

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Maria Clara de Oliveira Pinheiro

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AOS CORANTES ARTIFICIAIS POR CRIANÇAS
ENTRE 3 E 9 ANOS EM RELAÇÃO AO CONSUMO DE BALAS**

Rio de Janeiro
2012

Maria Clara de Oliveira Pinheiro

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AOS CORANTES ARTIFICIAIS POR CRIANÇAS
ENTRE 3 E 9 ANOS EM RELAÇÃO AO CONSUMO DE BALAS**

Dissertação de conclusão de curso apresentada
ao Programa de Pós-graduação em Vigilância
Sanitária do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo
Cruz como requisito para obtenção do título de
Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadora: Dra. Shirley de Mello Pereira
Abrantes

Rio de Janeiro
2012

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Pinheiro, Maria Clara de Oliveira

Avaliação da exposição aos corantes artificiais por crianças entre 3 e 9 anos em relação ao consumo de balas / Maria Clara de Oliveira Pinheiro. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

98 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2012.

Orientador: Shirley de Mello Pereira Abrantes

1. Corantes. 2. Consumo de coantes. I. Título.

ASSESSMENT OF EXPOSURE TO ARTIFICIAL DYES FOR CHILDREN BETWEEN 3 AND 9
YEARS IN RELATION TO CONSUMPTION OF CANDIES

Maria Clara de Oliveira Pinheiro

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AOS CORANTES ARTIFICIAIS POR CRIANÇAS
ENTRE 3 E 9 ANOS EM RELAÇÃO AO CONSUMO DE BALAS**

Dissertação de conclusão de curso apresentada
ao Programa de Pós-graduação em Vigilância
Sanitária do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo
Cruz como requisito para obtenção do título de
Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Helena Pereira da Silva Zamith
(INCQS / FIOCRUZ)

Prof. Dr. Marco Antonio Mota da Silva
(UEZO)

Prof. Dra Cyllene de Matos Ornelas da Cunha Corrêa de Souza
(Alimentação legal consultoria, auditoria e treinamento em segurança alimentar)

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

Dedico este trabalho e todas as minhas conquistas a minha melhor amiga, minha amada mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar comigo em todos os momentos felizes e menos felizes da vida, mesmo quando eu não encontro tempo para agradecê-lo pelas infinitas maravilhas que me proporciona.

À Nossa Senhora, minha “Mãezinha do Céu” por sua interseção e suas bênçãos.

À minha orientadora, Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes, por permitir que eu seja uma de suas “sementes”, me oferecendo todo apoio, paciência, ajuda, amizade e compreensão durante a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Ao Vinicius Vaz Cabral Nery, por ser o responsável por me apresentar a minha orientadora e por ser um amigo fundamental na minha vida.

Às minhas amigas, Ariane, Diovana e a minha “sócia” Maithe por toda ajuda para que eu conseguisse passar para o mestrado.

Ao químico Fábio Bazilio Silvestre, por toda a paciência, apoio, conselhos e orientações.

À professora Dra. Helena Pereira da Silva Zamith, revisora e presidente da minha banca, muito obrigada por todas as sugestões, pela sua disposição em me ajudar e por todo o tempo que despendeu corrigindo e engrandecendo este trabalho.

Aos professores Dr. Marco Antonio Mota da Silva, Dra. Cyllene de Matos Ornelas da Cunha Corrêa de Souza, Dr. Fábio Coelho Amendoeira e Dra. Sidinéa Cordeiro de Freitas que em meio aos seus inúmeros compromissos se dispuseram a participar da minha banca examinadora, os meus sinceros e afetuosos agradecimentos.

Ao chefe da biblioteca do INCQS, Alexandre Medeiros, pela ajuda e pelas rápidas correções, muito obrigada!

Aos colegas Rodrigo, Ana Cláudia, Iara, Marcus e Ângela pelos momentos de descontração e apoio durante as horas na “bancada”.

A Fundação Oswaldo Cruz pela oportunidade e pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Nacional de Controle De Qualidade Em Saúde pela oportunidade e pelos conhecimentos adquiridos.

A todos da Coordenação de Pós-Graduação do Instituto Nacional do Controle de Qualidade em Saúde pela colaboração.

A professora, amiga, e grande orientadora Dra. Ana Maria Wandelli, pelo carinho e apoio desde a graduação, me amparando e incentivando a iniciar e seguir a carreira acadêmica. Muito obrigada!

Ao meu pai do coração, Tio Elson, por sempre estar ao meu lado, me incentivando e amparando. Obrigada por ser o meu espelho.

A tia e madrinha Teresinha, por todo o carinho e estímulo que sempre me ofereceu. Sua torcida foi fundamental para impulsionar cada uma de minhas conquistas.

À toda minha família, meu amado pai Antonio Carlos, tios, padrinhos, irmãos, sobrinhas e primos que são meu porto seguro, por todas as situações em que estive ausente para me dedicar aos estudos.

Ao meu amor e noivo, Igor Nikitiuk, por todo o apoio, incentivo, carinho, paciência e compreensão dedicados a mim durante este período. Seu amor foi fundamental para esta conquista. Obrigada por suas noites de sono perdidas me ajudando e por estar ao meu lado!

E finalmente, mas em primeiro lugar no meu coração, agradeço a minha mãe, Lila Clara, amor da minha vida e maior motivo para eu querer melhorar a cada dia.

Para ter algo que nunca teve é preciso fazer algo que nunca fez.

Chico Xavier

RESUMO

Sabe-se que a única função dos corantes alimentares é conferir cor ao alimento não oferecendo nenhum valor nutritivo a este. Estudos vêm demonstrando a ocorrência de reações adversas a curto e longo prazo, devido ao consumo de alimentos que apresentam corantes artificiais. As reações variam desde reações tóxicas no metabolismo desencadeantes de alergias, alterações no comportamento, em geral, e carcinogenicidade, esta última observada em longo prazo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o consumo de corantes artificiais presentes em balas consumidos por estudantes com idade entre 3 e 9 anos da rede particular de ensino do bairro da Tijuca no município do Rio de Janeiro. Um questionário sobre o consumo de balas foi elaborado e enviado aos responsáveis pela criança para ser respondido. Os dados foram tratados no Microsoft Office Excel 2007. Verificou-se que aproximadamente 88% das crianças fazem uso semanal destas guloseimas. Os rótulos das balas foram analisados para se verificar os tipos de corantes utilizados. Observou-se que os corantes artificiais que constavam nos rótulos dos produtos mais consumidos pelas crianças eram: Vermelho 40 (E129), Azul brilhante (E133), Azul de indigotina (E132) e Amarelo crepúsculo (E110) e nenhum dos rótulos apresentou os teores dos corantes utilizados. Um método analítico para verificar e quantificar a presença de corante em balas foi validado e desenvolvido. Todas as balas analisadas estavam de acordo com a legislação, ou seja, não apresentavam mais de três corantes artificiais em sua composição e não ultrapassavam o limite máximo permitido pela legislação para cada corante. Porém, é relevante mencionar que a grande parte das crianças entrevistadas pode estar excedendo a ingestão diária aceitável (IDA) desses corantes, uma vez que a exposição não é dada somente pelo consumo de balas, mas pela totalidade do consumo de outros produtos coloridos artificialmente, como refrescos, gelatinas, refrigerantes, entre outros.

Palavras chaves: corantes artificiais, consumo, estudantes, balas, chicletes, validação.

ABSTRACT

It is known that food coloring is only to color the food, not offering any nutritional value to it. Studies have demonstrated the occurrence of adverse reactions to short and long term, due to consumption of foods with artificial dyes. The reactions may range from toxic reactions in the metabolism of triggering allergies, to changes in behavior, in general, and carcinogenicity, the latter observed in long-term. The objective of this study was to evaluate the present consumption of artificial dyes in candies consumed by students aged between 3 and 9 years of private schools located in Tijuca in the city of Rio de Janeiro. A candy consumption survey was developed and sent to those responsible for the child to be answered. The data were processed in Microsoft Office Excel 2007. It was found that approximately 88% of children make use of these weekly sweets. The candy labels were analyzed to verify the types of dyes used. It was observed that the artificial dyes that appeared on the labels of the products most consumed by children were: Red 40 (E129), Brilliant Blue (E133), indigo blue (E132) and sunset yellow (E110) and none of the labels showed the coloring agent level used. A method to verify and quantify the presence of dye in candies was developed and validated. All candies were analyzed according to the law, ie, had no more than three artificial dyes in each sample composition and did not exceed the maximum allowed by law for each dye. However, it is important to mention that the most of children reported they may exceed the acceptable daily intake (ADI) thereon, since exposure is given not only by the use of candies, but the entire consumption of other products artificially colored, as soft drinks, jellies, among others.

keywords: artificial dyes, consumption, students, candies, chewing gum, validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de análise da bala mole	38
Figura 2 - Esquema de análise das balas duras	40
Figura 3 - Esquema de preparo das soluções de trabalho de amarelo crepúsculo.	42
Figura 4 - Esquema de preparo das soluções de trabalho de vermelho 40, azul brilhante ou indigotina.	42
Figura 5 - Tendência do consumo de balas por crianças de 3 a 9 anos de idade em 15 escolas do bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.	48
Figura 6 - Cores de balas mais consumidas por crianças de 3 a 9 anos de idade em 15 escolas do bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.	49
Figura 7 – Corante amarelo crepúsculo / monoazo.....	53
Figura 8 - Corante vermelho 40 / monoazo.....	53
Figura 9 – Corante azul brilhante / trifenilmetano.....	53
Figura 10 – Corante indigotina / indigóide.....	53
Figura 11 – Cromatograma a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 presente na bala bA.....	55
Figura 12 – Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 na bala bA.	56
Figura 13- Cromatograma a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 presente na bala bN.....	57
Figura 14 - Cromatograma a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante indigotina presente na bala bN.	57
Figura 15 - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 da bala bN.	58
Figura 16 - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante indigotina da bala bN.	58
Figura 17 - Cromatograma a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 presente na bala bO.....	59
Figura 18 - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 da bala bO.	59
Figura 19 – Cromatograma a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 presente na bala bP.	60
Figura 20 - Cromatograma a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante amarelo crepúsculo presente na bala bP.....	61
Figura 21 - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 da bala bP... ..	61
Figura 22 – Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante amarelo da bala bP.....	62
Figura 23 - Cromatograma a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 presente na bala bQ.....	63
Figura 24– Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante amarelo da bala bQ.	63
Figura 25 – Curva analítica final pelo método CLAE para o vermelho 40.	64

Figura 26 – Curva analítica final pelo método CLAE para o amarelo crepúsculo.	65
Figura 27 – Curva analítica final pelo método CLAE para o azul brilhante.	65
Figura 28 – Curva analítica final pelo método CLAE para indigotina.....	65
Figura 29 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva analítica do vermelho 40.	66
Figura 30 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva analítica do amarelo crepúsculo.	66
Figura 31 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva analítica do azul brilhante.	66
Figura 32 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva analítica da indigotina.	67
Figura 33 - Gráfico de Durbin-Watson da curva analítica (e_i x e_{i-1}) – vermelho 40.....	69
Figura 34 - Gráfico de Durbin-Watson da curva analítica (e_i x e_{i-1}) – amarelo crepúsculo.....	69
Figura 35 - Gráfico de Durbin-Watson da curva analítica (e_i x e_{i-1}) – azul brilhante.....	69
Figura 36 - Gráfico de Durbin-Watson da curva analítica (e_i x e_{i-1}) – indigotina.	70
Figura 37 – Curvas do corante vermelho 40 em solvente (A) e na matriz dura (B).	77
Figura 38 – Curvas do corante amarelo crepúsculo em solvente (A) e na matriz dura (B).....	77
Figura 39 – Curvas do corante azul brilhante em solvente (A) e na matriz dura (B).....	78
Figura 40 – Curvas do corante indigotina em solvente (A) e na matriz dura (B).	78
Figura 41– Faixa de exposição semanal ao corante vermelho 40 – bala bA em crianças de 3 a 9 anos em 15 escolas no bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.	84
Figura 42 – Faixa de exposição semanal aos corantes vermelho 40 e indigotina – bala Bn em crianças de 3 a 9 anos em 15 escolas no bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.....	84
Figura 43 – Faixa de exposição semanal ao corante vermelho 40 – bala bO em crianças de 3 a 9 anos em 15 escolas no bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.	84
Figura 44 – Faixa de exposição semanal ao corante vermelho 40 – bala bP em crianças de 3 a 9 anos em 15 escolas no bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.	85
Figura 45 – Faixa de exposição semanal ao corante vermelho 40 – bala bQ em crianças de 3 a 9 anos em 15 escolas no bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nome, código, cor, IDA e limite máximo dos corantes artificiais para categoria 5 para uso em balas, confeitos, bombons, chocolates e similares.	27
Tabela 2 - Questionários enviados	36
Tabela 3 - Questionários enviados por escola.	47
Tabela 4 - Balas mais consumidas pelas crianças em 15 escolas do bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.....	50
Tabela 5 - Balas coloridas artificialmente mais consumidas pelas crianças de 3 a 9 anos de idade em 15 escolas do bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.	51
Tabela 6 - Composição das balas coloridas artificialmente mais consumidas pelas crianças de 3 a 9 anos de idade em 15 escolas do bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.....	52
Tabela 7 – Normalidade dos resíduos.	67
Tabela 8 – Teste de Levene para homogeneidade das variâncias dos resíduos.....	68
Tabela 9 – Teste de Dubin-Watson para não autocorrelação dos resíduos	68
Tabela 10 - Resultados da análise de variância quanto a significância da regressão.....	70
Tabela 11 - Resultados da análise de variância quanto a significância da regressão.....	71
Tabela 12 - Resultados da análise de variância quanto a significância da regressão.....	71
Tabela 13 - Resultados da análise de variância quanto a significância da regressão.....	72
Tabela 14 – Resumo das análises de premissas de linearidade pelo método MMQO.	73
Tabela 15 – Testes para análise de premissas para curva analítica em matriz ($\alpha = 0,05$) para o corante vermelho 40.....	74
Tabela 16 – Testes para análise de premissas para curva analítica em matriz ($\alpha = 0,05$) para o amarelo crepúsculo.....	74
Tabela 17 – Testes para análise de premissas para curva analítica em matriz ($\alpha = 0,05$) para o corante azul brilhante.	75
Tabela 18 – Testes para análise de premissas para curva analítica em matriz ($\alpha = 0,05$) para o corante indigotina.....	75
Tabela 19 - Resultados dos testes para avaliação do efeito matriz ($\alpha = 0,05$) no corante vermelho 40.	76
Tabela 20 - Resultados dos testes para avaliação do efeito matriz ($\alpha = 0,05$) no corante amarelo crepúsculo.....	76
Tabela 21 - Resultados dos testes para avaliação do efeito matriz ($\alpha = 0,05$) no corante azul brilhante.	76
Tabela 22 - Resultados dos testes para avaliação do efeito matriz ($\alpha = 0,05$) no corante indigotina.....	77
Tabela 23 – Resultados dos testes para avaliação de efeito matriz em balas moles.	79
Tabela 24 – Avaliação da repetitividade em matriz de bala dura	80

Tabela 25 – Avaliação da repetitividade em amostras de balas moles	80
Tabela 26 – Avaliação da Precisão intermediária do método CLAE ¹ para análise de corantes através de ensaios realizados em três dias diferentes	81
Tabela 27 – Limites e Detecção e de Quantificação das curvas analíticas para análise de corantes (mg / L)	81
Tabela 28 – Recuperação de corantes em diferentes tipos de balas pelo método CLAE ¹	82
Tabela 29 – Concentração final dos corantes nas balas pelo método CLAE ¹	83
Tabela 30 – Composição da mistura A de corantes (Stevenson e colaboradores - 2007)	86
Tabela 31 – Composição da mistura B de corantes (Stevenson e colaboradores - 2007)	86

LISTA DE SIGLAS

°C - Graus Celsius

μL – Microlitro

μm - Micrômetro

a.C – antes de Cristo

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CNNPA - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos

CRE - Coordenadoria Regional de Educação

CV - Coeficiente de variação

FAO - Food and Agriculture Organization

FDA - Food and Drug Administration

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FMA – faixa mínima aplicável

FT - Faixa de trabalho

g – grama

h – Hora

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

IPEC - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

ISO – International Organization for Standardization

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

JCGM – Joint Committee for Guides in Metrology

JECFA - Joint Expert Committee on Food Additives - FAO/WHO

kg – Quilograma

LM – Concentração da alíquota final de análise

LM1 – Concentração da alíquota final de análise em fração de massa

LMP – Limite máximo permitido

LOD – limite de detecção

LOQ – Limite de Quantificação

M - Molar

mg - Miligrama

min - Minutos

mL - Mililitro

MMQO - Método dos Mínimos Quadrados Ordinários

MRC - Material de referência certificado

nm – nanômetro

NBR – Normas brasileiras

OMS – Organização Mundial de Saúde

POP - Procedimento Operacional Padrão

RJ – Rio de Janeiro

Si – Desvio padrão de precisão intermediária

UE - União Européia

UV – ultravioleta

WHO – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	FORMAÇÃO DO HÁBITO ALIMENTAR	18
1.2	ADITIVOS ALIMENTARES	19
1.3	CORANTES.....	20
1.4	CORANTES ARTIFICIAIS	21
1.5	BALAS	21
1.6	TOXICIDADE E ALTERAÇÕES DE COMPORTAMENTO CAUSADAS POR CORANTES	22
1.7	AÇÕES DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA NO USO DE CORANTES ARTIFICIAIS	25
1.8	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA	28
1.8.1	Linearidade.....	28
1.8.2	Homocedasticidade.....	29
1.8.3	Exatidão	29
1.8.4	Recuperação	29
1.8.5	Precisão	29
1.8.5.1	Repetitividade.....	30
1.8.5.2	Precisão Intermediária	30
1.8.5.3	Reprodutibilidade	30
1.8.6	Limite de Detecção (LOD).....	30
1.8.7	Limite de Quantificação (LOQ).....	31
1.9	JUSTIFICATIVA	31
2	OBJETIVOS	32
2.1	OBJETIVO GERAL.....	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	EQUIPAMENTOS	33
3.2	VIDRARIAS	33
3.3	REAGENTES.....	34
3.4	PROCEDIMENTOS GERAIS	34
3.4.1	Elaboração do Questionário	34
3.4.2	Elaboração dos Escores.....	35
3.4.3	Avaliação de consumo	35
3.5	AMOSTRAS	37

3.6	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	37
3.6.1	Análise das Amostras.....	37
3.6.1.1	Bala Dura	37
3.6.1.2	Balas Moles	38
3.6.2	Validação Intralaboratorial.....	40
3.6.2.1	Faixa de Trabalho	40
3.6.2.2	Linearidade.....	41
3.6.2.3	Efeito Matriz	43
3.6.2.4	Repetitividade.....	44
3.6.2.5	Precisão Intermediária	44
3.6.2.6	Limite de Quantificação (LOQ) e Limite de Detecção (LOD).....	45
3.6.2.7	Recuperação	45
3.7	TRATAMENTO DE DADOS	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	AVALIAÇÃO DE CONSUMO.....	46
4.2	ANÁLISE DE CORANTES ARTIFICIAIS NAS AMOSTRAS DE BALAS	54
4.2.1	Bala bA	54
4.2.2	Bala bN	56
4.2.3	Bala bO	58
4.2.4	Bala BP	60
4.2.5	Bala bQ	62
4.3	VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL.....	64
4.3.1	Faixa de Trabalho	64
4.3.2	Linearidade.....	64
4.3.3	Efeito Matriz	73
4.3.4	Repetitividade.....	79
4.3.5	Precisão Intermediária	81
4.3.6	Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ).....	81
4.3.7	Recuperação	82
4.4	EXPOSIÇÃO AOS CORANTES PRESENTES EM BALAS.....	83
4.5	NOTA	87
5	CONCLUSÕES.....	88
	REFERÊNCIAS.....	89
	APÊNDICE A.....	94
	APÊNDICE B.....	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 FORMAÇÃO DO HÁBITO ALIMENTAR

A ingestão de alimentos, que são uma mistura complexa de agentes químicos é uma das principais vias de exposição do homem a diferentes compostos. (ARAÚJO, 2000).

A dieta da população vem empobrecendo a cada dia devido a mudança no hábito alimentar dos brasileiros e a substituição de alimentos *in natura* por alimentos processados. Este hábito resultou em modificações no padrão de adoecimento global na segunda metade do século XX, contribuindo para o aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis, responsáveis principalmente, pelas doenças do aparelho circulatório, diabetes e neoplasias. Fatores de riscos ambientais e comportamentais, como a alimentação inadequada, obesidade, dislipidemias, tabagismo e a inatividade física estão fortemente associados ao surgimento dessas enfermidades (PERES, 2009).

Durante a primeira infância os hábitos alimentares são formados. Nesse processo, estão envolvidos valores culturais, sociais, afetivos ou emocionais e comportamentais. A percepção de que existe uma grande diferença entre o ato social de comer e a atividade biológica de nutrir-se se torna cada vez mais evidente (TADDEI, 2009).

A criança influencia e é influenciada por aqueles que estão ao seu redor, exercendo um papel ativo desde os primeiros anos de vida, quando já é capaz de influenciar os cuidados e as relações familiares de que participa. (TADDEI, 2006).

Os meios de comunicação têm participação ativa nas atividades corriqueiras infanto-juvenis e acabam desempenhando um papel estruturador na construção e desconstrução dos hábitos e práticas alimentares (SERRA, 2003).

Linn (2006) assinalou em seu estudo, que a propaganda agrada às emoções, não ao intelecto e afeta mais fortemente crianças que adultos. Perigosamente, as indústrias alimentícias exploram a vulnerabilidade das crianças, com o falso conceito de alimento como algo que dê poder.

É preciso ter um olhar amplo para a saúde e nutrição infantil, uma vez que diversos alimentos industrializados, que compõe cotidianamente a alimentação das crianças apresentam aditivos alimentares, que podem provocar efeitos adversos à saúde (PERES, 2009).

1.2 ADITIVOS ALIMENTARES

Aditivo para alimentos é definido pela *Food and Agriculture Organization/World Health Organization* (FAO/WHO) 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” (FAO, 1974).

Os aditivos alimentares têm sido cada vez mais utilizados no desenvolvimento de novos produtos industrializados (GONÇALVES, 2008).

Edulcorantes também são adjuvantes utilizados com frequência para tornar as formulações orais para crianças mais palatáveis, tendo em vista que o açúcar usado nessas preparações é contra-indicado para crianças diabéticas, além de favorecer o aparecimento de cáries. (BALBANI, 2006).

O adoçante aspartame utilizado em xaropes e preparações pediátricas mostrou potencial carcinogênico em ratos, na dose diária equivalente à utilizada em humanos. Por passar diretamente para o feto, causando-lhe mal formação cerebral, mulheres grávidas não devem consumir esse adoçante (SOFFRITTI, 2007).

Os corantes são aditivos imprescindíveis para a conquista de mercados pela indústria, pois o aspecto visual é fundamental para a seleção e escolha de um produto (GONÇALVES, 2008).

1.3 CORANTES

Inúmeros produtos alimentícios originalmente não apresentam cor ou ela pode ser perdida ou alterada durante o processamento, surgindo então à necessidade da adição de corantes com a finalidade de conferir ou restaurar a coloração perdida (ROLLEMBERG, 2006).

A cor influencia nossas decisões, principalmente, as que envolvem a escolha dos alimentos. A segurança, aparência, características sensoriais e aceitabilidade dos alimentos são todas afetadas pela cor (QUEIJA, 2001).

As associações inerentes às características psicológicas, como a cor influenciar no sabor e, conseqüentemente, na preferência por certos alimentos e bebidas, interferem na escolha do produto e dificultam a quantificação do sabor. Isto se torna um problema para as indústrias, pois a relação causa-efeito não pode ser ignorada (GODOY, 2003).

Com a finalidade de melhorar a aparência dos alimentos, as civilizações antigas tinham o hábito de retirar substâncias da natureza para colorir seus alimentos (DOWNHAM, 2000). Existem evidências arqueológicas que indicam que os antigos egípcios usavam hena, carmim e outros corantes nos cabelos e na pele, cerca de 5000 a.C. Cerca de 1500 a.C, na China, Índia e Egito os corantes passaram a ser utilizados em alimentos (ARAÚJO, 2000).

A maior justificativa da indústria para o emprego dos corantes é melhorar a aparência do produto para aumentar sua aceitabilidade (PRADO, 2007).

“Os alimentos quando são atraentes, vistosos e coloridos, só podem ser deliciosos”; essa é a lógica do consumo iniciada pelos olhos, pois antes mesmo do paladar, os alimentos coloridos atraem as pessoas pela visão (PRADO, 2007).

A manutenção da cor natural do alimento é um fator fundamental para o marketing do produto. (PRADO, 2007). Entretanto, a única função dos corantes alimentares é conferir cor ao alimento não oferecendo nenhum valor nutritivo a este.

Numa produção em larga escala, os corantes são de suma importância sob o ponto de vista tecnológico, garantindo a uniformidade do produto (ABRANTES, 2007), porém o uso inadequado desses corantes pode mascarar alimentos mal processados ou deteriorados (PRADO, 2007).

1.4 CORANTES ARTIFICIAIS

O interesse da indústria pelos corantes artificiais aumentou, com a descoberta dos corantes sintéticos nos séculos XVIII e XIX. Além de a cor influenciar na aparência e, conseqüentemente, em uma maior aceitação dos produtos pelos consumidores, os corantes artificiais poderiam ser utilizados na tentativa de disfarçar alimentos de baixa qualidade. (GODOY, 2003).

Além de apresentarem um custo relativamente menor que os corantes naturais, os corantes artificiais apresentam uma taxa de coloração maior e são mais estáveis. Associado a pouca disponibilidade dos corantes naturais, o uso de corantes sintéticos pelas indústrias alimentícias aumenta a cada dia (ABRANTES, 2007).

O público infantil é o maior consumidor de alimentos coloridos, pois a indústria investe nesses produtos para as crianças por serem mais atrativos e influenciarem sua escolha. Porém, a presença de reações alérgicas sofridas pelas crianças não é rara, pois elas apresentam maior suscetibilidade às reações adversas provocadas pelos aditivos alimentares, devido a sua “imaturidade fisiológica”, que prejudica o metabolismo e a excreção dessas substâncias (PERES, 2009).

As diferenças farmacodinâmicas entre crianças e adultos ainda não foram esclarecidas de modo detalhado (MELLO, 2004).

Além disso, a capacidade cognitiva de um adulto para controlar um consumo regular ainda não é observada em uma criança. (GONÇALVES, 2008).

1.5 BALAS

As balas são produtos baratos e sozinhas custam apenas alguns centavos, sendo uma linha de comércio bastante lucrativa, já que praticamente não oneram o consumidor e muitas vezes substituem uma moeda de troco. Grandes investimentos em propagandas são realizados pelos fabricantes de guloseimas para conquistar o mercado e tornar seu produto cada vez mais atrativo, sendo uma de suas estratégias o uso de corantes artificiais. (PRADO, 2007).

1.6 TOXICIDADE E ALTERAÇÕES DE COMPORTAMENTO CAUSADAS POR CORANTES

Inúmeros estudos assinalam reações adversas aos aditivos alimentares, quer seja aguda ou crônica, tais como reações tóxicas no metabolismo desencadeantes de alergias, alterações comportamentais e carcinogenicidade (observada em longo prazo) (PERES, 2009). Porém os estudos sobre os possíveis danos causados pelos corantes artificiais à saúde ainda são insuficientes e bastante contraditórios (GODOY, 2003).

Não existe nenhum estudo de abrangência nacional ou internacional que tenha sido realizado para avaliar a verdadeira dimensão da alergia alimentar ao redor do mundo. Os dados de prevalência ou incidência de alergia alimentar, na maior parte das vezes, são obtidos com o estudo de pequenos grupos populacionais, com metodologia diagnóstica variável e, em geral, com resultados não extrapoláveis (RUBINI, 2007).

Corantes também são empregados em formulações farmacêuticas para crianças. O amarelo de tartrazina, por exemplo, tem estrutura química semelhante à de salicilatos, benzoatos e indometacina, possibilitando reações alérgicas cruzadas com esses fármacos (BALBANI, 2006).

A Câmara Técnica de Alimentos da Anvisa e a Universidade Federal Fluminense estão avaliando evidências clínicas do potencial alergênico daquele corante, porém os dados ainda não são conclusivos para que seja acrescentado aviso de precaução no rótulo (ANVISA, 2007).

Enquanto alguns estudos demonstram que corantes artificiais presentes nos alimentos podem ter efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos, isto é, podem induzir mutações no ácido desoxirribonucleico (ADN) e podem favorecer o desenvolvimento de tumores (ARAÚJO, 2000), outras pesquisas apontam efeito antitumoral nos corantes artificiais (KAPADIA, 1998).

As primeiras suspeitas da possível ação cancerígena dos corantes surgiram em 1906. Observou-se um crescimento celular atípico em coelhos que tiveram o corante vermelho escarlate injetado sob a pele da orelha e em 1924 foi verificado que a ingestão deste corante por camundongos podia induzir a formação de adenomas hepáticos (GODOY, 2003).

Ainda não existe concordância no uso de corantes artificiais entre os países, enquanto os Estados Unidos proíbem o uso de amaranto, azorrubina, ponceau 4R e azul patente, a União Europeia não permite o uso de verde rápido (ALISON, 2000).

O amaranço é proibido nos Estados Unidos devido a estudos realizados neste país apontarem um poder carcinogênico deste corante, porém no Canadá, seu uso é liberado, pois os testes não demonstram problemas de carcinogenicidade (GODOY, 2003).

Estudo realizado para verificar ação antitumoral em 29 corantes artificiais permitidos pelo FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos observou ação antitumoral da tartrazina e do índigo, além da eritrosina em ensaios *in vitro*, apresentando ação quimiopreventiva, com uma redução de até 50% na formação de papiloma em ratos (KAPADIA, 1998).

Em contra partida, outro estudo realizado no Japão, demonstrou que alguns corantes como a tartrazina e o amarelo crepúsculo podem inibir a síntese de tromboxano, além de interferir na coagulação sanguínea e alguns corantes vermelhos utilizados naquele país também podem interferir na coagulação sanguínea (YAMAZAKI, 1994).

Pesquisa realizada para investigar o efeito do corante eritrosina na reprodução de camundongos machos e sua influência na espermatogênese demonstrou, que houve diminuição significativa nos níveis de espermatozóides, diminuição da mobilidade e aumento do número de espermatozóides com cabeças anormais em camundongos, que sofreram administração deste corante em diferentes doses durante 21 dias. Verificou-se que o corante eritrosina interferiu de forma significativa na espermatogênese por desencadear ação tóxica em células germinativas dos camundongos machos (ABDEL-AZIZ, 1997).

Estudo realizado para investigar o uso prolongado da tartrazina e seus efeitos na mucosa gástrica de ratos apontou aumento significativo na produção de linfócitos e eosinófilos na mucosa antro gástrica. Não foi observada nenhuma alteração carcinogênica na dose de 7,5 mg de corante por kg de peso corpóreo/dia, durante dez meses. Os autores sugerem novos estudos com doses e tempos de exposição diferentes para observar mais claramente os efeitos carcinogênicos (MOUTINHO, 2007).

Sugimura, et al, demonstraram em seu estudo que a eritrosina e tartrazina apresentam potencial carcinogênico, alterando o “*turn-over*” das células durante seu crescimento normal ou no processo de hiperplasia regenerativa, colaborando para a incidência do câncer (SUGIMURA, 1982).

Outra pesquisa realizada com o corante eritrosina não demonstrou efeito mutagênicos para este corante, além de ter sido considerado um eficiente agente antimutagênico, inibindo as mutações induzidas pelo benzopireno, além de ter sido fortemente antimutagênico para o agente mitomicina C em *Salmonella*, por meio da interação com as enzimas de reparo do DNA (LAKDAWALLA, 1988).

Uma revisão sistemática de estudos experimentais realizada na França avaliou a segurança do consumo de tartrazina. Seus autores chegaram à conclusão que os efeitos adversos à saúde atribuídos a este corante são superestimados e que os mecanismos patogênicos ainda não foram satisfatoriamente compreendidos, porém, eles alertam para os produtos comercializados com este corante sem a devida rotulagem, que podem se configurar num risco a saúde (ELHKIM, 2007).

Em um estudo realizado durante consulta médica de rotina de crianças holandesas com idade entre 4 e 15 anos, os aditivos alimentares foram as substâncias mais assinaladas pelos pais e/ou responsáveis como culpados por manifestações clínicas e prevalência de reações adversas a alimentos. (BRUGMAN, 1998).

Os corantes que mais se destacam nas alterações do comportamento humano são tartrazina, amaranço, ponceau 4R, eritrosina e caramelo amoniacal (PERES, 2009).

Ben Feingold, há mais de trinta anos, fez a primeira observação sobre o suposto efeito dos corantes artificiais e outros aditivos alimentares na exacerbação da hiperatividade e agressividade no comportamento infantil (STEVENSON, 2007).

Nos EUA foi observado que a exposição a corantes poderia estar causando um grande aumento de crianças com desordem de déficit de atenção, dificuldade de aprendizado e outras desordens de comportamento, tais como, hiperatividade, desordem agressiva e deficiência emocional (PRESSINGER, 1997). Uma pesquisa publicada por Stevenson e colaboradores (Lancet; 2007) mostrou que misturas de aditivos, comumente achadas em alimentos, que continham os corantes amarelo crepúsculo, azorrubina, tartrazina, ponceau 4R, amarelo quinoleína e vermelho 40, quando administrada em alimentos infantis, causava aumento da hiperatividade em crianças nas idades de 3 a 9 anos. Os autores demonstraram que o uso destes aditivos acentua comportamentos como desatenção e impulsividade.

Estudo realizado com crianças hiperativas com idade entre 7 e 13 anos, demonstrou que 60% apresentava aumento da hiperatividade quando consumiam alimentos e bebidas coloridos artificialmente. Já o grupo controle, composto por crianças não hiperativas, teve apenas 12% de citações de problemas associados aos corantes artificiais. Acredita-se que a hiperatividade das crianças pode ser associada a diminuição de Zn e Fe no plasma sanguíneo e conseqüente aumento destes na urina, quando comparados com crianças do grupo controle. Apenas as crianças hiperativas apresentaram queda nos níveis de Zn plasmático e aumento de Zn na urina após consumir os corantes tartrazina e amarelo crepúsculo. Vinte e três crianças consumiram bebidas contendo tartrazina, destas, 18 aumentaram os níveis de hiperatividade,

16 se tornaram agressivas, 4 violentas, 2 diminuíram seus movimentos, 12 tiveram diminuição da coordenação motora e 8 desenvolveram asma (WARD, 1997).

Ainda existem muitas incertezas a respeito do emprego de aditivos alimentares, entre eles, os corantes artificiais, como os responsáveis pelo aparecimento do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade. Alguns estudos evidenciaram melhora no quadro clínico da hiperatividade quando as crianças foram submetidas a uma dieta isenta dessas substâncias. Porém é preciso melhorar a metodologia de confirmação diagnóstica para que a criança não seja submetida sem necessidade a uma dieta de exclusão de forma inadequada. (PERES, 2009)

1.7 AÇÕES DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA NO USO DE CORANTES ARTIFICIAIS

A participação efetiva dos órgãos de regulação na vigilância dos produtos com aditivos visando à proteção e promoção da saúde se faz necessária e indispensável. (PERES, 2009).

Em 1962, a *Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO)* designou um comitê, conhecido por *Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA)*, para avaliar sistematicamente o potencial tóxico, a mutagenicidade e carcinogenicidade dos aditivos para alimentos. O JECFA, baseado em dados experimentais, tem a missão de sugerir, ou não, o uso de determinado aditivo. Quando recomenda o uso, o JECFA também deve estabelecer o valor da Ingestão Diária Aceitável (IDA) para cada aditivo (ARAÚJO, 2000).

Segundo a FAO/WHO a Ingestão Diária Aceitável ou IDA de uma substância, expressa em mg/kg de peso corpóreo/dia, é definida como a quantidade de substância que, ingerida diariamente e durante a vida pelo homem, parece não oferecer riscos à saúde humana, à luz dos conhecimentos toxicológicos atuais.

No Brasil a regulamentação do uso de aditivos para alimentos, incluindo os corantes, é de competência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

O Decreto nº 50.040 de 24 de Janeiro de 1961, do Ministério da Saúde, foi a primeira norma técnica de regulamentação para o emprego de aditivos químicos em alimentos. Ele determina quais os alimentos em que podem ser empregados cada corante e seus limites máximos permitidos. O Artigo nono descreve que os corantes permitidos para serem introduzidos na fabricação de alimentos e bebidas são: corantes naturais, caramelo e corantes artificiais. Considerando:

Corante natural - os pigmentos considerados inócuos extraídos de produtos vegetais ou animais.

Caramelo - o produto obtido, a partir de açúcares, pelo aquecimento a temperatura superior ao seu ponto de fusão, e anterior tratamento indicado pela tecnologia.

Corante artificial - a substância corante artificial de composição química definida, obtida por processo de síntese.

A Resolução nº 44/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde estabelece as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos (e bebidas).

Nesta Resolução os corantes permitidos para uso em alimentos e bebidas são classificados da seguinte forma:

- **Corante orgânico natural** - aquele obtido a partir de 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.

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** - o 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 quilo).

A Resolução nº 387, de 05 de Agosto de 1999, emitida pela ANVISA, estabelece o regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 5: balas, confeitos, bombons, chocolates e similares.

Os corantes artificiais permitidos para balas, confeitos, bombons, chocolates e similares são: amaranço, amarelo crepúsculo, azorrubina, azul brilhante, azul patente V, eritrosina, indigotina, ponceau 4R, verde rápido, vermelho 40 e tartrazina (BRASIL, 1999). Apesar dos corantes artificiais citados serem permitidos pela ANVISA, a possibilidade de efeitos adversos a saúde não é nula (ALISON, 2000).

Na **Tabela 1** estão descritos os nomes comerciais, os códigos de identificação utilizados no Brasil, a cor referente a cada corante, a IDA e os limites máximos de cada corante permitidos para balas, confeitos, bombons, chocolates e similares descrito na Resolução nº 387 do Ministério da Saúde.

Tabela 1 - Nome, código, cor, IDA e limite máximo dos corantes artificiais para categoria 5 para uso em balas, confeitos, bombons, chocolates e similares.

NOME	CÓDIGO	COR	IDA (mg/kg de peso corpóreo)	LIMITE de MÁXIMO (mg/100g)
Amaranto	E123	Magenta	0,50	10,0
Amarelo	E110	Laranja	2,50	10,0
Crepúsculo				
Azorrubina	E122	Vermelho	4,00	5,00
Azul Brilhante	E133	Azul turquesa	10,00	30,00
Azul Patente V	E131	Azul	15,00	30,00
Eritrosina	E127	Pink	0,10	5,00
Indigotina	E132	Azul royal	5,00	30,00
Ponceau 4R	E124	Cereja	4,00	10,00
Verde Rápido	E143	Verde mar	10,00	30,00
Vermelho 40	E129	Vermelho alaranjado	7,00	30,00
Tartrazina	E102	Amarelo limão	7,50	30,00

Fonte: (ABRANTES, 2010).

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 os riscos da ingestão continuada de aditivos alimentares para a saúde. Desafios imprescindíveis para o campo da saúde coletiva (PERES, 2009).

1.8 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA

Segundo as Orientações Sobre Validação de Métodos Analíticos, os laboratórios devem dispor de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio de validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. A validação consiste na comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico foram atendidos (INMETRO, 2011).

A qualidade dos dados analíticos é um fator importante para garantir a segurança alimentar. Para os corantes artificiais não basta, simplesmente, provar que o produto é colorido artificialmente, cada corante, ou mistura desses, deve ser detectado e quantificado individualmente, o que tem sido dificultado, principalmente, pela falta de métodos analíticos adequados: (GODOY, 2003).

1.8.1 Linearidade

O estudo da linearidade tem por objetivo determinar a habilidade de um método analítico em produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa de concentração especificada (CODEX, 2007).

Para avaliação da linearidade é necessário se obter uma relação entre a concentração do analito e as respostas obtidas que no caso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), corresponde à área de pico cromatográfico, e verificar se a relação entre eles obedece a um modelo linear. A relação é obtida através da confecção de uma curva analítica construída pelo uso de concentrações equidistantes de analito e da verificação de suas respostas (INMETRO, 2011).

1.8.2 Homocedasticidade

É estudo que verifica a homogeneidade da variância dos resíduos. O uso do método estatístico dos mínimos quadrados ordinários supõe que cada ponto da curva analítica tenha uma variação absoluta constante (SOUZA, 2007).

1.8.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a concordância dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor de referência (ISO STANDARD 3534-2, 2006). Esse parâmetro pode ser expresso como percentual de recuperação, durante a determinação de uma concentração conhecida de substância em exame num meio de composição definida.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2011).

1.8.4 Recuperação

A recuperação de um analito é a relação entre o resultado experimental obtido depois da análise de uma amostra fortificada com uma quantidade conhecida do analito, e o valor teórico desta quantidade fortificada. O analito pode ser adicionado nas amostras em pelo menos três concentrações diferentes: próximo ao limite de quantificação, próxima a concentração esperada (limite estabelecido por regulamentação) e em uma concentração máxima da faixa de uso do método.

O teste de recuperação é utilizado principalmente em métodos que dependem de transferência / extração do analito a partir de uma matriz complexa, pois a possível perda de analito precisa ser observada (IUPAC, 1998).

1.8.5 Precisão

É a característica que mede o grau de proximidade entre os resultados individuais de um teste quando se aplica o método analítico a múltiplas preparações de uma amostra homogênea. A precisão pode ser medida através do grau de repetitividade, precisão

intermediária e/ou reprodutibilidade do método analítico sob condições normais de operação. Usualmente ela é expressa pelo desvio padrão entre os resultados obtidos (INMETRO, 2011).

1.8.5.1 *Repetitividade*

É a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições realizadas em um curto espaço de tempo. A repetitividade é verificada, por no mínimo, 7 repetições genuínas (INMETRO, 2011).

1.8.5.2 *Precisão Intermediária*

A precisão intermediária refere-se a concordância entre os resultados de uma mesma amostra, em um mesmo laboratório, com o mesmo método, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

Este teste é considerado o mais representativo da variabilidade dos resultados em um laboratório, portanto, é a mais aconselhável de usar (INMETRO, 2011).

1.8.5.3 *Reprodutibilidade*

Refere-se aos resultados de estudos colaborativos entre laboratórios, verificando o desempenho de seus métodos aos dados de validação obtidos por comparação interlaboratorial (INMETRO, 2011).

1.8.6 Limite de Detecção (LOD)

O LOD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

No caso de métodos como a CLAE, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base (INMETRO, 2011).

1.8.7 Limite de Quantificação (LOQ)

LOQ é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

1.9 JUSTIFICATIVA

A escolha de balas para este estudo deve-se ao fato de serem produtos amplamente consumidos pela população infantil e pela maioria apresentar corantes artificiais em sua composição (PRADO, 2007).

O controle dos níveis de corantes artificiais nos alimentos é de fundamental importância devido aos riscos toxicológicos associados ao consumo dessas substâncias. Deste modo, o presente estudo busca contribuir com a Vigilância Sanitária através de geração de dados e mecanismos para o monitoramento da presença e dos níveis destes aditivos em balas e chicletes, a fim de prevenir agravos à saúde da população infantil.

Este trabalho provoca a oportunidade de divulgar informações, despertar o interesse e a curiosidade dos responsáveis das crianças sobre o tema.

Inúmeros estudos divergem sobre a ação mutagênica e anti-mutagênica dos corantes artificiais e uma pesquisa publicada na *The Lancet* em 2007 comprovou que a administração de uma mistura de corantes artificiais comumente encontrada em alimentos infantis aumentam a hiperatividade em crianças de 3 e 8/9 anos (STEVENSON, 2007).

Com isto justifica-se a necessidade deste projeto e de uma ação de Vigilância Sanitária mais eficaz no que diz respeito aos aditivos presentes nos alimentos, abrangendo os riscos acarretados pelo consumo de corantes alimentares como um dos grandes desafios da Saúde Pública.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Validar e desenvolver método analítico para determinar corantes artificiais presentes em balas e, avaliar a exposição de crianças entre 3 e 9 anos aos corantes artificiais presentes em balas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudo bibliográfico de toxicidade, uso e regulamentação dos corantes artificiais em balas;
- Realizar estudo de campo com a aplicação de um inquérito alimentar para verificar os corantes mais consumidos;
- Monitorar os corantes artificiais presentes em balas nacionais e importadas consumidos por estudantes de 3 a 9 anos em 15 escolas particulares do bairro da Tijuca, município do Rio de Janeiro;
- Validar método analítico para determinar os teores de corantes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Determinar os teores de corantes artificiais presentes nas balas mais consumidas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica Sartorius modelo R200D com resolução de 0,01mg;
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com modo de operação em gradiente, detector UV/vis WATERS – 2487 (variável e com duplo comprimento de onda), injetor automático WATERS 717 PLUS AUTOSAMPLER e computador para aquisição e processamento dos dados;
- Coluna de fase reversa SYMETRY[®] C₁₈ – WATERS;
- Coluna de guarda C₁₈ – WATERS;
- Cartucho SEP-PAK[®] C₁₈ – WATERS;
- Cartucho Millex[®] 0,45µm – MILLIPORE;
- Membrana filtrante 0,45µm – WATERS;
- Banho ultrassônico – BRANSON;
- Bomba de pressão a vácuo – MILLIPORE;
- Bloco de evaporação – PIERCE.

3.2 VIDRARIAS

- Balões volumétricos de 10, 25, 50, 100 e 1000 mL;
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 50 e 100 mL;
- Micropipetas de 100, 250 e 500 µL;
- Seringa hipodérmica;
- Tubo de vidro graduado de 15 mL;
- Reservatório para fase móvel;
- Proveta de 1000 mL;
- Becher 50 mL;
- Naveta de vidro borosilicato;
- Frasco de vidro borosilicato com capacidade para 100 mL.

3.3 REAGENTES

- Amarelo Crepúsculo (90,00% de pureza) – ALDRICH / Lote: 13911CS;
- Vermelho 40 (80,00% de pureza) – ALDRICH / Lote: 01911PU;
- Indigotina (85,00% de pureza) – SIGMA / Lote: 112F-0674;
- Azul Brilhante (65,00% de pureza) – WATERS / Lote: N42 090;
- Acido acético para análise (P.A.) – MERCK / Lote: Z201262 021;
- Metanol grau cromatográfico – VETEC / Lote: 0801974;
- Acetato de amônio P.A. – MERCK/ Lote: A712216 603;
- Álcool isopropílico P.A. – SIGMA / Lote: 00554LE;
- Água desionizada tipo Milli – Q[®].

3.4 PROCEDIMENTOS GERAIS

3.4.1 Elaboração do Questionário

Um questionário foi elaborado com o objetivo de identificar as balas mais consumidas por crianças de 3 a 9 anos, estudantes da rede privada de ensino no bairro da Tijuca, município do Rio de Janeiro, RJ.

No questionário foram solicitados dados da criança como escola, série, idade, data de nascimento e sexo. Duas perguntas abriam o questionário: “Qual a bala preferida da criança?” Em seguida, foi requerido que se marcasse com um “X” a quantidade de balas de cada cor que a criança consome por semana, sendo apresentadas as opções vermelha, roxa, azul, laranja, amarela, rosa, verde e outra cor, com as seguintes opções de quantidade de balas para cada cor: zero, 1 a 5 balas, 6 a 10 balas, 11 a 15 balas, 16 a 20 balas e mais de 20 balas. Em cada cor também foi solicitado o nome da bala consumida. O questionário continha um total de 2 páginas.

O questionário elaborado foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) junto com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido destinado aos pais e o Termo de Consentimento da Escola, sendo aprovado em 28 de Setembro de 2010.

3.4.2 Elaboração dos Escores

Escores têm sido utilizados para caracterizar hábitos alimentares, pois constituem uma boa medida-consumo das frequências de consumo dos diversos alimentos. Por meio de escore é possível agrupar e classificar os indivíduos em segmentos semelhantes.

Neste estudo, o escore foi desenvolvido tendo como base um questionário de frequência de consumo de balas, preenchido pelo responsável da criança, onde o consumo destes alimentos foi tratado como variável ordinal e recebeu os valores a seguir: zero ponto, quando a criança consumia zero bala de uma determinada cor por semana, um ponto, quando a criança consumia de 1 a 5 balas de determinada cor por semana, dois pontos, quando a criança consumia de 6 a 10 balas de determinada cor por semana, três pontos, quando a criança consumia de 11 a 15 balas de determinada cor por semana, quatro pontos, quando a criança consumia de 16 a 20 balas de determinada cor por semana e cinco pontos, quando a criança consumia mais de 20 balas de determinada cor por semana.

3.4.3 Avaliação de consumo

Para determinação do tamanho da amostra, utilizou-se a amostragem por atributo da ISO 2859-1 / Geneva, 1999, com um nível de inspeção geral AII, que no plano de amostragem simples indicou que de um total de 59 escolas particulares na Tijuca, seria necessário realizar a pesquisa em pelo menos 8 escolas.

Foram sorteadas aleatoriamente 15 escolas da Tijuca, que através de contato telefônico com a coordenação e direção receberam o convite para participar da pesquisa. A participação da escola consistia em enviar para a casa das crianças entre 3 e 9 anos o questionário e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para que fosse preenchido pelo responsável e devolvido a escola.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi enviado com informações sobre os objetivos e as finalidades da pesquisa. Junto, havia um termo de autorização para ser assinado pelo responsável legal da criança.

A aplicação do questionário foi realizada nos meses de Outubro e Novembro de 2010, nas 15 escolas participantes, em crianças de ambos os sexos, com idade entre 3 e 9 anos.

Após a devolução, os questionários foram recolhidos para análise dos resultados obtidos.

Cada escola recebeu o número de questionários referentes à quantidade de crianças com idade entre 3 e 9 anos matriculadas na instituição (**Tabela 2**), perfazendo um total de 2350 questionários distribuídos.

Tabela 2 - Questionários enviados

Escola	Questionários enviados
A	200
B	85
C	100
D	30
E	100
F	100
G	200
H	65
I	410
J	300
L	40
M	120
N	180
O	220
P	200
Total	2350

Os critérios utilizados para a inclusão na pesquisa foram: crianças estudantes de escolas particulares do bairro da Tijuca, crianças com idade entre 3 e 9 anos, questionários preenchidos corretamente e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelo responsável legal da criança, autorizando a participação na pesquisa.

Os critérios de exclusão da pesquisa foram: crianças que não estudam em escolas particulares situadas no bairro da Tijuca, crianças que não tenham entre 3 e 9 anos, questionários preenchidos incorretamente e ausência da assinatura do responsável legal da criança autorizando a participação na pesquisa.

3.5 AMOSTRAS

As amostras foram adquiridas, em comércio no bairro da Tijuca no Rio de Janeiro, tendo como base o resultado obtido na avaliação de consumo, concluído pelo questionário. Basicamente as amostras eram constituídas de dois tipos de balas: bala dura e bala mole, cuja diferença era presença (mole) ou ausência (dura) de gordura vegetal hidrogenada. A bala sem esta gordura foi codificada como bO e as balas com esta gordura foram codificadas como: bA, bN, BP, bQ.

3.6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.6.1 Análise das Amostras

As cinco amostras de balas selecionadas a partir dos questionários respondidos pelos responsáveis das crianças precisaram ter o método adaptado à concentração de corante presente em cada uma delas, para que o resultado obtido ficasse dentro da curva validada para cada corante. No caso do amarelo crepúsculo a faixa de concentração da curva validada foi de 3 a 9 mg L⁻¹ e no caso dos outros três corantes: vermelho 40, azul brilhante e indigotina a faixa de concentração da curva validada foi de 12 a 24 mg L⁻¹.

A determinação dos corantes artificiais é realizada por extração do corante com água da bala e seu isolamento, através da utilização de cartucho SEP-PAK[®] com álcool isopropílico e posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

Baseado no POP INCQS N° 65.3120.063 – “Determinação de Corantes Artificiais em Bebidas não Alcoólicas”, desenharam-se os métodos descritos abaixo para validar e determinar a presença e quantidade de corantes artificiais em balas.

3.6.1.1 *Bala Dura*

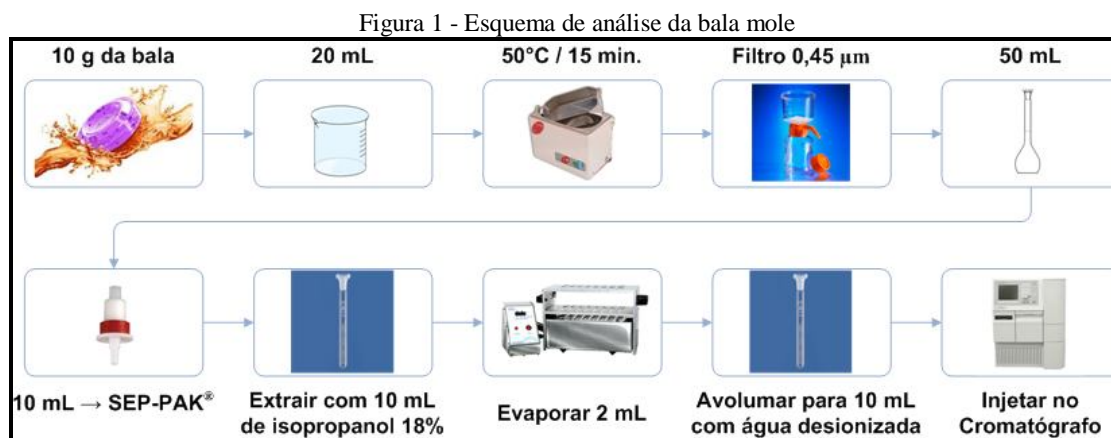
Bala bO

Pesou-se aproximadamente 10 g da bala, diluiu-se em aproximadamente 20 mL de água desionizada. A solução foi colocada no ultrassom à 50°C por 15 minutos. A solução foi passada em filtro de 0,45 µm e avolumada com água desionizada em balão de 50 mL; 10 mL

desta solução foi passada pelo SEP-PAK[®] C₁₈ pré-tratado e extraiu-se com 10 mL de solução de álcool isopropílico 18% para um tubo de ensaio graduado e calibrado. A solução foi evaporada aproximadamente até 8 mL e avolumada para 10 mL com água. Este procedimento foi realizado em triplicata. As três soluções originárias da bala foram injetadas no cromatógrafo simultaneamente com três pontos da curva validada (12, 18 e 24 mg L⁻¹) do corante descrito no rótulo da bala. Com este procedimento, as amostras já podiam ser analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo equipado com coluna de fase reversa C₁₈.

NOTA: Tratamento do cartucho SEP-PAK[®] C₁₈:

Antes de ser utilizado, o cartucho SEP-PAK[®] C₁₈, foi tratado com 2 mL de isopropanol e em seguida com 5 mL de solução aquosa de ácido acético 1% (v/v).



3.6.1.2 Balas Moles

O procedimento inicial para avaliar a presença e a concentração dos corantes descritos no rótulo das balas moles foi igual para todas as amostras, e consistiu em: pesou-se aproximadamente 10 g da bala, diluiu-se em aproximadamente 20 mL de água desionizada. A solução foi colocada no ultrassom à 50°C por 15 minutos, em seguida, a solução foi centrifugada a 5000 RPM por 10 minutos. A solução foi passada em filtro de 0,45 µm e avolumada com água desionizada em balão de 100 mL. Vinte mililitros desta solução foi passada pelo SEP-PAK[®] C₁₈ pré-tratado e extraiu-se com 10 mL de solução de álcool isopropílico 18% para um tubo de ensaio graduado e calibrado.

A partir deste ponto do ensaio, cada bala mole foi submetida a uma concentração diferente.

Bala bA

A solução contida no tubo foi evaporada aproximadamente até 1,5 mL e avolumada para 2 mL. Este procedimento foi realizado em triplicata. As três soluções da bala foram injetadas no cromatógrafo simultaneamente com três pontos da curva validada dos corantes descritos no rótulo da bala.

Bala bN

A solução foi evaporada aproximadamente até 4,5mL e avolumada para 5 mL. Este procedimento foi realizado em triplicata. As três soluções da bala foram injetadas no cromatógrafo simultaneamente com três pontos da curva validada (menor ponto, ponto do meio e maior ponto) dos corantes descritos no rótulo da bala.

Um dos corantes presentes no rótulo foi identificado no cromatograma, porém, sua concentração estava fora da curva (abaixo do menor ponto). Por este motivo o procedimento anterior foi repetido e os 10 mL da solução extraída do SEP-PAK[®] foi evaporada aproximadamente até 0,5 mL e avolumada para 1 mL. Este procedimento também foi realizado em triplicata. As três soluções da bala foram injetadas no cromatógrafo simultaneamente com três pontos da curva validada (menor ponto, ponto do meio e maior ponto) do corante descrito no rótulo da bala.

Bala bP

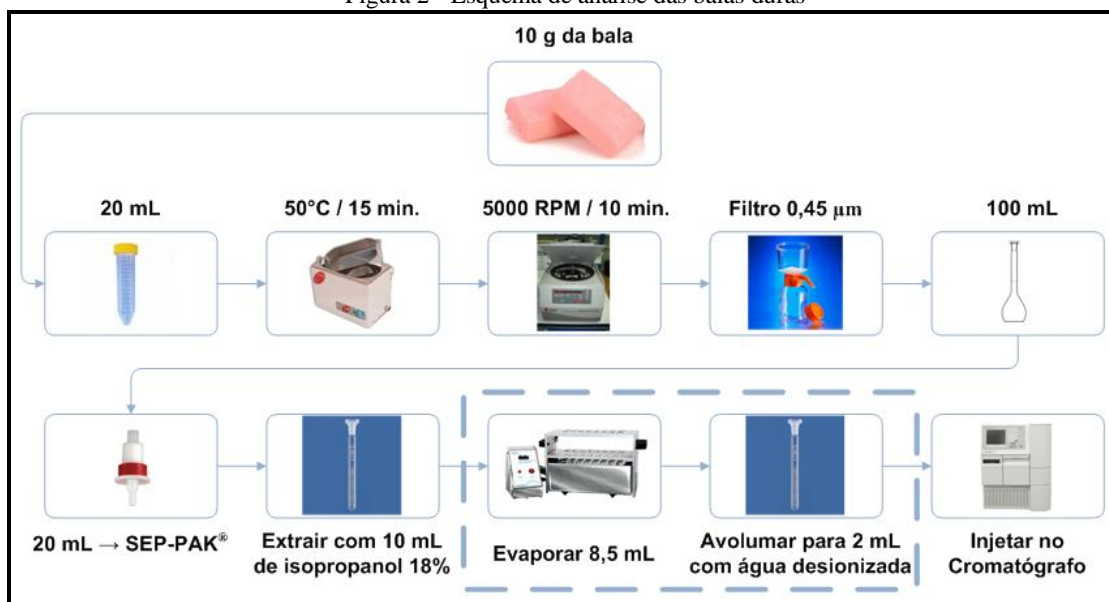
A solução foi evaporada aproximadamente até 8 mL e avolumada para 10mL. Este procedimento foi realizado em triplicata. As três soluções da bala foram injetadas no cromatógrafo simultaneamente com três pontos da curva validada (menor ponto, ponto do meio e maior ponto) dos corantes descritos no rótulo da bala.

Um dos corantes presentes no rótulo foi identificado no cromatograma, porém, sua concentração estava fora da curva (abaixo do menor ponto). Por este motivo o procedimento anterior foi repetido e os 10 mL da solução extraída do SEP-PAK[®] foi evaporada aproximadamente até 1,5 mL e avolumada para 2 mL. Este procedimento também foi realizado em triplicata. As três soluções da bala foram injetadas no cromatógrafo simultaneamente com três pontos da curva validada (menor ponto, ponto do meio e maior ponto) do corante descrito no rótulo da bala.

Bala bQ

A solução foi evaporada aproximadamente até 2,5 mL e avolumada para 3 mL. Este procedimento foi realizado em triplicata. As três soluções da bala foram injetadas no cromatógrafo simultaneamente com três pontos da curva validada (menor ponto, ponto do meio e maior ponto) do corante descrito no rótulo da bala.

Figura 2 - Esquema de análise das balas duras



3.6.2 Validação Intralaboratorial

A validação analítica foi realizada para os corantes artificiais presentes nas balas mais consumidas pelas crianças (vermelho 40, amarelo crepúsculo, indigotina e azul brilhante).

O procedimento para validação intralaboratorial foi basicamente o descrito por Bonfim e colaboradores (2010).

3.6.2.1 Faixa de Trabalho

A faixa de trabalho utilizada para cada corante artificial foi determinada com base na concentração da alíquota final de análise (LM), considerando o procedimento de isolamento do corante com concentração na amostra no seu limite máximo permitido (LMP) pela

Resolução nº 387 do Ministério da Saúde. Foi calculada a faixa de concentração mínima aplicável (FMA) pela fórmula:

$$FMA = LM \pm 0,06 \times LM \times (LM_1)^{-0,1505}$$

Onde:

FMA – faixa mínima aplicável;

LM – concentração da alíquota final de análise;

LM₁ – concentração da alíquota final de análise em fração de massa.

3.6.2.2 *Linearidade*

Foram preparadas 3 soluções estoque do corante S₁; S₂; S₃, pesando-se em balança analítica calibrada 3 massas de aproximadamente 0,1 g do padrão do corante. As massas foram transferidas quantitativamente para 3 balões volumétricos de 100 mL calibrados e foram avolumadas com água desionizada. Este procedimento foi realizado para os quatro corantes.

Uma série de 21 soluções de trabalho de cada corante foi preparada medindo-se volumes apropriados, conforme apresentado nas Figuras 1 e 2 (com auxílio de micropipetas calibradas e certificadas pelo laboratório de metrologia do INCQS) das soluções estoque S₁, S₂ e S₃ e, avolumando em balão volumétrico calibrado de 10 mL para o corante amarelo crepúsculo e 25 mL para os corantes vermelho 40, azul brilhante e indigotina.

Figura 3 - Esquema de preparo das soluções de trabalho de amarelo crepúsculo.

Amarelo crepúsculo em balão de 10 mL									
LMP = 0,01g/100g									
Concentração (mg/L)	Volumes tomados S₁			Volumes tomados S₂			Volumes tomados S₃		
3	S _{1.1}	←	30 µL	S _{2.1}	←	30 µL	S _{3.1}	←	30 µL
4	S _{1.2}	←	40 µL	S _{2.2}	←	40 µL	S _{3.2}	←	40 µL
5	S _{1.3}	←	50 µL	S _{2.3}	←	50 µL	S _{3.3}	←	50 µL
6	S _{1.4}	←	60 µL	S _{2.4}	←	60 µL	S _{3.4}	←	60 µL
7	S _{1.5}	←	70 µL	S _{2.5}	←	70 µL	S _{3.5}	←	70 µL
8	S _{1.6}	←	80 µL	S _{2.6}	←	80 µL	S _{3.6}	←	80 µL
9	S _{1.7}	←	90 µL	S _{2.7}	←	90 µL	S _{3.7}	←	90 µL

Figura 4 - Esquema de preparo das soluções de trabalho de vermelho 40, azul brilhante ou indigotina.

Vermelho 40, azul brilhante e indigotina em balão de 25 mL									
LMP = 0,03g/100g									
Concentração (mg/L)	Volumes tomados S₁			Volumes tomados S₂			Volumes tomados S₃		
12	S _{1.1}	←	300 µL	S _{2.1}	←	300 µL	S _{3.1}	←	300 µL
14	S _{1.2}	←	350 µL	S _{2.2}	←	350 µL	S _{3.2}	←	350 µL
16	S _{1.3}	←	400 µL	S _{2.3}	←	400 µL	S _{3.3}	←	400 µL
18	S _{1.4}	←	450 µL	S _{2.4}	←	450 µL	S _{3.4}	←	450 µL
20	S _{1.5}	←	500 µL	S _{2.5}	←	500 µL	S _{3.5}	←	500 µL
22	S _{1.6}	←	550 µL	S _{2.6}	←	550 µL	S _{3.6}	←	550 µL
24	S _{1.7}	←	600 µL	S _{2.7}	←	600 µL	S _{3.7}	←	600 µL

Após o preparo das soluções de trabalho, cada uma delas foi analisada nas seguintes condições cromatográficas:

- fase móvel: água/metanol (70:30, v/v);
- solução de acondicionamento: água/metanol (70:30, v/v) + acetato de amônio 0,08 M;
- fluxo: 0,5 mL/min;

- comprimento de onda: 475 e 600 nm;
- “loop”: 500 μL ;
- volume de injeção: 20 μL .

Nas condições indicadas acima, analisou-se 3 vezes cada ponto da curva de cada padrão e construiu-se um gráfico a partir das áreas obtidas contra a concentração das soluções padrão.

Posteriormente foi realizada a avaliação dos resíduos da regressão, através do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), que parte da premissa que os resíduos seguem a distribuição normal, têm variância constante e são independentes. Tais premissas relacionadas à análise de regressão foram avaliadas quanto à normalidade pelo método de Ryan e Joiner (1976); homogeneidade de variâncias como proposto por Levene (1960) e Brown e Forsythe (1974); e independência dos resíduos de regressão como indicado por Durbin e Watson (1951). O teste F foi conduzido para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação da significância da regressão (Draper e Smith, 1998).

3.6.2.3 *Efeito Matriz*

O efeito matriz dos corantes foi analisado a partir de duas matrizes de bala sem corantes em sua composição. Uma matriz era de bala dura (sem gordura vegetal hidrogenada) e a outra era de uma bala mole (com gordura vegetal hidrogenada).

Bala dura

A análise do efeito matriz dos corantes foi realizada a partir da preparação de uma nova curva analítica em matriz (bala sem corante), preparando-se amostras brancas (com ausência do analito) e fortificando ao final do procedimento com alíquotas das soluções estoque de cada corante, já preparadas, correspondentes aos níveis de concentração da curva analítica em solvente. Paralelamente foi preparado 3 amostras brancas sem adição do analito, nas mesmas condições da metodologia que estava sendo validada.

Bala mole

O efeito matriz foi analisado a partir das concentrações conhecidas do corante em estudo em cada bala “mole” analisada previamente, ou seja, neste teste, não houve a preparação de uma nova curva. O efeito matriz foi analisado somente nos pontos de concentração que cada corante se apresentava em cada bala.

Preparou-se a amostra branca (bala sem corante), submetendo-a ao mesmo procedimento que as amostras (balas com corantes) foram submetidas, e ao final do

procedimento a amostra branca foi fortificada de forma a ter a mesma concentração de corante encontrada nas três soluções de corante em água. Compararam-se as médias das concentrações da matriz branca adicionada de corante e das soluções de corantes em água pelo teste t de *Student*.

3.6.2.4 Repetitividade

Bala dura

Conforme o método utilizado para confecção da curva analítica, foram feitas 10 repetições genuínas de cada corante em concentração próxima ao limite máximo permitido pela legislação. As 10 repetições foram analisadas em sequência, e em seguida, a análise foi repetida alterando-se aleatoriamente a primeira sequência e novamente repetida alterando de maneira aleatória a sequência. As três replicatas das repetições foram integralmente analisadas, uma seguida da outra e o desvio padrão e coeficiente de variação foram calculados.

Bala mole

Foram feitas três análises independentes de cada bala calculando o desvio padrão da concentração do corante. A repetitividade foi calculada multiplicando o desvio padrão por 2,8; fator recomendado pela ISO 5725 (1994).

3.6.2.5 Precisão Intermediária

A avaliação da precisão intermediária foi realizada variando-se o dia de análise e o analista, a fim de verificar como estas mudanças poderiam interferir nas análises na rotina laboratorial. Cada uma das amostras (com concentração próxima ao limite máximo permitido pela legislação) foi repetida 4 vezes por cada um dos analistas, em dois dias. A precisão intermediária foi calculada conforme INMETRO (2011).

3.6.2.6 *Limite de Quantificação (LOQ) e Limite de Detecção (LOD)*

A determinação do LOQ e do LOD foi realizada após a avaliação da curva analítica mais adequada através das equações sugeridas por MILLER (1993).

3.6.2.7 *Recuperação*

Por não possuímos material de referência da bala, e por conta de observar com facilidade a total diluição do corante em água, assumiu-se que na extração do corante pela água, a perda é mínima ou praticamente nula. Isto porque, durante a filtração, é possível verificar que o filtro não apresenta nenhum resquício de coloração do corante. O mesmo procedimento foi utilizado para analisar a recuperação em balas moles e duras.

Desta maneira, o teste de recuperação foi realizado com o mesmo procedimento utilizado para a análise das amostras, porém, exclusivamente no solvente fortificado com o corante na mesma concentração encontrada nas balas com o corante. Conforme o tipo de bala mole ou dura tomou-se 20 ou 10 mL das soluções aquosas dos corantes começando o procedimento analítico pela eluição da solução pelo cartucho SEP-PAK[®] e continuando o procedimento normal. Em seguida, injetou-se no cromatógrafo. Concomitantemente, foi injetado um padrão com uma concentração conhecida e que era esperada na solução em solvente. A recuperação foi calculada conforme INMETRO (2011).

3.7 TRATAMENTO DE DADOS

Os dados foram tratados utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007 para análise de frequência e cruzamento dos dados.

A planilha eletrônica desenvolvida por Bazílio e colaboradores, foi utilizada na verificação da adequação das curvas analíticas ao modelo linear.

Na validação intralaboratorial do método analítico CLAE para determinar corantes artificiais presentes em balas os métodos estatísticos empregados no tratamento de valores aberrantes na avaliação da linearidade como os testes para verificação da normalidade e homogeneidade de variâncias dos dados, a autocorrelação dos resíduos, bem como os testes para análise da regressão e desvio de linearidade são mencionados ao longo da apresentação dos resultados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DE CONSUMO

De um total de 2350 questionários enviados, 707 (30,09%) foram devolvidos, destes, 99 estavam em branco e 104 não obedeciam aos critérios de inclusão na pesquisa.

A adesão ao estudo foi, portanto, de 21,45% (504 questionários) do total de questionários enviados. Este percentual refere-se ao número de questionários devolvidos, preenchidos corretamente e com o termo de consentimento assinado pelo responsável da criança.

Na Tabela 3 é possível observar que a adesão e o comprometimento das escolas em distribuir, incentivar o preenchimento por parte dos responsáveis e recolher os questionários variou bastante, o que refletiu no percentual de questionários devolvidos, tendo a variação de 95,0% de devolução da escola 5 a 1,00% da escola 10.

Tabela 3 - Questionários enviados por escola.

ESCOLA	Questionários enviados	Questionários devolvidos	% Questionários devolvidos	Questionários dentro do critério de aceitação	% Questionários dentro do critério de aceitação em relação ao total
1	200	28	14,00%	20	10,00%
2	85	31	36,47%	23	27,06%
3	100	42	42,00%	29	29,00%
4	30	10	33,33%	7	23,33%
5	100	95	95,00%	81	81,00%
6	100	30	30,00%	16	16,00%
7	200	85	42,50%	50	25,00%
8	65	9	13,85%	7	10,77%
9	410	104	25,37%	88	21,46%
10	300	3	1,00%	2	0,67%
11	40	24	60,00%	15	37,50%
12	120	73	60,83%	29	24,17%
13	180	32	17,78%	26	14,44%
14	220	80	36,36%	62	28,18%
15	200	61	30,50%	49	24,50%
Total	2350	707	30,09%	504	21,45%

Das 504 crianças entrevistadas 273 (54,2%) eram do sexo feminino e 231 (45,8%) do sexo masculino. Deste total, 6,5% com 3 anos, 11,3% com 4 anos, 10,7% com 5 anos, 16,9% com 6 anos, 11,9% com 7 anos, 21,2% com 8 anos e 21,4% com 9 anos.

O consumo de balas entre as crianças entrevistadas foi analisado baseado nos escores propostos na metodologia deste trabalho. O consumo total variou de 0 a 45 escores. No total, 60 crianças (11,9%) não consomem balas. Na figura 3 é possível verificar a tendência de consumo do grupo estudado. A maior parte de crianças (77,8%) consome até 11 escores por semana.

Figura 5 - Tendência do consumo de balas por crianças de 3 a 9 anos de idade em 15 escolas do bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.

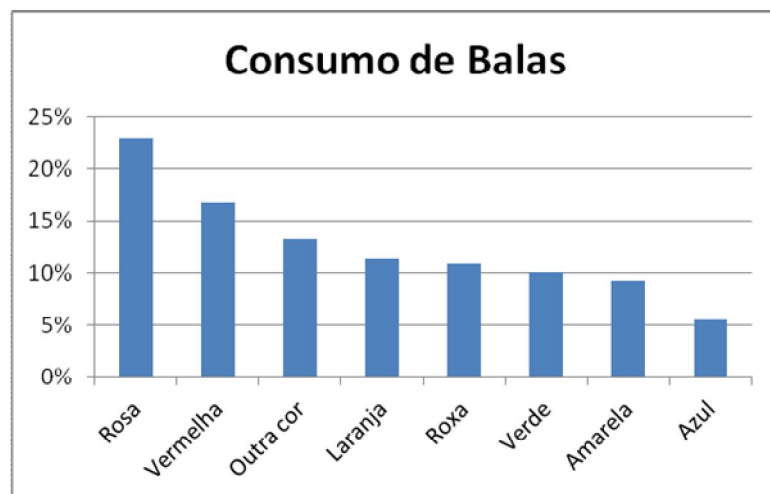


A partir da análise dos questionários foi possível identificar as cores e marcas de balas mais consumidas pelas crianças.

A cor de bala mais consumida pelas crianças foi a rosa representando 23% do consumo total de balas, seguida pelas cores vermelha (17%), balas de outra cor (13%), laranja (11%), roxa (11%), verde (10%), amarela (9%) e azul (6%) (Figura 4).

A cor predominante nas “balas de outra cor” foi a branca, representando 73,1% deste grupo.

Figura 6 - Cores de balas mais consumidas por crianças de 3 a 9 anos de idade em 15 escolas do bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.



Além do consumo, este estudo visou descobrir quais as balas preferidas das crianças.

As cinco balas mais citadas como preferidas das crianças foram: bala **bA**, sabor framboesa, cor rosa (22,4%), bala **bB**, sabor tutti-frutti, cor branca (8,3%), bala **bC**, vários sabores, colorida (7,1%), bala **bD**, vários sabores, colorida (3,8%) e bala **bE**, sabor menta, cor branca (3,0%).

Preferir uma marca de bala não significa que seu maior consumo será desta marca, pois a preferência nem sempre se reflete no consumo. É possível que se prefira uma bala, porém a disponibilidade e o preço levem ao consumo de outras marcas.

As quinze balas citadas como mais consumidas pelas crianças encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Balas mais consumidas pelas crianças em 15 escolas do bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.

Bala	Sabor	Cor	Número de crianças	% de crianças
bA	Framboesa	Rosa	159	31,5%
bB	Tutti-Frutti	Branca	71	14,1%
bF	Cereja	Vermelha	60	11,9%
bG	Morango	Rosa	58	11,5%
bH	Uva	Roxa	53	10,5%
bI	Abacaxi	Amarela	49	9,7%
bJ	Menta	Azul	48	9,5%
bL	Laranja	Laranja	42	8,3%
bM*	Laranja	Laranja	41	8,1%
bN	Uva	Roxa	36	7,1%
bO	Morango	Vermelha	33	6,5%
bP	Morango	Vermelha	32	6,3%
bQ	Framboesa	Vermelha	31	6,2%
bR	Morango	Vermelha	30	6,0%
bS*	Tutti-Frutti	Amarela	30	6,0%

*As balas **bM** e **bS** são brancas e provavelmente a cor que os pais citaram como sendo delas, foi confundida com a cor da embalagem, e as duas, não apresentam corantes em sua composição.

A bala mais consumida pelas crianças entrevistadas é a **bA**, sabor framboesa, cor rosa citada por 31,5% das crianças entrevistadas, seguida da bala **bB**, sabor tutti-frutti, cor branca, consumida por 14,1% das crianças e da bala **bF**, sabor morango, cor vermelha consumida por 11,9% das crianças.

Sabendo-se quais eram as marcas mais consumidas, foi possível analisar os 15 rótulos, identificando o perfil de corantes presentes na produção destes produtos.

A bala **bB** não apresenta corante em sua composição. As balas **bF**, **bG**, **bH**, **bI**, **bJ** e **bL** são coloridas com corantes naturais.

Na Tabela 5 encontram-se as 5 balas mais consumidas que apresentam corante artificial em sua composição, suas cores e os respectivos corantes.

Tabela 5 - Balas coloridas artificialmente mais consumidas pelas crianças de 3 a 9 anos de idade em 15 escolas do bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.

	SABOR	COR	CORANTES ARTIFICIAIS
bA	Framboesa	Rosa	Vermelho 40 (E129) Azul brilhante (E133)
bN	Uva	Roxa	Vermelho 40 (E129) Azul de indigotina (E132)
bO	Morango	Vermelha	Vermelho 40 (E129)
bP	Morango	Vermelha	Vermelho 40 (E129) Azul brilhante (E133) Amarelo crepúsculo (E110)
bQ	Framboesa	Vermelha	Vermelho 40 (E129)

As balas **bA** e **bP** são da mesma marca e as balas **bN** e **bQ** também são do mesmo fabricante.

A composição das cinco balas mais consumidas coloridas artificialmente encontram-se descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição das balas coloridas artificialmente mais consumidas pelas crianças de 3 a 9 anos de idade em 15 escolas do bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.

BALA	COMPOSIÇÃO
bA	Açúcar, xarope de glicose, gordura vegetal hidrogenada, acidulante: ácido láctico, emulsificantes: lecitina de soja e monoesterato de glicerila, corantes: vermelho 40 (E129) e azul brilhante (E133), aromatizante. Não contém glúten. Contém soja e traços de leite e amendoim.
bN	Açúcar cristal, xarope de glicose, gordura vegetal hidrogenada, acidulante: ácido cítrico, aromas idênticos ao natural e artificiais, estabilizante lecitina de soja, corantes artificiais: vermelho 40 (E129) e azul indigotina (E132), . Não contém glúten.
bO	Açúcar, xarope de glicose, acidulante: ácido cítrico, aromatizantes, regulador de acidez: citrato de potássio, corante artificial: vermelho 40 (E129). Não contém glúten.
bP	Açúcar, xarope de glicose, gordura vegetal hidrogenada, acidulante: ácido láctico, emulsificantes: lecitina de soja e monoesterato de glicerila, corantes: vermelho 40 (E129), azul brilhante (E133) e amarelo crepúsculo (E110), aromatizante. Não contém glúten. Contém soja e traços de leite e amendoim.
bQ	Açúcar cristal, xarope de glicose, gordura vegetal hidrogenada, acidulante: ácido cítrico, aromas idênticos ao natural e artificiais, estabilizante lecitina de soja, corante artificial: vermelho 40 (E129). Não contém glúten.

Os corantes presentes nas balas mais consumidas são: vermelho 40 (E129), azul brilhante (E133), azul de indigotina (E132) e amarelo crepúsculo (E110). Todos têm seu uso permitido no Brasil e nenhuma das guloseimas apresentou em sua rotulagem indicação de mais de três corantes por bala, o que não é permitido pela legislação (BRASIL, 1961).

Abaixo se verifica a estrutura química de cada um destes quatro corantes:

Figura 7 – Corante amarelo crepúsculo / monoazo

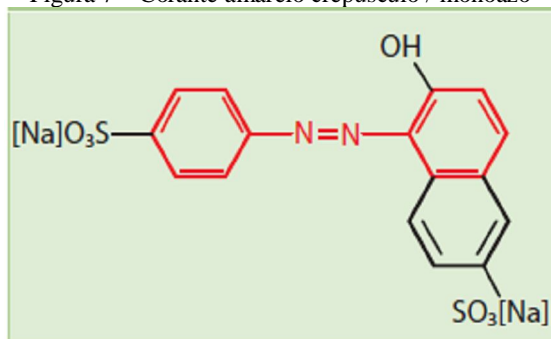


Figura 8 - Corante vermelho 40 / monoazo

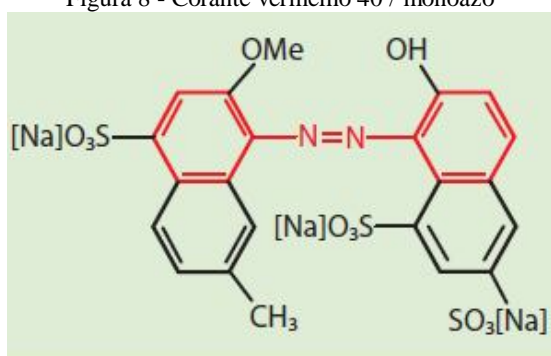


Figura 9 – Corante azul brilhante / trifenilmetano

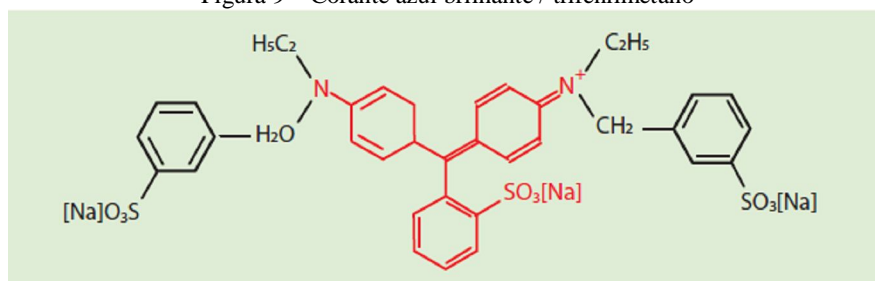
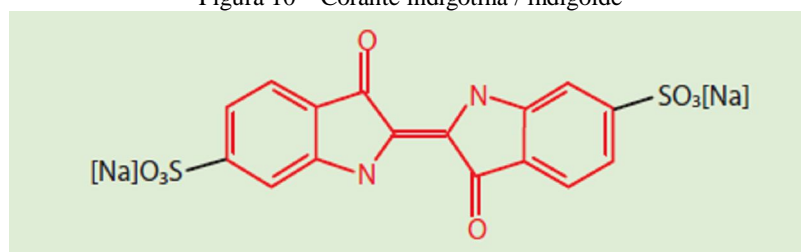


Figura 10 – Corante indigotina / indigóide



4.2 ANÁLISE DE CORANTES ARTIFICIAIS NAS AMOSTRAS DE BALAS

De posse dos resultados do questionário, iniciou-se a parte analítica desta pesquisa, de acordo com a proposta inicial do trabalho.

Para avaliação dos corantes presentes nas balas, confeccionaram-se as respectivas curvas dos corantes citados nos rótulos de cada amostra. Os valores dos resíduos aberrantes foram excluídos a partir do Teste Jackknife.

As condições cromatográficas dos testes realizados e representados pelas Figuras 5 a 22 são: Fase móvel: água/metanol (70:30, v/v); Solução de lavagem: água/metanol (70:30, v/v) + acetato de amônio 0,8 M; Fluxo: 0,5 mL/min; Comprimento de onda: 475 nm; “loop”: 500 µL; Volume de injeção: 20 µL.

4.2.1 Bala bA

A Figura 5 apresenta um cromatograma obtido a partir da análise desta amostra, onde se verifica o pico referente ao corante vermelho 40.

Na Figura 6 é possível verificar o resultado da análise realizada para a bala bA. A concentração média do corante vermelho 40 encontrado nesta bala foi 1,4 mg/100 g.

O corante azul brilhante, não foi detectado neste estudo. Mesmo concentrando a amostra até 1 mL, não foi possível verificar a presença deste corante.

Figura 11 – Cromatograma a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 presente na bala bA.

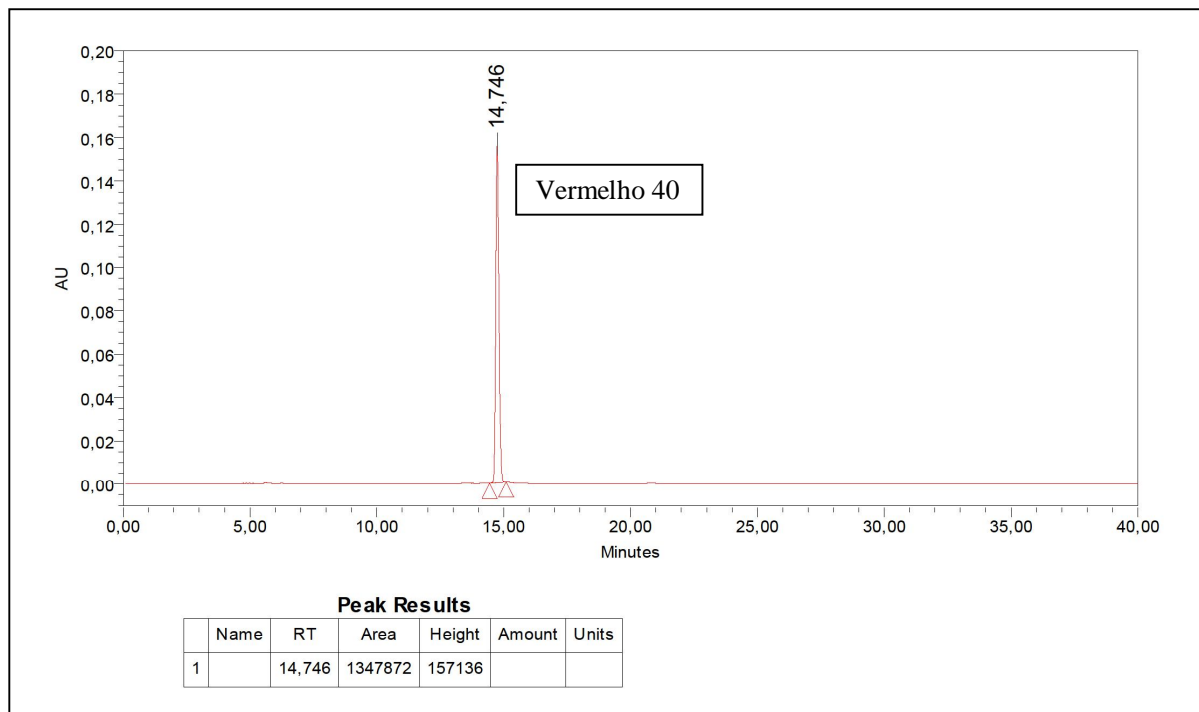
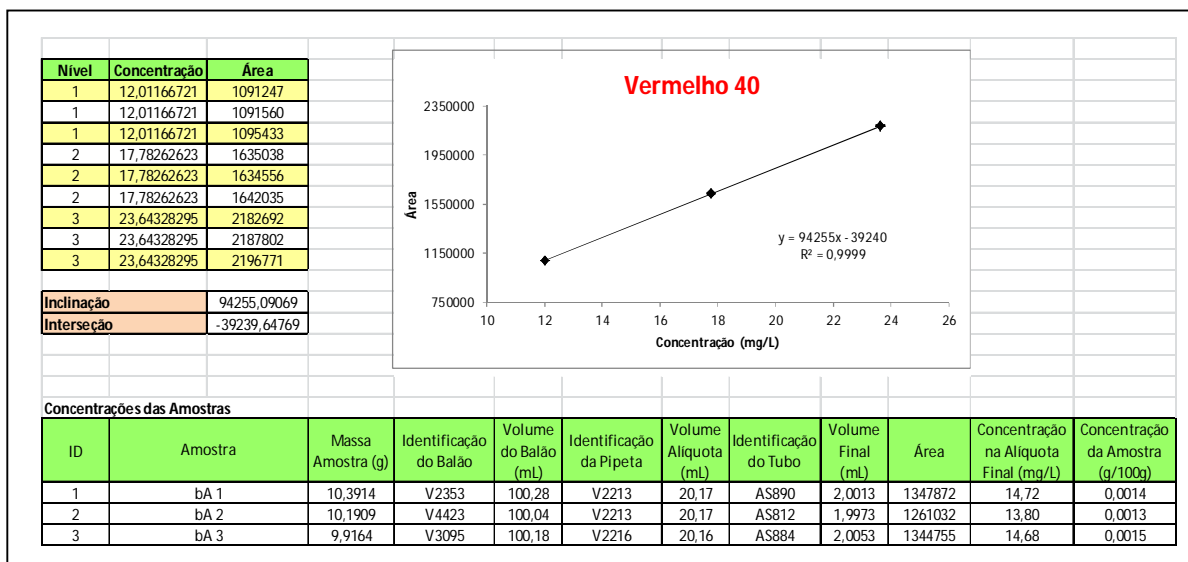


Figura 12 – Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 na bala bA.



4.2.2 Bala bN

Nas figuras 7 e 8 encontram-se os cromatogramas obtidos para o corante vermelho 40 e indigotina presentes na bala, respectivamente. A concentração média do corante vermelho 40 nesta bala foi 4,8 mg/100 g (Figura 9) e a concentração do corante indigotina foi 0,4 mg/100 g (Figura 10).

Figura 13- Cromatograma a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 presente na bala bN.

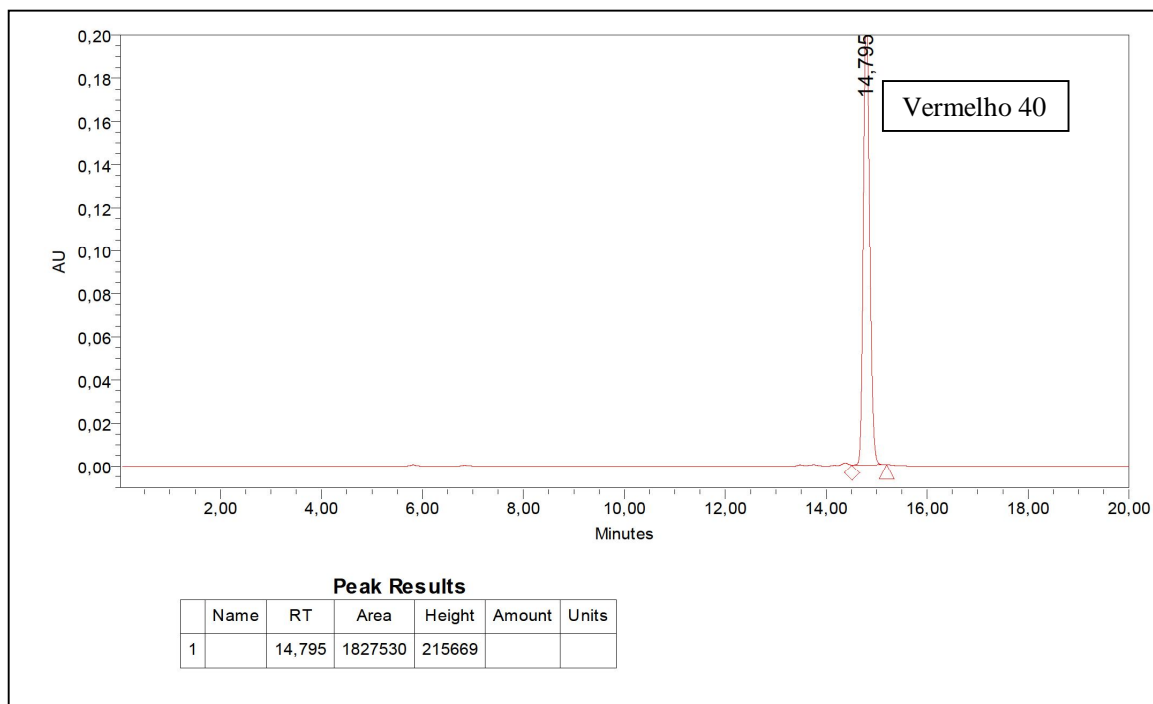


Figura 14 - Cromatograma a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante indigotina presente na bala bN.

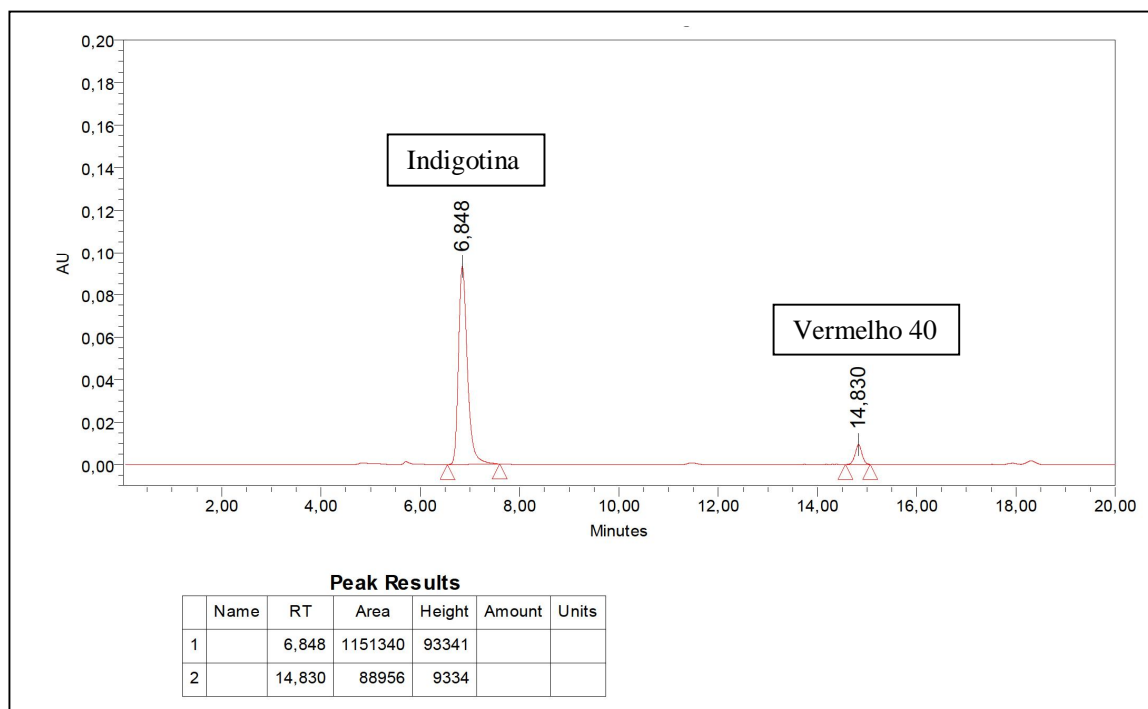


Figura 15 - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 da bala bN.

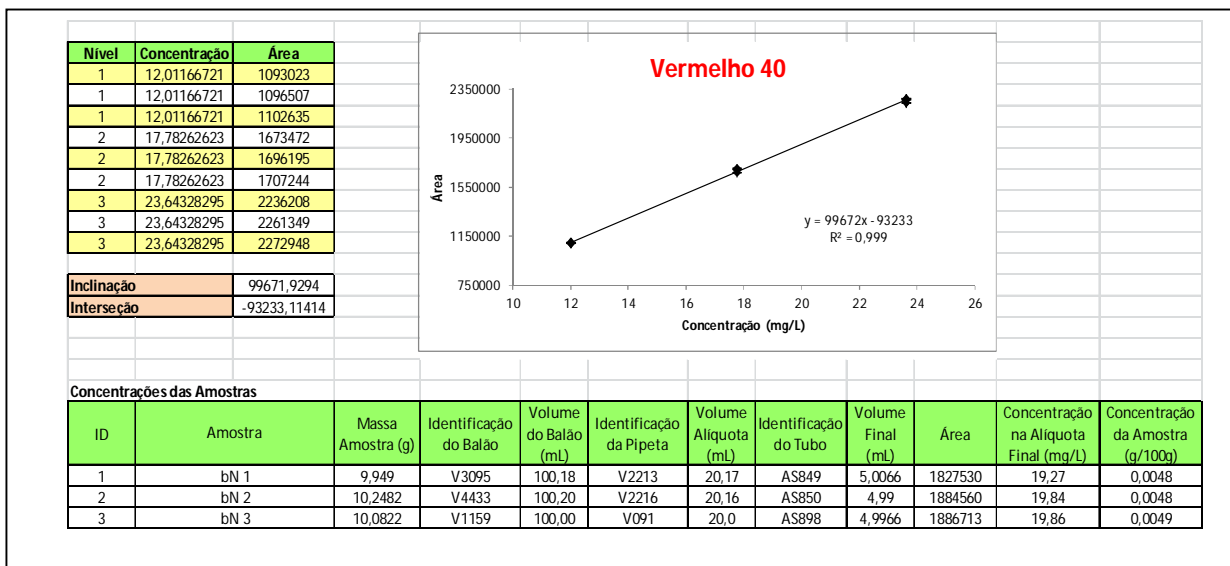
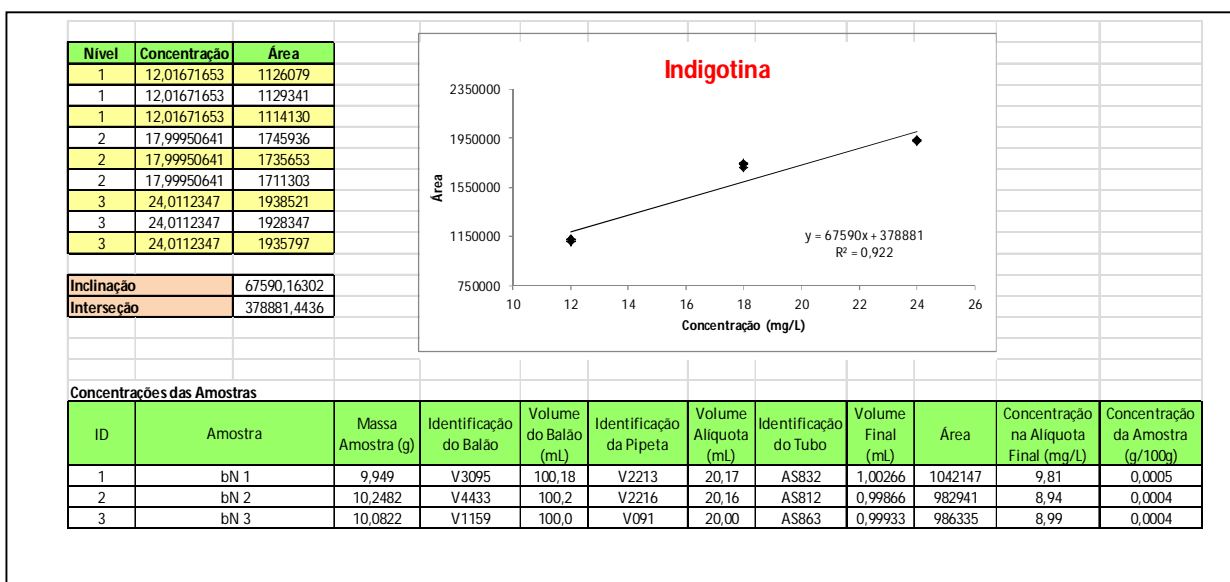


Figura 16 - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante indigotina da bala bN.



4.2.3 Bala bO

A concentração média de vermelho 40 encontrado nesta bala foi 7,0 mg/ 100g de bala (Figura 12).

Figura 17 - Cromatograma a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 presente na bala bO.

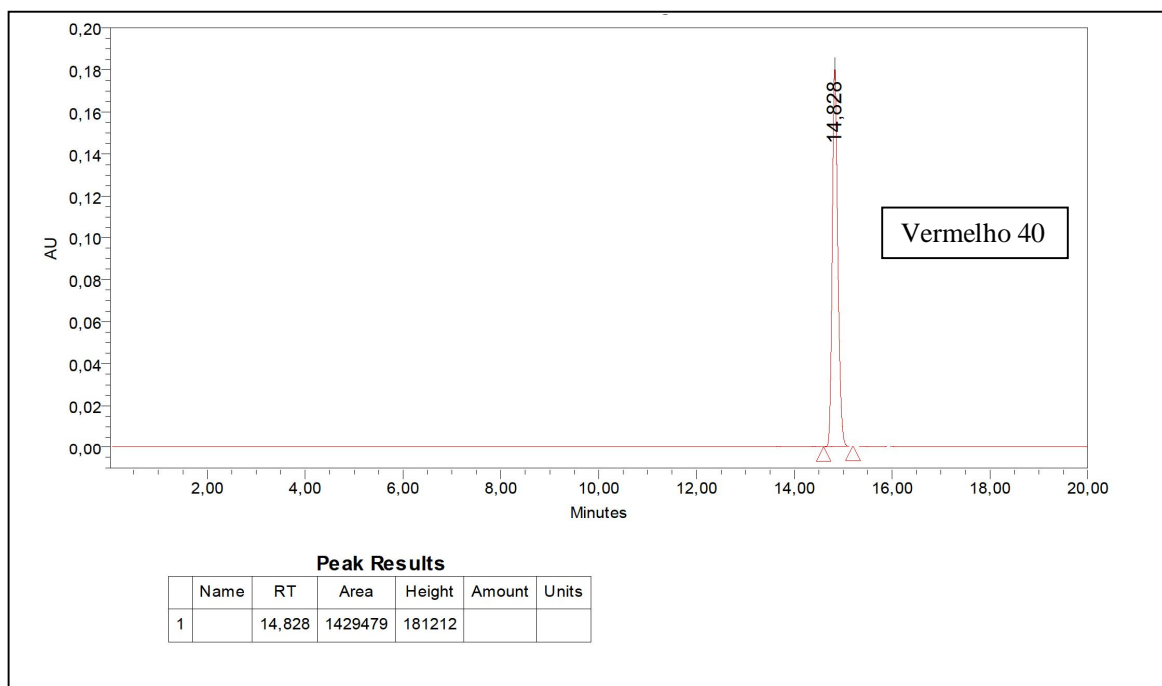
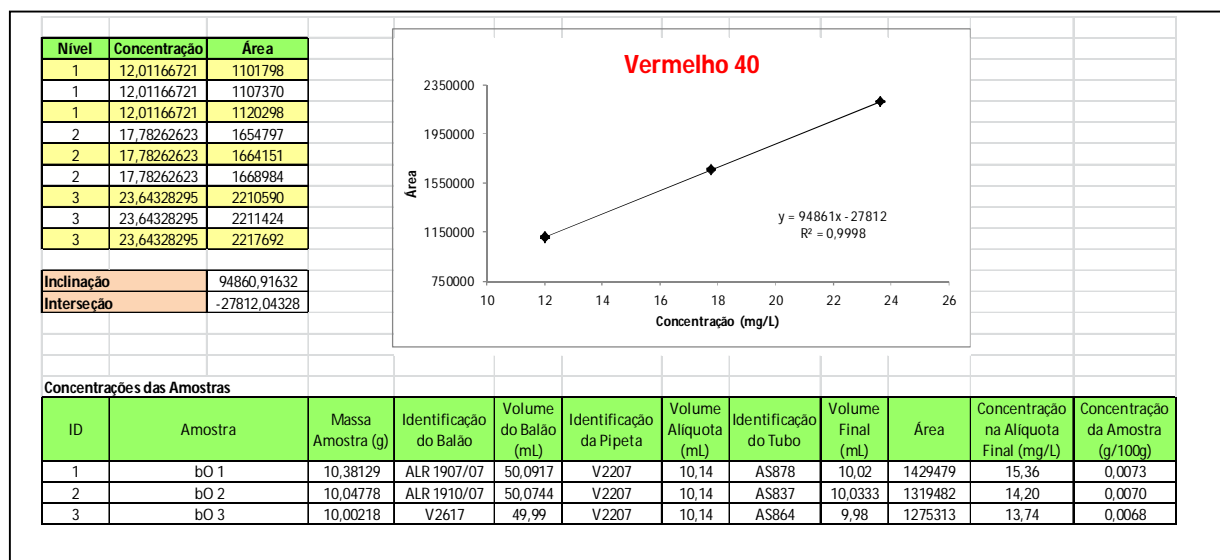


Figura 18 - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 da bala bO.



4.2.4 Bala BP

A Figura 13 apresenta um cromatograma obtido a partir da análise desta amostra, onde se verifica o pico referente ao corante vermelho 40 e a Figura 14 apresenta o cromatograma com o pico referente ao corante amarelo crepúsculo.

Na Figura 15 é possível verificar o resultado da análise do corante vermelho 40 e na Figura 16 o resultado para o corante amarelo crepúsculo realizadas para a bala bP.

A concentração média do corante vermelho 40 encontrado nesta bala foi 7,1 mg/100 g e de amarelo crepúsculo foi 0,6 mg/100 g.

O corante azul brilhante, não foi detectado neste estudo. Mesmo concentrando a amostra até 1 mL, não foi possível verificar a presença deste corante.

Figura 19 – Cromatograma a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 presente na bala bP.

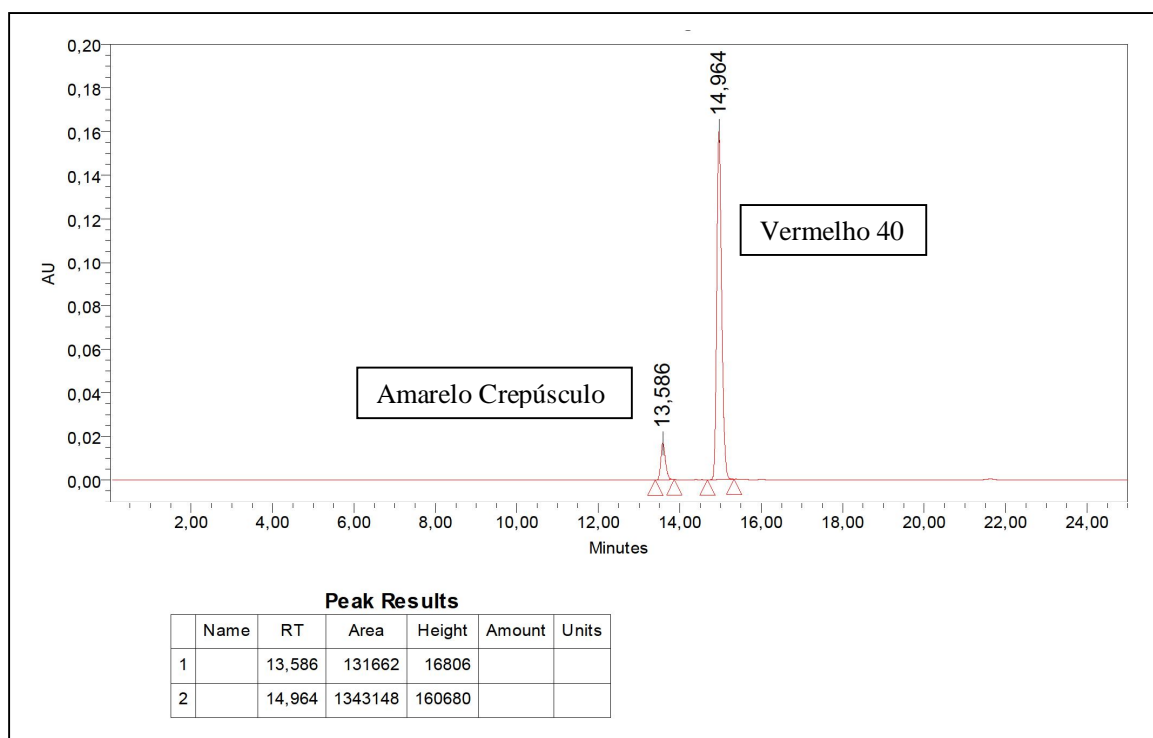


Figura 20 - Cromatograma a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante amarelo crepúsculo presente na bala bP.

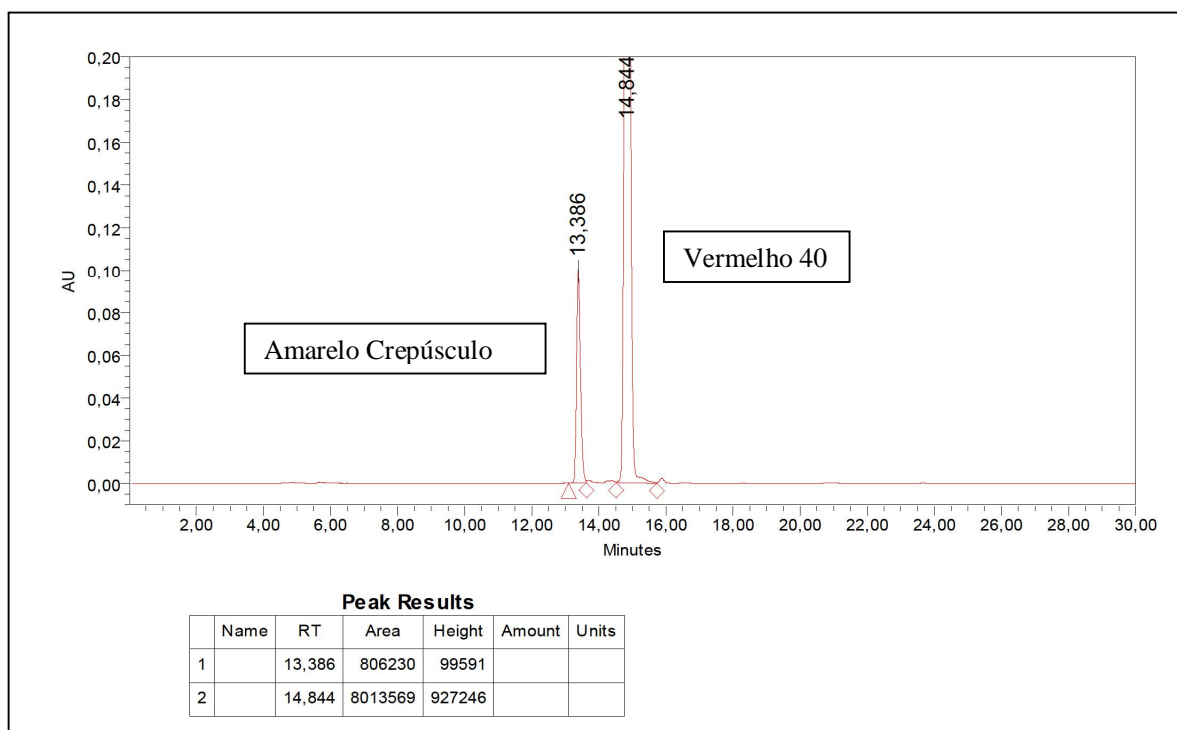


Figura 21 - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 da bala bP.

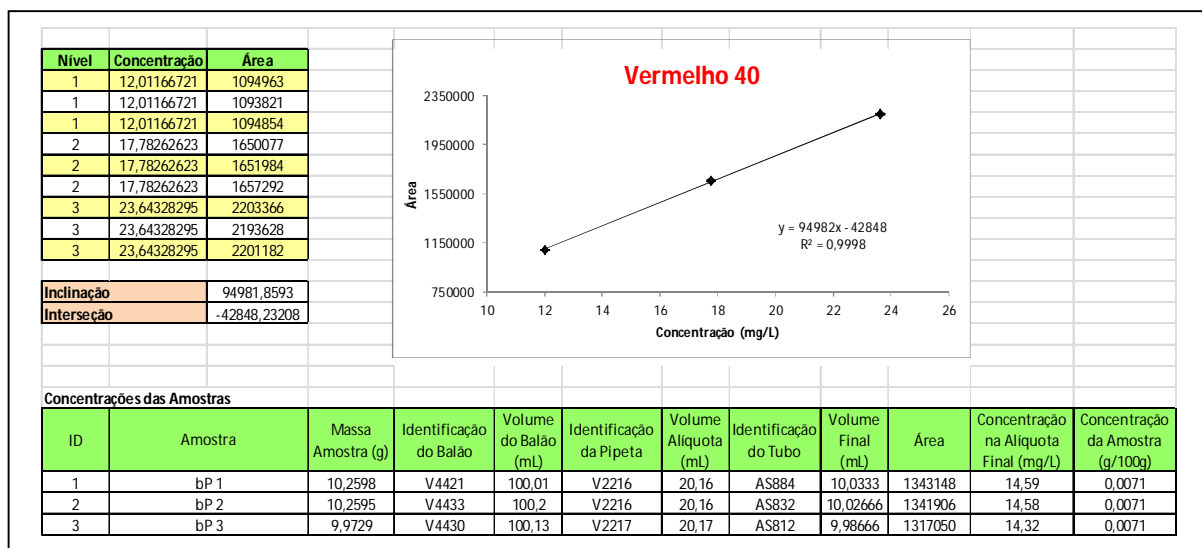
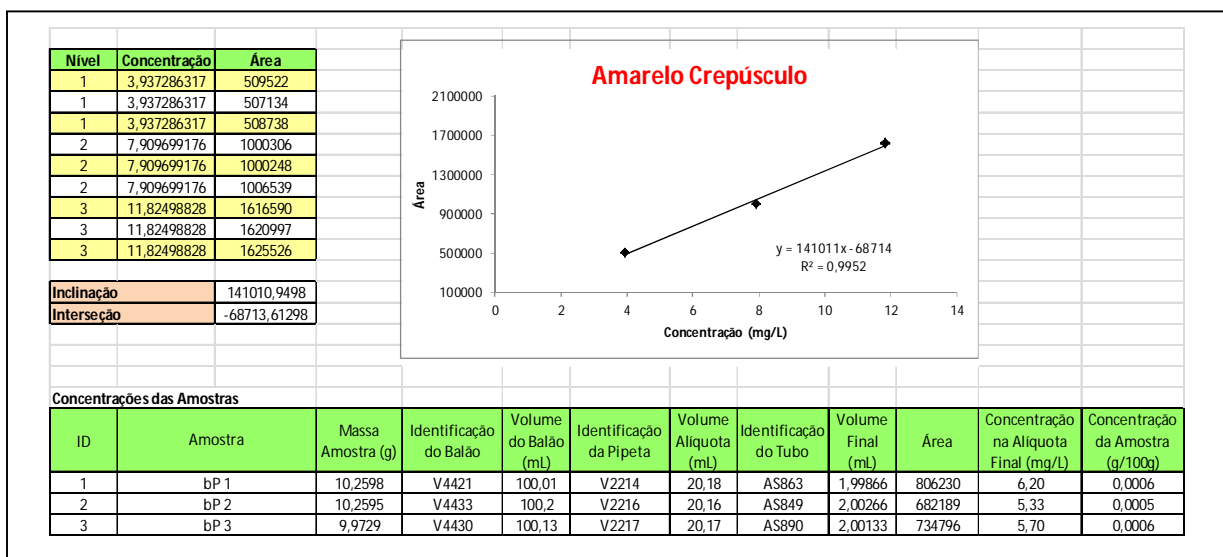


Figura 22 – Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante amarelo da bala bP.



4.2.5 Bala bQ

A Figura 17 apresenta um cromatograma obtido a partir da análise desta amostra, onde se verifica o pico referente ao corante vermelho 40.

Na Figura 18 verifica-se o resultado da análise realizada para a bala bQ, onde a concentração média do corante vermelho 40 encontrada foi 2,6 mg/100 g.

Figura 23 - Cromatograma a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante vermelho 40 presente na bala bQ.

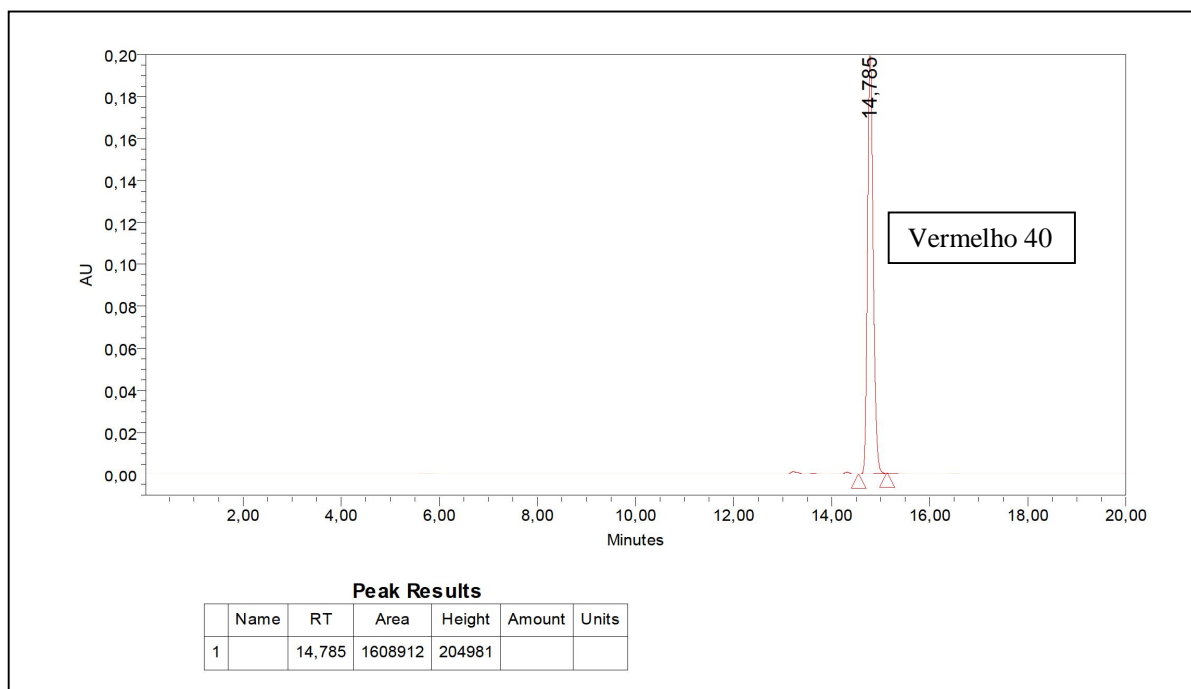
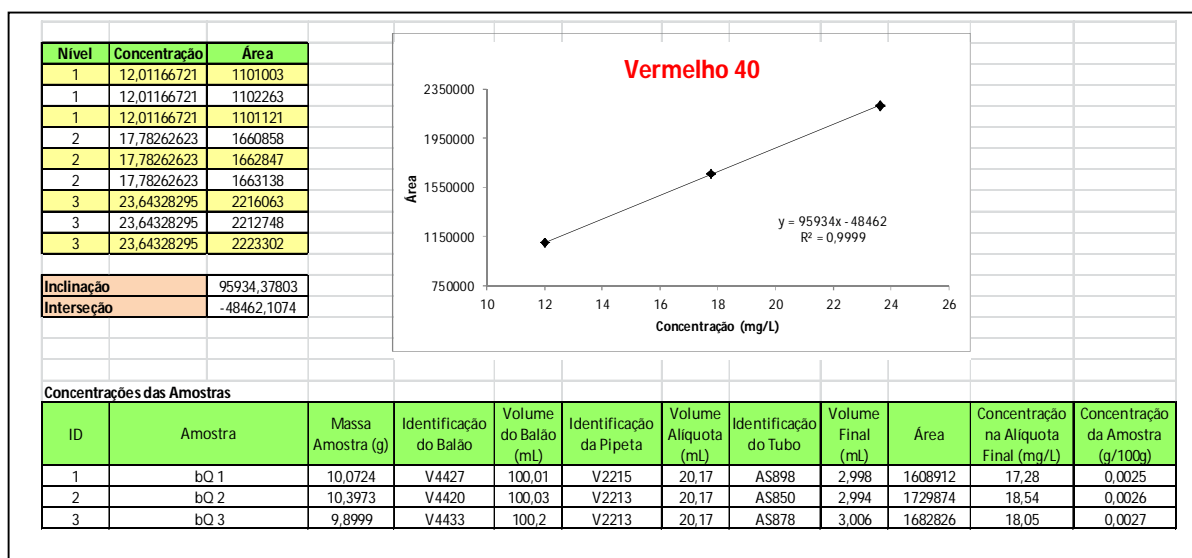


Figura 24– Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do corante amarelo da bala bQ.



4.3 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL

Os resultados obtidos a partir de procedimentos já mencionados e referentes à validação do método são apresentados nos itens subsequentes.

4.3.1 Faixa de Trabalho

A faixa de trabalho para cada corante foi estipulada baseado na quantidade máxima permitida de cada corante pela legislação e o procedimento analítico.

Para o corante amarelo crepúsculo a faixa de trabalho ficou entre 3 e 9 mg/L e para os corantes vermelho 40, azul brilhante e indigotina a faixa de trabalho foi de 12 a 24 mg/L.

4.3.2 Linearidade

A avaliação da linearidade e a confecção da curva analítica (figuras 19, 20, 21 e 22) foram realizadas através do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) para os corantes vermelho 40, amarelo crepúsculo, azul brilhante e indigotina. Os valores de resíduos aberrantes foram analisados previamente, pelo método Jackknife. A cada exclusão, os testes eram novamente executados. As premissas que devem ser satisfeitas para que o MMQO possa ser realizado são: testes de normalidade, independência, não autocorrelação dos resíduos e homogeneidade das variâncias dos resíduos, além da análise de variância da regressão e desvio da linearidade dos resíduos. Todos estes testes foram realizados para os corantes vermelho 40, amarelo crepúsculo, azul brilhante e indigotina.

Figura 25 – Curva analítica final pelo método CLAE para o vermelho 40.

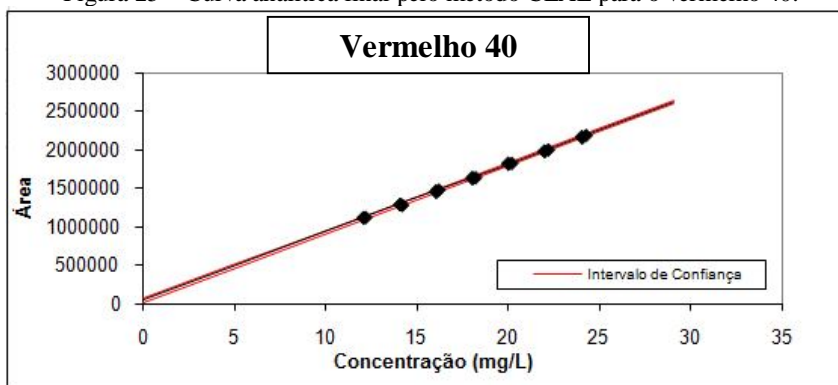


Figura 26 – Curva analítica final pelo método CLAE para o amarelo crepúsculo.

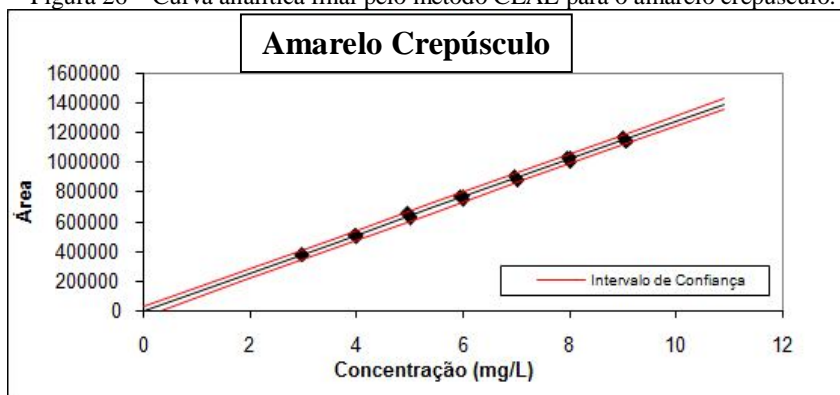


Figura 27 – Curva analítica final pelo método CLAE para o azul brilhante.

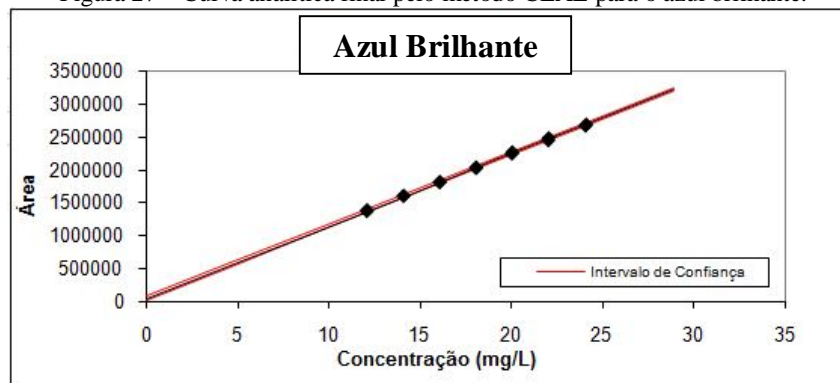
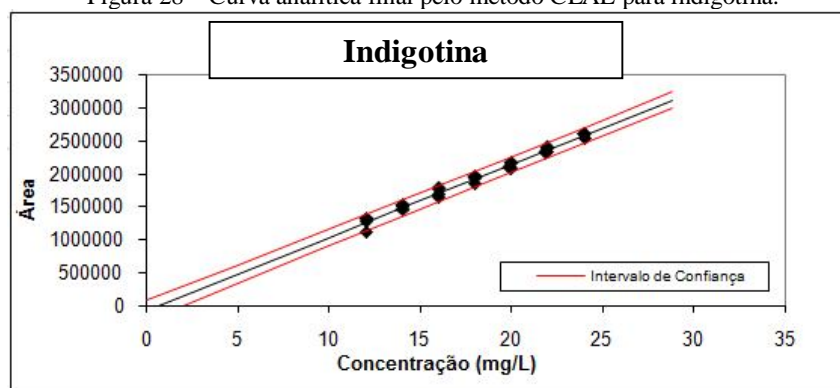


Figura 28 – Curva analítica final pelo método CLAE para indigotina.



Tratamento de valores aberrantes

Após realização do teste de resíduos padronizados Jackknife, nenhum dos corantes ultrapassou o limite de 22,2% de dados rejeitados estabelecido por Horwitz (1995). O corante vermelho 40 apresentou 2 dados rejeitados (Figura 23), o amarelo crepúsculo não apresentou

dados rejeitados (Figura 24), o azul brilhante apresentou 2 dados rejeitados (Figura 25) e por fim, o corante indigotina apresentou 1 dado rejeitado (Figura 26).

Figura 29 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva analítica do vermelho 40.

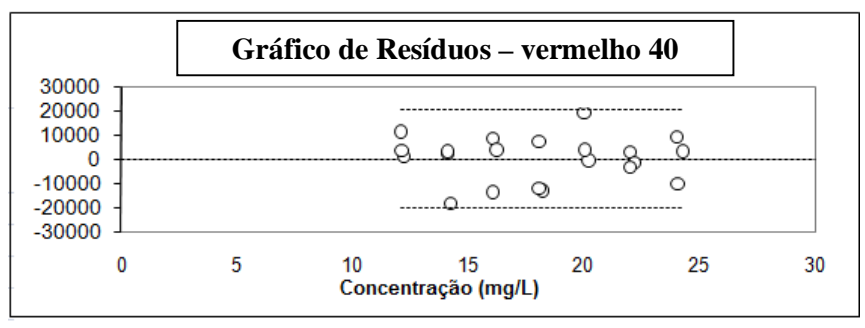


Figura 30 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva analítica do amarelo crepúsculo.

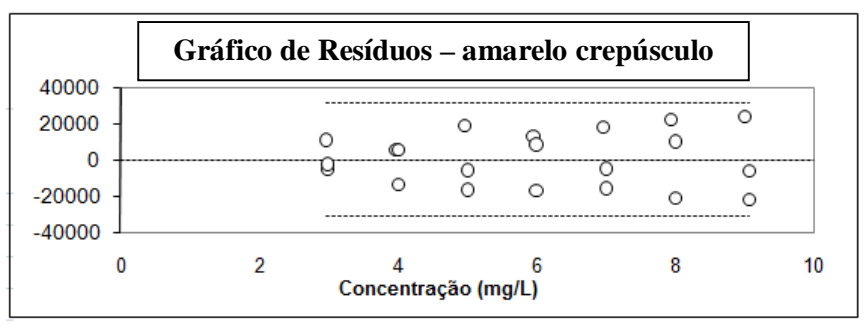


Figura 31 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva analítica do azul brilhante.

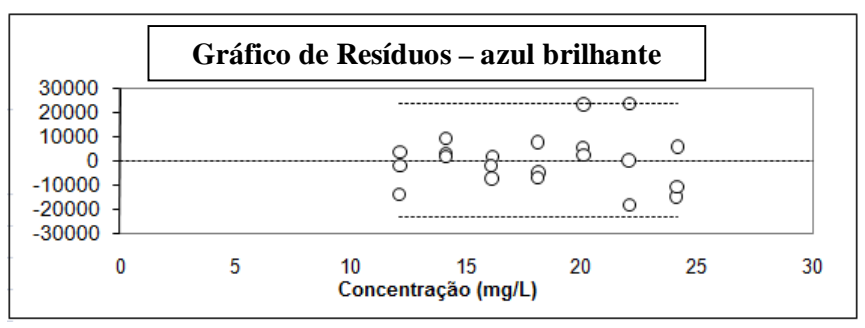
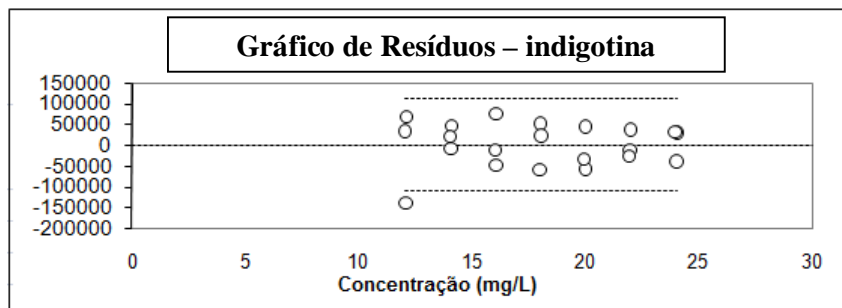


Figura 32 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva analítica da indigotina.



Teste de normalidade dos resíduos

A análise dos dados utilizados para a confecção da curva de cada corante mostrou, que os dados seguem a distribuição normal, através do coeficiente de relação de Ryan-Joiner (R_{eq}). Os coeficientes calculados foram superiores ao valor crítico estabelecido de 0,9521 ($\alpha = 0,05$), não havendo razões para rejeitar a hipótese nula de que os dados seguem a distribuição normal (BOMFIM, 2008).

Tabela 7 – Normalidade dos resíduos.

Corante	R_{eq}^1
Vermelho 40	0,9732
Amarelo Crepúsculo	0,9796
Azul Brilhante	0,9749
Indigotina	0,9649

¹ Coeficiente de relação de Ryan-Joiner

Teste de homogeneidade das variâncias dos resíduos

Para avaliar a homogeneidade das variâncias dos resíduos foi realizado o teste de Levene adaptado por Brown-Forsythe (BOMFIM, 2008). O valor de t tabelado ($\alpha = 0,05$) para todos os corantes é de 2,09 e, todos os valores de t_L calculados foram menores que o t tabelado.

Tabela 8 – Teste de Levene para homogeneidade das variâncias dos resíduos

Corante	t_L calculado
Vermelho 40	0,44
Amarelo Crepúsculo	- 0,76
Azul Brilhante	- 1,21
Indigotina	0,5

¹t de Levene

Desta forma, a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos de regressão são constantes foi aceita, havendo homogeneidade entre as mesmas.

Teste de não autocorrelação dos resíduos

A não autocorrelação ou independência dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Durbin-Watson (BOMFIM, 2008). O estatístico do teste é o valor de d , inferiores ou superiores. O valor de d calculado para cada corante encontra-se na Tabela 9. Todos se encontram acima dos valores críticos para d_L e d_U , respectivamente, 1,22 e 1,42 ($\alpha = 0,05$). Ou seja, a hipótese nula não foi rejeitada e confirmou-se a independência dos resíduos da regressão. As Figuras 27, 28, 29 e 30 representam graficamente a independência dos resíduos da regressão.

Tabela 9 – Teste de Dubin-Watson para não autocorrelação dos resíduos

Corante	d calculado
Vermelho 40	2,30
Amarelo Crepúsculo	2,75
Azul Brilhante	1,63
Indigotina	2,14

Figura 33 - Gráfico de Durbin-Watson da curva analítica (e_i x e_{i-1}) – vermelho 40.

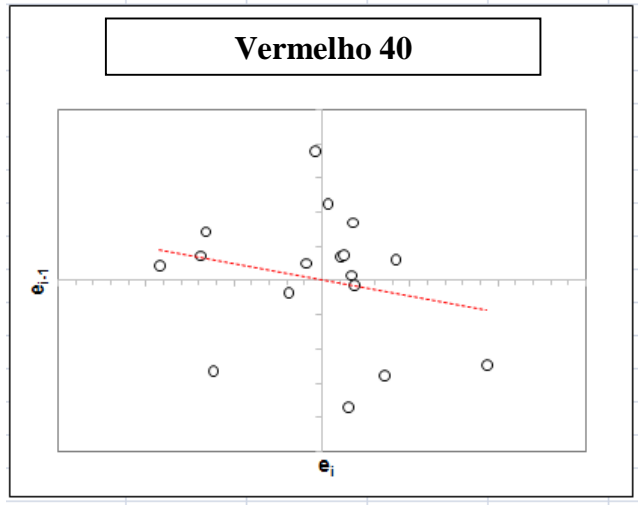


Figura 34 - Gráfico de Durbin-Watson da curva analítica (e_i x e_{i-1}) – amarelo crepúsculo

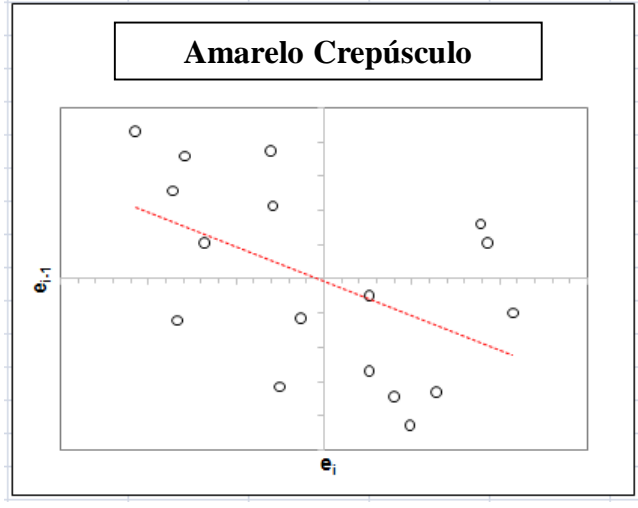


Figura 35 - Gráfico de Durbin-Watson da curva analítica (e_i x e_{i-1}) – azul brilhante.

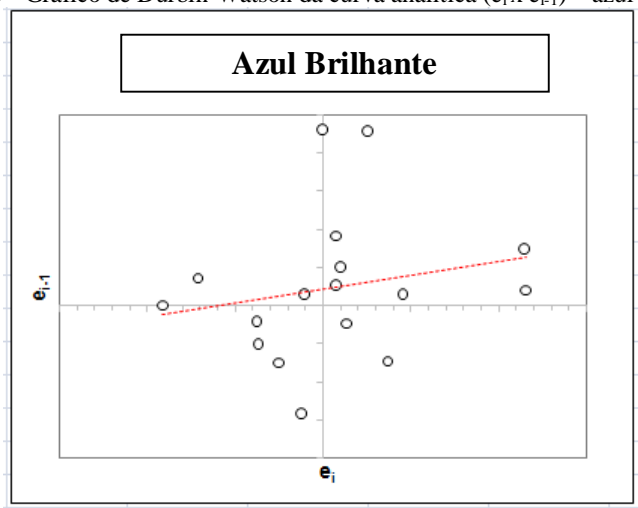
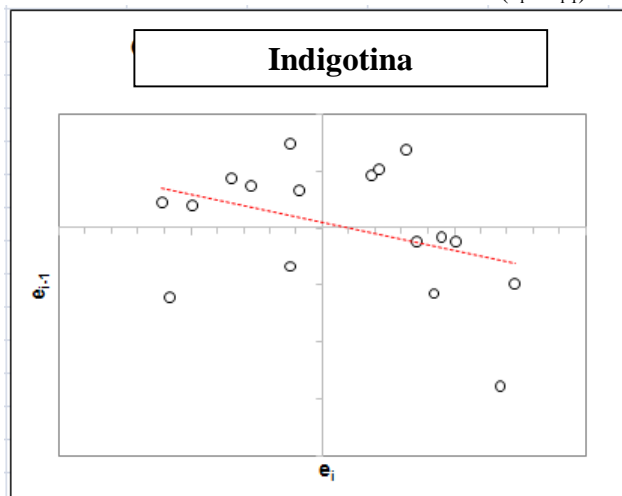


Figura 36 - Gráfico de Durbin-Watson da curva analítica (e_i x e_{i-1}) – indigotina.

Análise de variância dos resíduos da regressão e desvio da linearidade

A regressão linear bem como o ajuste ao modelo foi confirmada através do teste ANOVA. Os dados são apresentados nas Tabelas 10, 11, 12 e 13.

Tabela 10 - Resultados da análise de variância quanto a significância da regressão e não significância do desvio de linearidade ($\alpha = 0,05$) para a curva analítica do vermelho 40.

Fonte	G.L. ¹	SQ ²	QM ³	p ⁴
Regressão	1	$2,59 \times 10^{12}$	$2,59 \times 10^{12}$	$1,34 \times 10^{-31}$
Resíduos	19	$1,75 \times 10^9$	$9,19 \times 10^7$	
Desvio de linearidade	5	$1,53 \times 10^8$	$3,05 \times 10^7$	$9,23 \times 10^{-1}$
Erro puro	14	$1,59 \times 10^9$	$1,14 \times 10^8$	
Total	20	$2,59 \times 10^{12}$		

¹ Graus de liberdade

² Soma dos quadrados

³ Quadrado médio

⁴ Valor de p para o estatístico F

Tabela 11 - Resultados da análise de variância quanto a significância da regressão e não significância do desvio de linearidade ($\alpha = 0,05$) para a curva analítica do amarelo crepúsculo.

Fonte	G.L. ¹	SQ ²	QM ³	p ⁴
Regressão	1	1,40 X 10 ¹²	1,40 X 10 ¹²	2,30 X 10 ⁻²⁵
Resíduos	19	4,27 X 10 ⁹	2,25 X 10 ⁸	
Desvio de linearidade	5	1,26 X 10 ⁹	2,52 X 10 ⁸	3,71 X 10 ⁻¹
Erro puro	14	3,01 X 10 ⁹	2,15 X 10 ⁸	
Total	20	1,40 X 10 ¹²		

¹ Graus de liberdade

² Soma dos quadrados

³ Quadrado médio

⁴ Valor de p para o estatístico F

Tabela 12 - Resultados da análise de variância quanto a significância da regressão e não significância do desvio de linearidade ($\alpha = 0,05$) para a curva analítica do azul brilhante.

Fonte	G.L. ¹	SQ ²	QM ³	p ⁴
Regressão	1	4,02 X 10 ¹²	4,02 X 10 ¹²	3,13 X 10 ⁻³²
Resíduos	19	2,32 X 10 ⁹	1,22 X 10 ⁸	
Desvio de linearidade	5	2,08 X 10 ⁸	4,16 X 10 ⁷	9,19 X 10 ⁻⁰¹
Erro puro	14	2,12 X 10 ⁹	1,51 X 10 ⁸	
Total	20	4,02 X 10 ¹²		

¹ Graus de liberdade

² Soma dos quadrados

³ Quadrado médio

⁴ Valor de p para o estatístico F

Tabela 13 - Resultados da análise de variância quanto a significância da regressão e não significância do desvio de linearidade ($\alpha = 0,05$) para a curva analítica da indigotina.

Fonte	G.L. ¹	SQ ²	QM ³	p ⁴
Regressão	1	4,04 X 10 ¹²	4,04 X 10 ¹²	2,76 X 10 ⁻¹⁹
Resíduos	19	5,45 X 10 ¹⁰	2,87 X 10 ⁹	
Desvio de linearidade	5	5,17 X 10 ⁸	1,03 X 10 ⁸	1,00
Erro puro	14	5,40 X 10 ¹⁰	3,86 X 10 ⁹	
Total	20	4,09 X 10 ¹²		

¹ Graus de liberdade

² Soma dos quadrados

³ Quadrado médio

⁴ Valor de p para o estatístico F

A partir da ANOVA, as regressões das curvas analíticas relativas aos 4 corantes foram extremamente significativas ($p < 0,001$) e o ajuste ao modelo linear ou desvio da linearidade não foi significativo ($p > 0,05$) observados pelos valores do estatístico F calculado.

Ao final, para todos os corantes a linearidade do método foi comprovada na faixa de trabalho de cada um.

O corante vermelho 40, com faixa de trabalho de 12 a 24 mg/l, obteve a seguinte equação final de regressão: $y = 88234x + 47522$.

O corante amarelo crepúsculo, com faixa de trabalho de 3 a 9 mg/L, teve a seguinte equação final de regressão: $y = 127971x - 6772,7$.

O corante azul brilhante, com faixa de trabalho de 12 a 24 mg/L, obteve a seguinte equação final de regressão: $y = 109877x + 37015$.

O corante indigotina, com faixa de trabalho de 12 a 24 mg/L, obteve a seguinte equação final de regressão: $y = 110531x - 85296$.

Onde, y é a área do pico do corante e x a concentração do analito.

Os critérios exigidos pelo método dos MMQO estão dispostos na tabela 16.

Tabela 14 – Resumo das análises de premissas de linearidade pelo método MMQO.

Homogeneidade de variância
Há Homocedasticidade - $p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade
A regressão é significativa - $p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade - $p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)
Não há autocorrelação - $d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)
Segue a Normal - $R_{eq} > R_{crit}$

A análise de todos os resultados de cada corante mostra que o método de quantificação dos corantes segue um modelo linear.

4.3.3 Efeito Matriz

Bala Dura

Para este ensaio, foram confeccionadas novas curvas analíticas para a verificação de ocorrência de efeito matriz, empregando-se as mesmas concentrações de cada corante utilizadas para a confecção de cada curva analítica, porém primeiramente utilizando o solvente (água) e depois utilizando uma bala dura sem corante em sua composição (Figuras 37, 38, 39 e 40).

Após confeccionar as duas curvas para cada corante e retirar os valores aberrantes presentes nas análises foram realizados além dos testes sugeridos por Souza (2007) para avaliação do efeito matriz (testes de normalidade e ajuste ao modelo linear), todos os testes de premissas apresentados nas tabelas 15, 16, 17 e 18.

Tabela 15 – Testes para análise de premissas para curva analítica em matriz ($\alpha = 0,05$) para o corante vermelho 40.

Testes estatísticos	Estatístico	Valor estatístico calculado matriz	Valor crítico do estatístico
<i>Normalidade</i>	<i>R</i>	0,9639	0,9521
<i>Homocedasticidade</i>	<i>t_L</i>	0,608	2,093
<i>Independência de resíduos</i>	<i>d</i>	2,22	$d_L=1,22$; $d_U=1,42$
<i>Regressão</i>	<i>p</i>	$2,51 \times 10^{-27}$	$1,00 \times 10^{-3}$
<i>Desvio da linearidade</i>	<i>p</i>	$2,26 \times 10^{-1}$	$5,00 \times 10^{-2}$

Tabela 16 – Testes para análise de premissas para curva analítica em matriz ($\alpha = 0,05$) para o amarelo crepúsculo.

Testes estatísticos	Estatístico	Valor estatístico calculado matriz	Valor crítico do estatístico
<i>Normalidade</i>	<i>R</i>	0,9548	0,9503
<i>Homocedasticidade</i>	<i>t_L</i>	0,658	2,101
<i>Independência de resíduos</i>	<i>d</i>	2,11	$d_L=1,20$; $d_U=1,41$
<i>Regressão</i>	<i>p</i>	$1,21 \times 10^{-36}$	$1,00 \times 10^{-3}$
<i>Desvio da linearidade</i>	<i>p</i>	*	$5,00 \times 10^{-2}$

*Este teste possui uma limitação, pois quando os resíduos são muito pequenos o resultado gerado é inconclusivo. Devido a isto, para este corante, foi utilizado o coeficiente de determinação (R^2) como parâmetro de avaliação, onde este deve ser maior 0,95. O valor encontrado para o corante amarelo crepúsculo 0,9999, sendo a curva considerada adequada.

Tabela 17 – Testes para análise de premissas para curva analítica em matriz ($\alpha = 0,05$) para o corante azul brilhante.

Testes estatísticos	Estatístico	Valor estatístico calculado matriz	Valor crítico do estatístico
<i>Normalidade</i>	<i>R</i>	0,9882	0,9521
<i>Homocedasticidade</i>	<i>t_L</i>	1,437	2,093
<i>Independência de resíduos</i>	<i>d</i>	1,47	$d_L=1,22$; $d_U=1,42$
<i>Regressão</i>	<i>p</i>	$3,45 \times 10^{-31}$	$1,00 \times 10^{-3}$
<i>Desvio da linearidade</i>	<i>p</i>	$9,24 \times 10^{-2}$	$5,00 \times 10^{-2}$

Tabela 18 – Testes para análise de premissas para curva analítica em matriz ($\alpha = 0,05$) para o corante indigotina.

Testes estatísticos	Estatístico	Valor estatístico calculado matriz	Valor crítico do estatístico
<i>Normalidade</i>	<i>R</i>	0,9870	0,9521
<i>Homocedasticidade</i>	<i>t_L</i>	0,368	2,093
<i>Independência de resíduos</i>	<i>d</i>	2,35	$d_L=1,22$; $d_U=1,42$
<i>Regressão</i>	<i>p</i>	$7,61 \times 10^{-16}$	$1,00 \times 10^{-3}$
<i>Desvio da linearidade</i>	<i>p</i>	$7,49 \times 10^{-1}$	$5,00 \times 10^{-2}$

Satisfeitas as premissas e confirmada a linearidade do analito em matriz, as etapas subsequentes como o teste de homocedasticidade das variâncias dos resíduos e o teste *t* para variâncias combinadas foram realizados (tabela 19, 20, 21 e 22).

Tabela 19 - Resultados dos testes para avaliação do efeito matriz ($\alpha = 0,05$) no corante vermelho 40.

Testes Estatísticos	Estatística	Calculado	Valor crítico
<i>Homocedasticidade das variâncias dos resíduos</i>	F	0,36	2,22
<i>Teste t de Student para variâncias combinadas</i>	$t_b ; t_a$	$t_b = 0,83$ $t_a = 1,28$	2,02

Tabela 20 - Resultados dos testes para avaliação do efeito matriz ($\alpha = 0,05$) no corante amarelo crepúsculo.

Testes Estatísticos	Estatística	Calculado	Valor crítico
<i>Homocedasticidade das variâncias dos resíduos</i>	F	0,56	2,22
<i>Teste t de Student para variâncias combinadas</i>	$t_b ; t_a$	$t_b = 0,71$ $t_a = 0,38$	2,03

Tabela 21 - Resultados dos testes para avaliação do efeito matriz ($\alpha = 0,05$) no corante azul brilhante.

Testes Estatísticos	Estatística	Calculado	Valor crítico
<i>Homocedasticidade das variâncias dos resíduos</i>	F	0,77	2,22
<i>Teste t de Student para variâncias combinadas</i>	$t_b ; t_a$	$t_b = 0,12$ $t_a = 0,38$	2,02

Tabela 22 - Resultados dos testes para avaliação do efeito matriz ($\alpha = 0,05$) no corante indigotina.

Testes Estatísticos	Estatística	Calculado	Valor crítico
<i>Homocedasticidade das variâncias dos resíduos</i>	F	0,46	2,22
<i>Teste t de Student para variâncias combinadas</i>	$t_b ; t_a$	$t_b = 0,80$ $t_a = 1,27$	2,02

Conforme apresentado nas Tabelas 19, 20, 21 e 22, os resultados dos testes permitem afirmar que o método não apresenta efeito matriz, pois, estatisticamente ($\alpha = 0,05$), as curvas analíticas dos corantes em solvente e em matriz (bala dura) se equivalem.

Figura 37 – Curvas do corante vermelho 40 em solvente (A) e na matriz dura (B).

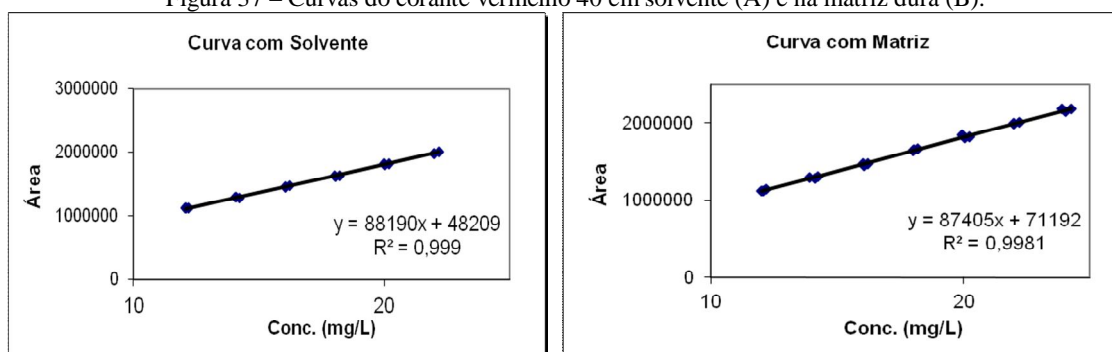


Figura 38 – Curvas do corante amarelo crepúsculo em solvente (A) e na matriz dura (B).

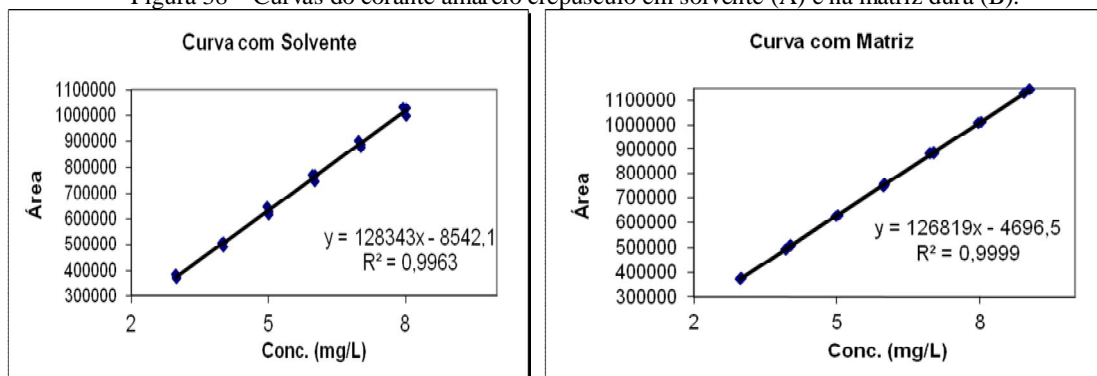


Figura 39 – Curvas do corante azul brilhante em solvente (A) e na matriz dura (B).

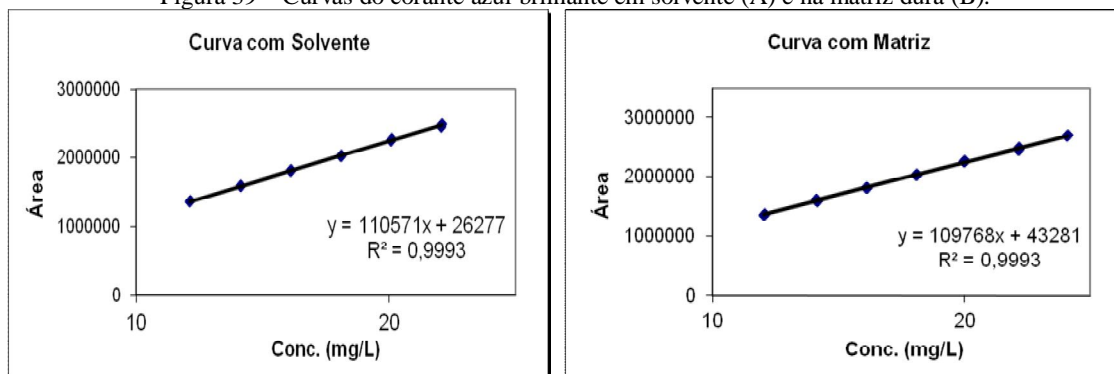
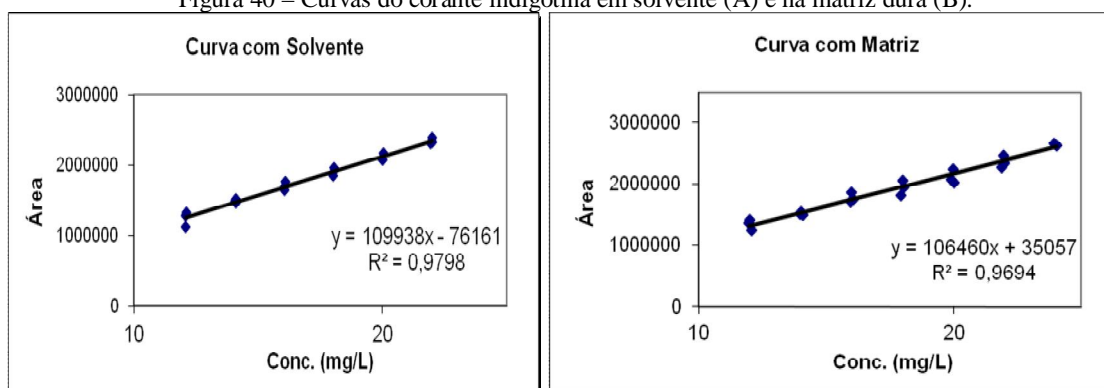


Figura 40 – Curvas do corante indigotina em solvente (A) e na matriz dura (B).



Bala Mole

Após se verificar que parte das balas mais consumidas pelas crianças eram moles, ou seja, tinham gordura vegetal hidrogenada em sua composição, um teste simplificado com uma matriz de bala mole sem corantes para avaliar se havia efeito matriz nestas balas foi realizado e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 23. Após análise das concentrações conhecidas de corante em cada bala, na matriz e no solvente, realizou-se um teste t para avaliar se os resultados eram equiparáveis.

Tabela 23 – Resultados dos testes para avaliação de efeito matriz em balas moles.

	Concentração na matriz (mg / L)	Concentração no solvente (mg / L)	Teste F		Teste t de <i>Student</i>	
			Calculado	Valor Crítico	Calculado	Valor Crítico
Bala bA / vermelho 40	14,75	18,75	1,44	19,00	2,41	2,78
Bala bN / vermelho 40	19,74	20,11	1,49	19,00	1,68	2,78
Bala bP / vermelho 40	14,11	13,79	5,55	19,00	2,10	2,78
Bala bP / amarelo crepúsculo	6,07	6,56	1,63	19,00	1,30	2,78
Bala bQ / vermelho 40	18,25	17,48	1,50	19,00	2,03	2,78

Estes resultados demonstram que o método não apresenta efeito matriz, pois, estatisticamente ($\alpha = 0,05$), as concentrações analisadas dos corantes em solvente e em matriz (bala mole) se equivalem.

4.3.4 Repetitividade

Bala Dura

Baseando-se em critérios estabelecidos a partir da equação de Horwitz e Albert (2006), os valores de *HorRat* encontrados (Tabela 24) indicam que o método apresenta repetitividade adequada.

Tabela 24 – Avaliação da repetitividade em matriz de bala dura

Repetitividade (HORWITZ e ALBERT,2006)		
Corante	Valor calculado HorRat _{repe}	Critério de aceitabilidade
Vermelho 40	1,9101	≤ 2,0
Amarelo crepúsculo	1,0412	≤ 2,0
Azul brilhante	1,4204	≤ 2,0
Indigotina	1,0833	≤ 2,0

Bala Mole

Com base na ISO 5725-6 (1994) a repetitividade de cada corante presente nas balas moles foi analisada. Os resultados apresentados na Tabela 25 indicam que o método apresenta repetitividade adequada.

Tabela 25 – Avaliação da repetitividade em amostras de balas moles

Repetitividade (ISO 5725-6 International Standard)		
	Desvio Padrão	Critério de aceitabilidade
Bala bA / vermelho 40	0,0001	≤ 2,8
Bala bN / vermelho 40	0,00006	≤ 2,8
Bala bN / indigotina	0,00006	≤ 2,8
Bala bP / vermelho 40	0	≤ 2,8
Bala bP / amarelo crepúsculo	0,00006	≤ 2,8
Bala bQ / vermelho 40	0,0001	≤ 2,8

4.3.5 Precisão Intermediária

Os valores de *CV* (%) encontrados (Tabela 26) indicam que o método apresenta precisão adequada quando as medidas de uma única amostra são obtidas em dias diferentes.

As condições cromatográficas dos testes realizados e representados pelas Figuras 26, 28 e 29 são: Fase móvel: água/metanol (70:30, v/v); Solução de lavagem: água/metanol (70:30, v/v) + acetato de amônio 0,8M; Fluxo: 0,5 mL/min; Comprimento de onda: 475 nm; “loop”: 500 µL; Volume de injeção: 20 µL.

Tabela 26 – Avaliação da Precisão intermediária do método CLAE¹ para análise de corantes através de ensaios realizados em três dias diferentes

	CV(%)	Média dos resultados obtidos	Si
Vermelho 40	0,2998	0,02534	0,00003
Amarelo crepúsculo	0,1815	0,01	0,00003
Azul brilhante	0,2134	0,01945	0,00004
Indigotina	0,1653	0,0289	0,0001

4.3.6 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

A curva analítica confeccionada para cada corante (Figuras 19 a 22 no ítem 4.3.2) foi utilizada para a determinação dos limites (tabela 27).

Tabela 27 – Limites e Detecção e de Quantificação das curvas analíticas para análise de corantes (mg / L)

	LOD	LOQ
Vermelho 40	3,24 X 10 ⁻¹	9,67 X 10 ⁻¹
Amarelo crepúsculo	2,97 X 10 ⁻¹	8,84 X 10 ⁻¹
Azul brilhante	3,00 X 10 ⁻¹	8,96 X 10 ⁻¹
Indigotina	1,45	4,23

4.3.7 Recuperação

A recuperação obtida para cada corante presente a cada uma das balas está apresentada na Tabela 28.

Tabela 28 – Recuperação de corantes em diferentes tipos de balas pelo método CLAE¹

Tipo de bala / corante	Recuperação <i>R</i> (%)	Critério de aceitabilidade
Bala bA / vermelho 40	106,24	80 – 110%
Bala bN / vermelho 40	99,0	80 – 110%
Bala bO / vermelho 40	98,44	80 – 110%
Bala bP / vermelho 40	95,73	80 – 110%
Bala bP / amarelo crepúsculo	96,43	80 – 110%
Bala bQ / vermelho 40	101,48	80 – 110%

Com os resultados de recuperação as concentrações de cada corante foram corrigidas e o resultado final pode ser visto na Tabela 29.

Tabela 29 – Concentração final dos corantes nas balas pelo método CLAE¹

Tipo de bala / corante	Concentração (g/100g)	Recuperação (%)	Concentração corrigida (g/100g)	Concentração corrigida (mg / 100g)
bA / vermelho 40	0,0014	106,24	0,0013	1,3
bN / vermelho 40	0,0048	99,0	0,0048	4,8
bN / Indigotina	0,0004	99,0	0,000	0,4
bO / vermelho 40	0,0070	98,44	0,007	7,1
bP / vermelho 40	0,0071	95,73	0,0074	7,4
bP / amarelo crepúsculo	0,0006	96,43	0,0006	0,6
bQ / vermelho 40	0,0026	101,48	0,0025	2,6

4.4 EXPOSIÇÃO AOS CORANTES PRESENTES EM BALAS

A partir do resultado dos questionários, da massa de cada uma das balas e da concentração de corante em 100 g de bala, foi possível estimar a quantidade de corante que as crianças consumiam somente a partir das balas.

Observando os gráficos (Figuras 35 a 39) abaixo se verifica que a maior parte das crianças indicam um consumo equivalente a 1 escore, ou seja, de 1 a 5 balas por marca semanalmente.

Figura 41 – Faixa de exposição semanal ao corante vermelho 40 – bala bA em crianças de 3 a 9 anos em 15 escolas no bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.

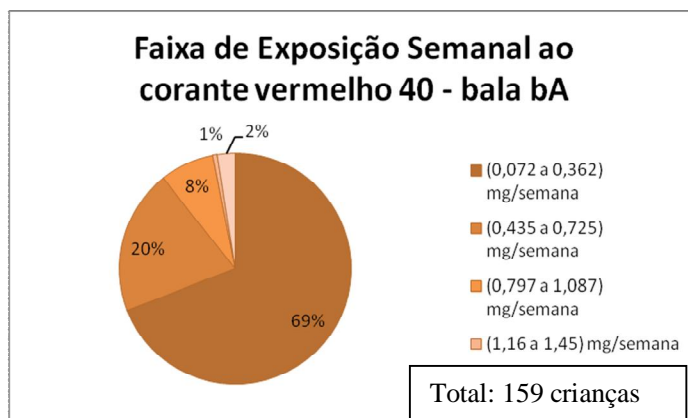


Figura 42 – Faixa de exposição semanal aos corantes vermelho 40 e indigotina – bala Bn em crianças de 3 a 9 anos em 15 escolas no bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.

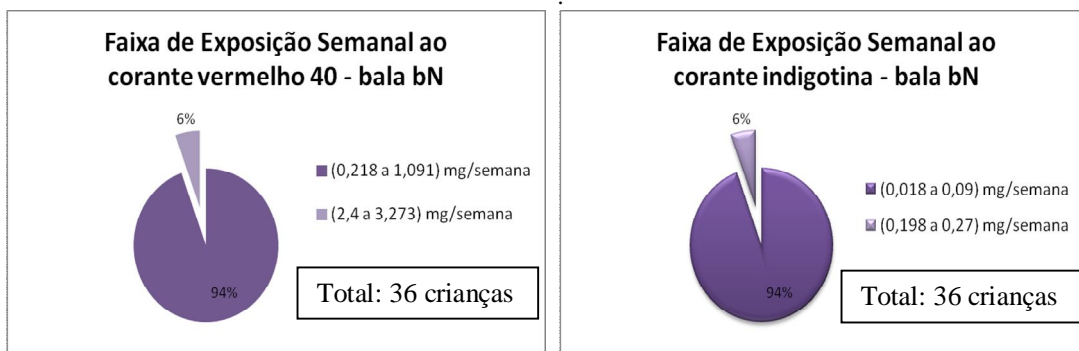


Figura 43 – Faixa de exposição semanal ao corante vermelho 40 – bala bO em crianças de 3 a 9 anos em 15 escolas no bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.

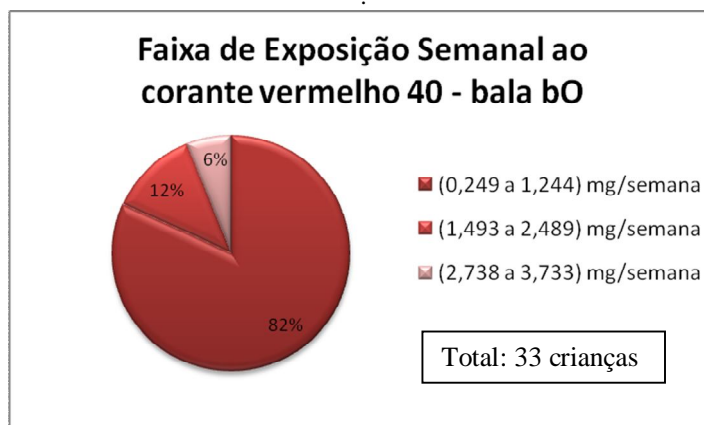


Figura 44 – Faixa de exposição semanal ao corante vermelho 40 – bala bP em crianças de 3 a 9 anos em 15 escolas no bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.

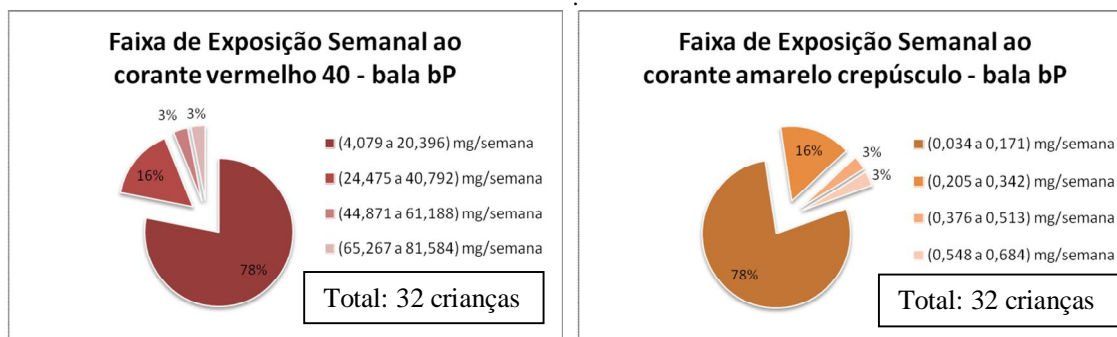
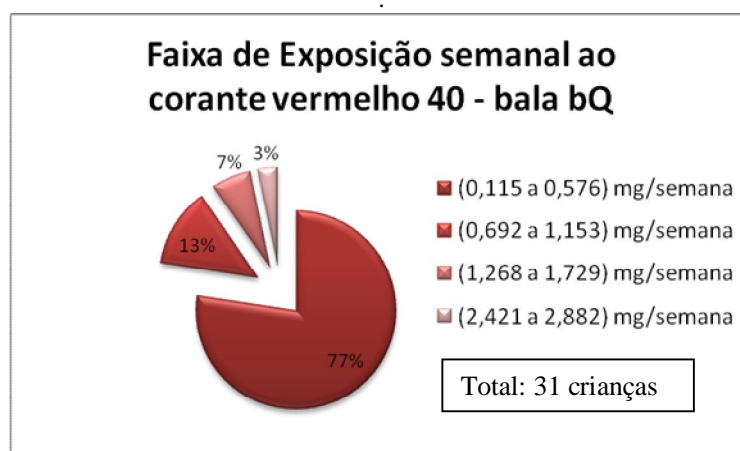


Figura 45 – Faixa de exposição semanal ao corante vermelho 40 – bala bQ em crianças de 3 a 9 anos em 15 escolas no bairro da Tijuca no Rio de Janeiro no período de Outubro a Dezembro de 2010.



O estudo realizado por Stevenson e colaboradores (2007) ofereceu uma mistura de corantes para crianças de 3, 8 e 9 anos e comprovou que esta mistura exacerbava comportamentos hiperativos, desatenção e impulsividade. O grupo de crianças foi dividido em um grupo com as crianças de 3 anos e outro grupo com as crianças de 8 e 9 anos. Cada grupo foi dividido em 3 sub-grupos, um recebeu a mistura A, o segundo a mistura B e o terceiro a mistura placebo. A composição de cada mistura encontra-se nas tabelas 30 e 31. Segundo o estudo as misturas A e B ofertados as crianças de 3 anos equivaliam a aproximadamente a mesma quantidade de corante alimentar presente em 2 pacotes de 56g de doces. E para as crianças de 8 e 9 anos a dose da mistura A também equivale a aproximadamente 2 pacotes de doces e a mistura B a 4 pacotes de doces.

Tabela 30 – Composição da mistura A de corantes (Stevenson e colaboradores - 2007)

MISTURA A		
	3 anos	8 / 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 4R	5,00 mg	6,25 mg
Massa total de corantes	20 mg	24,98 mg

Tabela 31 – Composição da mistura B de corantes (Stevenson e colaboradores - 2007)

MISTURA B		
	3 anos	8 / 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 de corantes	30 mg	62,4mg

Se levarmos em consideração que mais de 44 % (226) das crianças deste estudo consomem mais de 20 balas por semana, ou seja, entre 70 g e 110 g de bala (a massa das balas variou entre 3,5 g e 5,5 g), podemos concluir que somente por esta exposição, muitas crianças já consomem uma quantidade total de corantes artificiais suficientes para exacerbar um comportamento hiperativo. Contudo, a afirmação de que este consumo de balas realmente exacerbe a hiperatividade infantil, não pode ser provada, visto, que inclusive por motivos éticos, não realizamos um estudo oferecendo corantes a nossa população alvo. Além disso, nem todos os corantes artificiais usados no estudo de Stevenson e colaboradores (2007), mesmo tendo seu uso permitido em balas no Brasil (com exceção do amarelo de quinoleína), foram encontrados nas balas mais consumidas pelas crianças estudantes de escolas particulares do bairro da Tijuca. Somente os corantes vermelho 40 e amarelo crepúsculo aparecem nos dois estudos.

As balas não são as únicas fontes de corantes artificiais a que as crianças estão expostas, inúmeros biscoitos, sucos, refrigerantes, doces, gelatinas, iogurtes, bebidas matinais, confeitos e até mesmo suplementos infantis são coloridos artificialmente, isso sem levar em

consideração medicamentos destinados as crianças, portanto, a exposição aos corantes artificiais é muito maior do que o mensurado neste estudo e as conseqüências deste consumo devem ser analisadas e ponderadas quanto ao risco e o benefício na utilização de alimentos coloridos artificialmente.

4.5 NOTA

É importante mencionar, que este estudo também tinha como objetivo ser aplicado nas escolas públicas do bairro da Tijuca. O pedido de autorização para a pesquisa foi realizado dia 01/10/2010, com abertura de um processo e entrega de toda a documentação exigida segundo a portaria E/DGED N°41 de 12 de Fevereiro de 2009 a 2ª CRE (Coordenadoria Regional de Educação), da Secretaria Municipal de Educação do Município do Rio de Janeiro. O prazo para resposta era de trinta dias. Porém até a data de 31/10/2011, mais de um ano depois, todas as tentativas para uma resposta informavam que o processo ainda estava em análise. Com isso, a pesquisa teve que seguir sem os dados de consumo das escolas públicas.

5 CONCLUSÕES

Através do estudo realizado com crianças na faixa etária de 3 a 9 anos, estudantes de escolas particulares do bairro da Tijuca, Rio de Janeiro, foi possível verificar que aproximadamente 88% dos entrevistados fazem uso semanal de balas.

Em relação aos corantes presentes nos alimentos em estudo, constatou-se que os corantes mais mencionados nos rótulos dos produtos foram: vermelho 40 (E129), azul brilhante (E133), azul de indigotina (E132) e amarelo crepúsculo (E110). É relevante mencionar que a grande parte das crianças entrevistadas pode estar excedendo a ingestão diária aceitável (IDA) desses corantes, uma vez que a exposição não é dada somente pelo consumo de balas, mas pela totalidade do consumo de outros produtos coloridos artificialmente, como refrescos, gelatinas, refrigerantes, entre outros.

Foi possível observar com a análise dos 15 rótulos de balas mais consumidos, que muitas balas já apresentam corantes naturais em sua composição, ou algumas nem apresentam corantes. Vale ressaltar que a segunda bala mais consumida pelas crianças não apresenta corantes em sua composição, e mesmo assim é atrativa ao público infantil. Portanto, como a única função dos corantes alimentares é conferir cor ao alimento não oferecendo nenhum valor nutritivo a este, talvez esta pesquisa contribua para que as empresas busquem outras maneiras de tornar seu produto competitivo e conquistar mercado, que não seja utilizando corantes artificiais em suas formulações.

Este estudo demonstra a importância de pesquisas na área da Vigilância Sanitária, para que haja um planejamento de novas políticas públicas de saúde, que visem garantir a não só a segurança dos alimentos sob o aspecto da contaminação, como também a segurança dos aditivos alimentares empregados pelas indústrias, assegurando assim, a saúde humana.

REFERÊNCIAS

ABDEL-AZIZ, A.H., SHOURMAN, S.A., ATTIA, A.S., SAAD, S.F. A study on the reproductive toxicity of erythrosine in male mice. **Pharmacol Res**, v.35, p. 457-462, 1997.

ABRANTES, S. Avaliação de corantes artificiais em bebidas não alcoólicas e não gaseificadas. **Analytica**, n.27, Fev/Mar, 2007.

ABRANTES, S., OLIVEIRA, A.P.S., JACQUES, G.F., NERY, V.V.C. Consumo de corantes artificiais em balas e chicletes por crianças de seis a nove anos. **Analytica**. n.44, p.79-85, Dez, 2009 / Jan, 2010.

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

ARAÚJO, M.C.P., ANTUNES, L.M.G. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Rev. Nutr.** v.13, n. 2, p. 81-88, Maio/Ago, 2000.

BALBANI A.P.S., STELZER L.B, MONTOVANI J.C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 72, n. 3, p. 400-6, 2006.

BAZILIO, F.S.; BOMFIM, M. V. J.; ALMEIDA, R. J.; ABRANTES, S. M. P. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Analytica**. No prelo.

BOMFIM, M.V.J., **Avaliação Sanitária de Filmes de Poliamida (Nylon 6) em Embalagens Acondicionantes de Alimentos Gordurosos**. 2008. 80p. Dissertação de Mestrado – INCQS, Rio de Janeiro, 2008.

BRASIL, Decreto 50.040, de 24 de Janeiro de 1961. Dispõe sobre as Normas Técnicas Especiais Reguladoras do emprego de aditivos químicos a alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF. 1961. Seção1. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/50040_61.htm>. Acesso em: 15 abr. 2010.

BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária. Resolução nº44, de 05 de Agosto de 1977. Dispõe sobre Boas Práticas Farmacêuticas para o controle sanitário do funcionamento, da dispensação e da comercialização de produtos e da prestação de serviços farmacêuticos em farmácias e drogarias e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 6 ago. 1977.

BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária, Resolução nº387, 05 de Agosto de 1999. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF., 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/387_99.htm>. Acesso em: 17 nov. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF., 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 17 nov. 2009.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Considerações sobre o corante amarelo tartrazina. **Informes Técnicos** n. 30, 24 de jul. de 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/30_240707.htm>. Acesso em: 12 dez. 2011.

BROWN, M.B.; FORSYTHE, A.B. Robust tests for the equality of variances. **Journal of The American Statistical Association**. v.69, p. 364-67, 1974.

BRUCE, M.E.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim. Acta**, v.128, p.92-106, 1998.

BRUGMAN E., et al. Prevalence of self-reported food hypersensitivity among school children in The Netherlands. **Eur J Clin Nutr**. n.52, p.577-81. 1998.

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

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 3. Ed. Washington: Wiley, 1998.

DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression ii. **Biometrika**, v.38, p 159-178, 1951.

EDUARDO, M.B.P. **Vigilância Sanitária**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade do Estado de São Paulo, 1998. v. 8.

ELHKIM, M.O. et al. New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine: an update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France. **Regul Toxicol Pharmacol**. v.47, p.308-316, 2007

FEBRAFARMA. **Técnicas de Amostragem na Indústria Farmacêutica**. São Paulo, 2003.

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

GODOY, H.T.; PRADO, M.A. Corantes artificiais em alimentos. **Alim. Nutr**, Araraquara, v.14, n.2, p.237-250, 2003.

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.

GRUBBS, F. E.; BECK, G. Extension of sample sizes and percentage points for significance testes of outlying observations. **Technometrics**. v.14, p847-856, 1972

GUIDELINES ON ANALYTICAL TERMINOLOGY. CAC / GL. 72, 2009.

HARMONIZED guidelines for the use of recovery informations in analytical measurement, IUPAC / ISO / AOAC International/ Eurachem technical report, 1998.

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. 331-43, 1995.

INCQS. **Manual da Qualidade 65.3120,063**. Determinação de corantes artificiais em bebidas não alcoólicas. Rev. 03. Rio de Janeiro. 2008, 19p.

INCQS. **POP 65.1120.065**. Orientações para validação de métodos analíticos. Rev. 01. Rio de Janeiro, 2011, 12p.

INCQS. **POP 65.3120.126**. Validação de metodologias com determinação através de curva analítica linear. Rev. 01. Rio de Janeiro, 2009, 24p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use**. Validation of analytical procedures. ICH Q2B. Geneva, 1996.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos: DOQ-CGCRE-008: Normatização e Qualidade Industrial: Revisão 4**. Rio de Janeiro, 2011.

ISO. **ISO 2859-1**: Sampling procedures for inspection by attributes - Part 1: Sampling schemes indexed by acceptance quality limit (AQL) for lot-by-lot inspection, Geneva, 1999

ISO. **ISO 3534-2**: Vocabulary and Symbols Part 2: Applied Statistics. Geneva, 2006.

ISO. **ISO 5725**: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Geneva, 1994.

JCGM. **International vocabulary of metrology**: Basic and general concepts and associated terms (VIM). 3. ed. Paris, 2012. (JCGM 200: 2012). Disponível em: < http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_200_2012.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2012.

KAPADIA, G.J. et al. Cancer chemopreventive activity of synthetic colorants used in foods, pharmaceuticals and cosmetic preparations. *Cancer Letter, Limerick*, v.129, n.1, p.87-95, 1998.

LAKDAWALLA, A.A., NETRAWALI, M.S. Mutagenicity, comutagenicity, and antimutagenicity of erythrosine (FD and C red 3), a food dye, in the Ames/Salmonella assay. *Mutation Research, Amsterdam*. v.204, n.2, p.131-139, 1988.

LANÇAS, F.M. Validação de Métodos Cromatográficos de Análise. São Carlos: Rima, 2004.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I; et al. (Ed.). *Contributions to probability and statistics*. Stanford University Press, 278-92, 1960.

LINN S., editor. *Crianças do consumo: a infância roubada*. São Paulo: Instituto Alana. 2006.

MELLO ED. Prescrição de medicamentos em pediatria. In: Fuchs FD, Wannmacher L, Ferreira MBC, eds. Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004: 942-8.

MILLER, J. C.; MILLER, J. N. Error in instrumental analysis; regression and correlation. In: _____. Statistic for analytical chemistry. 3rd ed. Chichester: Ellis Horwood. Chapter v.5, p. 101-141, 1993.

MOUTINHO, I.L.D., BERTGES, L.C., ASSIS, R.V.C., O uso prolongado do corante alimentar tartrazina e seus efeitos sobre a mucosa gástrica de ratos Wistar. Revista Brasileira de Biologia. v.67, n.1, 2007.

PERES, F.; POLÔNIO, M.L.T. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para saúde pública brasileira. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.25, n.8, Agosto, 2009.

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, n.2, p268-273, 2007.

PRESSINGER, R.W. Environmental Causes of Learning Disabilities and Chile Neurological Disorders: Review of the Research. 1997. Disponível em: http://www.chemtox.com/pregnancy/learning_disabilities.htm. Acesso em 26 de out. 2008 às 14h.

QUEIJA, C.; QUEIRÓS, M. A.; RODRIGUES, L. M. A cor dos Alimentos. Química - Bol. Soc. Portuguesa Quím. v.80, p.6-11, 2001.

RYAN, T.A.; JOINER, B.L. Normal probability plots and tests for normality. The State College: Pennsylvania State University, 1976.

RIBANI, M.; BOTTOLI C.B.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM. I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. Quimica Nova. v.27 n.5: p771-780, 2004.

ROLLEMBERG, M.C.E.; VIDOTTI, E.C.; Espectrofotometria derivativa: uma estratégia simples para a determinação simultânea de corantes em alimentos. Quim Nova. v.29, n.2, p230-233, 2006.

ROZENFELD, S.(org). Fundamentos da Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2000.

RUBINI, N.P.; SOLA, D.; JACOB, C.M.A.; PASTORINO, A.C.; NETO, A.P.; BURNS, D.A.; SARINHO, E.S.C.; PRADO, E.A.; SOARES, F.J.P.; RIZZO, M.C.V.; SILVA, M.G.N. O conhecimento de pediatras sobre alergia alimentar: estudo piloto. Revista Paulista de Pediatria. v.25, n.4, São Paulo, Dez, 2007.

SERRA, G.M.A.; SANTOS, E.M.; Health and media in construction of obesity and perfect body. Ciência Saúde Coletiva, n.8, p.691-701, 2003.

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

SOFFRITTI M, BELPOGGI F, TIBALDI E, ESPOSTI D.D, LAURIOLA M. Life-span exposure to low doses of aspartame beginning during prenatal life increases cancer effects in rats. *Environ Health Perspect*; 115(9):1293-97, 2007.

SOUZA, S.V.C. Procedimentos para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

SUGIMURA, T. Mutagens, carcinogens, and tumor promoters in our daily food. *Cancer*, v.49, p.1970-1984, 1982.

TADDEI, J.A.; BRASIL A.L.; PALMA D.; MORAES, D.E.; RIBEIRO, L.C.; LOPEZ, F.A.; et al. Manual crechEficiente: guia prático para educadores e gerentes. São Paulo: Manole, 2006.

TADDEI, J.A.; PONTES, T.E.; COSTA, T.F.; MARUM, A.B.R.F.; BRASIL, A.L. Orientação nutricional de crianças e adolescentes e os novos padrões de consumo: propagandas, embalagens e rótulos. *Revista Paulista de Pediatria*, São Paulo, v.27, nº1, Mar, 2009.

UNIÃO EUROPÉIA (UE). Performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of European Union*. L. 221-8, 2002.

VALIDAÇÃO de metodologias com determinação através de curva analítica linear. In: *MANUAL da Qualidade*. Rio de Janeiro. INCQS/FIOCRUZ, 2009, 24p. (65.3120.126)

WARD, N.I. Assessment of chemical factors in relation to child hyperactivity. *J. Nutr. Environ. Med.* v.7, n.4, p.333-342, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants. 37th report. Geneva: World Health Organization, 1991.

YAMAZAKI, H. ET al. Effect of food additives on rabbit platelet function. II. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*; v.40, n.1, p.41, 1994.

APÊNDICE A



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



“Avaliação da exposição aos corantes artificiais por crianças entre 3 a 9 anos em relação ao consumo de balas”

Nome da criança:

Escola:

Série:

Idade: _____ Data de Nascimento:

Sexo: () Masculino () Feminino

Qual a bala preferida da criança?

Nome / marca:

Cor da bala:

Marque com “X” a quantidade de **balas** de cada cor que a criança come por semana:

Bala Vermelha:

Nome/ marca

Zero
 1 a 5 balas
 6 a 10 balas
 11 a 15 balas
 16 a 20 balas
 Mais de 20 balas

Bala Roxa:

Nome/ marca

Zero 1 a 5 balas 6 a 10 balas 11 a 15 balas 16 a 20 balas Mais de 20 balas

Bala Azul:

Nome/ marca

Zero 1 a 5 balas 6 a 10 balas 11 a 15 balas 16 a 20 balas Mais de 20 balas

Bala Laranja:

Nome/ marca

Zero 1 a 5 balas 6 a 10 balas 11 a 15 balas 16 a 20 balas Mais de 20 balas

Bala Amarela:

Nome/ marca

Zero 1 a 5 balas 6 a 10 balas 11 a 15 balas 16 a 20 balas Mais de 20 balas

Bala Rosa:

Nome/ marca

Zero 1 a 5 balas 6 a 10 balas 11 a 15 balas 16 a 20 balas Mais de 20 balas

Bala Verde:

Nome/ marca

Zero 1 a 5 balas 6 a 10 balas 11 a 15 balas 16 a 20 balas Mais de 20 balas

Bala (outra cor): _____

Nome/ marca

Zero 1 a 5 balas 6 a 10 balas 11 a 15 balas 16 a 20 balas Mais de 20 balas

APÊNDICE B

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz**Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Caro (a) Senhor (a),

Eu, Shirley de Mello Pereira Abrantes, pesquisadora da FIOCRUZ, departamento de química, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Avenida. Brasil nº 4365, Manguinhos, shirley.abrantes@incqs.fiocruz.br, cujo telefone de contato é (21) 38655124, vou desenvolver uma pesquisa cujo título é “Avaliação da exposição aos corantes artificiais por crianças entre 3 e 9 anos em relação ao consumo de balas”.

O objetivo deste estudo é avaliar o uso de corantes artificiais em balas, determinando seus teores nesses produtos, e tentar relacionar esses dados com publicações de danos a saúde de crianças, gerando dados para avaliar a exposição de crianças aos corantes artificiais. Necessito que o Sr. (a). forneça informações a respeito de seu (sua) filho (a), cujas perguntas estão em anexo.

A participação do (a) seu (a) filho (a) nesta pesquisa é voluntária e não determinará qualquer risco ou desconforto, pois não mantereí qualquer contato com ele (a), ficando a coleta dos dados restritos à entrevista.

A participação do (a) seu (a) filho (a) não trará qualquer benefício direto mas proporcionará um melhor conhecimento a respeito dos efeitos desses corantes artificiais sobre as crianças, que poderão beneficiar outras crianças ou, então, somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

Informo que Sr (a). tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com a Sra. Léa Camillo Coura no Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC, Avenida. Brasil nº 4365, Manguinhos, cujo telefone de contato é (21) 38659585.

Também é garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo, punição ou atitude preconceituosa.

Garanto que as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outras crianças, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos participantes.

O Sr (a). tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas e caso seja solicitado, darei todas as informações que solicitar.

Não existirá despesas ou compensações pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à participação do (a) seu (a) filho (a).

Eu me comprometo a utilizar os dados coletados somente para pesquisa e os resultados serão veiculados através de artigos científicos em revistas especializadas e/ou em encontros científicos e congressos, sem nunca tornar possível a identificação do (a) seu (a) filho (a).

Consentimento Pós-informação

Acredito ter sido suficiente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Avaliação da exposição aos corantes artificiais por crianças entre 3 e 9 anos em relação ao consumo de balas”.

Eu discuti com a pesquisadora Shirley de Mello Pereira Abrantes sobre a minha decisão em permitir a participação de meu (minha) filho (a) nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que a participação do (a) meu (minha) filho (a) é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo. Concordo voluntariamente em permitir a participação do (a) meu (minha) filho (a) deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Data ____/____/____

Assinatura do pai (mãe) ou responsável

Nome:

Endereço:

RG:

Fone:

Data ____/____/____

Assinatura da pesquisadora

Data ____/____/____

Assinatura da aluna de mestrado

Nome da criança: _____