



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Adriana Rodrigues da Silva Pereira

CARMINA EM IOGURTES: OCORRÊNCIA E AVALIAÇÃO
DO RISCO

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar,
orientada pela Professora Doutora Celeste Matos Lino e
pela Professora Doutora Liliana Silva e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Adriana Rodrigues da Silva Pereira

**CARMINA EM IOGURTES: OCORRÊNCIA E
AVALIAÇÃO DO RISCO**

**Dissertação no âmbito do mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela
Professora Doutora Celeste Matos Lino e pela Professora Doutora Liliana
Silva apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**

Setembro de 2019

Agradecimentos

Chega assim ao fim mais uma etapa, a qual devo agradecer a muitas pessoas.

À Professora Doutora Celeste de Matos Lino, pelo seu tempo, dedicação e orientação, ao longo deste percurso.

A todas as pessoas que passaram horas comigo no Laboratório de Bromatologia da Universidade de Coimbra, que me alegraram os dias, um especial agradecimento à Professora Doutora Liliana Silva pela sua demonstração de paciência e por me ensinar o necessário para conseguir realizar este trabalho.

À Brígida, pelos momentos passados no laboratório, que não teriam sido tão animadores e enriquecedores e pelo apoio e paciência que sempre demonstraste.

Aos meus amigos que me apoiaram sempre e que me deram força para continuar.

Por último, mas sem dúvida o mais importante, à minha família, mãe, pai e irmão aos quais serei sempre muito grata por me apoiarem e incentivarem a continuar e em especial por serem o meu porto de abrigo em todos os momentos menos bons.

A todos, e a cada um, o meu mais sincero obrigada.

Abstract

There has always been a need to change certain food characteristics, such as color. This is often done with artificial or natural substances. These changes are mainly intended to make them more attractive to the consumer, so that they have the ideal or preferred color in the food itself, even if it has no influence on taste. The purpose of these changes relates only to appearance, with no interest or effect on the nutritional value of the food.

One of the most consumed natural dyes in the world is carmine, obtained through the dry body of cochineal.

Despite being considered safe for human health and approved by different international agencies, this dye proves to be one of the best known to cause allergic reactions.

This coloring is used in a wide variety of products, mainly food, including yogurt.

The methodology used to evaluate the carmine content expressed in carminic acid present in the samples was by acid hydrolysis, followed by detection and quantification by 494 nm UV-Vis spectrophotometry.

In this study were analyzed 30 samples, 13 of liquid yogurt and 17 of solid yogurt. Of these, 43.3% were non-brand and 56.6% were manufacturer brands.

In the group consisting of solid yogurt a maximum value of 193.75 mg / kg was observed and in the group of liquid yogurt this value was 153.13 mg / kg. Of the 17 solid yogurt samples analyzed, six are above the maximum use limit allowed by European legislation, 150 mg / kg, and 13 of the liquid yoghurt samples analyzed, two are also above that limit.

Although some samples are above the allowable values, the EDI value did not exceed the ADI value established by EFSA in 2015, and it can be concluded that the intake of carminic acid from yogurt consumption does not pose a risk to consumers health.

Keywords: carminic acid, cochineal, spectrophotometry, yogurts.

Resumo

Desde sempre existiu a necessidade de alterar certas características dos alimentos, como é o exemplo da cor. Para tal recorre-se, frequentemente, a substâncias artificiais ou naturais. Estas alterações visam principalmente torná-los mais atraentes para o consumidor, para que tenham a cor tomada como ideal ou preferida no alimento em si, mesmo que não tenha qualquer influência no sabor. O objetivo destas alterações relaciona-se apenas com a aparência, não havendo qualquer interesse ou efeito no valor nutricional do alimento.

Um dos corantes naturais mais consumidos no mundo é a carmina, corante obtido através do corpo seco da cochonilha.

Apesar de ser considerado seguro para a saúde humana e aprovado por diferentes agências internacionais, este corante mostra ser um dos mais conhecidos por causar reações alérgicas.

Este corante é usado numa enorme variedade de produtos, principalmente alimentares, onde se incluem os iogurtes.

A metodologia usada para avaliar o teor de carmina expresso em ácido carmínico presente nas amostras consistiu em proceder a uma hidrólise em meio ácido, seguida de deteção e quantificação por espectrofotometria UV-Vis a 494 nm.

Neste estudo foram analisadas 30 amostras, 13 de iogurtes líquidos e 17 de iogurtes sólidos. De entre estas, 43,3% eram de marcas brancas e 56,6% de marcas de fabricante.

No grupo constituído pelos iogurtes sólidos observou-se um valor máximo de 193,75 mg/kg e no dos iogurtes líquidos esse valor foi de 153,13 mg/kg. Das 17 amostras de iogurtes sólidos analisadas seis encontram-se acima do limite máximo de utilização permitido pela legislação europeia, 150 mg/kg, e dos 13 iogurtes líquidos analisados, duas também se encontram acima daquele limite.

Apesar de algumas amostras se encontrarem acima dos valores permitidos, o valor da EDI não ultrapassou o valor da ADI estabelecido pela EFSA em 2015, podendo concluir-se que a ingestão de ácido carmínico veiculada pelo consumo de iogurtes não apresenta risco para a saúde dos consumidores.

Palavras-chave: ácido carmínico, cochonilha, espectrofotometria, iogurtes.

Índice Geral

Agradecimentos	II
Abstract	III
Resumo	IV
Índice Figuras	7
Abreviaturas	8
Objetivos	9
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
1.1. Introdução	11
1.2. Classificação dos aditivos	12
1.3. Corantes	12
1.3.1. Classificação de Corantes	14
1.3.2. Carmina / Ácido Carmínico	16
1.3.2.1. Características físico-químicas	18
1.3.2.2. Aplicações	22
1.3.2.3. Toxicidade para o Homem	22
1.3.2.4. Legislação	24
1.3.2.4.1. Limites Máximos de Utilização	24
1.3.2.4.2. Ingestão Diária Admissível (ADI)	29
1.3.2.5. Metodologias analíticas para a determinação de carmina	29
1.3.2.5.1. Extração e Purificação da amostra	29
1.3.2.5.2. Deteção e Quantificação	30
1.3.2.6. Ocorrência e teores de carmina/ácido carmínico em matrizes alimentares	33
2. PARTE EXPERIMENTAL	36
Parte Experimental	37
2.1. Materiais e metodologia analítica	37
2.1.1. Reagentes e soluções	37
2.1.1.1. Reagentes	37
2.1.1.2. Soluções	37
2.1.2. Materiais	37
2.1.3. Equipamentos	37
2.2. Amostragem	38
2.2.1. Recolha de amostras	38
2.3. Metodologia analítica	39

2.4.	Validação da metodologia analítica	40
2.4.1.	Ensaio em branco	40
2.4.2.	Linearidade	40
2.4.3.	Limite de detecção e limite de quantificação.....	41
2.4.4.	Exatidão e precisão	41
2.5.	Resultados e discussão.....	42
2.5.1.	Validação	42
2.5.1.1.	Linearidade	42
2.5.1.2.	Limites de detecção e quantificação de ácido carmínico.....	43
2.5.1.3.	Exatidão e precisão	44
2.5.2.	Níveis de ácido carmínico nas amostras de iogurtes.....	44
2.5.3.	Avaliação da exposição.....	47
3.	Conclusão.....	49
4.	Referências bibliográficas	50

Índice Figuras

Figura 1. Estrutura química do ácido carmínico (Adaptação de Yilmaz, Ergun e Yilmaz, 2014).....	20
Figura 2. Estrutura química da laca de carmin (Adaptação de Crizel, 2017).....	21
Figura 3. Curva de calibração em solvente.	42
Figura 4. Curva de calibração em amostras fortificadas.....	43
Figura 5. Concentração de ácido carmínico (mg/Kg) em iogurtes sólidos	45
Figura 6. Concentração de ácido carmínico (mg/Kg) em iogurtes líquidos.....	45
Figura 7. Concentração de ácido carmínico (mg/Kg) em iogurtes de marca branca.....	46
Figura 8. Concentração de ácido carmínico (mg/Kg) em iogurtes de marca de fabricante	46
Figura 9. Consumo humano de leite e produtos lácteos (t) por tipo de leites e produtos lácteos	48

Índice Tabelas

Tabela 1. Listagem dos corantes permitidos pela legislação da UE (Adaptação do REGULAMENTO (UE) n.º 1129/2011 DA COMISSÃO de 11 de Novembro de 2011)	16
Tabela 2. Propriedades do ácido carmínico, carmina (REGULAMENTO DA UE n.º 2018/1472 DA COMISSÃO DE 28 DE SETEMBRO DE 2018.).....	19
Tabela 3. Géneros alimentícios e teor máximo de E 120 de acordo com o Regulamento UE n.º 1129/2011.....	26
Tabela 4. Metodologias analíticas usadas na determinação de carmina e ácido carmínico.....	32
Tabela 5. Ocorrência e teores de carmina e ácido carmínico encontrados em matrizes alimentares	35
Tabela 6. Listagem de amostras analisadas.....	39
Tabela 7. Exatidão e Precisão intra-dia e inter-dia.....	44
Tabela 8. Frequência (%) e teores (mg/kg) de ácido carmínico nas amostras analisadas, de acordo com a textura e a marca.....	46

Abreviaturas

AC – Ácido carmínico

ADI – Ingestão diária admissível

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

CC – Curva de calibração

DDP – Polarografia de pulso diferencial

EDI – Ingestão diária estimada

ESFA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

FDA – *Food and Drug Administration*

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

LOD – Limite de deteção

LOQ – Limite de quantificação

MALDI – Desorção / ionização por laser assistida por matriz

OMS – Organização Mundial de Saúde

SV – *Stripping Voltammetry*

Objetivos

A elaboração do presente trabalho teve como objetivos:

- 1) a validação de uma metodologia analítica para a determinação de ácido carmínico em diferentes amostras de iogurtes por espectrofotometria UV-Vis;
- 2) a aplicação da metodologia analítica validada à análise de diferentes amostras de iogurte adquiridas comercialmente;
- 3) a avaliação da exposição humana ao corante mencionado, de modo a verificar se a ingestão de ácido carmínico, através do consumo de iogurtes, constitui um risco para a população portuguesa.

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Introdução

A alimentação desde sempre desempenhou um papel fundamental na evolução do Homem. Aquela constitui uma das atividades humanas mais importantes não só por razões biológicas evidentes, mas também por envolver aspetos sociais, culturais, científicos, políticos e económicos (Proença, 2010; Rocha, 2015a; Souza, 2012).

O aumento demográfico mundial e a evolução dos processos tecnológicos tiveram uma enorme influência na forma como os produtos passaram a ser consumidos, tendo deixado de ser consumidos apenas no seu estado natural para serem consumidos e transformados em larga escala (Decreto - Lei n.º 192/89 de 8 de Junho).

Há muito que existe a necessidade de alterar certas características dos alimentos, tais como a cor e sabor. Para tal recorre-se, frequentemente, a substâncias artificiais ou naturais. Estas alterações visam principalmente torná-los mais atraentes para o consumidor, para serem mais facilmente escolhidos na hora de comprar, ou que tenham a cor tomada como ideal ou preferida no alimento em si, mesmo que não tenha qualquer influência no sabor. O objetivo destas alterações relaciona-se apenas com a aparência, não havendo qualquer interesse ou efeito no valor nutricional do alimento (Rocha, 2015a).

Para tal houve a necessidade de adicionar aos géneros alimentícios certas substâncias - os aditivos -, que os sofisticados processos industriais cada vez mais impõem, pois estes tornam os alimentos mais atraentes e com aspeto mais próximo do natural, características que se podem ter perdido durante o processamento (Borges *et al.*, 2012; Cabrera, 2008; Crizel, 2017; Decreto-Lei n.º 192/89 de 8 de Junho; González *et al.*, 2002).

O Regulamento n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, define aditivos alimentares como toda a substância, quer tenha ou não valor nutritivo, que por si só não é normalmente género alimentício nem ingrediente característico de um género alimentício, mas cuja adição intencional, com finalidade tecnológica na manufatura, processamento, preparação, tratamento, acondicionamento, transporte ou armazenagem de um género alimentício, tem como consequência quer a sua incorporação nele ou a presença de um derivado, quer a modificação de características desse género.

É evidente a importância dos aditivos sob o ponto de vista tecnológico na produção de géneros alimentícios. Porém, é necessário estar atento aos possíveis riscos toxicológicos que acarretam pela sua ingestão frequente (Polônio e Peres, 2009).

Diversos estudos mostram que os aditivos provocam reações adversas, quer sejam agudas ou crônicas, como reações tóxicas no metabolismo desencadeantes de alergias, de alterações no comportamento, em geral, de carcinogenicidade, sendo que esta é observada a longo prazo (Polônio e Peres, 2009).

Embora o consumo de um determinado alimento devesse depender principalmente do seu valor nutricional, a sua cor, o aroma e a textura são fatores que conduzem à preferência do consumidor. Dentre estes fatores, a cor é o mais importante fator de preferência, já que é a qualidade que mais facilmente desperta a atenção do consumidor (Souza, 2012).

1.2. Classificação dos aditivos

Na Europa, os aditivos alimentares estão divididos em classes funcionais de acordo com a função tecnológica que desempenham no alimento e o Anexo II do Regulamento (CE) n.º 1129/2011 conta com 322 aditivos diferentes distribuídos por 26 classes funcionais, identificados pela letra E, seguida de um número (Rocha, 2015 a).

Os corantes alimentares são classificados de E100 a E180 (Regulamento (UE) n.º 1129/2011 de 11 de Novembro).

Os aditivos alimentares estão sujeitos a uma avaliação de segurança feita atualmente pela European Food Safety Authority (EFSA), antes de poderem ser autorizados e utilizados na União Europeia (UE). Desta avaliação pode resultar que os aditivos sejam autorizados em doses “quantum satis” ou limites máximos de utilização (LMU), ou então que permaneçam não autorizados (Diretiva n.º 98/72/CE de 15 de Outubro; Decreto-Lei n.º 64/2011 de 9 de Maio).

Após a sua autorização, os aditivos alimentares são sujeitos a revisões periódicas para comprovar a sua segurança (Pereira, 2015).

1.3. Corantes

A aparência do alimento pode exercer efeito estimulante ou inibidor do apetite. Além de necessária para sobrevivência, a alimentação também é fonte de prazer e satisfação. É por essa razão que o setor alimentar se preocupa tanto com a adição de cores e obtenção de alimentos que agradem ao olhar do consumidor (Aditivos & Ingredientes, 2009).

A ideia de consumo dos produtos dá-se numa fase inicial pela visão. Os alimentos coloridos e vistosos são muito mais atraentes para o consumidor, e essa cor deve-se, sobretudo, ao uso de corantes alimentares (Souza, 2012), um dos grupos de aditivos alimentares mais utilizado nos géneros alimentícios (Rocha, 2015 a).

Corantes alimentares são substâncias usadas para conferir ou restituir cor a um alimento ou quaisquer aplicações não alimentares incluindo produtos farmacêuticos e que são constituídas por componentes naturais de géneros alimentícios ou outras substâncias naturais que não são normalmente consumidas como alimentos nem como ingredientes característicos de alimentos (Regulamento (UE) n.º 1333/2008 de 16 de Dezembro). É também para além do que já foi referido, qualquer produto químico que reage com outra substância e provoque a formação de uma cor (Amchova, Kotolova e Ruda-Kucerova, 2015).

Conferir cor aos alimentos para torná-los mais apetecíveis e atraentes já é um hábito muito antigo. As especiarias e os condimentos já tinham essa função (Hamerski, Rezende e Silva, 2013).

Já as primeiras civilizações reconheciam que as pessoas também "comem com os olhos". Esta expressão, traduz muito bem a importância da cor nos alimentos (Aditivos & Ingredientes, 2009; Queirós e Rodrigues, 2001).

Até 1850 todos os corantes alimentares provinham de três fontes: vegetais (cenoura = laranja, beterraba = vermelho, pele de uva = preto, entre outros), extratos de origem animal ou vegetal normalmente não consumidos (ácido carmínico = vermelho, estigma de açafrão = açafrão) e resultados da transformação de substâncias naturais (caramelos = castanho) (Petter, Rosa e Kissmann, 2010).

Os corantes são usados fundamentalmente para compensar a descoloração devido a exposição solar, ao ar, a temperaturas extremas, a condições humidade e de conservação, para equilibrar as variações naturais ou sazonais nas matérias-primas alimentares ou efeitos de processamento e conservação e para intensificar as cores que naturalmente ocorrem nos alimentos, mas que são menos intensas do que a cor associada a um determinado alimento (Gilvaz, 2012).

A cor desempenha um papel crucial na aceitação dos produtos, podendo exercer efeito estimulante ou inibidor de apetite, pois é um dos atributos mais impactantes na avaliação do consumidor sobre um produto, pois espera-se que estes tenham uma coloração característica. O consumidor quer ver alimentos com a tonalidade tomada como a certa para o alimento, quer ver carne vermelha, queijo amarelado, refrigerantes com as cores

apelativas, doces com cores chamativas para as crianças e outros aspetos apelativos (Borges *et al.*, 2012; Rocha, 2015 a).

Com o hábito da população de associar a cor dos produtos a outras características, como sabor e nível de doçura, por exemplo, existe a necessidade de apresentar uma cor correspondente para os produtos em desenvolvimento, pois esta será fundamental para sua aceitação (Nascimento e Prato, 2016).

Várias pesquisas comprovam que o consumidor avalia primeiramente a cor de um produto alimentar, associando-a ao sabor. Assim, como a cor influencia a compra do produto, os fabricantes recorrem à utilização de corantes para garantir que o alimento é apelativo e conseqüentemente mais facilmente adquirido (Souza, 2012).

Mas a adição de cores a certos alimentos pode também ser vista como algo que pode levar o consumidor ao engano quanto à sua natureza e pode ser considerada uma ação de cosmética desnecessária. Uma vez que o objetivo dos corantes é melhorar o aspeto visual do alimento, a sua utilização pode mascarar a má qualidade das matérias-primas ou a utilização de métodos ou técnicas de produção indesejáveis e tornar-se um recurso fácil e abusivo para a indústria alimentar (Rocha, 2015 a).

As cores mais vivas e brilhantes são as mais utilizadas em produtos alimentares destinados às crianças, que constituem, em termos de saúde pública, o grupo etário mais exposto aos efeitos negativos destas substâncias na saúde das populações (Rocha, 2015 a).

1.3.1. Classificação de Corantes

Duas classes de corantes estão disponíveis para uso em alimentos, os sintéticos e os naturais. Considera-se corante natural, o pigmento ou corante inócuo extraído de substância vegetal ou animal. Já o corante artificial é a substância obtida por processo de síntese, com composição química definida (Constant, Stringheta e Sandi, 2002; Honorato *et al.*, 2013).

Os corantes E 102 – Tartarazina, E 104 – Amarelo de quinoleína, E 110 – Amarelo-sol FCF, E 124 – Ponceau 4 R, e E 132 – Indigotina ou carmim de índigo, são de entre muitos outros corantes pertencentes ao grupo dos sintéticos (ASAE, 2019; Honorato *et al.*, 2013).

De entre os corantes naturais encontram-se: E 100 – Curcumina, E 120 – Ácido carmínico e carmina, E 140 – Clorofilas e compostos derivados, clorofilinas, E 160a – Carotenos mistos e beta-caroteno, E 161b – Luteína, E 163 – Antocianinas, entre outros.

Os corantes mais utilizados são os de origem natural, extraídos de plantas e animais, como é o exemplo da cochonilla, obtida a partir de insetos esmagados (Rocha, 2015 a). A adição de corantes naturais aos géneros alimentícios é praticada há séculos e tem vindo a ocupar um lugar cada vez mais importante na indústria agroalimentar pelo seu impacto económico (Queirós e Rodrigues, 2001). Os corantes naturais possuem baixa toxicidade, sendo que os derivados de plantas são extremamente abundantes (Both *et al.*, 2014).

Apesar dos corantes sintéticos apresentarem custos de produção menos elevados e uma maior estabilidade, o número de aditivos sintéticos que são permitidos nos países desenvolvidos está gradualmente a diminuir e estão cada vez mais a ser substituídos pelos de origem natural, uma vez que são considerados inofensivos ou mesmo saudáveis. Mesmo assim apresentam algumas desvantagens em relação aos sintéticos, já que são mais caros e menos estáveis. Além disso, a União Europeia e os Estados Unidos da América restringiram o uso de corantes sintéticos como aditivos alimentares. Essas restrições aumentaram o uso de corantes naturais pela indústria alimentar e os consumidores exigem que os alimentos sejam tão naturais quanto possível (Borges *et al.*, 2012; Cabrera, 2008; Honorato *et al.*, 2013).

Na tabela I encontram-se listados os corantes permitidos pela União Europeia (UE) de acordo com o Regulamento n.º 1129/2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011.

A EFSA recomendou a revisão do atual título «Cochonilha, ácido carmínico, carminas» de modo a refletir com mais exatidão o material utilizado como aditivo alimentar para “ácido carmínico, carmina” (Regulamento da UE n.º 2018/1472 da Comissão de 28 de setembro de 2018).

Tabela I. Listagem dos corantes permitidos pela legislação da UE (Adaptação do REGULAMENTO (UE) n.º 1129/2011 DA COMISSÃO de 11 de Novembro de 2011)

Número E	Designação
E 100	Curcumina
E 101	Riboflavinas
E 102	Tartarazina
E 104	Amarelo de quinoleína
E 110	Amarelo-sol FCF/amarelo alaranjado S
E 120	Cochonilha, ácido carmínico, carminas
E 122	Azorubina, carmosina
E 123	Amarante (2)
E 124	Ponceau 4R, vermelho cochonilha A
E 127	Eritrosina (2)
E 129	Vermelho allura AC
E 131	Azul patenteado V
E 132	Indigotina, carmim de índigo
E 133	Azul brilhante FCF
E 140	Clorofilas e clorofilinas
E 141	Complexos cúpricos de clorofilas e clorofilinas
E 142	Verde S
E 150a	Caramelo simples (1)
E 150b	Caramelo sulfito cáustico
E 150c	Caramelo de amónia
E 150d	Caramelo sulfito de amónia
E 151	Negro brilhante BN, negro PN
E 153	Carvão vegetal
E 155	Castanho HT
E 160a	Carotenos
E 160b	Anato, bixina, norbixina (2)
E 160c	Extracto de pimentão, capsantina, capsorubina
E 160d	Licopeno
E 160e	Beta-apo-8'-carotenal (C 30)
E 161b	Luteína
E 161g	Cantaxantina (*)
E 162	Vermelho de beterraba, betanina
E 163	Antocianinas
E 170	Carbonato de cálcio
E 171	Dióxido de titânio
E 172	Óxidos e hidróxidos de ferro
E 173	Alumínio (2)
E 174	Prata
E 175	Ouro
E180	Litolrubina BK (2)

(1) O termo caramelo está relacionado com produtos de cor castanha mais ou menos intensa usados como corantes. Não corresponde ao produto açucarado aromático obtido pelo aquecimento dos açúcares e usado como aroma (por exemplo, em produtos de confeitaria e pastelaria ou em bebidas alcoólicas).

(2) Estes corantes não podem ser vendidos diretamente aos consumidores.

(*) A cantaxantina não está autorizada nas categorias de alimentos enumeradas nas partes D e E. Esta substância encontra-se nesta lista porque é utilizada em medicamentos ao abrigo da Diretiva 2009/35/CE do Parlamento Europeu e do Conselho (JO L 109 de 30.4.2009, p. 10).

1.3.2. Carmina / Ácido Carmínico

Em diferentes períodos os corantes vermelhos foram obtidos de diversos materiais, de origem vegetal ou animal. Os mais cobiçados pela intensidade e brilho da coloração dada aos tecidos eram corantes naturais obtidos a partir de animais, tais como a cochonilha, muito procurados no Renascimento (Ferraz, 2007).

Apesar da comercialização do inseto desde esta época, o carmim só foi fabricado em 1818 por Joseph Pelletier que foi um dos inventores da quinina. No século XII o império inca utilizava a cochonilha para tingir tecidos e pintar cerâmica (Martins, 1997).

No México do século XVI, os Astecas utilizavam a cochonilha para obter tons vermelhos e rosados, chegando a fazer a sua exportação, no período colonial. Os espanhóis trouxeram a cochonilha para a Europa e durante muito tempo exerceram monopólio sobre a produção industrial de carmim (Martins, 1997).

No século XVII, a produção de cochonilha foi tentada sem sucesso na Europa enquanto era promovida nas colônias espanholas. Portanto, esta indústria cedo desempenhou um papel importante no desenvolvimento econômico da América Central e do Sul. Atualmente, a cochonilha é explorada no México, Perú, Chile, Bolívia, Argentina, Espanha, São Salvador, Itália, África do Sul e Índia, de onde são nativas (Cabrera, 2008; Carvalho, 1996; Gilvaz, 2012; Martins, 1997).

As cochonilhas pertencem à ordem *Hemiptera* e são consideradas pragas em diversos sistemas de produção. São um pequeno inseto, hospedeiro do cato da espécie *Opuntia ficus-indica* (Cabrera, 2008; Carvalho, 1996).

Tendo em vista a sua importância, dentre os gêneros de cochonilha, pode-se destacar a *Dactylopius* spp. e a *Ceroplastes* spp., pertencentes às famílias *Dyctylopiidae* e *Coccidae*, respetivamente (Álvarez, 2003; Cruz e Perez, 2013).

A cochonilha tem um período de vida de cerca de 130 dias, com maturidade sexual por volta dos 100 dias. Durante a sua existência deposita cerca de 500 ovos. Cada inseto na forma adulta tem aproximadamente 5 mm de tamanho e contém de 18% a 22% de ácido carmínico. Um quilo do inseto pode conter até 80 mil indivíduos (Carvalho, 1996; Hamerski, Rezende e Silva, 2013).

As fêmeas adultas da cochonilha são colhidas manualmente, antes da postura, usando-se uma espátula. De seguida são secas através da exposição solar por longos períodos (4 a 5 horas

por dia, por aproximadamente uma semana) ou à sombra por 25 a 30 dias, ou ainda através do uso de estufas, a 65 °C, durante 4 horas (Carvalho, 1996; Nejad e Nejad, 2013).

O princípio corante é o ácido carmínico. O corpo seco da cochonilha contém cerca de 10% do princípio corante, o ácido carmínico. As cochonilhas são, desde a época dos Incas, utilizadas como matéria-prima para a coloração dos mais variados objetos (Nejad e Nejad, 2013; Carvalho, 1996; Gilvaz, 2012).

A partir desta matéria podem obter-se três produtos principais com propriedades corantes: o extrato de cochonilha, o ácido carmínico e as carminas. Dentro do grupo dos corantes naturais, o corante E 120 é um dos mais consumidos no mundo (Hamerski, Rezende e Silva, 2013).

1.3.2.1. Características físico-químicas

O ácido carmínico é obtido a partir de extratos aquosos, aquoso-alcoólicos ou alcoólicos de cochonilha, que consiste em corpos secos de insetos fêmeas *Dactylopius coccus* Costa. É possível obter lacas de alumínio de ácido carmínico (carmina) em que o alumínio e o ácido carmínico se encontram presentes na proporção molar de 1:2 (Decreto-Lei n.º 193/2000 de 18 de Agosto; Regulamento (UE) n.º 231/2012 da Comissão de 9 de março de 2012). Assim, a carmina é o quelato de alumínio hidratado do ácido carmínico (Regulamento da UE n.º 2018/1472 da Comissão de 28 de setembro de 2018).

O extrato apresenta-se na forma de líquido vermelho escuro e, geralmente, contém material proteico proveniente dos insetos. Nesta solução, o elemento responsável pela cor é o ácido carmínico (Cabrera, 2008, Rocha, 2015 a).

De acordo com as especificações do FDA (*Food and Drug Administration*), de 1999, o extrato de cochonilha deve obedecer às seguintes especificações: pH 5,0–5,5; teor de ácido carmínico: min. 1,8%; teor de chumbo: máx. 10 ppm, e arsénio max. 1 ppm (Cabrera, 2008). A EFSA recomendou, em novembro de 2015, a atualização das especificações no que diz respeito à percentagem de material não contabilizado, aos teores máximos de elementos tóxicos e à presença de compostos proteicos presentes no ácido carmínico, carmina (Regulamento da UE n.º 2018/1472) (Tabela 2).

Tabela 2. Propriedades do ácido carmínico, carmina (Regulamento da UE n.º 2018/1472 da Comissão de 28 de setembro de 2018)

E 120, Ácido Carmínico, Carmina	
Nº do Índice de Coloração	75470
Denominação química	Ácido 7-β-D-glucopiranosil-3,5,6,8-tetra-hidroxi-1-metil-9,10-dioxoantraceno-2-carboxílico (ácido carmínico); a carmina consiste no quelato de alumínio hidratado deste ácido.
Fórmula química	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃ (ácido carmínico)
Massa molecular	492,39 (ácido carmínico)
Composição	Teor de ácido carmínico não inferior a 90%; teor de ácido carmínico nos quelatos não inferior a 50%.
Descrição	Produto sólido quebradiço ou pulverulento, de cor vermelha a vermelha escura
Identificação	
Espectrometria	<p>Ácido carmínico: Máximo a cerca de 518 nm, em solução aquosa de amónia Máximo a cerca de 494 nm, em solução de ácido clorídrico diluído E 1% / 1 cm, 139 num pico a cerca de 494 nm, em ácido clorídrico diluído</p> <p>Ácido 4-aminocarmínico: Máximo a 535 nm, em solução aquosa de amónia Máximo a 530 nm, em solução de ácido clorídrico diluído E 1% / 1 cm, 260 num pico a cerca de 535 nm, em solução aquosa de amónia, pH 9,5</p>
Pureza	
Resíduos de solventes	Etanol: Teor não superior a 150 mg/kg; Metanol: Teor não superior a 50 mg/kg
Cinzas totais	Ácido carmínico: Teor não superior a 5%; Carmina: Teor não superior a 12%
Proteínas (N × 6,25)	Ácido carmínico: Teor não superior a 2,2%; Carmina: Teor não superior a 25%
Ácido 4-aminocarmínico	Teor não superior a 3% em relação ao ácido carmínico
Matérias insolúveis em amónia diluída	Carmina: Teor não superior a 1%
Arsénio	Teor não superior a 1 mg/kg
Chumbo	Teor não superior a 1,5 mg/kg
Mercúrio	Teor não superior a 0,5 mg/kg
Cádmio	Teor não superior a 0,1 mg/kg

Podem utilizar-se lacas de alumínio deste corante

O ácido carmínico é um composto orgânico derivado da antraquinona, especificamente uma hidroxiantraquinona ligada a uma unidade de glicose (Figura 1). A denominação oficial é ácido 7-β-D-glucopiranosil-3,5,6,8-tetra-hidroxil-metil-9,10-dioxoantraceno-2-carboxílico (Regulamento da UE n.º 2018/1472 da Comissão de 28 de setembro de 2018). A fórmula molecular é C₂₂H₂₀O₁₃ com massa molecular 492,39 (Borges *et al.*, 2012; Crizel, 2017) (Tabela 2). O ácido carmínico é uma substância sólida, cuja tonalidade do corante comercial pode variar de laranja a vermelho (Hamerski, Rezende e Silva, 2013; Leite, 2010).

A sua coloração é dependente do pH do meio. Em soluções ácidas é laranja e em soluções alcalinas é violeta, no entanto a sua intensidade de cor é relativamente baixa, o que restringe a sua aplicação isoladamente, sendo necessário realizar a complexação com metais (Borges *et al.*, 2012; Both *et al.*, 2014; Crizel, 2017).

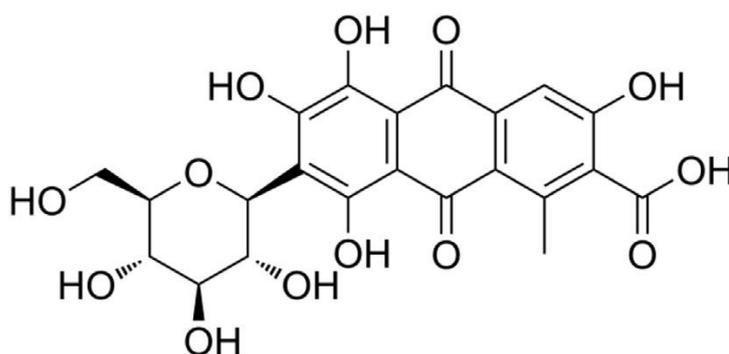


Figura 1. Estrutura química do ácido carmínico (Adaptação de Yilmaz, Ergun e Yilmaz, 2014)

Este ácido é solúvel em água, álcool, éster, soluções ácidas e alcalinas, mas insolúvel em éter de petróleo, benzeno e clorofórmio (Borges *et al.*, 2012; Cabrera, 2008).

O ácido carmínico puro é comercializado sob a forma de pó ou de soluções com concentrações variando de 1 a 10% (p / v). Os níveis de pureza estão entre 50 e 60%. As preparações secas por pulverização também estão disponíveis com um conteúdo de 2-7% de ácido carmínico. O ácido carmínico compete com a betanina, corante da beterraba vermelha, e as antocianinas na coloração dos alimentos e sua principal limitação é a insolubilidade a pH baixo. As aplicações alimentares incluem bebidas suaves e alcoólicas, marmeladas, misturas secas de bolos e conservas. O ácido carmínico também encontra aplicações na indústria farmacêutica e cosmética, na indústria têxtil, entre outras (Cabrera, 2008).

As carminas são obtidas a partir do ácido carmínico que se complexa com certos metais, como o cálcio ou o alumínio, resultando um pigmento natural também conhecido como “laca de carmim” (Figura 2). Assim, o princípio corante é um quelato de alumínio ou cálcio do ácido carmínico. Este pó contém aproximadamente 50% de ácido carmínico e cerca de 20% de material proteico proveniente dos insetos (Rocha, 2015 a).

Apresentam-se, na forma sólida, com cor vermelha a vermelho escuro. A sua solubilidade em soluções alcalinas é elevada, enquanto em água quente e ácidos diluídos é pouco solúvel (Crizel, 2017; Leite, 2010).

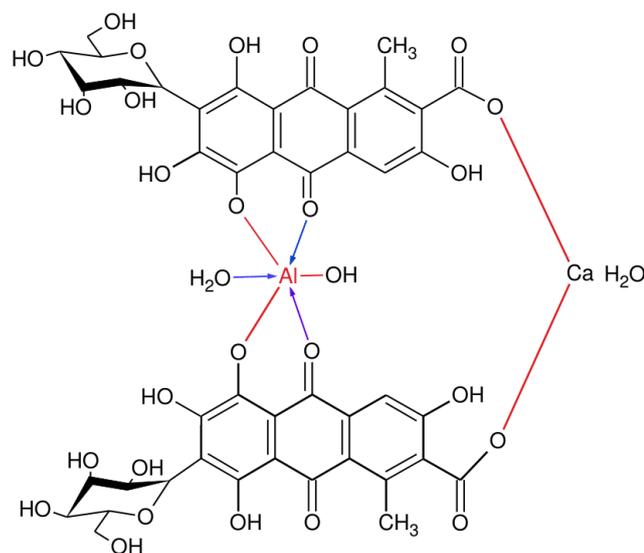


Figura 2. Estrutura química da laca de carmim (adaptação de Crizel, 2017)

As lacas de alumínio, como estes complexos são conhecidos, apresentam uma coloração mais intensa que o ácido carmínico. Ao contrário do ácido carmínico, a coloração altera pouco com as variações de pH do meio (é vermelha a pH=4 e altera para azul a pH=10), sendo a fraca solubilidade em pH ácido a única limitação técnica para o seu uso (Constant, Stringheta e Sandi, 2002).

1.3.2.2. Aplicações

A cochonilha é utilizada principalmente para obtenção de ácido carmínico e da carmina. Foi largamente usada desde o século XVI como corante em alimentos, bebidas, cosméticos e têxteis (Martins, 1997; Voltolini *et al.*, 2014).

Hoje em dia, continua a ser usada em alimentos, bebidas e cosmética, mas é também usada pela indústria farmacêutica e em histologia (Añibarro *et al.*, 2003; Voltolini *et al.*, 2014). Devido à sua natureza não – tóxica e pelas suas propriedades anticancerígenas, este é o único corante que é permitido pela FDA para utilização em cosmética para os olhos. É também usado em outros cosméticos como batons e vernizes (Cruz e Perez, 2013; Jaggannagari, 2010).

A cochonilha serve também de indicador de análise volumétrica para determinar zircónio, zinco, alumínio, cobre, platina, terras raras, urânio, entre outros e para análise de licores (Martins, 1997).

Este corante é aplicado numa enorme variedade de produtos, principalmente em produtos alimentares. É utilizado numa vasta lista de alimentos, tanto salgados como doces. É usado em molhos culinários e carnes processadas, como por exemplo hambúrgueres e salsichas. De entre os alimentos doces estão, entre muitos outros produtos, bebidas, gelados, iogurtes, gomas, recheios de bolachas e geleias (Martins, 1997; Voltolini *et al.*, 2014). É também usado corante alimentar em iogurtes, refrigerantes e bebidas alcoólicas (Cabrera, 2008).

1.3.2.3. Toxicidade para o Homem

Os corantes alimentares são uma classe de aditivos alimentares, e como tal, a sua utilização deve trazer vantagens e benefícios para o consumidor não alterando a natureza e a qualidade do género alimentício (Rocha, 2015 a). A carmina tem feito da estabilidade a sua principal característica e, com isto tem conquistando cada vez mais o mercado (Carvalho, Collins e Carvalho, 2001).

O corante E 120 é considerado seguro para a saúde humana e é aprovado por diferentes agências internacionais incluindo a agência reguladora dos Estados Unidos (FDA), a União Europeia e o Comité internacional de especialistas em aditivos alimentares e contaminantes (JECFA) administrado pela FAO/OMS (Gilvaz, 2012).

Além de promover cor, um estudo recente mostrou que o ácido carmínico possui atividade antioxidante semelhante à de antioxidantes conhecidos, como a quercetina e o ácido ascórbico (Hamerski, Rezende e Silva, 2013).

No entanto, entre os alimentos e aditivos para medicamentos, o E 120 é um dos mais conhecidos como causador de reações alérgicas (Voltolini *et al.*, 2014). Desde há muito que o E 120 é conhecido por provocar reações alérgicas, e para isso contribui o facto de este ser um corante com elevada percentagem de proteínas provenientes dos insetos a partir dos quais é elaborado. O seu forte potencial alergénico tem sido atribuído a proteínas alergénicas, também presente noutros insetos. Algumas dessas proteínas já foram identificadas, e uma delas é análoga à fosfolipase A, que é um alergénio bastante conhecido no veneno de *vespidae* (Nakayama *et al.*, 2015; Rocha, 2015 b). Os contaminantes proteicos existentes na carmina podem causar dispneia e reações anafiláticas nos consumidores de produtos que contenham o corante (Nakayama *et al.*, 2015).

Casos de asma e alergia alimentar envolvendo extrato de cochonilha já tem sido relatados, no entanto os relatos de reações adversas associadas à ingestão de alimentos ou bebidas contendo corante carmin são raros (Crizel, 2017; Hamerski, Rezende e Silva, 2013; Yilmaz, Ergun e Yilmaz, 2014).

Ao contrário, outros estudos relatam graves reações alérgicas após a ingestão de alimentos e bebidas que têm carminas na sua composição. Para além das reações alérgicas, rinite alérgica e asma em trabalhadores expostos ao pó de carminas em ambientes ocupacionais, como por exemplo açougueiro, assim como casos de urticária, angioedema e choque anafilático provocados pela ingestão de alimentos contendo carminas são também bastante notórias (Añibarro *et al.*, 2003; Hamerski, Rezende e Silva, 2013; Rocha, 2015 b; Voltolini *et al.*, 2014).

Os casos mais graves ocorreram em indivíduos, na sua maioria mulheres, após sensibilização prévia por contacto com o corante, também utilizado em produtos de maquilhagem. Estudos efetuados em ratos apontam para alterações em parâmetros neurocomportamentais e reprodutivos. Uma reação alérgica após o contato com a pele, a partir do uso de cosméticos, por exemplo, pode ocorrer com maior frequência, pois o nível de exposição é mais elevado (Hamerski, Rezende e Silva, 2013; Rocha, 2015 b).

Não há, no entanto, estudos sobre a absorção, a distribuição, o metabolismo ou a excreção (ADME) da cochonilha, do ácido carmínico ou de carmina. O painel científico da EFSA considerou que, devido às propriedades de ionização do ácido carmínico (com valores de

pKa de 2,81, 5,43 e 8,10), a carmina deve ser absorvida pelo processo de difusão no estômago (EFSA, 2015).

Conforme relatado pela JECFA, em 1982, as evidências indiretas de estudos toxicológicos sugerem que esses compostos poderiam ser absorvidos até um certo ponto.

1.3.2.4. Legislação

Hoje em dia todos os corantes alimentares são cuidadosamente regulamentados pelas autoridades competentes para assegurar que os alimentos que os contêm estão convenientemente rotulados e que são seguros em termos de saúde pública. O Decreto-Lei n.º192/89 de 8 de Junho estabelece então os princípios orientadores da utilização destes aditivos alimentares nos géneros alimentícios (Queirós e Rodrigues, 2001).

1.3.2.4.1. Limites Máximos de Utilização

Na UE, o ácido carmínico e a carmina são designados pelo mesmo código de identificação, E 120, e constituem um grupo de substâncias corantes vulgarmente designado na rotulagem dos géneros alimentícios por “carminas”.

O corante E 120 é amplamente utilizado na indústria alimentar, nomeadamente em carnes processadas (hambúrgueres, enchidos), peixe (delícias do mar), bebidas alcoólicas (licores) e não alcoólicas (refrigerantes), conservas de fruta, compotas, produtos de confeitaria (doces, gomas), bolos, bolachas, sobremesas instantâneas, gelados, iogurtes, etc.

Na indústria alimentar existem vários corantes que permitem conferir cor aos alimentos nas tonalidades de vermelho. Sendo o E 120 um corante natural, obedece, da mesma forma que os corantes artificiais, a limites máximos de utilização (LMU) fazendo parte do Grupo III (corantes alimentares com um teor máximo em combinação). O LMU é o teor mais elevado de um aditivo alimentar permitido num dado género alimentício para atingir um efeito tecnológico pretendido (Pereira, 2015). Os teores permitidos variam com o modo de utilização, simples ou em combinação, e ainda com a categoria e o tipo de género alimentício. Para alguns invólucros e revestimentos comestíveis de carnes, a sua utilização é autorizada em quantum satis. Segundo as normas europeias, o uso de corantes alimentares deve respeitar a condição de não induzir o consumidor em erro, pois o uso dos mesmos

não deve dar a ideia de que o género alimentício inclui ingredientes que não estão presentes na sua composição (Rocha, 2015 a).

Os níveis máximos permitidos de E 120 e as suas condições de utilização foram definidos no Regulamento (CE) n.º 1333/2008, sobre aditivos alimentares destinados a alimentos. Posteriormente o Regulamento (UE) n.º 1129/2011 de 11 de Novembro de 2011 alterou o Anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da UE de aditivos alimentares. Os LMU são expressos em ácido carmínico, que é o princípio de coloração do E 120.

O corante E120 é autorizado, na UE, com limites máximos que variam entre 50 e 500 mg/kg em 57 categorias de alimentos e em quantidade “quantum satis” em quatro categorias de alimentos, designadamente casca de queijo comestível, carne transformada não tratada termicamente (unicamente pasturmas), invólucros, revestimentos e elementos decorativos para carne (unicamente o revestimento externo comestível de pasturmas) e invólucros, revestimentos e elementos decorativos para carne (unicamente invólucros comestíveis) (Regulamento (UE) n.º 1129/2011 de 11 de Novembro).

A Tabela 3 resume os géneros alimentícios cuja incorporação do E 120 (ácido carmínico, carmina) é permitida e o teor máximo correspondente, conforme estabelecido no Regulamento (UE) n.º 1129/2011.

Tabela 3. Géneros alimentícios e teor máximo de E 120 de acordo com o Regulamento UE n.º 1129/2011.

FCS	Designação	Numero E / Grupo	Restrições / Exceções	Teor máximo (mg/kg ou mg/l consoante o caso)
01.4	Produtos lácteos fermentados aromatizados, incluindo os produtos tratados termicamente	Grupo III		150
01.6.3	Outros cremes	Grupo III	Unicamente natas aromatizadas	150
01.7.1	Queijos não curados, exceto produtos abrangidos pela categoria 16	Grupo III	Unicamente queijos não curados aromatizados	150
01.7.2	Queijos curados	E 120	Unicamente queijo de pasta vermelha marmoreada (ou jaspeada)	125
01.7.3	Casca de queijo comestível	Grupo III		<i>Quantum satis</i>
01.7.5	Queijos fundidos	E 120	Unicamente queijos fundidos aromatizados	100
01.7.6	Produtos à base de queijo, exceto produtos abrangidos pela categoria 16	E 120	Unicamente produtos de pasta vermelha marmoreada (ou jaspeada)	125
01.7.6	Produtos à base de queijo, exceto produtos abrangidos pela categoria 16	Grupo III	Unicamente produtos curados aromatizados	100
03	Sorvetes	Grupo III		150
04.2.1	Frutas e produtos hortícolas secos	E 120	Unicamente conservas de frutos vermelhos	200
04.2.2	Frutas e produtos hortícolas em vinagre, óleo ou salmoura	E 120	Unicamente conservas de frutos vermelhos	200
04.2.3	Frutas e produtos hortícolas em lata ou em frasco	E 120	Unicamente conservas de frutos vermelhos	200
04.2.4.1	Preparações de frutas e produtos hortícolas, exceto compotas	E 120	Unicamente conservas de frutos vermelhos	200
04.2.4.1	Preparações de frutas e produtos hortícolas, exceto compotas	Grupo III	Unicamente mostarda de fruta	200
04.2.5.2	Doces, geleias, citrinadas e creme de castanha, tal como definidos na Diretiva 2001/113/CE	E 120	Exceto creme de castanha	100
04.2.5.3	Outras pastas de barrar semelhantes de frutas e produtos hortícolas	E 120	Exceto creme de ameixa	100
05.2	Outros produtos de confeitaria, incluindo mini-rebuçados para refrescar o hálito	Grupo III	Exceto frutas e produtos hortícolas confitados	300
05.2	Outros produtos de confeitaria, incluindo mini-rebuçados para refrescar o hálito	Grupo III	Unicamente frutas e produtos hortícolas confitados	200
05.3	Gomas de mascar	Grupo III		300
05.4	Produtos para decoração, revestimento e recheio, exceto os recheios à base de fruta abrangidos pela categoria 4.2.4	Grupo III	Unicamente produtos para decoração, revestimento e molhos, excluindo os recheios	500
05.4	Produtos para decoração, revestimento e recheio, exceto os recheios à base de fruta abrangidos pela categoria 4.2.4	Grupo III	Unicamente recheios	300
06.3	Cereais para pequeno-almoço	E 120	Unicamente cereais para pequeno-almoço aromatizados com fruta	200
06.6	Polmes	Grupo III	Unicamente polmes para revestimento	500
07.2	Produtos de padaria fina	Grupo III		200

08.2.1	Carne transformada não tratada termicamente	E 120	Unicamente enchidos	100
08.2.1	Carne transformada não tratada termicamente	E 120	Unicamente chouriço / salsicha	200
08.2.1	Carne transformada não tratada termicamente	E 120	Unicamente pasturmas	Quantum satis
08.2.2	Carne transformada tratada termicamente	E 120	Unicamente enchidos, patês e terrinas de carne	100
08.2.3	Invólucros, revestimentos e elementos decorativos para carne	E 120	Unicamente o revestimento externo comestível de pasturmas	Quantum satis
08.2.3	Invólucros, revestimentos e elementos decorativos para carne	Grupo III	Unicamente elementos decorativos e revestimentos; exceto o revestimento externo comestível de pasturmas	500
08.2.3	Invólucros, revestimentos e elementos decorativos para carne	Grupo III	Unicamente invólucros comestíveis	Quantum satis
09.2	Peixe e produtos da pesca transformados, incluindo moluscos e crustáceos	E 120	Unicamente pastas de peixe e de crustáceos	100
09.2	Peixe e produtos da pesca transformados, incluindo moluscos e crustáceos	E 120	Unicamente crustáceos pré-cozidos	250
09.2	Peixe e produtos da pesca transformados, incluindo moluscos e crustáceos	E 120	Unicamente peixe fumado	100
09.2	Peixe e produtos da pesca transformados, incluindo moluscos e crustáceos	Grupo III	Unicamente surimi e produtos semelhantes e sucedâneos de salmão	500
09.3	Ovas de peixe	Grupo III	Exceto ovas de esturção (caviar)	300
12.2.2	Temperos e condimentos	Grupo III	Unicamente temperos, por exemplo pó de caril, mistura para tandoori	500
12.4	Mostarda	Grupo III		300
12.5	Sopas e caldos	Grupo III		50
12.6	Molhos	Grupo III	Incluindo pickles, molhos aromáticos à base de vegetais ou frutas (condimentos), chutney e picallili; exceto molhos à base de tomate	500
12.9	Produtos proteicos, exceto os produtos abrangidos pela categoria 1.8	Grupo III	Unicamente sucedâneos de carne e peixe à base de proteínas vegetais	100
13.2	Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos, tal como definidos na Diretiva 1999/21/CE (exceto os produtos da categoria 13.1.5)	Grupo III		50
13.3	Alimentos dietéticos para dietas de controlo do peso destinados a substituir a ingestão diária total de alimentos ou uma refeição (a totalidade do regime alimentar diário ou parte dele)	Grupo III		50
14.1.4	Bebidas aromatizadas	Grupo III	Exceto leite achocolatado e produtos de malte	100
14.2.3	Sida e perada	Grupo III	Exceto cidre bouché	200
14.2.4.	Vinho de fruta e vinho artesanal	Grupo III		200
14.2.6	Bebidas espirituosas, tal como definidas no Regulamento (CE) n.º 110/2008	Grupo III	Exceto: bebidas espirituosas, tal como definidas no artigo 5.º, n.º 1, e denominações de venda enumeradas no anexo II, categorias I a I4, do Regulamento (CE) n.º 110/2008, aguardente de (seguida do nome do fruto) obtida por maceração e destilação, London gin, Sambuca, Maraschino, Marrasquino ou Maraskino e Mistra	200

14.2.7.1	Vinho aromatizado	Grupo III	Exceto americano, vinho amargo	200
14.2.7.1	Vinho aromatizado	E 120	Unicamente americano, vinho amargo	100
14.2.7.2	Bebidas aromatizadas à base de vinho	E 120	Unicamente soda amarga	100
14.2.7.2	Bebidas aromatizadas à base de vinho	Grupo III	Exceto soda amarga, sangria, clarea, zurra	200
14.2.7.3	Cocktails aromatizados de produtos vitivinícolas	Grupo III		200
14.2.8	Outras bebidas alcoólicas, incluindo misturas de bebidas alcoólicas com bebidas não-alcoólicas e bebidas espirituosas contendo menos de 15 % de álcool.	Grupo III	Unicamente bebidas alcoólicas com menos de 15 % de álcool	200
15.1	Aperitivos à base de batata, cereais, farinha ou amido	Grupo III	Exceto aperitivos salgados extrudidos ou expandidos	100
15.1	Aperitivos à base de batata, cereais, farinha ou amido	Grupo III	Unicamente aperitivos salgados extrudidos ou expandidos	200
15.2	Frutos de casca rija transformados	Grupo III	Unicamente frutos de casca rija revestidos e salgados	100
16	Sobremesas, exceto produtos abrangidos pelas categorias 1, 3 e 4	Grupo III		150
17.1	Suplementos alimentares que se apresentam em forma sólida, incluindo cápsulas, comprimidos e formas semelhantes, exceto as formas para mastigar	Grupo III		300
17.2	Suplementos alimentares que se apresentam em forma líquida	Grupo III		100
17.3	Suplementos alimentares que se apresentam em forma de xarope ou para mastigar	Grupo III	Unicamente suplementos alimentares sólidos	300
17.3	Suplementos alimentares que se apresentam em forma de xarope ou para mastigar	Grupo III	Unicamente suplementos alimentares líquidos	100

1.3.2.4.2. Ingestão Diária Admissível (ADI)

O E 120 foi previamente avaliado pelo JECFA, em 2000, e pelo SCF, em 1983. Ambos os comités estabeleceram uma Ingestão Diária Admissível (ADI) de 5 mg/kg de peso corporal/dia (EFSA, 2015). O comité da Organização Mundial de Saúde (OMS) avaliou o extrato de cochonilha na oitava e vigésima reunião, mas não alocou uma ADI. No entanto, avaliou as carminas na vigésima primeira, vigésima quinta e vigésima sexta reunião, sendo que na última o comité também atribuiu uma ADI para a cochonilha, ácido carmínico e carminas de 5 mg/kg peso corporal /dia (Rocha, 2015 a; World Health Organization (WHO), 2001).

O Painel da EFSA concluiu que essa ADI deveria ser expressa como ácido carmínico, e que deve corresponder a 2,5 mg de ácido carmínico / kg peso corporal / dia (EFSA, 2015).

1.3.2.5. Metodologias analíticas para a determinação de carmina

O estudo destes aditivos alimentares, tão importantes para a indústria alimentar, não está apenas ligado aos benefícios que eles proporcionam no processamento e à venda de produtos, mas também ao seu potencial tóxico para a saúde humana. As consequências desta toxicidade podem resultar em alergias e outros riscos mais graves. Por esse motivo, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para a avaliação da toxicidade destes aditivos, bem como da estabilidade e produtos de degradação destes corantes durante o processamento dos mesmos, resultando no consequente desenvolvimento de metodologias de detecção e quantificação, e confirmação destes compostos (Santos, Demiate e Nagata, 2010).

Diversos métodos para a determinação de ácido carmínico e carminas em alimentos são descritos na literatura, verificando-se uma variedade relevante de estudos na sua identificação, separação e quantificação (Campos, 2014; EFSA, 2015).

1.3.2.5.1. Extração e Purificação da amostra

Uma das técnicas mais comumente usada no processo de extração é a de extração em fase sólida (SPE). Esta é uma técnica de separação líquido-sólido, também extensamente utilizada para purificação de amostras líquidas e amostras sólidas extraídas com solventes adequados (Rodrigues, 2016). Os principais objetivos da SPE prendem-se com a remoção de interferentes da matriz, a concentração e o isolamento dos analitos das matrizes. Em relação

à extração líquido-líquido (LLE), a SPE permite a redução do uso de solventes orgânicos, aos quais está habitualmente associado um maior custo e toxicidade tanto para os operadores como para o ambiente (Rodrigues, 2016).

González *et al.* recorreram a 100 mg C 18 para purificação de matrizes alimentares contendo ácido carmínico. Este corante foi posteriormente monitorizado por cromatografia líquida com detecção por fotodíodos (HPLC-DAD) a 500 nm (González, Gallego e Valcárcel, 2003). Merino *et al.*, em 1997, também tinham usado o mesmo adsorvente, tendo recorrido a HCl 2M como solvente de extração.

O mesmo se verifica no método de ensaio da JECFA, 2000, que usa uma solução de HCl 2M para extração do corante presente na amostra.

No método de Lim *et al.* (2014) foi usada uma solução de hidróxido de sódio 0,05 M para a extração de carmina /ácido carmínico de amostras de alimentos, seguida de centrifugação a 5000 rpm/5 min. Em seguida, 10 ml de sobrenadante foram submetidos a filtração com filtro de membrana de 0,45µm, antes da injeção no sistema de HPLC. O LOQ obtido foi de 1 µg /mL.

Heydari, Hosseini e Zarabi, em 2015, usaram a técnica de Cloud Point Extraction (CPE). A carmina foi extraída usando Triton X-100 como solvente da extração. O LOD e o LOQ obtidos foram de 0,012 mg/L e 0,04 mg/L, respetivamente.

1.3.2.5.2. Detecção e Quantificação

Os métodos de detecção e quantificação utilizados para avaliação dos teores de carminas e ácido carmínico em diferentes géneros alimentícios são diversos.

Esses métodos incluem polarografia de pulso diferencial (DPP), voltametria de stripping (SV), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e métodos espectrofotométricos. Alguns destes métodos, por exemplo a cromatografia e polarografia, não são considerados métodos analíticos “green” devido ao uso de solventes orgânicos perigosos, em cromatografia, ou perda de mercúrio, na polarografia. Por outro lado, os métodos cromatográficos são considerados métodos alternativos mais eficientes (Heydari, Hosseini e Zarabi, 2015).

Nas técnicas de separação, características como o alto custo instrumental e operacional, incluindo geralmente a necessidade de preparação de amostra, dificultam a obtenção de uma análise rápida. No caso dos métodos espectrofotométricos, embora mais acessíveis,

apresentam limitada seletividade decorrente das interferências espectrais que resultam em faixas de absorção amplamente sobrepostas (Santos, Demiate e Nagata, 2010).

São vários os autores que reportam o uso da cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de carmina e ácido carmínico em matrizes alimentares (Tabela 4). Entre eles, Jalón, Peña e Rivas, em 1989, na determinação de carminas em iogurtes, usaram HPLC que compreendia uma coluna de fase reversa (C18), uma fase móvel constituída por acetonitrilo: ácido fórmico e detecção por PDA a 280 e 500 nm (Scotter, 2011).

A HPLC é uma técnica com a capacidade de separar, identificar e quantificar compostos presentes numa mistura. Este é um processo contínuo que opera num circuito fechado (Porto, 2014) e que utiliza uma fase estacionária e uma fase móvel. Os analitos passam através da fase estacionária com a qual deverão interagir, sendo nela adsorvidos. As separações são baseadas nas diferentes distribuições entre as duas fases, móvel e estacionária, e conseqüentemente nas diferentes velocidades de migração (que ocorre apenas na fase móvel) dos vários componentes da mistura. Após este processo, os compostos são detetados, identificados e quantificados através de um detetor, (Porto, 2014; Rodrigues, 2016).

A HPLC acoplada a um detetor de fotodíodos foi também utilizada por Lim *et al.* (2014) para distinguir a carmina do ácido carmínico. Este método usa solução de hidróxido de sódio para a extração de carmina de amostras de alimentos e o LOQ obtido foi de 1 µg / mL.

Além dos métodos cromatográficos, outras metodologias, como espectrofotometria na região UV-VIS, são também bastante utilizadas (Campos, 2014). Esta metodologia analítica, já reportada por diversos autores, consiste num processo que utiliza radiação eletromagnética com comprimentos de onda entre 200 nm e 780 nm. Quando a radiação entra em contato com a matéria ocorrem transições eletrônicas ou excitação molecular, de acordo com as quantidades específicas de radiação absorvidas ou emitidas. Após a absorção pode-se relacionar a absorvância com a concentração de uma dada substância que interagiu com a radiação e proporcionou a realização deste fenómeno. É um método útil para detetar e quantificar analitos, mesmo em pequenas concentrações (Fernandes, 2014).

A determinação dos níveis de carmina em gelados e refrigerantes utilizando voltametria de stripping também foi reportada (Scotter, 2011). Outro método envolvendo polarografia de pulso diferencial foi aplicado com sucesso à análise de carmina em leite comercial enriquecido, tendo sido obtido um LOQ de 0,55 µM. Este método é preciso, exato e requer pouco tempo para análise, já que a extração não é necessária (Yilmaz *et al.*, 2014).

Tabela 4. Metodologias analíticas usadas na determinação de carmina e ácido carmínico

Matriz	Extração	Purificação	Deteção e quantificação	% R	LOD	LOQ	Bibliografia
logurtes	NaOH	-	HPLC-UV-VIS a 493 nm	97 - 99%	100 ng/g	-	(Lancaster e Lawrence, 1996)
Vários Alimentos	Cloud Point Extraction (CPE)	-	Espectrofotometria a 513 nm	100%	0,012 µg/mL	0,04 µg/mL	(Heydari, Hosseini e Zarabi, 2015)
Doces e leite	-	-	DDP - Polarografia de pulso diferencial	99,4%	0,16 µM	0,55 µM	(Yilmaz, Ergum e Yilmaz, 2014)
Gelados e refrigerantes	-	-	SV - Stripping Voltammetry	97,2%	0,002 µg/mL	0,05 µg/mL	(Alghamdi et al., 2009)
Alimentos	NaOH 0,05 M	Centrifug. 5000 rpm/5 min. 10 ml de sobrenadante: filtração com filtro de membrana de 0,45µm	HPLC-fotodiodos a 281 nm	94,1%	0,4 µg/mL	1,0 µg/mL	(Lim et al., 2014)
logurtes e outros produtos lácteos	8M NaOH 6M HCl	-	HPLC-DAD a 480 nm / HPLC-FD a 470/600 nm	99% / 96%	1 µg/mL / 1,5 µg/mL	-	(Carvalho e Collins, 1997)
Lactícínios	ácido acético /acetato de sódio, pH 4,7	SPE: 100 mg de RP-C 18	LC-DAD a 500 nm	90,9 – 104,3%	0,02 µg/mL	-	(González, Gallego e Valcárcel, 2003)
logurtes	RP-HPLC – C18 Fase móvel: acetonitrilo: ácido fórmico em sol. aquosa	Coluna de Poliamida	RP-HPLC / PDA a 280 e 500 nm	87,2 - 95,3%	-	0,1 µg/g	(Jalón, Peña e Rivas, 1989)
Vários Alimentos (gelados, iogurtes, entre outros.)	HCl 2M	SPE: 100 mg de C18	LC-UV a 280 nm	85 – 94%	0,1 mg/L	-	(Merino, Edberg e Tidriks, 1997)

1.3.2.6. Ocorrência e teores de carmina/ácido carmínico em matrizes alimentares

Recentemente, foram disponibilizados, por alguns Estados-Membro, à Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), resultados analíticos relativos aos níveis de E 120 em amostras de alimentos recolhidas entre 2004 e 2013. No total, 5308 resultados foram comunicados à EFSA por oito países: Áustria (n=568), Chipre (n=48), República Checa (n=8), Alemanha (n=372), Hungria (n=368), Espanha (n=304), Eslováquia (n=344) e Reino Unido (n=296) (EFSA, 2015). Os dados fornecidos diziam respeito principalmente a gelados, outros produtos de confeitaria e bebidas aromatizadas. Os teores de E120 em 1442 amostras foram inferiores ao LOQ, em 3068 amostras inferiores ao LOD, em 490 amostras os resultados obtidos foram qualitativos (presença ou ausência) e apenas em 308 os teores foram quantitativos (EFSA, 2015).

Os dados analíticos (n=33) sem informação relatada sobre o LOD ou LOQ não foram utilizados na avaliação da exposição. Vários dados analíticos (n=304) relativos a categorias de alimentos em que a utilização de E 120 não é autorizada, principalmente em sumos de fruta e néctares de frutos, não foram incluídos na avaliação de exposição. Desses 304 dados reportados para categorias de alimentos não autorizados, apenas 6 resultados, obtidos para produtos de cacau e chocolate, pão e pãezinhos e sumos de frutas, estavam acima do LOD (EFSA,2015).

Na literatura científica foram também relatados casos de ocorrência de E120 em diversos alimentos (Tabela 5). Jalón, Peña e Rivas, em 1989, verificaram na determinação deste corante em iogurtes, usando RP-HPLC, um teor médio de ácido carmínico de 9,52 µg/g (Scotter, 2011).

Na Coreia do Sul, Lim *et al.* (2014) analisaram 84 amostras de vários produtos alimentares como leite processado (n=4), produtos de confeitaria (n=50), produtos hortofrutícolas transformados (n=4), produtos açúcarados (n=5), produtos de peixe (n=7), queijo processado (n=4) e bebidas (n=10). Os teores máximos de carmina encontrados foram 46,7 µg/g, 865 µg/g, 149,9 µg/g, 754,7 µg/g, 28,9 µg/g, 19 µg/g e 973,9 µg/g, respetivamente.

Na Turquia foram detetados teores de carmina em amostras de leite e de doces, com teores de 121 mg/mL e 28,4 mg/g, respetivamente, por DPP, e 27,1 mg de ácido carminico/g para o segundo grupo de amostras analisadas por espectrofotometria UV a 567 nm (Yilmaz, Ergum e Yilmaz, 2014).

González, Gallego e Valcárcel, em 2003, analisaram amostras de laticínios (iogurtes e batidos de leite) oriundos de Espanha, tendo sido encontrados teores de ácido carmínico que variaram entre 18,5 mg/kg e 24 mg/kg.

No estudo realizado por Lancaster e Lawrence, em 1996, em que foram analisadas 4 amostras de bebidas de framboesa-limão, em apenas uma foi detetado ácido carmínico, com um teor de 152 µg/g (Lancaster e Lawrence, 1996).

Tabela 5. Ocorrência e teores de carmina (C) e ácido carminico (AC) encontrados em matrizes alimentares

País	Tipo amostra	N° amostras	Amostras detetadas	Teores		Teores Média ± DP	Bibliografia
				Min	Máx		
Coreia do Sul	Leite processado	4	1	n.d.	46,7 mg C /kg	-	(Lim et al., 2014)
	Confeitaria	50	22	n.d.	865 mg C /kg	-	
	Produto hortofrutícola transformado	4	2	n.d.	149,9 mg C /kg	-	
	Produto açucarado	5	1	n.d.	754,7 mg C /kg	-	
	Produtos de peixe	7	1	n.d.	28,9 mg C /kg	-	
	Queijo processado	4	1	n.d.	19 mg C /kg	-	
	Bebida importada	10	2	n.d.	973,9 mg C /kg	-	
	Leite	5	5	-	-	121 ± 4 mg AC /mL	
	Doces	5	5	-	-	28,4 ± 1,5 mg AC/g	
	Doces	4	4	-	-	27,1 ± 2,5 mg AC/g	
Espanha	logurte pêssego	1	1	-	-	18,5 ± 0,7 mg AC/kg	(González, Gallego e Valcárcel, 2003)
	logurte morango	1	1	-	-	22 ± 1 mg AC/kg	
	Gelado Frutas	1	1	-	-	26 ± 1 mg AC/kg	
	Batido baunilha	1	1	-	-	24 ± 1 mg AC/kg	
Canadá	Bebida de limão-framboesa	41	1	-	-	152 ± 3 µg AC /g	(Lancaster e Lawrence, 1996)
	Queijo <i>Petit suisse</i>	-	-	-	-	6 ± 0,3 mg AC/Kg	(Carvalho e Collins, 1997)
logurte líquido	-	-	-	-	63,9 ± 6,3 mg AC/Kg		
Bolachas com recheio	-	-	-	-	5,6 ± 1 mg AC/Kg		
Bebidas alcoólicas	-	-	-	-	435,7 ± 20 mg AC/Kg		

n.d. – Não detetado

2. PARTE EXPERIMENTAL

Parte Experimental

2.1. Materiais e metodologia analítica

2.1.1. Reagentes e soluções

2.1.1.1. Reagentes

- Carmina em pó (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA);
- Ácido clorídrico 2M 37% (VWR Chemicals, Fonteney-sous-Bois, France);
- Água bidestilada, obtida a partir de sistema de filtração Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.1.1.2. Soluções

- Solução de ácido clorídrico 2M preparada dissolvendo 166 mL de ácido clorídrico a 37% num balão volumétrico de 1L (1000 mL), perfazendo com água bidestilada;
- Solução de ácido carmínico, preparada através da dissolução de 50 mg de carmina em 30 mL de HCl 2M (a ferver) num balão volumétrico de 1L;
- Prepararam-se várias soluções de ácido carmínico para a curva de calibração em solvente e em matriz com as seguintes concentrações de 2,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 10 e 15 µg/mL e 25; 55; 65; 75; 100 e 150 µg/g, respetivamente.

2.1.2. Materiais

- Balões Volumétricos (50, 1000 mL);
- Proveta;
- Espátula;
- Pipetas;
- Tubos falcon (50 mL);
- Filtros de acetato de nitrilo (0,22 µm).

2.1.3. Equipamentos

- Aparelho de ultrassonificação modelo Sonorex RK 100 (Berlim, Alemanha);
- Balança analítica Mettler Toledo modelo AG 285 (Columbus, Ohio, EUA);

- Placa aquecimento;
- Centrífuga Sigma Modelo 3-16 K (St. Louis, E.U.A);
- Espectrómetro UV-VIS, da marca HITACHI, Modelo U-200 (Jena, Alemanha).

2.2. Amostragem

2.2.1. Recolha de amostras

A recolha das amostras analisadas foi realizada durante os meses de abril e maio de 2018 em superfícies comerciais, no distrito e concelho de Coimbra e no concelho de Mortágua. Foi efetuada uma seleção de diferentes marcas, incluindo marcas brancas de iogurtes, líquidos e sólidos, cuja rotulagem referisse conter carminas.

No total foram analisadas 30 amostras: 13 de iogurtes líquidos (43,3%) e 17 de iogurtes sólidos (56,6%). Foram analisadas marcas brancas (43,3%) e marcas de fabricante (56,6%).

Tabela 6. Listagem de amostras analisadas

Marca	Aroma	Tipo iogurte		Tipo de marca	
		Líquido	Sólido	Branca	Fabricante
Adagio	Morango		X		X
Agros Pedacos	Morango		X		X
Auchan Colesterol	Morango	X		X	
Bifidus Auchan	Morango		X	X	
Continente Aroma	Morango		X	X	
Corpos Danone	Morango	X			X
Corpos Danone	Morango/ Framboesa	X			X
Danacol	Morango	X			X
Danone (Danoninho)	Morango		X		X
Danone Original	Morango	X			X
Danone Yogur Original	Morango		X		X
Dia	Framboesa	X		X	
Dia Grego	Morango		X	X	
Dia Magro	Morango	X		X	
Milbone Bifidus	Morango	X		X	
Milbone Cremoso	Morango	X		X	
Milbone	Frutos Silvestres		X	X	
Milbone Magro	Morango	X		X	
Milbone	Morango		X	X	
Milbone	Morango	X		X	
Milsani (Aldi)	Morango		X	X	
Mimosa Bem Especial (Magro)	Morango		X		X
Mimosa Fruta Batida	Morango		X		X
Nestle Longa Vida	Morango		X		X
Oikos Danone	Morango		X		X
Pastoret	Morango		X		X
Paturages Arom'	Morango		X		X
Yoco Nestle	Morango	X			X
Yoco Suissinho	Morango		X		X
Yoggi	Morango	X			X

2.3. Metodologia analítica

Neste estudo, a carmina foi determinada sob a forma de ácido carmínico de acordo com a metodologia preconizada pela JECFA (JEFCA, 2000). Assim, o método usado para calcular a concentração de ácido carmínico em iogurtes consistiu na pesagem de 3 g de amostra e extração com 30 mL de ácido clorídrico (HCl).

Após pesagem e adição de HCl, as amostras foram fervidas durante 2 minutos. O extrato, uma vez arrefecido, foi transferido para tubos falcon de 50 mL e centrifugado a 5400 g, a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado com filtro 0,22 µm de acetato de nitrilo e, de seguida, colocado na célula para determinação dos níveis de absorvância.

Em seguida, procedeu-se à determinação da absorvância da solução através do método de espectrofotometria UV. As absorvâncias foram determinadas em células de 1 cm a um comprimento de onda de 494 nm, usando ácido clorídrico 2 M como branco.

Entre cada análise a célula foi limpa com HCl.

Todas as amostras foram realizadas em duplicado.

2.4. Validação da metodologia analítica

A validação de uma metodologia analítica é decisiva para demonstrar que um determinado método, desenvolvido para identificar e quantificar um ou mais analitos numa determinada matriz, é suficientemente fiável para que os resultados obtidos sejam com elevado grau de confiança (Rodrigues, 2016). Assim, o seu objetivo consiste em demonstrar que o método analítico que se vai utilizar é o mais adequado para o fim a que se destina.

Para este estudo, a validação da metodologia foi realizada com recurso a soluções padrão, brancos e ensaios de fortificação tendo sido estudados vários parâmetros abaixo referidos.

2.4.1. Ensaio em branco

Neste estudo foram realizados dois ensaios em branco. Um ensaio em branco dos reagentes com o objetivo de avaliar possíveis interferências dos reagentes e outro ensaio em branco da amostra para avaliar possíveis interferências da amostra e efeito da matriz.

2.4.2. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método fornecer resultados proporcionais à concentração da substância em análise, num determinado intervalo de interesse (Ribani et al., 2004). Demonstra a proporcionalidade entre as concentrações que estão presentes numa dada amostra e o sinal obtido. A curva de calibração foi obtida usando um processo de regressão linear dos mínimos quadrados da absorvância em função da concentração. A relação é tanto maior quanto mais próximo for o valor do coeficiente de correlação (r^2) de 1 (Rodrigues, 2016).

A avaliação da linearidade foi efetuada com soluções padrão e com amostras fortificadas. Na primeira situação foram usadas soluções padrão com concentrações de ácido carmínico de 2,5 mg/L, 4,5 mg/L, 5,5 mg/L, 6,5 mg/L, 7,5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L. Em amostras fortificadas foram utilizados cinco níveis de fortificação, correspondentes à curva em padrão, 25 mg/Kg, 55 mg/Kg, 65 mg/Kg, 100 mg/Kg e 150 mg/Kg.

2.4.3. Limite de detecção e limite de quantificação

A menor concentração da substância em análise que pode ser detetada, mas não quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental, é representado pelo limite de detecção (LOD) (Ribani *et al.*, 2004). Uma leitura inferior ao limite de detecção não expressa que esse analito não se encontra presente, mas que a concentração da substância a analisar é inferior ao limite de detecção (Rodrigues, 2016).

O limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração da substância em análise que se pode quantificar na amostra com um nível de exatidão e precisão aceitáveis. O LOQ e o LOD foram calculados através das curvas de calibração em matriz com $|3,3S_{y/x}|/b$ e $|10S_{y/x}|/b$, respetivamente, onde b corresponde ao declive e $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual da função linear.

2.4.4. Exatidão e precisão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados no estudo e um valor de referência aceite como verdadeiro. É sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão.

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas.

A avaliação da exatidão e da precisão da metodologia utilizada foi realizada através de ensaios de fortificação. Os ensaios foram realizados em triplicado e em 3 dias diferentes.

A exatidão foi avaliada através das percentagens de recuperação para os diferentes níveis de fortificação escolhidos. Estes ensaios foram realizados com um branco e três níveis de fortificações 45 mg/Kg, 75 mg/Kg e 150 mg/Kg.

A precisão do método analítico foi avaliada através da repetibilidade intra e inter-dia. A repetibilidade intra-dia consistiu na avaliação de uma amostra fortificada a três níveis distintos, em triplicado, num mesmo dia. A repetibilidade inter-dia foi avaliada repetindo o mesmo procedimento em 3 dias diferentes.

2.5. Resultados e discussão

2.5.1. Validação

2.5.1.1. Linearidade

A avaliação da linearidade foi efetuada para as soluções padrão e para as amostras fortificadas.

Na primeira situação foram usadas soluções padrão com concentrações de 2,5 mg/L, 4,5 mg/L, 5,5 mg/L, 6,5 mg/L, 7,5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L. Obteve-se uma curva com o coeficiente de correlação de 0,9954 (Figura 3).

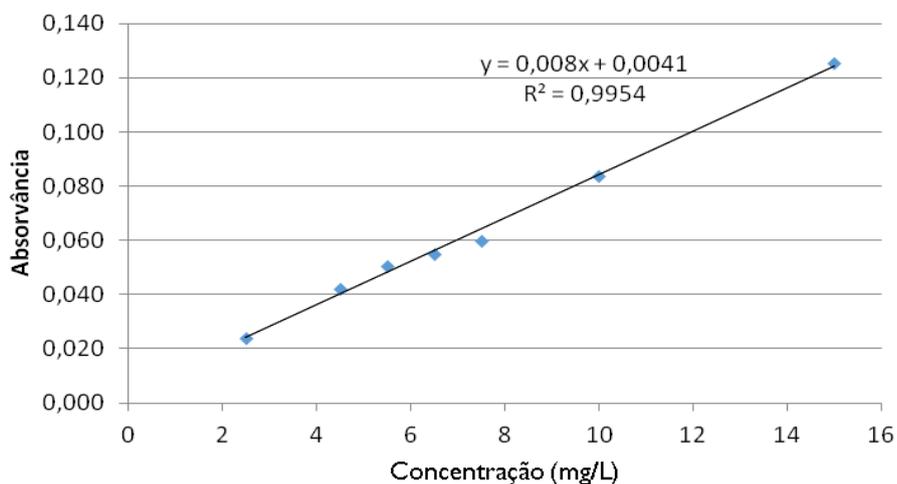


Figura 3. Curva de calibração em solvente.

Foi também estudada a linearidade em amostras fortificadas utilizando cinco níveis de concentração, correspondentes à curva em padrão, 25 mg/Kg, 55 mg/Kg, 65 mg/Kg, 100 mg/Kg e 150 mg/Kg.

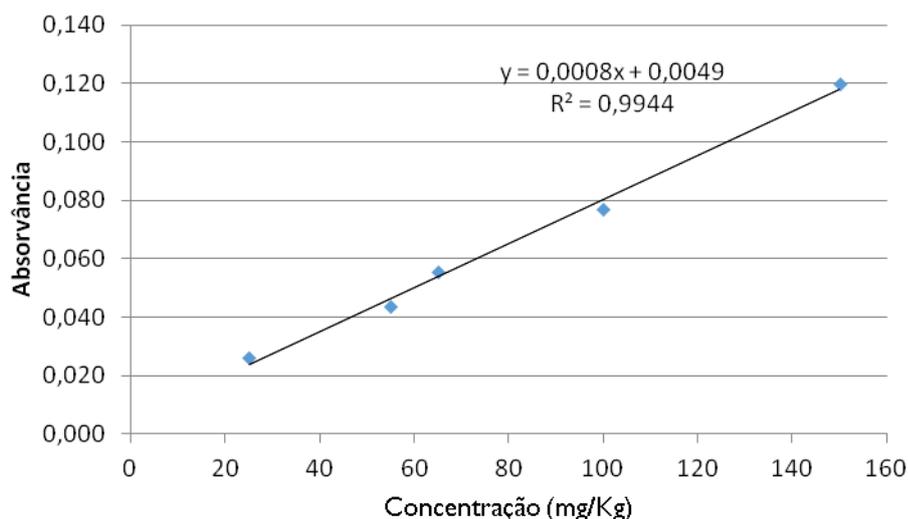


Figura 4. Curva de calibração em amostras fortificadas.

Como se pode observar nos gráficos que ilustram a linearidade, os valores de R^2 obtidos para as soluções padrão e para as amostras fortificadas foram de 0,9954 e 0,9944, respectivamente, evidenciando uma boa correlação dentro das concentrações pretendidas (Figuras 3 e 4).

As curvas de calibração foram usadas para calcular o efeito de matriz (ME), dividindo o declive da calibração correspondente na matriz (B) pelo declive da calibração do padrão em fase móvel (A). Assim, a razão $(B/A \times 100)$ foi definida como o efeito de matriz absoluto (ME%). O valor obtido foi interpretado da seguinte forma: um valor de 100% demonstra uma ausência de efeito de matriz, um valor superior a 100% indica um aumento do sinal e abaixo de 100% uma supressão de sinais. O valor do efeito matriz obtido foi de 93,75%, que se pode considerar negligenciável.

2.5.1.2. Limites de detecção e quantificação de ácido carmínico

Como já anteriormente descrito, o LOD representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detetada. O LOQ representa a menor concentração de substância em análise que pode ser quantificada.

O LOD e o LOQ obtidos para esta metodologia analítica foram de 12,88 mg/kg e de 39,04 mg/kg, respectivamente. O valor de LOD obtido com esta metodologia analítica, para matriz idêntica, é inferior ao obtido por Lancaster e Lawrence (1996), 100 ng/g, mas superior aos

obtidos por Carvalho e Collins (1997), 1 µg/mL, e por Merino *et al.* (1997), 0,1 mg/L, ao usarem HPLC-DAD a 480 nm e LC-UV a 280 nm, respetivamente (Tabela 4).

2.5.1.3. Exatidão e precisão

A exatidão e a precisão foram avaliadas através de três níveis de fortificação: 45 mg/Kg; 75 mg/Kg e 100 mg/Kg, em triplicado durante três dias.

Tabela 7. Exatidão e Precisão intra-dia e inter-dia.

Nível de Fortificação (mg/kg)	Exatidão	Repetibilidade	
	Recuperação (%)	RSD intra-dia (%)	RSD inter-dia (%)
45	97,70	6,93	20,75
75	103,48	3,45	6,22
150	103,03	1,76	8,87

Os resultados obtidos, quer para a exatidão quer para a precisão, são adequados para a determinação de ácido carmínico em iogurtes. No que respeita à exatidão, os valores obtidos oscilaram entre 97,7% e 113,48%, para níveis de fortificação de 45 e 75 mg/kg, respetivamente. Outros investigadores obtiveram valores entre 85% (Merino *et al.*, 1997) e 99% (Lancaster e Lawrence, 1997).

2.5.2. Níveis de ácido carmínico nas amostras de iogurtes

Foram analisadas 30 amostras de iogurtes podendo constatar que em todas os teores de ácido carmínico se encontravam acima do nível de quantificação (Tabela 8).

No grupo dos iogurtes sólidos foi onde se verificaram as concentrações médias mais elevadas, 137,15 mg/kg, tendo-se observado um valor máximo de 193,75 mg/kg (Figura 5).

O valor médio encontrado no grupo dos iogurtes líquidos foi de 107,16 mg/kg, sendo o valor máximo encontrado de 153,13 mg/kg (Figura 6).

Das 18 amostras de iogurte sólido analisadas, 6 continham teores acima do limite máximo de utilização (LMU) estabelecido para o ácido carmínico (150 mg/kg). Relativamente aos 12 iogurtes líquidos analisados, 2 também se encontram acima do LMU, como se pode observar pelas figuras abaixo (Figura 5 e 6).

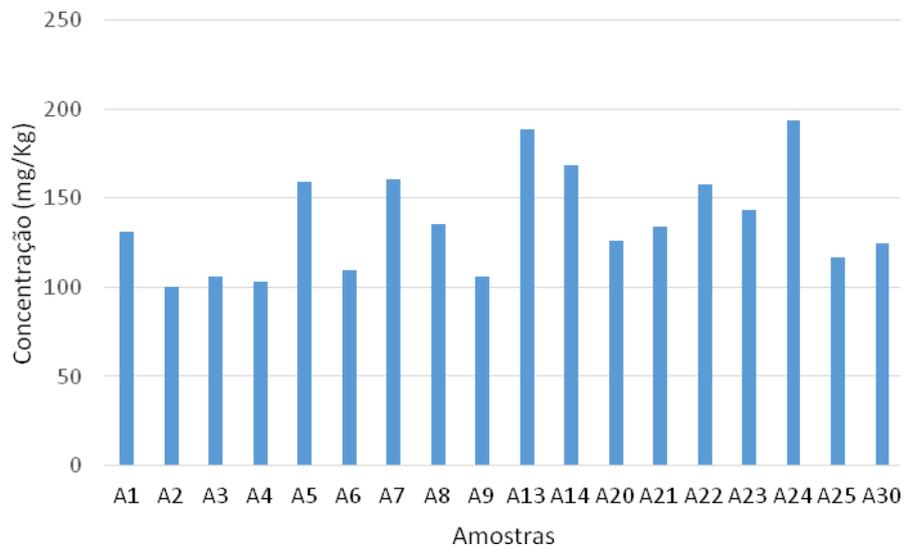


Figura 5. Concentração de ácido carmínico (mg/Kg) em iogurtes sólidos.

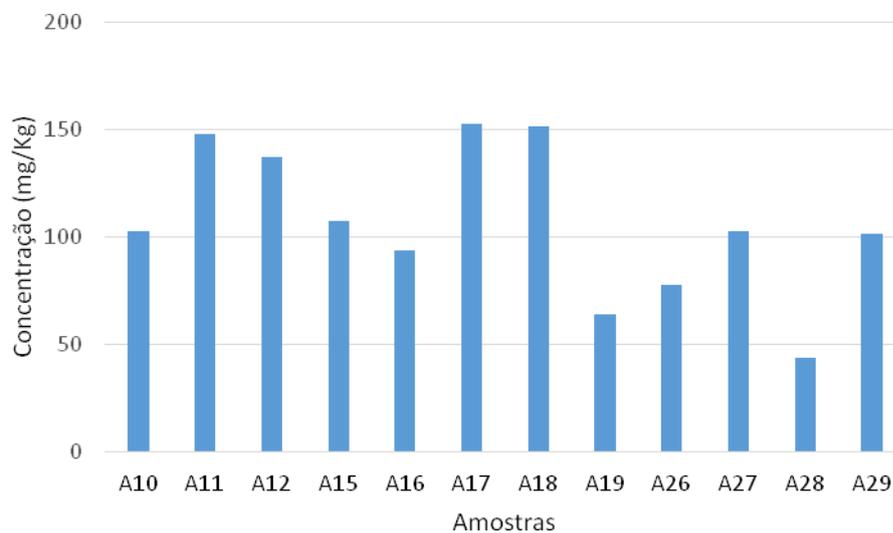


Figura 6. Concentração de ácido carmínico (mg/Kg) em iogurtes líquidos.

Do total das amostras analisadas, 13 foram de marca branca e 17 de marca de fabricante (Tabelas 6 e 8).

Os iogurtes de marca branca apresentaram teores médios de ácido carmínico ligeiramente superiores aos de marca de fabricante, 125,36 vs 125 mg/kg (Tabela 8).

Como se pode verificar pelas figuras abaixo indicadas (Figuras 7 e 8), 4 amostras de iogurtes de marca branca e 4 amostras marca de fabricante continham teores superiores ao LMU estabelecido.

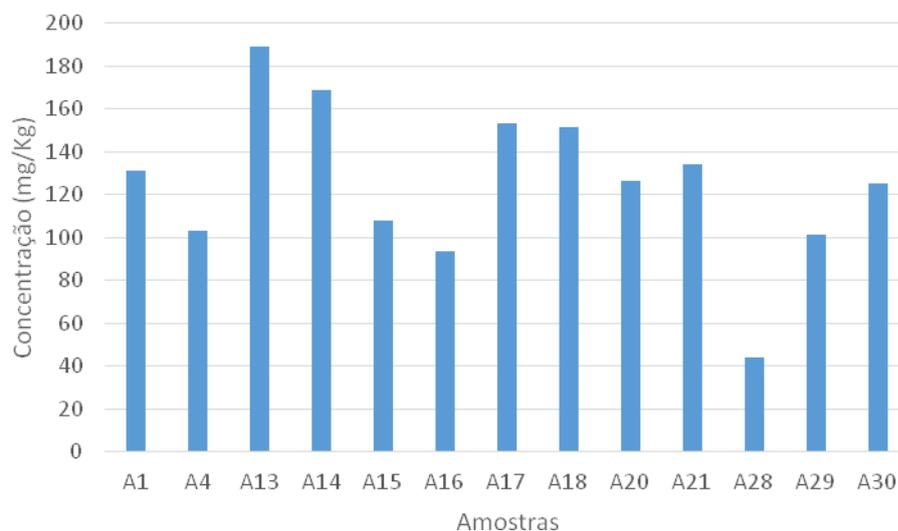


Figura 7. Concentração de ácido carnínico (mg/Kg) em iogurtes de marca branca.

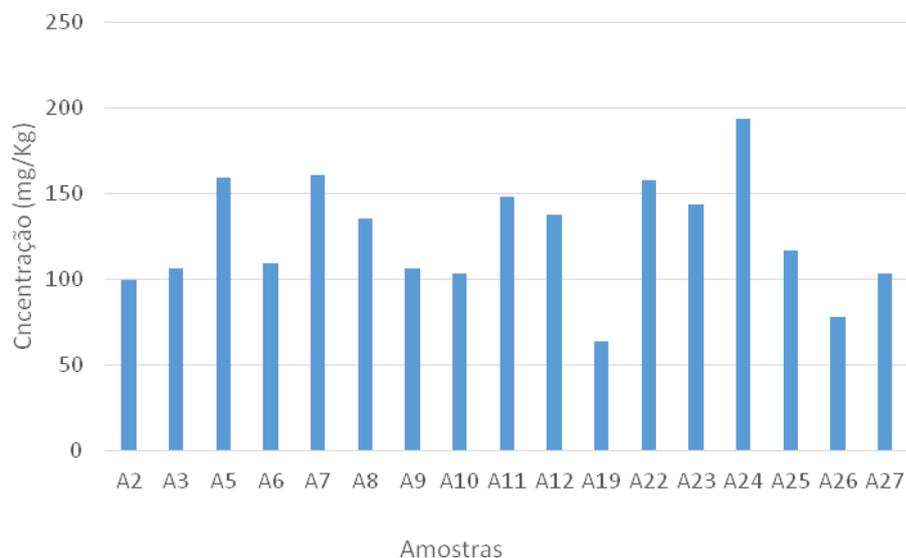


Figura 8. Concentração de ácido carnínico (mg/Kg) em iogurtes de marca de fabricante

Tabela 8. Frequência (%) e teores (mg/kg) de ácido carnínico nas amostras analisadas, de acordo com a textura e a marca

Iogurtes	Frequência (%)	Teores (mg/Kg)	
		Min. - Máx.	Média ± SD
Sólidos (n=17)	100	100 – 193,75	137,15 ± 29,05
Líquidos (n=13)	100	43,75 – 153,16	107,16 ± 35,26
Marca branca (n=13)	100	43,75 – 189,06	125,36 ± 37,13
Marca de fabricante (n=17)	100	64,06 – 193,75	125 ± 33,50
Total (n=30)	100	43,75 – 193,75	125,16 ± 34,49

Comparando com outros estudos já referidos anteriormente na tabela 5, verifica-se que os teores de ácido carmínico encontrados no presente estudo são mais elevados.

Jalón, Peña e Rivas, em 1989, ao efetuarem a determinação de carmina em iogurtes, por RP-HPLC, encontraram um teor médio de ácido carmínico de 9,52 mg/kg.

Na Coreia do Sul foram analisadas 84 amostras de vários produtos alimentares. De entre eles, o leite processado (n=4) apresentou um teor máximo de carmina de 46,7 mg/kg (Lim et al., 2014).

González, Gallego e Valcárcel, em 2003, analisaram amostras de lacticínios (iogurtes e batidos de leite) oriundos de Espanha, tendo encontrado teores de ácido carmínico entre os 18,5 mg/kg e 24 mg/kg.

No estudo conduzido por Yilmaz, Ergum e Yilmaz, em 2014, usando um método de determinação de ácido carmínico em produtos lácteos e doces, por DDP, encontraram valores médios de 121 mg/L de ácido carmínico para produtos lácteos e 28,4 mg/g em doces.

No Canadá foram analisadas 41 amostras de bebida de limão-framboesa, por tendo sido somente detetado ácido carmínico em uma das amostras, com um teor de 152 mg/Kg (Lancaster e Lawrence, 1996).

Carvalho e Collins, em 1997, analisaram vários géneros alimentícios e bebidas para determinação de ácido carmínico, entre os quais queijo Petit suisse, iogurte líquido, bolachas com recheio e bebidas alcoólicas tendo obtido teores de 6 mg/Kg, 63,9 mg/Kg, 5,6 mg/Kg e 435,7 mg/Kg, respetivamente.

2.5.3. Avaliação da exposição

Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE), o consumo de leites acidificados, incluindo iogurtes, tem oscilando ao longo dos anos, mas tem vindo a diminuir desde 2016, como se pode observar pela Figura 9.

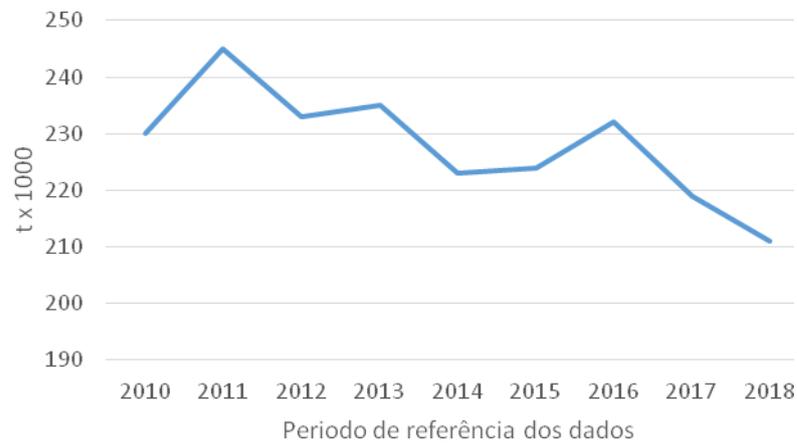


Figura 9. Consumo humano de leite e produtos lácteos (t) por tipo de leites e produtos lácteos (Adaptação de www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000213&contexto=bd&selTab=tab2&xlang=pt)

De acordo com a mesma fonte, o consumo de iogurtes (1980-2015) aumentou a um ritmo médio anual de 6,2%, fixando-se em 21,5 kg *per capita* em 2015.

A ingestão diária estimada de ácido carmínico pelo consumo de iogurtes foi calculada através da seguinte fórmula:

$$EDI = (\sum c \times C) / (D \times K),$$

em que $\sum c$ é a soma da concentração de ácido carmínico nas amostras analisadas (mg/Kg), C é o consumo médio anual estimado por habitante, N é o número de amostras analisadas, D é o número de dias do ano e K é o peso corporal.

Segundo o INE, em 2015, o consumo de iogurtes pela população portuguesa foi de 21,5 Kg *per capita*. O peso médio corporal dos adultos em Portugal considerado foi de 69 Kg.

Deste modo, o valor obtido foi de 0,104 mg/Kg p.c./dia.

Para a avaliação do risco foi utilizada a ADI recomendada pelo Painel da EFSA, em 2015, para ácido carmínico de 2,5 mg/Kg peso corporal /dia. Assim, considerando a percentagem do rácio EDI/ADI, obtém-se um risco de 4,16%, pelo que podemos concluir que a ingestão de ácido carmínico através do consumo de iogurtes não apresenta risco para os consumidores.

3. Conclusão

O estudo dos corantes alimentares não está apenas ligado aos benefícios que eles proporcionam no processamento e na venda de produtos, mas também ao seu potencial efeito negativo para a saúde humana. As consequências desta toxicidade podem resultar em alergias e outros riscos mais graves.

Por esse motivo, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para a avaliação da toxicidade destes aditivos. Não há, no entanto, muitos trabalhos realizados para a avaliação da concentração de teores de ácido carmínico / carminas em iogurtes.

Para a detecção e quantificação de ácido carmínico presente nas amostras de iogurtes recorreu-se à técnica de espectrofotometria UV-Vis. De acordo com os resultados da validação do método, este mostrou ser adequado para a finalidade a que se destina. O LOD e o LOQ obtidos foram de 12,88 mg/kg e 39,04 mg/kg, respetivamente.

Das 30 amostras analisadas de iogurtes, sólidos e líquidos, verificou-se que 8 se encontravam acima dos valores permitidos pelo Regulamento da UE n.º 1129/2011, sendo 4 de marca branca e 4 de marca de fabricante, o que evidencia a falta de cumprimento da regulamentação em vigor por parte dos fabricantes.

Em relação à avaliação da exposição humana ao ácido carmínico, através da ingestão de iogurtes que contêm o corante E120, verificou-se que o seu consumo não apresenta risco para a saúde do consumidor, uma vez que a ingestão diária estimada (EDI) é inferior à ADI estabelecida pela EFSA de 2,5 mg de ácido carmínico/Kg peso corporal/dia.

Com a elaboração deste estudo pode concluir-se que, apesar de já existirem alguns trabalhos similares, mas que recorreram a metodologias diferentes e em matrizes alimentares distintas, a quantificação de ácido carmínico em iogurtes é escassa e os valores encontrados na presente análise são também diferentes dos encontrados na literatura científica anteriormente descrita.

4. Referências bibliográficas

- ADITIVOS & INGREDIENTES - Os corantes alimentícios. Editora Insumos. (2009). 1–12.
- ALGHAMDI, A. H. *et al.* - Determination of carmine food dye (E120) in foodstuffs by stripping voltammetry. *Journal of AOAC International* (2009) 1454–1459.
- ÁLVAREZ, M. M. C. - Extracción, estabélizaci3n y evaluaciones analíticas del carmín. Instituto Politécnico Nacional, 2003. Disponível em: <https://tesis.ipn.mx/handle/123456789/960>
- AMCHOVA; KOTOLOVA, Hana; RUDA-KUCEROVA, Jana - Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. . ISSN 10960295. (2015) 1–9. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.09.026.
- AÑIBARRO, Belén *et al.* - Occupational asthma induced by inhaled carmine among butchers. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. . ISSN 12321087. 16:2 (2003) 133–137.
- ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Econ3mica, 2019. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/aditivos-alimentares/corantes.aspx>
- BORGES, M. E. *et al.* - Natural dyes extraction from cochineal (*Dactylopius coccus*). New extraction methods. *Food Chemistry*. . ISSN 03088146. 132:4 (2012) 1855–1860. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.12.018.
- BOTH, M. A. *et al.* - Degradação enzimática do corante de cochonilha. Em *Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química*
- CABRERA, R. B. - Downstream processing of natural products: carminic acid. *International University Bremen*, 2005
- CAMPOS, P. R. P. - Desenvolvimento e validação de um método de quantificação de corantes em amostras de suco artificial em pó. *Universidade Federal do Rio Grande do Norte*, 2014
- CARVALHO, P. R. N.; COLLINS, C. H. - HPLC determination of carminic acid in foodstuffs and beverages using diode array and fluorescence detection. *Chromatographia*. 45: (1997) 63–66.
- CARVALHO, P. R. N. - Extração de ácido carminico e análise por cromatografia líquida de alta eficiência. *Universidade Estadual de Campinas*, 1996. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/249925>
- CARVALHO, P. R. N. ; COLLINS, C. H. ; CARVALHO, C. R. L. - Extração e produção do corante carmim de cochonilha. *Brazilian Journal of Food Technology*. 4 (2001) 9–17.
- CONSTANT, P. B. L; STRINGHETA, P. C. ; SANDI, D. - Corantes alimentícios. *Boletim Ceppa*. ISSN 19839774. 20:2 (2002) 203–220. doi: 10.5380/cep.v20i2.1248.

CRIZEL, R. L. - Prospecção de pigmentos produzidos por cochonilhas *Ceroplastes* spp. para aplicação em alimentos. Universidade Federal de Pelotas, 2017. Disponível em: <http://guaiaca.ufpel.edu.br:8080/handle/prefix/3260>

CRUZ, L. M. P.; PEREZ, W. P. Z. - Metodología de extracción del colorante azul a partir de la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa), para la elaboración de helados. Universidad Nacional del Callao, 2013. Disponível em: <http://repositorio.unac.edu.pe/handle/UNAC/1608>

Decreto-Lei n.º 192/89, de 8 de junho, que estabelece os princípios orientadores da utilização dos aditivos alimentares nos géneros alimentícios. Cria a Comissão de Avaliação Toxicológica dos Aditivos Alimentares (CATA), com Competência Consultiva.

Decreto-Lei n.º 193/2000, de 18 de agosto, que estabelece as condições de utilização e os critérios de pureza específicos dos corantes que podem ser utilizados nos géneros alimentícios, transpondo para o ordenamento jurídico nacional a Diretiva n.º 1999/75/CE, da Comissão, de 22 de julho, que altera a Diretiva n.º 95/45/CE, da Comissão, de 26 de julho.

Decreto-Lei n.º 64/2011, de 9 de Maio, que altera os critérios de pureza específicos dos aditivos alimentares, transpõe as Diretivas n.os 2010/69/UE, da Comissão, de 22 de Outubro, e 2010/67/UE, da Comissão, de 20 de Outubro, e procede à nona alteração ao Decreto-Lei n.º 365/98, de 21 de Novembro, e à sétima alteração ao Decreto-Lei n.º 121/98, de 8 de Maio.

Diretiva n.º 98/72/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de outubro de 1998, que altera a Diretiva n.º 95/2/CE relativa aos aditivos alimentares com exceção dos corantes e dos edulcorantes.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA - Scientific Opinion on the re-evaluation of cochineal, carminic acid, carmines (E 120) as a food additive. EFSA Journal. . ISSN 18314732. 13:11 (2015) 4288. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4288.

FERNANDES, D. M. S. - Relatório espectrofotometria UV-Vis: determinação de ácido ascórbico em efervescente comercial. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, 2014. Disponível em: https://www.academia.edu/8843536/ESPECTROFOTOMETRIA_UV-VIS_determina%C3%A7%C3%A3o_de_%C3%A1cido_asc%C3%B3rbico_em_efervescente_comercial

FERRAZ, M. H. M. - A rota dos estudos sobre a cochonilha em Portugal e no Brasil no século XIX: caminhos descontraídos. *Antiquity*. 30:4 (2007) 1032–1037.

FERREIRA, F. S. - Aditivos alimentares e suas reações adversas no consumo. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*. 13:1 (2015) 397–407.

FREITAS, A.S. - Tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. *Acta Tecnológica*. 7:2 (2012) 65–72.

GILVAZ, Isabel - Caracterização de cremes pasteleiros industriais versus cremes pasteleiros tradicionais. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (2012). Disponível em

:https://sigarra.up.pt/fcup/pt/pub_geral.pub_view?pi_pub_base_id=24301

GONZÁLEZ, Monica *et al.* - Liquid chromatographic determination of natural and synthetic colorants in lyophilized foods using an automatic solid-phase extraction system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. . ISSN 00218561. 51:8 (2003a) 2121–2129. doi: 10.1021/jf0261147.

GONZÁLEZ, Monica *et al.* - Determination of natural and synthetic colorants in prescreened dairy samples using liquid chromatography-diode array detection. *Analytical Chemistry*. . ISSN 00032700. 75:3 (2003b) 685–693. doi: 10.1021/ac020468f.

GONZÁLEZ, Monica *et al.* - Optimizing conditions for the extraction of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa) using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. . ISSN 00218561. 50:24 (2002) 6968–6974. doi: 10.1021/jf025756r.

HAMERSKI, L.; REZENDE, M. J. C.; SILVA, B. V. - Usando as cores da natureza para atender aos desejos do consumidor: substâncias naturais como corantes na indústria alimentícia. *Revista Virtual de Química*. ISSN 19846835. 5:3 (2013) 394–420. doi: 10.5935/1984-6835.20130035.

HEYDARI, R.; HOSSEINI, M.; ZARABI, S. - A simple method for determination of carmine in food samples based on cloud point extraction and spectrophotometric detection. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015.

INE, Instituto Nacional de Estatística. Disponível em: www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000213&contexto=bd&selTab=tab2&xlang=pt. 2019

JAGGANNAGARI, S. B. - Solvent Effects on Emission Spectra of Carminic Acid and Determination of its Ground and Excited State Dipole Moments. Governors State University, IL, 2010. Disponível em: <https://opus.govst.edu/capstones/33/>

JECFA. (2000). Carmine. *FAO Food and Nutrition Paper 52 Add 8*.

LANCASTER, F. E.; LAWRENCE, J. F. - High-performance liquid chromatographic separation of carminic acid, a-and B-bixin, and a-and B-norbixin, and the determination of carminic acid in foods. *Journal of Chromatography A*. 732: (1996) 394–398.

LEITE, L. O. R. - Termodinâmica de partição do corante natural carmim de cochonilha em diferentes sistemas aquosos bifásicos. Universidade Federal de Viçosa, 2010. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/2095>

LIM, Ho-Soo *et al.* - Quantitative determination of carmine in foods by high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 2014) 521–526.

MARTINS, A. P. - Obtenção e Avaliação da Estabilidade de Carmim de Cochonilha (*Dactylopius coccus*). [S.l.] : Universidade Estadual de Campinas, 1997. Disponível em: http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/CAMP_90cdeaa3c1c9927519c8f7a9c542974a

MERINO, L.; EDBERG, U.; TIDRIKS, H. - Development and validation of a quantitative method for determination of carmine (E120) in foodstuffs by liquid chromatography: NMKL Collaborative Study. *Journal of AOAC International*. ISSN 10603271. 80:5 (1997) 1044–1051.

NAKAYAMA, N. *et al.* - Development of a rapid and simple method for detection of protein contaminants in carmine. *International Journal of Analytical Chemistry*. ISSN 1687-8760. 2015:174302 (2015) 748056. doi: 10.1155/2015/748056.

NASCIMENTO, M. G.; PRATO, T. S. - Influência da cor e do odor na discriminação do sabor de um produto (2016) 0–5. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/files/117.pdf>

NEJAD, H. E.; NEJAD, A. E. - Cochineal (*Dactylopius coccus*) as one of the most important insects in industrial dyeing. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. 1:11 (2013) 1302–1308.

PEREIRA, A. L. C. - Avaliação da exposição a aditivos alimentares em crianças dos 0 aos 3 anos : estudo exploratório. Universidade Nova de Lisboa Escola, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.18/4191>

PETTER, A.G.; ROSA, E.B. ; KISSMANN, T.W - Corantes. Estácio Pós - Graduação | MBA, São Paulo, 2002. Disponível em: <http://www.luzimarteixeira.com.br/wp-content/uploads/2010/04/corantes-completo.pdf>

PIASINI, A. *et al.* - Análise da concentração de tartrazina em alimentos consumidos por crianças e adolescentes. *Revista UNINGÁ*. 19:1 (2014) 14–18.

POLÔNIO, M.; PERES, F. - Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. *Cadernos de Saúde Pública*. . ISSN 0102-311X. 25:8 (2009) 1653–1666. doi: 10.1590/S0102-311X2009000800002.

PORTO, H. S. M. - HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos. Universidade de Coimbra, 2014 Disponível em: https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/28121/1/TeseMestrado_HelenaPorto.pdf

PROENÇA, R. - Alimentação e globalização: algumas reflexões. *Alimentação/Artigos*. . ISSN 0009-6725. 2005 (2010) 43–47.

QUEIRÓS, C. Q.; RODRIGUES, L. M. - A cor dos alimentos. *Química - Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*. 80 (2001) 6–11.

Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho no que diz respeito à utilização de lacas de alumínio de cochonilha, ácido carmínico e carminas (E 120) em alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos.

Regulamento (CE) n.º 1129/2011 da Comissão, de 11 de novembro de 2011, que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares.

Regulamento (CE) n.º 231/2012 da Comissão, de 9 de março de 2012, que estabelece especificações para os aditivos alimentares enumerados nos anexos II e III do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho.

Regulamento (UE) n.º 2015/537 da Comissão, de 31 de março de 2015, que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho no que diz respeito à utilização de lacas de alumínio de cochonilha, ácido carmínico e carminas (E 120) em alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos deve ser incorporado no Acordo EEE.

Regulamento da UE n.º 2018/1472 da Comissão de 28 de setembro de 2018 que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho e o anexo do Regulamento (UE) n.º 231/2012 da Comissão no que diz respeito a cochonilha, ácido carmínico, carminas (E 120).

ROCHA, A. C. C. - Validação e controlo da qualidade da quantificação de corantes em alimentos por HPLC-UV / Vis. : Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2015^a. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10451/20367>

ROCHA, A. P. N. - A presença de corantes na alimentação de crianças e adolescentes e implicações na saúde pública. Universidade de Coimbra, 2015b. Disponível em: [https://eg.uc.pt/bitstream/10316/37766/1/A presença de corantes na alimentacao de criancas e adolescentes e implicacoes na saude publica.pdf](https://eg.uc.pt/bitstream/10316/37766/1/A%20presenca%20de%20corantes%20na%20alimentacao%20de%20criancas%20e%20adolescentes%20e%20implicacoes%20na%20saude%20publica.pdf)

RODRIGUES, J. - Avaliação da contaminação por fluoroquinolonas em aves consumidas em cantinas pré-escolares e do primeiro ciclo do ensino básico da região centro. Universidade de Coimbra, 2016.

SANTOS, M. E.; DEMIATE, I. M.; NAGATA, N. - Determinação simultânea de amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo em alimentos via espectrofotometria UV-VIS e métodos de calibração multivariada. 30:4 (2010) 903–909.

SCOTTER, M. J. - Methods for the determination of european union-permitted added natural colours in foods: A review. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment. . ISSN 19440049. 28:5 (2011) 527–596. doi: 10.1080/19440049.2011.555844.

SOUZA, R. M. - Corantes Naturais Alimentícios e Seus Benefícios a Saúde. UEZO Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, 2012 Disponível em: [http://www.uezo.rj.gov.br/tccs/ccbs/Rosilane Moreth de Souza.pdf](http://www.uezo.rj.gov.br/tccs/ccbs/Rosilane%20Moreth%20de%20Souza.pdf)

VOLTOLINI, S. *et al.* - New risks from ancient food dyes: cochineal red allergy. European Annals of Allergy and Clinical Immunology. . ISSN 17641489. 46:6 (2014) 232–233.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - evaluation of certain food additives and contaminants 55th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2001).

YILMAZ, U. T.; ERGUN, F.; YILMAZ, H. - Determination of the food dye carmine in milk and candy products by differential pulse polarography. Journal of Food and Drug Analysis. . ISSN 10219498. 22:3 (2014) 329–335. doi: 10.1016/j.jfda.2013.12.002.