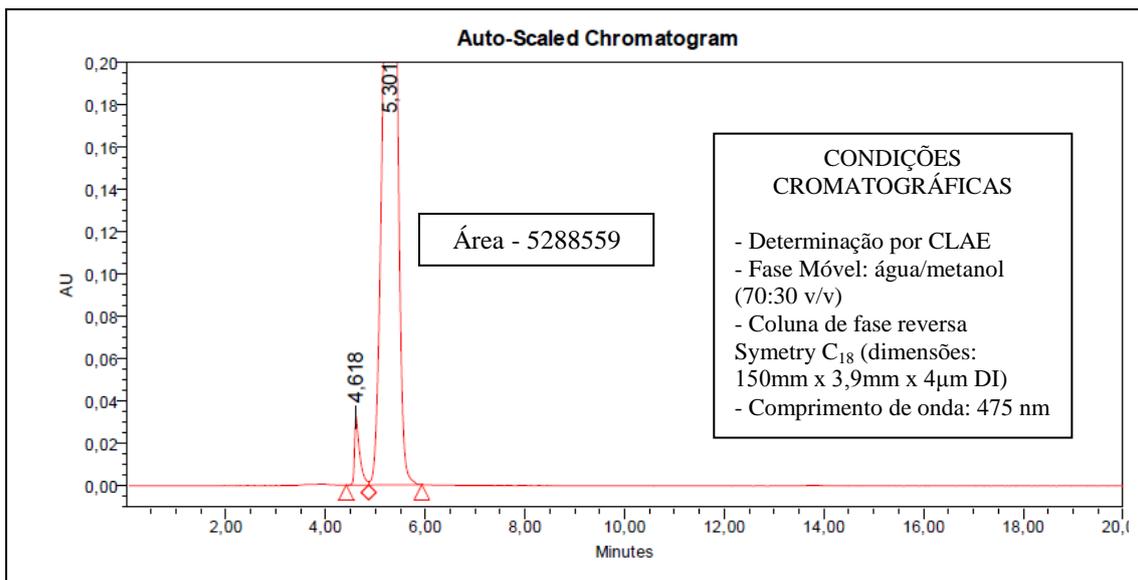


Figura 43 Cromatograma efeito matriz do vermelho 40 concentração de 35 mg/L

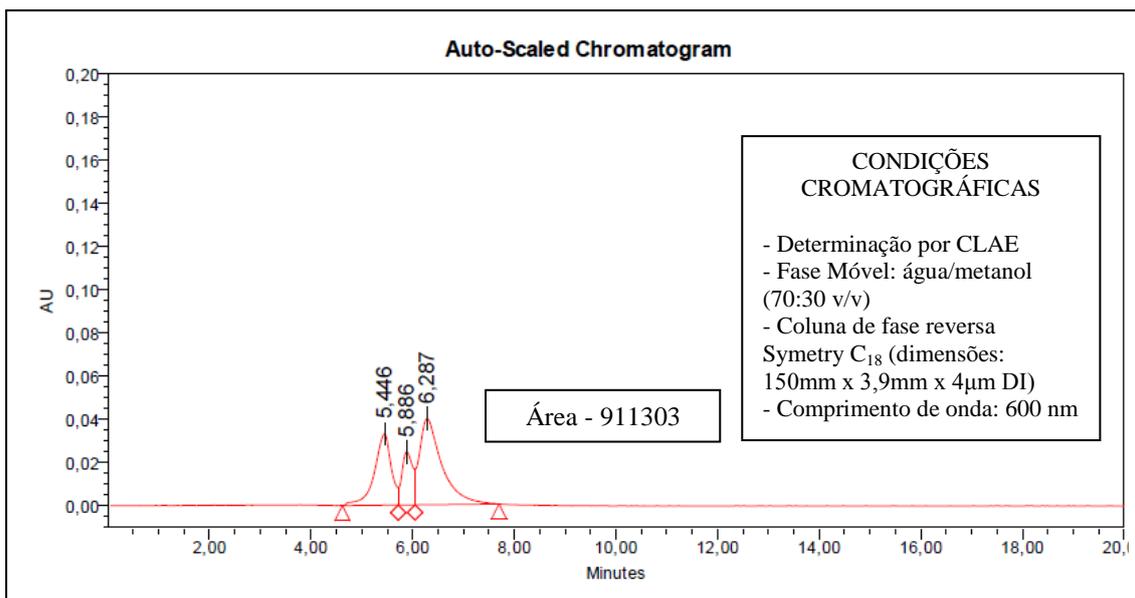


Figura 44 Cromatograma efeito matriz do azul brilhante concentração de 5 mg/L

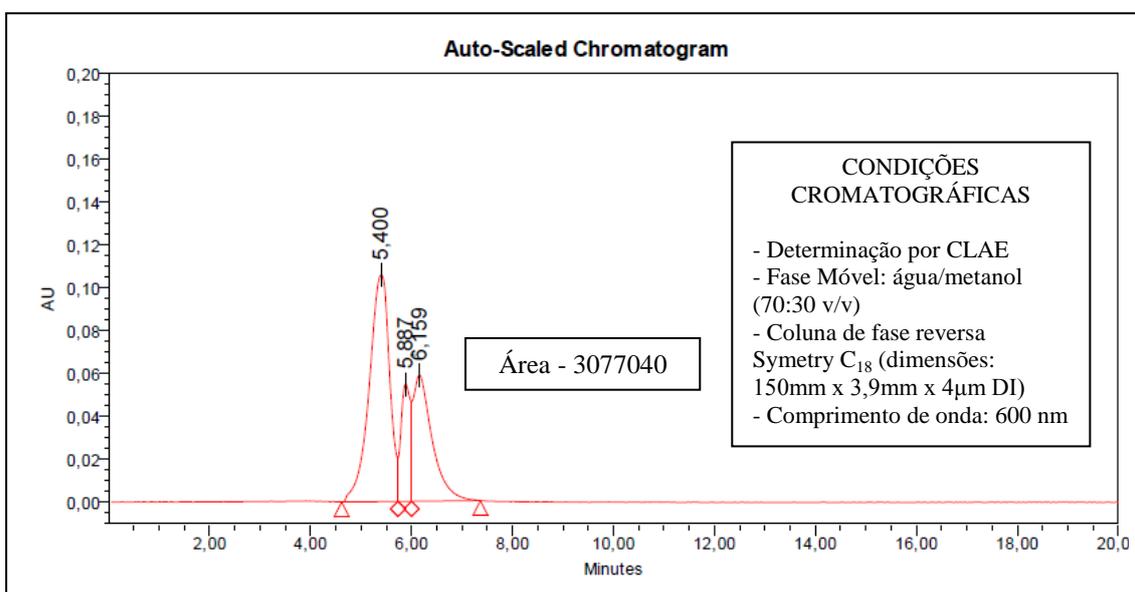


Figura 45 Cromatograma efeito matriz do azul brilhante concentração de 20 mg/L

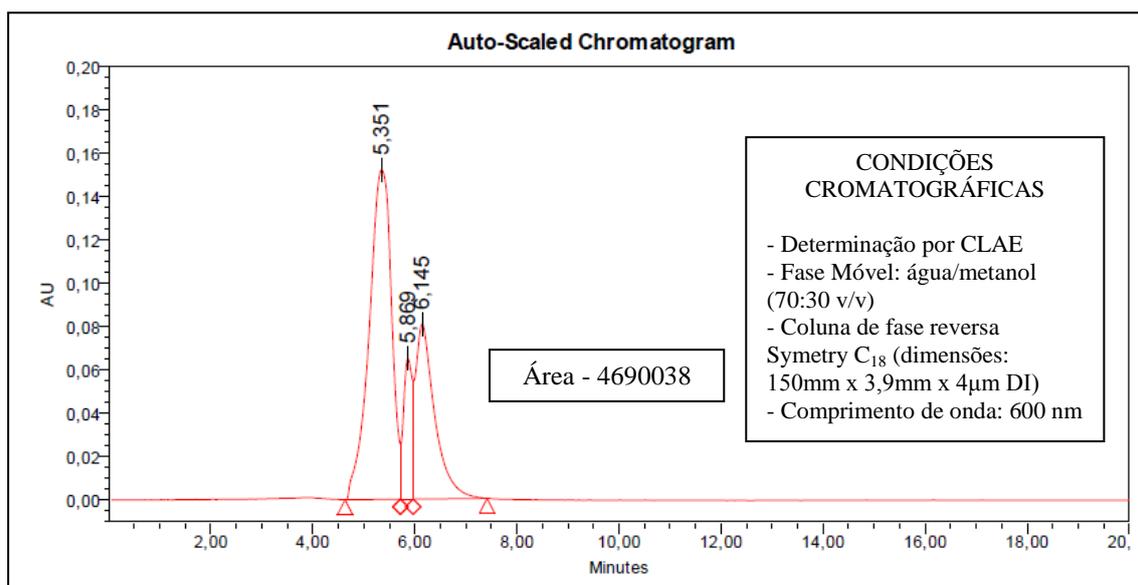


Figura 46 Cromatograma efeito matriz do azul brilhante concentração de 35 mg/L

Para a determinação do efeito matriz foram calculados a partir dos dados da curva analítica em solvente e da curva analítica obtida com a matriz, calculou-se o efeito matriz, a partir do Teste F de Snedecor e o Teste t Student com $\alpha=0,05$, onde foi achado o valor de t crítico de 2,02 e o valor t_b e t_a , respectivamente, de 0,62 e 0,50 para o amarelo crepúsculo; o valor t_b e t_a , respectivamente, de 1,62 e 1,67, para o vermelho 40; e o valor t_b e t_a , respectivamente, de 0,06 e 0,33 para o azul brilhante, conforme Tabela 13. De acordo com estes resultados estatísticos é permitido afirmar que o método em questão não possui efeito matriz, uma vez que estatisticamente as curvas analíticas dos três corantes em solvente e em matriz se equivalem, conforme observado na Tabela 13

Tabela 13 Avaliação estatística ($\alpha=0,05$) do efeito matriz dos corantes analisados

Teste Estatístico	Valor Calculado	Valor Crítico
Teste t de Student		
Corante Amarelo Crepúsculo	$t_b = 0,62$ $t_a = 0,50$	2,02
Corante Vermelho 40	$t_b = 1,62$ $t_a = 1,67$	2,02
Corante Azul Brilhante	$t_b = 0,06$ $t_a = 0,33$	2,02

5.2.4 Repetitividade

Outro parâmetro de validação do método analítico que foi avaliado foi a repetitividade, o qual foi calculado a partir do preconizado por Horwitz e Albert (2006), a qual avalia a razão de Horwitz (HorRat), que pode ser observada na equação a seguir:

$$HorRat_r = \frac{CV\%_r}{\frac{1}{2} CV\%_{HR}} \leq 2$$

No caso do desenho experimental em questão, o CV% HORWITZ é obtido pelo valor de $2C^{-0,1505}$ (Horwitz, 1995). De acordo com os resultados encontrados, e que são representados na Tabela 14, o método possui repetitividade dentro dos parâmetros esperados.

Tabela 14 Repetitividade dos corantes analisados

Corante	Valor Calculado HorRat _{repetitividade}	Critério de Aceitação de HorRat
Amarelo Crepúsculo	0,455	≤ 2,0
Vermelho 40	0,375	≤ 2,0
Azul Brilhante	0,542	≤ 2,0

5.2.5 Precisão Intermediária

Para a determinação da precisão intermediária, também denominado reprodutibilidade parcial, foi modificado o analista que realizou a análise, e este critério também foi baseado no estabelecido por Horwitz e Albert (2006). Para o cálculo deste parâmetro foi utilizada a fórmula determinada pelo INMETRO (2011), através do documento de caráter informativo DOQ-CGCRE-008:

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \times \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

Onde: $Si_{(j,k)}$ = precisão intermediária;

t = total de amostras ensaiadas;

y_{j1} = primeiro resultado obtido para a amostra j ;

y_{j2} = segundo resultado obtido para a amostra j .

Após a determinação do $Si_{(j,k)}$ foi determinado CV%_{experimental} multiplicando o $Si_{(j,k)}$ por 100 e dividindo pela concentração média. O CV% HORWITZ foi obtido pelo valor de $2C^{-0,1505}$. O valor de HorRat, foi calculado e comparado com o valor de aceitação. Os resultados encontrados pelo analista A e pelo analista B, que foram utilizados para a determinação estatística da aceitação deste parâmetro na validação do

método, podem ser visualizados na Tabela 15, comprovando que o método possui reprodutibilidade parcial.

Tabela 15 Reprodutibilidade parcial dos corantes

Repetição	Analista A (mg/L)	Analista B (mg/L)	Valor Calculado HortRat _{reprodutibilidade}	Critério de Aceitação
AC 1	0,000200	0,000208		
AC 2	0,000213	0,000206	0,393	≤ 2,0
AC 3	0,000208	0,000204		
VM 1	0,001407	0,001401		
VM 2	0,001362	0,001351	0,090	≤ 2,0
VM 3	0,001368	0,001368		
AB 1	8,15E-05	8,11E-05		
AB 2	8,49E-05	8,46E-05	0,040	≤ 2,0
AB 3	9,32E-05	9,28E-05		

AC – Amarelo crepúsculo

VM – Vermelho 40

AZ – Azul brilhante

5.2.6 Recuperação

A exatidão foi estimada como percentagem de recuperação, através da análise de amostras fortificadas com uma concentração conhecida de corante artificial. As amostras foram fortificadas em três níveis diferentes de concentração relacionados à faixa linear estudada: o mais baixo, o central e o maior. Os valores achados na recuperação foram comparados pelos estabelecidos pela FAO/WHO, de acordo com o LM do analito em questão, que neste desenho experimental deve ser de 80 a 110% de recuperação (CODEX ALIMENTARIUS, 2011).

No método analítico em questão, foi achada a faixa de recuperação de 82 a 97% para o corante amarelo crepúsculo, de 82 a 87% para o vermelho 40 e de 81 a 86% e para o corante azul brilhante, estando, todos os três, dentro das especificações esperadas para matrizes complexas (CELEGHINI et al., 2009; CODEX ALIMENTARIUS, 2011).

Frente aos resultados obtidos nos critério de aceitação para validação intralaboratorial da metodologia proposta, em relação aos corantes amarelo crepúsculo, vermelho 40 e azul brilhante, o mesmo pode ser considerado válido para a determinação destes corantes em cereal matinal.

5.3 Análise dos Corantes Artificiais nos Cereais Matinais

A primeira avaliação feita em relação ao cereal matinal foi a leitura crítica do rótulo, onde verificou a adequação dos rótulos à Resolução RDC 259/02 da ANVISA. De acordo com tal legislação, os alimentos que possuem corantes artificiais em sua composição deverão informar o mesmo ao consumidor, com o nome do corante e/ou o

número INS na lista de ingredientes e com a seguinte frase na especificação do produto: “colorido artificialmente”.

Das seis amostras recolhidas no mercado os Cereais designados A e B são sabor frutas e os Cereais designados C, D, E e F são sabor chocolate. Destas, apenas uma não estava adequada à legislação de rotulagem, a Amostra A, onde declara na sua lista de ingredientes (Figura 47) o corante amarelo canário, o qual não existe na listagem de corantes permitidos o uso no Brasil. Além disso, a Amostra A também não declara na designação do produto a frase: “colorido artificialmente” (Figura 48).

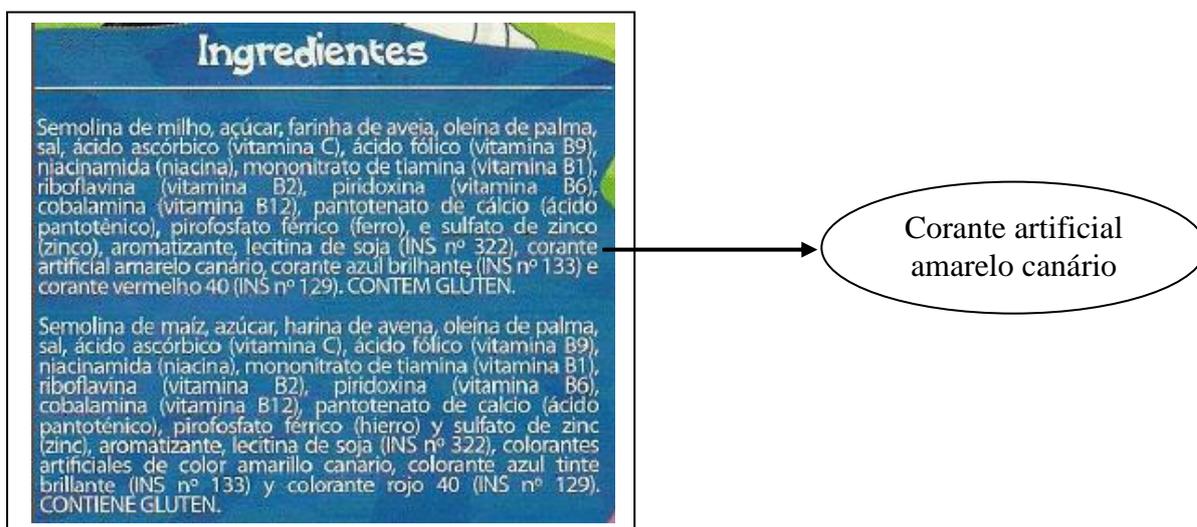


Figura 47 Lista de Ingredientes do Cereal Matinal A



Figura 48 Designação do Cereal Matinal A

Todas as outras amostras declararam na lista de ingredientes a presença dos corantes artificiais, assim como a expressão “colorido artificialmente” na designação do produto, conforme pode-se observar nas Figuras 49 e 50 para o Cereal B, nas Figuras 51 e 52 para o Cereal C, nas Figuras 53 e 54 para o Cereal D, nas Figuras 55 e 56 para o Cereal E e nas Figuras 57 e 58 para o Cereal F.



Figura 49 Lista de Ingredientes do Cereal Matinal B



Figura 50 Designação do Cereal Matinal B

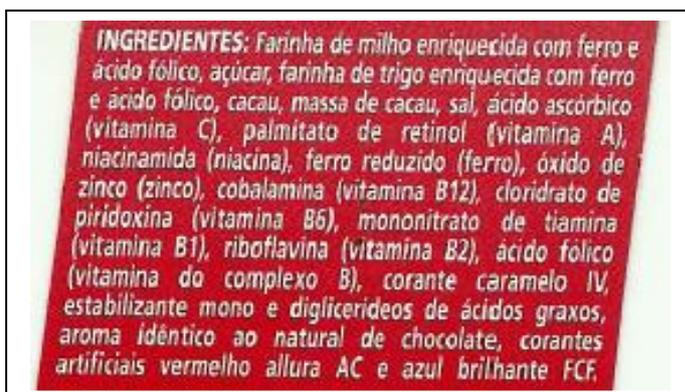


Figura 51 Lista de Ingredientes do Cereal Matinal C

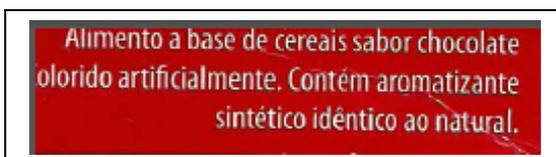


Figura 52 Designação do Cereal Matinal C



Figura 53 Lista de Ingredientes do Cereal Matinal D



Figura 54 Designação do Cereal Matinal D



Figura 55 Lista de Ingredientes do Cereal Matinal E

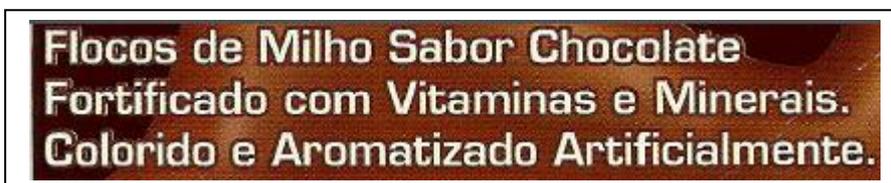


Figura 56 Designação do Cereal Matinal E



Figura 57 Lista de Ingredientes do Cereal Matinal F



Figura 58 Designação do Cereal Matinal F

Em relação à determinação dos corantes em cereais matinais, a metodologia utilizada para extração e quantificação foi a mesma validada nesta pesquisa. Durante a quantificação do corante amarelo crepúsculo no Cereal Matinal A verificou-se que, pelo tempo de retenção, o corante amarelo utilizado é o tartrazina, conforme pode ser visto na comparação do cromatograma do padrão do tartrazina com o cromatograma da análise do Cereal A, nas Figuras 59 e 60, respectivamente. O uso deste corante é proibido pela atual legislação em cereal matinal.

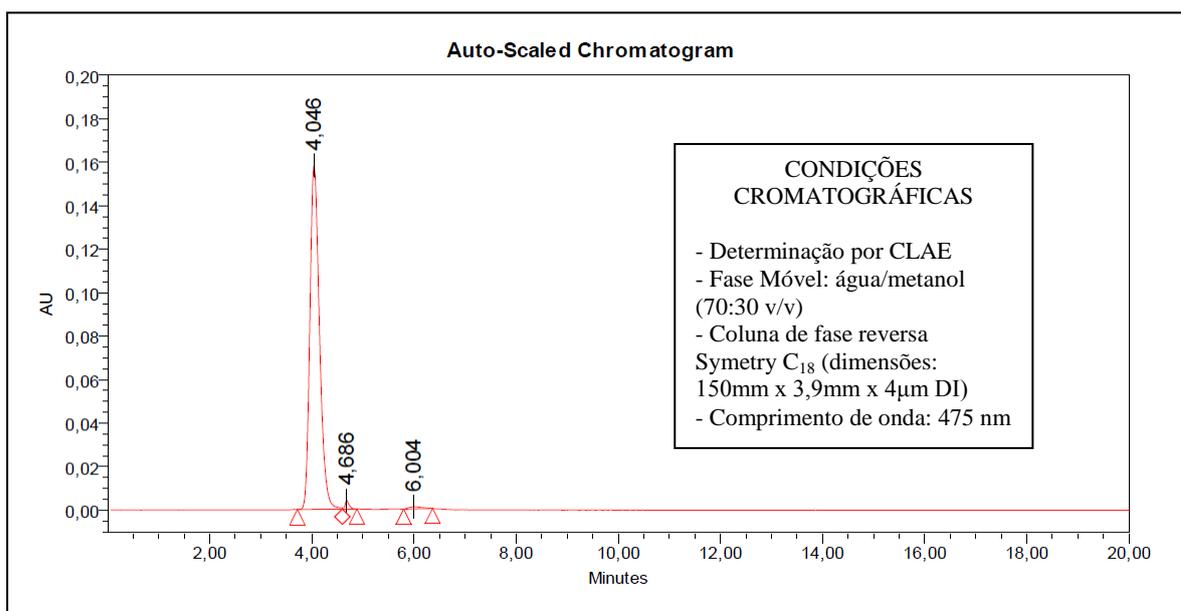


Figura 59 Cromatograma em solução do corante tartrazina na concentração de 25 mg/L

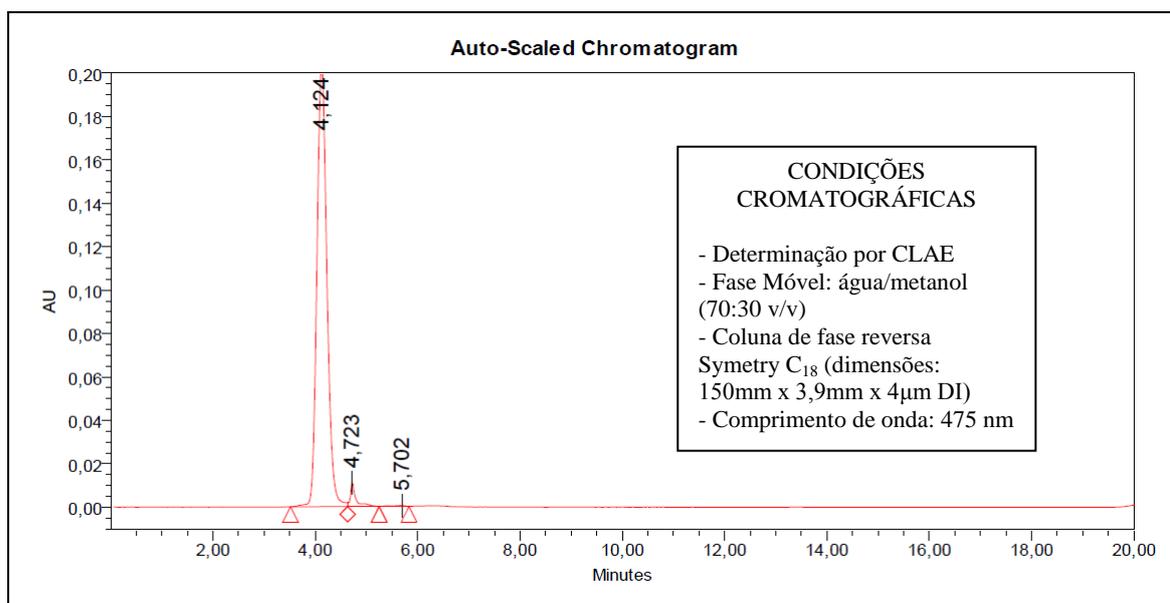


Figura 60 Cromatograma da análise do Cereal Matinal A, cor amarelo

O Cereal Matinal A é um cereal sabor frutas e possui as seguintes cores: amarelo, laranja, vermelho e verde. Como discutido anteriormente, o cromatograma do corante amarelo se assemelha muito com o do corante tartrazina, e como este é um corante não permitido para este tipo de produto, sua simples presença já condena o produto, por esse motivo, sua concentração não foi calculada. Para as outras cores neste Cereal Matinal foram detectados para a cor vermelho o corante vermelho 40, para a cor laranja a mistura do corante vermelho 40 e tartrazina e para a cor verde a mistura do corante azul brilhante e tartrazina. A concentração dos corantes artificiais no Cereal Matinal A pode ser visualizada na Tabela 16, assim como a correção da concentração pelo percentual de recuperação de cada corante.

Tabela 16 Concentração dos Corantes Artificiais no Cereal Matinal A, sabor fruta

Cor do Cereal Matinal A / Corante	Concentração do corante (g/100g)	Recuperação (%)	Concentração	
			do corante corrigida (g/100g)	Limite Máximo (g/100g)*
Vermelho / Vermelho 40	0,0064	85	0,0075	0,02
Laranja / Vermelho 40	0,0055	85	0,0065	0,02
Verde / Azul brilhante	0,0052	84	0,0062	0,02

* Fonte: RDC 60/07 (BRASIL 2007)

O Cereal Matinal B também é um cereal sabor frutas e apresenta as seguintes cores: vermelho, laranja, amarelo, verde e roxo. Na análise deste produto não foi detectada a presença do corante amarelo crepúsculo, sendo que a cor amarela é conseguida com o uso do corante sintético idêntico ao natural beta caroteno descrito em rótulo. Assim, foram detectados os seguintes corantes: vermelho 40 no cereal cor vermelho; vermelho 40 no cereal cor laranja; azul brilhante no cereal cor verde; e vermelho 40 e azul brilhante para o cereal roxo. A concentração final já corrigida pelo percentual de recuperação dos corantes no Cereal Matinal B pode ser visualizada na Tabela 17.

Oliveira (2006), em estudo de quantificação dos principais carotenóides em produtos derivados do milho, inclusive em cereais matinais, verificou que este produto apresenta, em média, 3,26 µg/g de luteína, 10,7 µg/g de zeaxantina, 2,11 µg/g de β-criptoxantina e 1,45 µg/g de β-caroteno, confirmando assim a presença destes corantes naturais em cereais matinais.

Tabela 17 Concentração dos Corantes Artificiais no Cereal Matinal B, sabor fruta

Cor do Cereal Matinal B / Corante	Concentração do corante (g/100g)	Recuperação (%)	Concentração do corante corrigida (g/100g)	Limite Máximo (g/100g)*
Vermelho / Vermelho 40	0,0068	85	0,0080	0,02
Laranja / Vermelho 40	0,0054	85	0,0064	0,02
Verde / Azul brilhante	0,0050	84	0,0060	0,02
Roxo / Vermelho 40	0,0051	85	0,0060	0,02
Roxo / Azul brilhante	0,0052	84	0,0062	0,02

* Fonte: RDC 60/07 (BRASIL, 2007)

Os Cereais Matinais, C, D, E e F são cereais sabor chocolate e possuem declarados em rótulo o uso em sua composição dos corantes vermelho 40 e azul brilhante, porém na análise destes cereais só foi detectada a presença do corante azul brilhante. Podem-se visualizar na Tabela 18 as concentrações finais corrigidas pelo percentual de recuperação. O uso de corantes artificiais neste tipo de produto pode ser facilmente substituído apenas pelo cacau, substância natural que confere essa coloração

amarronzada ao alimento, conforme já pode ser observado em algumas marcas que oferecem este produto no mercado.

Tabela 18 Concentração dos Corantes Artificiais nos Cereais Matinais Sabor Chocolate

Tipo do Cereal Matinal / Corante	Concentração do corante (g/100g)	Recuperação (%)	Concentração do corante corrigida (g/100g)	Limite Máximo (g/100g)*
Cereal C / Azul brilhante	0,0051	84	0,0061	0,02
Cereal D / Azul brilhante	0,0050	84	0,0060	0,02
Cereal E / Azul brilhante	0,0052	84	0,0062	0,02
Cereal F / Azul brilhante	0,0051	84	0,0061	0,02

* Fonte: RDC 60/07 (BRASIL, 2007)

5.4 Exposição das Crianças aos Corantes Artificiais Presentes nos Cereais Matinais

Tendo conhecimento da concentração dos corantes em cada cereal e da quantidade de cereal consumido pelas crianças, de acordo com o questionário, foi possível estimar a quantidade de corante que as crianças ingerem somente a partir deste produto alimentício. Conforme visto anteriormente, a frequência de consumo de cereal matinal foi dividido em dois grandes grupos, sendo o primeiro compreendido entre as idades de 2 a 5 anos e o segundo entre as idades de 6 a 8 anos, com o escore médio de consumo de 1 e 2, respectivamente. Isso corresponde ao consumo de menos de 1 vez por mês para as crianças do primeiro grupo e de 1 a 3 vezes por mês para as crianças do segundo grupo.

Na observação da média em gramas do consumido para cada escore, observou-se que tanto as crianças classificadas no escore 1 quanto as crianças classificadas no escore 2 consomem uma média de 24 gramas do produto / consumo. Considerando a concentração que foi analisada de cada corante nos cereais, pode-se calcular a ingestão de cada corante pelas crianças, valores estes que podem ser observados na Tabela 19.

Tabela 19 Exposição das crianças ao corante artificial presente nos cereais matinais

Cereal matinal / Cor do cereal	Corante Artificial	Corante (g) / 100g do produto	Corante / 24g do produto	Exposição da criança ao corante	
				Escore 1	Escore 2
Cereal matinal A / Laranja	Vermelho 40	0,0075	0,0018	0,0018g/mês	0,0018 a 0,0054g/mês
Cereal matinal A / Vermelho	Vermelho 40	0,0065	0,0016	0,0016g/mês	0,0016 a 0,0048g/mês
Cereal matinal A / Verde	Azul Brilhante	0,0062	0,0015	0,0015g/mês	0,0015 a 0,0045g/mês
Cereal matinal B / Vermelho	Vermelho 40	0,0080	0,0019	0,0019g/mês	0,0019 a 0,0057g/mês
Cereal matinal B / Laranja	Vermelho 40	0,0064	0,0015	0,0015g/mês	0,0015 a 0,0045g/mês
Cereal matinal B / Verde	Azul Brilhante	0,0060	0,0014	0,0014g/mês	0,0014 a 0,0042g/mês
Cereal matinal B / Roxo	Vermelho 40	0,0060	0,0014	0,0014g/mês	0,0014 a 0,0042g/mês
Cereal matinal B / Roxo	Azul Brilhante	0,0062	0,0015	0,0015g/mês	0,0015 a 0,0045g/mês
Cereal matinal C / Chocolate	Azul Brilhante	0,0061	0,0015	0,0015g/mês	0,0015 a 0,0045g/mês
Cereal matinal D / Chocolate	Azul Brilhante	0,0060	0,0014	0,0014g/mês	0,0014 a 0,0042g/mês
Cereal matinal E / Chocolate	Azul Brilhante	0,0062	0,0015	0,0015g/mês	0,0015 a 0,0045g/mês
Cereal matinal F / Chocolate	Azul Brilhante	0,0061	0,0015	0,0015g/mês	0,0015 a 0,0045g/mês

Com os resultados encontrados pode-se afirmar que, em relação ao consumo de cereais matinais, as crianças não ultrapassam a IDA estipulada como máxima para os corantes artificiais em questão.

Recentemente, Pinheiro (2012) avaliou a exposição de crianças de 3 a 9 anos aos corantes artificiais em relação ao consumo de balas e verificou que mais de 44% das crianças que consomem balas ingerem uma quantidade de corantes artificiais

exacerbada, quantidade esta que já seria suficiente para desenvolver um comportamento hiperativo nas crianças. Porém, por questões éticas, não foi realizado estudo toxicológico nas crianças.

Vale ressaltar que esse é apenas um tipo de alimento, amplamente consumido pelas crianças, e que possui em sua composição a presença de vários corantes artificiais. A maioria dos produtos industrializados faz uso do corante artificial, com a finalidade de deixar o produto mais aceito comercialmente, como por exemplo, sucos em pó, doces diversos, biscoitos, gelatinas, confeitos, refrigerantes.

Em relação aos cereais matinais não verificou um consumo que sugerisse que a IDA recomendada pela atual legislação fosse ultrapassada pela população estudada. Porém, vale a pena ressaltar que a IDA é calculada para um adulto de peso médio de 70 kg, peso este que fica além do peso médio de crianças, sinalizando assim a necessidade de uma legislação mais rigorosa frente ao uso de corantes artificiais em produtos alimentícios voltados para o consumo infantil.

6 CONCLUSÃO

Através do estudo seccional realizado, observa-se que 65% das crianças consomem cereal matinal e que o sabor de maior consumo é o tradicional (65%), seguido do sabor chocolate (25%) e por fim o sabor de frutas (10%). Esse é um dado de extrema relevância, pois mostra que o cereal preferido das crianças é o isento de corante artificial, dando embasamento que nem sempre é necessário, para atrair o público infantil, colorir demasiadamente o produto. Assim, as crianças, em relação a este produto, não estariam expostas aos sintomas de TDAH causados pelos corantes artificiais.

A pesquisa também aponta para uma necessidade de elaboração e validação de metodologias que sejam específicas para extrair e quantificar corantes artificiais em alimentos. No caso da base alimentar de cereais matinais e extração destes corantes artificiais mostrou-se satisfatória utilizando solução alcoólica de amônia 10% (v/v) à ebulição, e o isolamento através da eluição de solução aquosa de álcool iso-propílico 60% (v/v) em cartuchos SEP-PACK® C₁₈. Após evaporação completa do álcool iso-propílico do eluato e diluição em água a amostra é analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Todos os parâmetros de validação utilizados para a validação intralaboratorial da metodologia proposta estiveram dentro dos valores de aceitação estabelecidos pelo Codex Alimentarius, tornando, assim, o método válido para a determinação de corantes artificiais em cereais matinais.

Apesar de nenhuma amostra exceder o limite de restrição preconizado pela legislação, vale à pena avaliarmos a real necessidade de uso dos corantes artificiais em produtos alimentares, principalmente aos voltados para o público infantil. Como por exemplo, o uso de corantes artificiais nos cereais sabor chocolate, o qual se faz desnecessário, uma vez que existe no mercado cereais sabor chocolate e que utilizam apenas cacau em sua composição, sendo o cacau suficiente para colorir o alimento de forma que ele seja atrativo e sem expor ao público consumidor aos efeitos deletérios do corante artificial.

Além disso, o fato de uma amostra conter tartrazina, corante não permitido para uso neste tipo de alimento, alerta sobre a necessidade de uma fiscalização sanitária eficaz em relação aos produtos coloridos artificialmente. Assim, como consequência, uma diminuição ao risco de exposição da população, principalmente a infantil, em relação aos aditivos alimentares.

Vale salientar a importância da Vigilância Sanitária com ações que intercedam no campo da precaução e da prevenção, principalmente na vertente da saúde do consumidor. A fiscalização deve ocorrer de forma efetiva e eficaz em todas as etapas do processo produtivo, desde ao registro do produto a ser fabricado até o produto final, o qual possui todas as substâncias que serão ingeridas pelo consumidor. Logo, os resultados mostram que, apesar do limite de restrição legal ser obedecido nos produtos analisados, foi encontrado em uma amostra a tartrazina, sinalizando a necessidade de elaboração de estratégias e ações de educação, conscientização e fiscalização, com o intuito de proporcionar uma vida saudável ao consumidor, com a responsabilidade de preservar a saúde e o bem estar.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. Consumo de alimentos em novo patamar. **ABIA Informa**, São Paulo, nº. 272, 1997.

ABIA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. **Compendium da legislação de alimentos: consolidação das normas e padrões de alimentos**. 8ª revisão. São Paulo: ABIA, vol. 1, 2001.

ABRANTES, S. AMORIM, J.R.; OLIVEIRA, S.M. de; BASTOS, P. de A.; NERY, V.V.C.; BAZILIO, F.S. Avaliação de corantes artificiais em bebidas não alcoólicas e não gaseificadas. **Analytica**, nº27, Fev/Mar, 2007.

ADITIVOS & INGREDIENTES. **Corantes**. In: <http://www.insumos.com.br/aditivoseingredientes/materias/119.pdf>. Acesso em 26/07/2011.

AIRES, A. P. P.; SOUZA, C. C. L. de; BENEDETTI, F. J.; BLASI, T. C.; KITSTEN, V. R. Consumo de alimentos industrializados em pré-escolares. **Revista AMRIGS**, Porto Alegre, 55 (4): 350-355, out-dez 2011.

ALISON, D.; COLLINS, P. Colouring our food in the last and next millennium. **Journal of Food Science and Technology**. v. 35, p. 5-22, 2000.

ALTMAN, D. R.; CHIARAMONTE, L. T. Public perception of food allergy. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v. 97, n. 6, p. 1247-1251, jun. 1996.

AMARAL, A. H. do; GUERREIRO, M. M. Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade: proposta de avaliação neuropsicológica para diagnóstico. **Arq Neuropsiquiatria**; 59(4): 884-888, 2001.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)**. 4 ed. Washington: American Psychiatric Association, 1995.

ANGELUCI, E. Corantes naturais versus corantes artificiais. In: **Corantes naturais para alimentos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, p.1-15, 1988.

ANTIGNAC, J. P.; BIZEC, B. L.; MONTEAU, F.; ANDRE, F. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the "2002/657/EC" European decision: guideline and application, **Analytica Chimica Acta**, v. 483, p. 325-334, 2003.

ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **RevNutr**, campinas, 13(2): 81-88, mai-ago., 2000.

AQUINO, R. de C. de; PHILIPPI, S. T. Consumo infantil de alimentos industrializados e renda familiar na cidade de São Paulo. **Rev Saúde Pública**; 36(6): 655-60, 2002.

ASSOLINI, P. J. O *eatertainment*: alimentando as crianças na sociedade de consumo. IN: GALINDO, D. dos S. **Comunicação mercadológica: uma análise**

multidisciplinar. Universidade Metodista de São Paulo: São Bernardo do Campo, 2008.

BARROS, H. D. Estudo da exposição do consumidor aos plastificantes ftalato e adipato de di-(2-etil-hexila) adicionados a filmes de PVC utilizados para acondicionamento de alimentos gordurosos, 2010, 80f. **Tese** (Doutorado em Vigilância Sanitária), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

BARROS, A. A. de; BARROS, E. B. de P. **A química dos alimentos: produtos fermentados e corantes.** Coleção química do cotidiano – volume 4. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química. 88p., 2010.

BATEMAN, B.; WARNER, J. O.; HUTCHINSON, E.; DEAN, T.; ROWLANDSON, P.; GANT, C.; GRUNDY, J.; FITZGERALD, C. STEVENSON, J. The effects of a double blind, placebo controlled, artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. **Archivesofdisese in childhood**, 89:506-511, 2004.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L.K.; MACEDO, G.A. Fontes e aplicações de taninos e tanasesem alimentos. **Alim. Nutr.**, Araraquara, vol. 15, nº. 1, p. 63-72, 2004.

BAZILIO, F. S.; ET AL. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. *Analytica*, v.59, p.60-67, 2012. Disponível em: http://revistaanalytica.com.br/ed_anteriores/59/analytica.pdf. Acesso em: 02 de Outubro de 2012.

BELTRÃO, P.; STRINGHETA, P.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos.** Curitiba, v. 20, n. 2, p.203-220, jul/dez 2002.

BLEIL, S. I. O padrão alimentar ocidental: considerações sobre a mudança de hábitos no Brasil. **Cadernos de Debate.** Campinas, vol. VI, p.1-25, 1998.

BOMFIM, M. V. J.; ABRANTES, S. M. P. Validação de método analítico para determinação da migração de ϵ -caprolactama das embalagens para alimentos gordurosos. **Química Nova**, V. 33 (5), 1114-1118, 2010.

BRASIL, Portaria nº 540, 27 de Outubro de 1997. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 1997. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 de Fevereiro de 2012.

BRASIL, Resolução CNNPA nº 44, 25 de Novembro de 1977. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. Seção1. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 de Maio de 2011.

BRASIL, Resolução nº 382, 05 de Agosto de 1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 1999. Seção1. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 de Maio de 2011.

BRASIL, Resolução nº 383, 05 de Agosto de 1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 1999. Seção1. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 de Maio de 2011.

BRASIL, Resolução nº 384, 05 de Agosto de 1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 1999. Seção1. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 de Maio de 2011.

BRASIL, Resolução nº 385, 05 de Agosto de 1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 1999. Seção1. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 de Maio de 2011.

BRASIL, Resolução nº 386, 05 de Agosto de 1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 1999. Seção1. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 de Maio de 2011.

BRASIL, Resolução nº 387, 05 de Agosto de 1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 1999. Seção1. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 de Maio de 2011.

BRASIL, Resolução nº 388, 05 de Agosto de 1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 1999. Seção1. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 de Maio de 2011.

BRASIL, Resolução nº 263, 22 de Setembro de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 2005. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 05 de Novembro de 2011.

BRASIL, Resolução nº 60, 05 de Setembro de 2007. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 2007. Seção1. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 de Maio de 2011.

BRASIL, Resolução RDC nº 24, 15 de Junho de 2010. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 2010. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 de Janeiro de 2012.

BRASIL, Resolução RDC nº 259, 20 de Setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 2002. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 de Outubro de 2012.

BRASIL, Resolução RE nº 899, 29 de Maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 2003. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 10 de Fevereiro de 2012.

BURIN, R.; BURIN, V. M.; TAHA, P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Validação de uma metodologia analítica para determinação de cálcio em produtos cárneos. **CiencTecnol Alimentos**, Campinas, 28(4): 973-978, out-dez, 2008.

CALDAS, L. Q. de; MORAIS, L. S. T. Controvérsias regulatórias na utilização de corantes em alimentos, medicamentos e cosméticos. **Rev Juris da Faculdade de Direito**, São Paulo, v.3, jan/jun 2010.

CAMIRE, M.E. et al. Chemical and nutritional changes in foods during extrusion. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v.19, p.35-57, 1990.

CARTER, C. M.; URBANOWICZ, M.; HEMSLEY, R.; MANTILLA, L.; STROBEL, S.; GRAHAM, P. J.; TAYLOR, E. Effects of a few food diet in attention deficit disorder. **Archives of disease in childhood**; 69: 564-568; 1993.

CELEGHINI, R. M. S.; SOUZA, I. M. O.; SILVA, A. P.; RODRIGUES, R. A. F.; FOGGIO, M. A. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE-IR para determinação de artemisinina em *Artemisia annua* L. **Química Nova**, v. 32, p. 875-878, 2009.

CHEN, J. et al. effects of extrusion conditions on sensory properties of corn nealextrudates. **Journal of Food Science**, v. 56, n.1, p. 84-89, 1991.

COLUCCI, A.C.A.; PHILIPPI, S.T.; SLATER, B. Desenvolvimento de um questionário de frequência alimentar para avaliação do consumo alimentar de crianças de 2 a 5 anos de idade. **Rev Bras Epidemiologia**; 7(4): 393-401, 2004.

COUTINHO, G.; MATTOS, P.; ARAÚJO, C.; DUCHESNE, M. Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade: contribuição diagnóstica de avaliação computadorizada de atenção visual. **Rev PsiqClin**; 34(5): 215-222, 2007.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our food in the last and next millennium. **Int J Food Sci Technol**; v.35, p-5-22; 2000.

DRAKE, J. J. P. Food colours - harmless, aesthetics or epicurean luxuries? **Toxicology**; v. 5; p.3-42, 1975.

EMBRAPA. **Extrusão**. Documentos on-line. Passo Fundo: RS, n. 74, Dezembro, 2006. Disponível em: www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do74_4.htm. Acesso em: 09 de Março de 2012.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry. **Pure Applied Chemistry**, v.70, p.993-1002, 1998.

FALLICO, B.; ARENA, E.; CHIPPARA, E.; BALLISTRERI, G. Colour and label evaluation of commercial pasteurised red juices and related drinks. **Food additives and contaminants: part B**. vol. 3; n.º.4; p.201-211, december 2010.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Evaluation of certain food additives**. Geneva. p.1-37, 1974. (Technical Report Series, 557).

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Principles for the Establishment of Codex Methods of Analysis**. Procedural Manual – CAC, Roma, 20 Ed., p.50-61, 2011.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Alimentación y nutrición: creación de un mundo bien alimentado**. Roma, 1992.

- FEINBERG, M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. **Journal of Chromatography A**, v.1158, p.174-183, 2007.
- FONSECA, M. de J. M. da; CHOR, D.; VALENTE, J. G. Hábitos alimentares entre funcionários de banco estatal: padrão de consumo alimentar. **Cadernos de Saúde Pública**, vol.15, n.1, Rio de Janeiro, Jan/Mar, 1999.
- FONTANA, R. da S.; VASCONCELOS, M. M. de; WERNER JR., J.; GÓES, F. V. de; LIBERAL, E. F. Prevalência de TDAH em quatro escolas públicas brasileiras. **ArqNeuropsiquiatria**; 65 (1): 134-137, 2007.
- GARCIA, O. E.; INFANTE, R. B.; RIVERA, C.J. Determination of total, soluble and insoluble dietary fibre in two new varieties of *Phaseolus vulgaris* L. using chemical and enzymatic gravimetric methods. **FoodChemistry**, Vol. 59, N°1, pp. 171-174, 1997.
- GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, v.21, n.6, p.468-486, 2002.
- GOMES, F. da S.; CASTRO, I. R. R. de; MONTEIRO, C. A. Publicidade de alimentos no Brasil: avanços e desafios. **Ciência e Cultura**, vol. 62, n.4, São Paulo, oct. 2010.
- GONÇALVES, E.C.B.A.; SCHUMANN, S.P.A.; POLÔNIO, M.L.T. Avaliação do consumo de corantes artificiais por lactentes, pré-escolares e escolares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n°3, Jul/Set, 2008.
- GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, A. A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 26, n.3, p. 227-237, 2007.
- HARPER, J. M. **Extrusion of foods**.Flória: CRC, 1981.
- HENRY, B.S. Natural food colours. In: HENDY, G.A.F; HOUGHTON, J.D. **Natural food colorants**. 2ª ed. Great Britain: Chapman & Hall. p. 40-79, 1996.
- HORWITZ, W.; ALBERT, R. The Horwitz Ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision. **Journal of AOAC International**. v.89, n.4, p.1095-1109, 2006.
- HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies.**Pure Applied Chemistry**. v. 67, p.331-343, 1995.
- HUSAIN, A.; SAWAYA, W.; AL-OMAIR, A.; AL-ZENKI, S.; AL-AMIRI, H.; AHMED, N.; AL-SINAN, M. Estimates of dietary exposure of children to artificial food colours in Kuwait. **Foodadditivesandcontaminants**; 23(3): 245-251, march 2006.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2008-2009**. Aquisição alimentar domiciliar per capita - Brasil e grandes regiões. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008aquisicao/default.shtm>. Acesso em 19 de janeiro de 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE / FIOCRUZ. Validação de metodologias com determinação através de curva analítica linear. In: **Manual da Qualidade**. Rio de Janeiro. INCQS/ FIOCRUZ, 24p. (65.3120.126), 2009.

INSTITUTO DE PESQUISA AC NIELSEN. **Tendências 97**. São Paulo, 1997.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, julho de 2011.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology**, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995a.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995b.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 2859-1**: Sampling procedures for inspection by attributes – Part 1: Sampling schemes indexed by acceptance quality limit (AQL) for lot-by-lot inspection. Second edition, 1999.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO/IEC17025**: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, 1999.

KLEINMAN, R.E.; BROWN, R.T.; CUTTER, ET AL. A research model of investigating the effects of artificial food colorings on children with ADHA. **Pediatrics**; 127(6): 1575-84, 2011.

LEDERER, J. **Alimentação e Câncer**. Editora Manole Dois: São Paulo, 1990. 216p.

MAESTRO, V.; SILVA, M.V. A participação dos alimentos industrializados na dieta de alunos de escolas públicas brasileiras. **Cadernos de Debates**. Campinas, v. XI, p.98-111, dez 2004.

MARÇO, P.H.; POPPI, R.R.; SCARMINIO, I.S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, vol. 31, nº.5, São Paulo, 2008.

MASCARENHAS, J.M.O. Corantes em alimentos: perspectivas, uso e restrições. **Dissertação do Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 150p, 1998.

MATTOS, M.C.; NASCIMENTO, P.C.B.D.; ALMEIDA, S.S.; COSTA, T.M.B. Influência de propagandas de alimentos nas escolhas alimentares de crianças e adolescentes. **Psicologia: teoria e prática**, 12(3):34-51, 2010.

MATTOS, P.; PASTURA, G.; AYRÃO, V.; SABOYA, E. executive functions in a non-clinical sample of children and adolescents with attention-deficit hiperactivity disorder (ADHD). **J Bras Psiquiatria**; 54(3): 178-181, 2005.

MCCANN, D.; BARRETT, A.; COOPER, A.; CRUMPLER, D.; DALEN, L.; GRIMSHAW, K.; KITCHIN, E.; LOK, K.; PORTEOUS, L.; PRINCE, E.; SONUGA-BARKE, E.; WARNER, J. O.; STEVENSON, J. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. **The Lancet**, vol. 370, p.1560-1567; november 3, 2007.

MCCLEARY, B. V. Dietary fibre analysis. **Proceedings of the Nutrition Society**, 62, p. 3-9, 2003.

MENDES, M. J. F. L. et al. Associação de fatores de risco para doenças cardiovasculares em adolescentes e seus pais. **Rev Bras Saúde Materna e Infantil**, v.6, supl.1, s549-s554, 2006.

MERCOSUL/GMC. Resolução N°14/93 - Lista geral harmonizada de colorantes de calibração. **X GMC** - Assunção, 30 de junho de 1993.

MERCOSUL/GMC. Resolução N°19/93 - Lista geral harmonizada de aditivos Mercosul. **X GMC** - Assunção, 30 de junho de 1993.

MERCOSUL/GMC. Resolução N°101/94 - Lista de aditivos alimentários com suas classes funcionais. **XV GMC** –Cartagena de Indias, 24 de junho de 1994.

MERCOSUL/GMC. Resolução N° 38/01 - Regulamento técnico Mercosul sobre incorporação de aditivos na lista geral harmonizada de aditivos, na lista geral harmonizada de corantes e na lista de aditivos alimentares com suas classes funcionais. **XLIII GMC** – Montevideu, 10 de Outubro de 2001.

MINTZ, S. W. Comida e antropologia - uma breve revisão. **Rev Bras de Ciências Sociais**, vol. 16, n° 47, p.31-41, outubro 2001.

MOLINA, M. del C. B.; LOPÉZ, P. M.; FARIA, C. P. de; CADE, N. V.; ZANDONADE, E. Socioeconomic predictors of child diet quality. **Rev Saúde Pública**, 44(5): 1-7, 2010.

MONTEIRO, C. A.; MONDINI, L.; SOUZA, A. L. M.; POPKIN, B. M. The nutrition transition in Brazil. **Eur J Clin Nutr**, 49:13-15, 2010.

MULLER, M. J.; MAST, M.; ASBECK, I.; LANGNASE, K. GRUND, A. Prevention of obesity - is it possible? **Obes Rev**, 2:15-28, 2001.

NESTAL, P. **Fortificación de los alimentos em los países em desarrollo**. Washington (DC): Agência de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional, 1993.

NETTO, R. C. M. Dossiê corantes. **Food Ingredients Brazil**, 9:40-59, 2009.

OLIVEIRA, G. P. R. de. Avaliação de milho e derivados de milho como fontes de luteína e zeaxantina, 2006, 53f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

- PADOVANI, R. M.; AMAYA-FARFÁN, J.; COLUGNATI, F. A. B.; DOMENE, S. M. A. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. **Rev Nutr**, Campinas, 19(6): 741-760, Nov/dez, 2006.
- PELSSER, L. M. J.; BUITELAAR, J. K.; SAVELKOUL, H. F. J. ADHA as a (non) allergichypersensitivity disorder: A hypothesis. **Pediatr Allergy Immunol**; 20: 107-112, 2009.
- PÉREZ-RODRIGO, C.; ARANCETA, J. Scholl-based nutrition education: lessons learned and new perspectives. **Publ Health Nutr**, 4: 131-139, 2001.
- PINHEIRO, M. C. de O. Avaliação da exposição aos corantes artificiais por crianças entre 3 e 9 anos em relação ao consumo de balas, 2012, 97f. **Dissertação** (Mestrado em Vigilância Sanitária), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.
- POLLA, S. F.; SCHERER, F. Perfil alimentar e nutricional de escolares da rede municipal de ensino de um município do Rio Grande do Sul. **Cad Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, 19(1): 111-116, 2011.
- POLLOCK, I.; WARNER, J.O. Effect of artificial food colours on childhood behaviour. **Archives of Disease in Childhood**; 65:74-77, 1990.
- POLÔNIO, M.L.T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para saúde pública brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.25, nº8, Agosto, 2009.
- PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.14, n.2, p.237-250, 2003.
- PRADO, M.A.; GODOY, H.T. Teores de corantes artificiais em alimentos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v.30, nº2, p268-273, 2007.
- PRESTES, O. D.; PRESTA, M. A.; KOLBERG, D. I. S.; ZANELLA, R.; ROSSATO, S. B.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L H. R. Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de histamina em vinho utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. **Química Nova**, v. 30, n.1, p. 18-21, 2007.
- QUEIJA, C.; QUEIRÓS, M. A.; RODRIGUES, L. M. A cor dos Alimentos. **Química - Bol. Soc. Portuguesa Quím.**v.80, p.6-11, 2001.
- RADOMSKI, J. L. Toxicology of food colors. **Annu Ver Pharmacology**, 14:127-137, 1974.
- RAMOS, M. STEIN, L. M. Desenvolvimento do comportamento alimentar infantil. **Jornal de Pediatria**, vol. 76, supl 3, s229-s237, 2000.
- RAO, P.; BHAT, R. V.; SUDERSHAN, R. V.; KRISHNA, T. P.; NAIDU, N. Exposure assessment to synthetic food colours of a selected population in Hyderabad, India. **Food Additives and Contaminants**, vol. 21, nº. 5, p. 415-421, may 2004.

RENHE, I.R.T. **Extração e estabilidade do corante azul de jenipapo (Genipa americana L.)**, Dissertação de Mestrado, CCEA/UFV, Viçosa, 49p, 2008.

REYES, F. G. R.; PRADO, M. A. JECFA – aditivos e contaminantes alimentares. **Notícias ILSI Brasil**; v.9, n.1, p.5-6, set 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, vol.27, nº5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. de L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R. da; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, vol.31, n.1, p.164-171, 2008.

ROLLEMBERG, M.C.E.; VIDOTTI, E.C.; Espectrofotometria derivativa: uma estratégia simples para a determinação simultânea de corantes em alimentos. **Química Nova**.v.29, nº2, p230-233, 2006.

ROSE, T. L. The functional relationship between artificial food colors and hyperactivity. **Journal of Applied Behavior Analysis**; nº. 4; 11: 439-446, 1978.

SALINAS, R. D. **Alimentos e nutrição: introdução à bromatologia**. 3ª Edição, Porto Alegre: Artmed, 2002. 280p.

SCHAB, D. W.; TRINH, N.T. Do artificial food colours promote hyperactivity in children with hyperactive syndromes? A meta-analysis of double-blind placebo-controlled trials. **Journal Dev Behav Pediatric**; 25:423-34, 2004.

SCHMITZ, B. de A. S.; RECINE, E.; CARDOSO, G. T.; SILVA, J. R. M. da; AMORIM, N. F. de A.; BERNARDON, R.; RODRIGUES, M de L. C. F. A escola promovendo hábitos alimentares saudáveis: uma proposta metodológica de capacitação para educadores e donos de cantina escolar. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 24 Sup 2: S312-S322, 2008.

SCHUMANN, S. P. A.; POLÔNIO, M. L. T.; GONÇALVES, E. C. B. de A. Avaliação do consumo de corantes artificiais por lactentes, pré-escolares e escolares. **CiencTecnol Aliment**, Campinas, 28(3): 534-539, jul-set. 2008.

SIEGEL, S.; CASTELLAN JR., N. J. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. Ed. Artmed / Bookman, 2006.

SILBERGELD, E, K.; ANDERSON, S. M. Artificial food colors and childhood behavior disorders. **Bull N Y Acad Med**; v. 58, nº.3; april 1982.

SOARES, L. M. V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.60, n.1, p.79-84, 2001.

SOUZA, S. V. C. de; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, 552, p. 25-35, 2005.

STEVENS, L. J.; KUCZEK, T.; BURGESS, J. R.; HURT, E.; ARNOLD, L. E. Dietary sensitivities and ADHD symptoms: thirty-five years of research. **Clinical Pediatrics**; 50(4): 279-293, december 2010.

STREIT, N.M.; CANTERLENE, L.P.; CANTO, M.W. do; HECKTHEUER, L.H.H. As clorofilas. **Ciência Rural**, vol. 35, nº. 3, Santa Maria, Mai/Jun, 2005.

TAKEUCHI, K. P.; SABADINI, E.; CUNHA, R. L. da. Análise das propriedades mecânicas de cereais matinais com diferentes fontes de amido durante o processo de absorção de leite. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 25(1): 78-85, jan.-mar. 2005.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. International Union of Pure and Applied Chemistry (UIPAC). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure & Applied Chemistry**, v.74, n.5, p.835-855, 2002.

TOLEDO, M. C. F.; GUERCHON, M. S.; RAGAZZI, S. Potential weekly intake of artificial food colours by 3-14-year-old children in Brazil. **Food additives and contaminants**, v. 9; nº.4, p.291-301, 1992.

TRICHES, R. M.; GIUGLIANI, E. R. J. Obesidade, práticas alimentares e conhecimentos de nutrição em escolares. **Rev Saúde Pública**, 39(4): 541-547, 2005.

TUMA, R. C. F. B.; COSTA, T. H. M. da; SCHMITZ, B. de A. S. Avaliação antropométrica e dietética de pré-escolares em três creches de Brasília, Distrito Federal. **Ver Bras Saúde Matern Infant**, Recife, 5(4): 419:428, out/dez, 2005.

UENOJO, M.; MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformações para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, vol. 30; nº. 3, 616-622, 2007.

USPC – UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION. Validation of Compendial Methods <1225>, Rockville, p.2149-2163, 1999.

VASCONCELOS, M. M.; WERNER JR., J.; MALHEIROS, A. F. de A.; LIMA, D. F. N.; SANTOS, I. S. O.; BARBOSA, J. B. Prevalência do transtorno de déficit de atenção / hiperatividade numa escola pública primária. **Arq Neuropsiquiatria**; 61(1): 67-73, 2003.

WALFORD, J. **Developments in food colours - Volume I**. The developments series. Applied Science Publishers Ltd: England, 1980. 259p.

WALFORD, J. **Developments in food colours - Volume II**. The developments series. Applied Science Publishers Ltd: England, 1984. 257p.

WENDER, E. H. The food additive-free diet in the treatment of behavior disorders: a review. **J Develoip and Behav Pediatrics**; v.7; nº I, february, 1986.

WILLIAMS, P.; STIRLING, E.; KEYNES, N. Food fears: a national survey on the attitudes of Autralian adults about the safety and quality of food. **Asia Pacific J Clin Nutr**, 13(1): 32-39, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION(WHO). **Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases report of a WHO study group.** Genebra: World Health Organization, 1990.

YOUNG, E.; STONEHAM, M. D.; PETRUCKEVITCH, A.; BARTON, J.; RONA, R. A population study of food intolerance. **The Lancet**, vol. 343, p. 1127-1130, May 7, 1994.

ZANFERRARI, N. M.; DIAS, C. F. Perfil nutricional de crianças pré-escolares da rede pública e privada do município de Bauru. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente**, vol. 13, nº. 16, p. 29-43, 2010.

ZEIGER, E. Mutagenicity of chemicals added to foods. **Mutation Research**, 290:53-61, 1993.

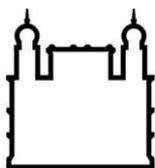
8 ANEXOS

8.1 Anexo 1 SNAP-IV

Características	Nem um pouco	Só um pouco	Bastante	Demais
1. Não consegue prestar muita atenção a detalhes ou comete erros por descuido nos trabalhos da escola ou tarefas				
2. Tem dificuldade de manter a atenção em tarefas ou atividades de lazer				
3. Parece não estar ouvindo quando se fala diretamente com ele				
4. Não segue instruções até o fim e não termina deveres de escola, tarefas ou obrigações				
5. Tem dificuldade para organizar tarefas e atividades				
6. Evita, não gosta ou se envolve contra a vontade em tarefas que exigem esforço mental prolongado				
7. Perde coisas necessárias para atividades (p. ex.: brinquedos, deveres de escola, lápis ou livros)				
8. Distrai-se com estímulos externos				
9. É esquecido em atividades do dia-a-dia				
10. Mexe com as mãos ou os pés ou se remexe na cadeira				
11. Sai do lugar na sala de aula ou em outras situações em que se espera que fique sentado				
12. Corre de um lado para outro ou sobe demais nas coisas em situações em que isso é inapropriado				
13. Tem dificuldade em brincar ou envolver-se em atividades de lazer de forma calma				
14. Não para ou frequentemente está a “mil por hora”				
15. Fala em excesso				
16. Responde às perguntas de forma precipitada antes delas terem sido terminadas				
17. Tem dificuldade de esperar a sua vez				
18. Interrompe ou outros ou se intromete (p. ex.: mete-se nas conversas, jogos)				

FONTE: MATTOS et al, 2005.

8.2 Anexo 2
Questionário



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



**“AVALIAÇÃO DO TEOR DE CORANTES ARTIFICIAIS EM CEREAIS
MATINAIS: CONTRIBUIÇÃO PARA AVALIAR A EXPOSIÇÃO DE
CRIANÇAS DE 2 A 8 ANOS”**

Nome da Criança: _____
Escola: _____ Série: _____
Idade: _____ Data de Nascimento: _____
Sexo: () Masculino () Feminino

Assinale com um X a frequência de consumo do **CEREAL MATINAL** (Ex: Sucrilhos[®]) que a criança consumiu habitualmente durante os últimos 6 meses:

- | | |
|----------------------------|-----------------------------|
| () Nunca | () 2 a 4 vezes por semana |
| () Menos de 1 vez por mês | () 1 vez por dia |
| () 1 a 3 vezes por mês | () 2 ou mais vezes por dia |
| () 1 vez por semana | |

Assinale com um X a quantidade de **CEREAL MATINAL** que a criança consome a cada frequência:

- | | |
|----------------------|-------------------|
| () ½ xícara de chá | () 1 tigela |
| () 1 xícara de chá | () 1 prato raso |
| () 2 xícaras de chá | () 1 prato fundo |

Assinale com um X o sabor do **CEREAL MATINAL** que a criança consome:

- () Tradicional
() Chocolate
() Frutas (colorido)

8.3 Anexo 3

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO PARA DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS EM CEREAIS MATINAIS

SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Campo de Aplicação
3. Definições
4. Siglas
5. Condições Gerais
6. Condições Específicas
7. Avaliação
8. Bibliografia

1. OBJETIVO

Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas no Setor de Contaminantes, para a determinação de três corantes artificiais em cereais matinais.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este POP aplica-se na determinação de corantes artificiais presentes nos cereais matinais.

3. DEFINIÇÕES

Para efeito deste POP é adotada a seguinte definição:

3.1. Corante

Substância que confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento

3.2. Repetição

Alíquotas de uma mesma amostra preparadas e analisadas independentemente

3.3. Replicata

Injeções, leituras de uma mesma alíquota ou amostra

4. SIGLAS

São utilizadas no texto deste Pop as seguintes siglas:

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

C₁₈ - Gel de Sílica Funcionalizada com Octadecilsilano

P.A. - Para Análise

UV/vis - Ultravioleta / Visível

SVS - Secretaria de Vigilância Sanitária

MS - Ministério da Saúde

DI - Diâmetro Interno

5. CONDIÇÕES GERAIS

A determinação dos corantes artificiais é realizada pela extração do corante presente no alimento com solução alcoólica de amônia 10% (v/v) à ebulição, e o isolamento através da eluição de solução aquosa de álcool iso-propílico 60% (v/v) em cartuchos SEP-PACK[®] C₁₈. Após evaporação completa do álcool iso-propílico do eluato e diluição em água a amostra é analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

6. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

6.1. Vidrarias

- a) balões volumétricos de 10 e 100 mL;
- b) pipetas volumétricas de 1, 2, 3 e 20 mL;
- c) microsseringas de 100 e 1000 µL;
- d) seringas hipodérmicas de 5 e 10 mL;

- e) tubo de vidro graduado de 15 mL;
- f) reservatório para fase móvel;
- g) provetas de 50, 100, 250 e 1000 mL;
- h) béquer de 100 mL;
- i) tubos de polipropileno de 50 mL;
- j) vials de vidro de 1 mL.

6.2. Equipamentos

- a) balança analítica com resolução de 0,01 mg;
- b) cromatógrafo a líquido com modo de operação gradiente;
- c) detector UV/vis WATERS 2487 (variável e com duplo comprimento de onda);
- d) coluna de fase reversa SYMETRY C₁₈ (dimensões: 150 mm x 3,9 mm - 4 µm DI);
- e) coluna de guarda C₁₈;
- f) cartucho SEP-PACK[®] C₁₈;
- g) cartucho contendo uma membrana filtrante hidrofílica de 0,45 µm (Millex[®]);
- h) membrana filtrante hidrofílica 0,45 µm;
- i) banho ultrassônico;
- j) bomba de pressão à vácuo;
- k) bloco de evaporação;
- l) injetor automático WATERS 717 PLUS AUTOSAMPLER;
- m) centrífuga;
- n) banho-maria até 100°C.

6.3. Padrões e Reagentes

- a) Amarelo Crepúsculo (90,00% de pureza);

- b) Vermelho 40 (80,00% de pureza);
- c) Azul Brilhante (65,00% de pureza);
- d) Ácido acético P.A.;
- e) Metanol grau cromatográfico;
- f) Acetato de amônio;
- g) Álcool iso-propílico P.A.;
- h) Etanol 96% P.A.;
- i) Hidróxido de amônio P.A.;
- j) água desionizada tipo Milli-Q®.

6.4. Preparo da Solução Estoque

Pesar 0,1 g de cada corante, separadamente, transferir quantitativamente para balões de 100 mL e avolumar com água desionizada. Preparar 3 soluções estoque para cada corante.

6.5. Preparo de Soluções Padrão a Serem Utilizadas para a Curva Analítica

As soluções padrão para a curva analítica devem ser preparadas de acordo com o limite de restrição de cada corante, sendo calculada a faixa aplicável mínima e após a determinação da faixa de trabalho linear, onde o ponto central da curva seja o limite de restrição do corante, considerando a alíquota de análise. Para o corante **amarelo crepúsculo**, toma-se os volumes da solução estoque descritos na tabela 1, e completa-se o volume para 10 mL com água desionizada. A curva analítica foi validada conforme orientações descritas no POP n.º 65.3120.126 (INCQS/FIOCRUZ).

Como a análise das amostras ocorreu concomitantemente à validação da curva analítica, foi utilizado para o cálculo da concentração do corante na amostra em questão a planilha de Bazílio e colaboradores (2012).

Segundo o POP n.º 65.3120.126 (INCQS/FIOCRUZ) é preconizado para determinações de rotina, a elaboração de uma nova curva analítica, com apenas 3 pontos, em triplicata de análise, considerando para tal os pontos de menor e maior concentração e o central da curva analítica.

Tabela 1 - Pontos da Curva Utilizados para a Validação e Determinação da Concentração

Concentração Correspondente (mg/L)	15	20	25	30	35	40	45
Volume da Solução Estoque (μL)	150	200	250	300	350	400	450

Para os corantes **vermelho 40** e **azul brilhante**, toma-se os volumes da solução estoque descritos na tabela 2 e completa-se o volume para 10 mL com água desionizada.

Tabela 2 - Pontos da Curva Utilizados para a Validação e Determinação da Concentração

Concentração Correspondente (mg/L)	05	10	15	20	25	30	35
Volume da Solução Estoque (μL)	50	100	150	200	250	300	350

6.6. Condições Cromatográficas

- Fase Móvel: água/metanol (70:30 v/v);
- Fase de Acondicionamento: solução de acetato de amônio 0,08 M em água/metanol (70:30 v/v);
- Fluxo: 0,5 mL/min;
- Comprimentos de Onda: 475 e 600 nm;
- "Loop": 500 μL ;
- Volume de Injeção: 20 μL .

Notas:

- a) Deve-se degaseificar, filtrar e ajustar o pH das fases móvel e de acondicionamento na faixa entre 6 e 7;
- b) Entre cada injeção, lava-se o sistema com a fase de acondicionamento durante 10 minutos.

6.7. Confeção da Curva Analítica

Nas condições de operação indicadas no item 6.1.6, injetar 3 repetições cada ponto da curva de cada padrão e construir um gráfico a partir das áreas obtidas contra a concentração do padrão.

6.8. Preparo da Amostra

6.8.1. Extração dos corantes contidos na amostra

Pesar 30 g da amostra, o equivalente a 1 porção do cereal, separado por cores, triturar até obter um pó fino. Pesar 5 g da amostra homogeneizada em um béquer de 100 mL, adicionar 20 mL de água desionizada e homogeneizar com o auxílio de um bastão de vidro.

Adicionar 40 mL de solução alcoólica de hidróxido de amônio 10% (preparado com 900 mL de etanol 96% e 100 mL de hidróxido de amônio) e levar ao banho-maria, em ebulição, por 10 minutos. Retirar do banho-maria e deixar em repouso, até separar o precipitado, passar o líquido sobrenadante, vagarosamente, para outro béquer de 100 mL. Adicionar ao precipitado 10 mL da solução alcoólica de hidróxido de amônio e levando ao banho-maria, repetir de forma a completar o volume para 90 mL do filtrado ou até não sair mais cor no líquido sobrenadante.

Centrifugar o líquido sobrenadante a 5000 rpm, por 20 minutos a fim de separar as fase e filtrar a parte líquida em membrana filtrante hidrofílica 0,45 µm. Avolumar o filtrado para 100 mL, em um balão volumétrico calibrado. Tomar 20 mL, em pipeta volumétrica calibrada, e levar para o tubo de ensaio graduado e evaporar à secura. Quando tiver apenas o corante no tubo de ensaio graduado, avolumar a 5 mL com água desionizada.

Levar ao ultrassom por 10 minutos a 27°C, para garantir a completa solubilização do corante na água.

6.8.2. Tratamento do cartucho SEP-PAK[®] C₁₈

Tratar o cartucho SEP-PAK[®] C₁₈ com 2 mL de álcool iso-propílico PA e em seguida com 5 mL de solução aquosa de ácido acético 1% (v/v).

6.8.3. Tratamento da amostra

Passar os 5 mL da solução de extração do corante da amostra no cartucho SEP-PAK[®] C₁₈ tratado e posteriormente extrair o corante que ficou retido com 10 mL de solução aquosa de álcool iso-propílico 60%.

Evaporar todo o álcool, completar o volume de 10 mL com água desionizada e levar ao ultrassom por 10 minutos a 27°C, para garantir a completa solubilização do corante na água.

Por fim, filtrar em cartucho contendo membrana filtrante hidrofílica de 0,45µm (Millex[®]) e injetar no CLAE.

6.9. Determinação dos Teores de Corantes Artificiais

A quantificação é feita por interpolação da área dos picos cromatográficos obtidos na curva analítica.

6.9.1. Cálculos dos parâmetros de regressão

$$Y = bX \text{ (mg/L)} + a$$

Onde: X = concentração dos corantes em mg/L

Y = área do pico cromatográfico

b = coeficiente angular da equação da reta obtida pela curva analítica

a = coeficiente linear da equação da reta obtida pela curva analítica

Logo, a concentração dos corantes na alíquota analisada é:

$$X \text{ (mg/L)} = \frac{Y - a}{b}$$

6.9.2. Correção da concentração do volume final tomado (10 mL):

$$X (mg) = X (mg/L) \times \frac{10}{1000}$$

6.9.3. Correção da concentração na amostra em relação à massa tomada da amostra (1g) e ao limite de restrição na resolução em g/100g

$$X (g/100g) = \frac{X (mg/L) \times 10^{-3}}{1}$$

6.9.4. Concentração final real em relação à recuperação

$$\text{Concentração real} = X (g/100g) \times \frac{\text{Recuperação}}{100}$$

6.10. Resultados

A concentração final dos corantes é dada pela média das três repetições da amostra.

7. AVALIAÇÃO

A Resolução n.º 60 de 05 de setembro de 2007 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do MS estabelece os limites de restrição para os corantes artificiais em cereais e produtos de ou a base de cereais.

Limite de Restrição do corante artificial amarelo crepúsculo: 300 mg/kg (0,03 g/100g).

Limite de Restrição dos corantes artificiais vermelho 40 e azul brilhante: 200 mg/kg (0,02 g/100g).

8. BIBLIOGRAFIA

Validação de metodologias com determinação através de curva analítica linear. In: **Manual da Qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 4.3 (POP 65.3120.126)

BAZILIO, F. S.; ET AL. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Analytica**, v.59, p.60-67, 2012. ISSN: 167-3055. Disponível em: http://www.revistaanalytica.com.br/ed_anteriores/59/analytica.pdf. Acesso em: 20/02/2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária (2007). Resolução nº 60, 05 de Setembro de 2007. Cereais e Produtos ou a Base de Cereais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 2007. Seção1. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 de Maio de 2011.