



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

DANIELA DE QUEIROZ PANE

**DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE
METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE
EDULCORANTES POR HPLC**

**TESE DE DOUTORADO
APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA
DE ALIMENTOS – UNICAMP, PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

ORIENTADORA: HELENA TEIXEIRA GODOY

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Daniela de Queiroz Pane, aprovada pela comissão julgadora em 29/02/2012 e orientada pela Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy.

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

P192d Pane, Daniela de Queiroz, 1977-
Desenvolvimento, validação e aplicação de
metodologia para determinação de edulcorantes por HPLC
/ Daniela de Queiroz Pane. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Helena Teixeira Godoy.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). 2.
Edulcorantes. 3. Validação de método. 4. Alimentos.
5. Cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). I.
Godoy, Helena Teixeira. II. Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Development, validation and application of a method for the
determination of artificial sweeteners by high performance liquid
chromatography

Palavras-chave em inglês:

High performance liquid chromatography (HPLC)

Sweeteners

Method validation

Food

Ultra performance liquid chromatography (UPLC)

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Helena Teixeira Godoy [Orientador]

Adriana Dillenburg Meinhart

Carolina Schaper Bizotto

Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira

Marcelo Alexandre Prado

Data da defesa: 29/02/2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy - UNICAMP
(Orientadora)

Profa. Dra. Adriana Dillenburg Meinhart - UNICAMP
(Titular)

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado - UNICAMP
(Titular)

Dra. Carolina Schaper Bizzoto - MARS
(Titular)

Profa. Dra. Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira - SENAI
(Titular)

Prof. Dr. Stanislau Bogusz Junior - UFSJ
(Suplente)

Dra. Ana Cecília Rybka - EMBRAPA
(Suplente)

Profa. Dra. Cláudia Hoffman Kowalsky - LANAGRO
(Suplente)

"Loucura? Sonho? Tudo é loucura ou sonho no começo. Nada do que o homem fez no mundo teve início de outra maneira, mas tantos sonhos se realizaram que não temos o direito de duvidar de nenhum."

Monteiro Lobato

Dedico esse trabalho a minha família constituída ao longo de toda essa jornada: meu marido Flávio e nossa filha Ana Clara - sem vocês nada disso teria sido possível. É um orgulho para mim ter sido escolhida para fazer parte da vida de vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo eterno apoio e compreensão em muitas das minhas ausências.

Ao meu marido e companheiro de todas as horas Flávio, que sempre acompanhou, incentivou e esteve ao meu lado durante a realização desse trabalho.

À minha sogra Vanda, sem a qual esse trabalho não teria sido realizado e por me acolher tão carinhosamente em sua família.

À prof^ª Dr^ª Helena Teixeira Godoy, por ter sido minha maior fonte de inspiração e motivação durante todos esses anos de convivência. Também por sua incessante paciência, pela busca constante de aprimoramento deste trabalho, mas principalmente por sua amizade.

Aos membros da banca examinadora, pelas observações e sugestões que muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Aos professores Marcelo Prado e Juliana Pallone por toda disposição em sempre ajudar na minha formação.

Aos meus amigos de muitos anos Cíntia, Giovanna, Michelle e Rodrigo, sem os quais esse caminho teria sido muito mais difícil.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Alimentos, Adriana, Carlos, Carol, Ciça, Cíntia, Dani Bio, Élede, Francisco, Janclei, Lucíula, Marla, Merenice, Milene, Paula, Pollyane, Raquel, Romina, Sabrina, Stanislau e Vivian, pois cada um de vocês está guardado em uma parte muito especial da minha vida e eu vou levar isso pra sempre!

A todos os amigos que embora estejam distantes estão sempre presentes: vocês contribuíram com a realização desse trabalho sem nem mesmo estarem cientes disso.

À técnica de laboratório Renata, por todo apoio e ajuda prestada, além dos inúmeros momentos de risadas compartilhadas.

Ao Seu Dirceu, por ser um exemplo de profissional dedicado, competente e sempre disposto a ajudar.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos e da secretaria de Pós-Graduação, em especial ao Cosme, por todo auxílio e paciência em me explicar os processos administrativos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento concedido para a realização desta pesquisa.

A todos vocês, o meu muito obrigado!

Daniela de Queiroz Pane

ÍNDICE GERAL

Resumo geral _____	xvi
Summary _____	xviii
Introdução geral _____	01
Bibliografia _____	03

CAPÍTULO 1

Edulcorantes: aspectos químicos, legislação, segurança e toxicidade _	05
1. Introdução _____	06
2. Edulcorantes _____	08
2.1. Principais edulcorantes utilizados em alimentos _____	10
2.2. Características físico-químicas dos edulcorantes _____	13
2.3. Sinergismo entre edulcorantes _____	20
2.4. Segurança e toxicidade dos edulcorantes _____	21
3. Legislação _____	25
3.1. Regulamentação _____	26
4. Métodos de análise _____	29
5. Bibliografia _____	31

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento e validação de metodologia para separação de edulcorantes por HPLC em geléias _____	45
Resumo _____	46
1. Introdução _____	49
2. Materiais e métodos _____	51
2.1. Amostras _____	51
2.2. Reagentes _____	51
2.3. Equipamento _____	51

2.4 Desenvolvimento da metodologia	52
2.5. Validação da metodologia	53
2.6. Preparo de amostras	55
3. Resultados e discussão	57
3.1. Desenvolvimento da metodologia	57
3.2. Validação da metodologia	58
3.3. Aplicação em amostras	59
4. Conclusões	62
5. Bibliografia	62

CAPÍTULO 3

Determinação e avaliação de 5 edulcorantes por HPLC em alimentos	66
Resumo	67
1. Introdução	70
2. Materiais e métodos	71
2.1. Amostras	71
2.2. Reagentes	72
2.3. Equipamento	72
3. Determinação dos edulcorantes	73
3.1. Preparo de amostra	73
3.2. Condições cromatográficas	74
3.3. Análise estatística	75
4. Resultados e discussão	75
5. Conclusões	89
6. Bibliografia	90

CAPÍTULO 4

Comparação entre as metodologias por HPLC e UPLC na determinação de edulcorantes em alimentos	94
Resumo	95

1. Introdução	97
2. Materiais e métodos	98
2.1. Amostras	98
2.2. Reagentes	99
2.3. Equipamentos	100
2.4. Avaliação das figuras de mérito	100
3. Determinação dos edulcorantes	101
3.1. Preparo de amostra	101
3.2. Condições cromatográficas	102
4. Resultados e discussão	104
4.1. Condições de análise	104
4.2. Figuras de mérito	107
4.2.1. Limites de detecção e de quantificação	107
4.2.2. Repetitividade e precisão intermediária	108
5. Conclusões	116
6. Bibliografia	117
CONCLUSÕES GERAIS	122
ANEXOS	124
Anexo 1 - Perfis cromatográficos obtidos na determinação de edulcorantes (ACE: acessulfame -227 nm; SAC: sacarina -201 nm; CIC: ciclamato -192 nm; ASP: aspartame - 192 nm; NEO: neotame - 192 nm) por HPLC e por UPLC. Condições cromatográficas descritas no Capítulo 4	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1 – Métodos de análise para edulcorantes em alimentos

Figura 1. Classificação dos edulcorantes nutritivos e não-nutritivos __ 09

Figura 2. Estrutura química dos edulcorantes _____ 12

Capítulo 2 – Desenvolvimento e validação de metodologia para separação de edulcorantes por HPLC em alimentos

Figura 1. Fluxograma da metodologia utilizada na determinação de edulcorantes em alimentos "diet/light" _____ 56

Figura 2. Perfil cromatográfico obtido na determinação de edulcorantes (ACE: acessulfame - 227 nm); SAC: sacarina - 201 nm); CIC: ciclamato - 192 nm); ASP: aspartame - 192 nm); NEO: neotame - 192 nm)), referentes aos padrões (A, B, C) e à amostra geléia (D, E, F). Condições cromatográficas: coluna Pinnacle II, C18, 5 µm, 150x4,6 mm d.i. (Restek); fase móvel composta por tampão fosfato de sódio monobásico (5 mM, pH 7,0) e acetonitrila; detecção por arranjo de diodos. _____ 61

Capítulo 3 – Determinação e avaliação de cinco edulcorantes por HPLC em alimentos

Figura 1. Perfil cromatográfico obtido na determinação de edulcorantes (ACE: acessulfame - 227 nm; SAC: sacarina - 201 nm; CIC: ciclamato - 192 nm; ASP: aspartame - 192 nm; NEO: neotame - 192 nm), referentes às amostras de refrigerante tipo cola do Fabricante 1 (A, B), néctar de uva do Fabricante 2 (C, D), geléia do Fabricante 11 (E e F), cappuccino do Fabricante 8 (G, H), achocolatado do Fabricante 6 (I) e pó para o preparo de pudim sabor baunilha do Fabricante 10 (J, K, L). Condições cromatográficas: coluna Pinnacle II, C18, 5 µm, 150x4,6 mm

d.i. (Restek); fase móvel composta por tampão fosfato de sódio monobásico (5 mM, pH 7,0) e acetonitrila; detecção por arranjo de diodos. _____ 76

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1 – Métodos de análise para edulcorantes em alimentos

Tabela 1. Dulçor relativo de alguns edulcorantes _____	13
Tabela 2. Diferentes condições de estabilidade dos edulcorantes _____	14
Tabela 3. Ingestão Diária Aceitável (IDA) para edulcorantes _____	21
Tabela 4. Limites máximos para adição de edulcorantes em alimentos e bebidas no Brasil _____	27

Capítulo 2 – Validação intra-laboratorial de metodologia para separação de edulcorantes em geléia por HPLC

Tabela 1. Gradiente utilizado para o método de separação de edulcorantes por UPLC _____	52
Tabela 2. Gradiente utilizado para o método de separação de edulcorantes por HPLC _____	57
Tabela 3. Precisão do método (desvio-padrão relativo, CV%) _____	58
Tabela 4. Taxas de recuperação (%) dos edulcorantes nos níveis de concentração empregados _____	58
Tabela 5. Valores de F para cada edulcorante _____	59
Tabela 6. Teor de edulcorantes ($\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$) presentes em geléias de morango "diet" _____	60

Capítulo 3 – Determinação e avaliação de cinco edulcorantes em alimentos por HPLC

Tabela 1. Gradiente utilizado para o método de separação de edulcorantes por HPLC _____	74
Tabela 2. Taxas de recuperação (%) dos edulcorantes nos níveis de concentração empregados _____	77

Tabela 3. Teor de edulcorantes (mg.100mL ⁻¹) presentes em refrigerantes, néctares e sucos _____	78
Tabela 4. Teor de edulcorantes (mg.100mL ⁻¹) presentes em preparado de achocolatados, pós para preparo de refresco, cappuccino, pudim e gelatina) _____	82
Tabela 5. Teor de edulcorantes (mg.100mL ⁻¹) presentes em geléias, catchup e molho tipo "barbecue" _____	87
Tabela 6. Teor de edulcorantes (mg.100mL ⁻¹ ou mL.100mL ⁻¹) presentes em adoçantes de mesa _____	88

Capítulo 4 - Comparação entre as metodologias por HPLC e UPLC na determinação de edulcorantes em alimentos

Tabela 1. Gradiente utilizado para o método de separação de edulcorantes por HPLC _____	102
Tabela 2. Gradiente utilizado para o método de separação de edulcorantes por UPLC _____	103
Tabela 3. Comparação entre os tempos de corrida e acondicionamento, vazão e volume de fase móvel empregados nas técnicas por HPLC e UPLC _____	105
Tabela 4. Comparativo de custos entre os métodos por HPLC e UPLC, para 100 análises _____	106
Tabela 5. Limites de detecção e de quantificação obtidos pelas técnicas de HPLC e UPLC, para a matriz geléia _____	107
Tabela 6. Precisão dos métodos por HPLC e UPLC (desvio-padrão relativo, CV%) _____	108
Tabela 7. Teor de edulcorantes presentes em achocolatados, cappuccinos e pós para o preparo de pudim, em mg.100mL ⁻¹ , pelas metodologias por HPLC e por UPLC _____	110
Tabela 8. Teor de edulcorantes presentes em refrigerantes, em mg.100mL ⁻¹ , pelas metodologias por HPLC e por UPLC _____	111

Tabela 9. Teor de edulcorantes presentes em néctares e pós para o preparo de refresco, em $\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$, pelas metodologias por HPLC e por UPLC _____	112
Tabela 10. Teor de edulcorantes presentes em refrigerantes, em $\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$, pelas metodologias por HPLC e por UPLC _____	114

RESUMO GERAL

Foi desenvolvido um novo método, eficiente e econômico, para a análise simultânea de cinco edulcorantes em alimentos (acesulfame-k, sacarina, ciclamato, aspartame e neotame) pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O método foi validado e aplicado em diferentes produtos da categoria "light", "diet" e "zero", sendo esses refrigerantes, néctares, pós para preparo de refresco, pudins, cappuccinos, achocolatados, geléias, gelatina, molho tipo "barbecue", catchup e adoçantes de mesa. Para tanto, utilizou-se uma coluna C18, fase móvel composta por fase aquosa (5 mM de tampão fosfato de sódio monobásico; pH 7) e fase orgânica (acetonitrila), eluição por gradiente, vazão de 0,4 mL.min⁻¹ e temperatura de 56°C. Os edulcorantes apresentaram adequada linearidade na faixa de trabalho. A repetitividade, a precisão intermediária e os limites de detecção e de quantificação foram adequados para os cinco edulcorantes. As taxas de recuperação variaram entre 85,2% e 101,4%, para as diferentes matrizes avaliadas. O método apresentou uma limitação para as amostras contendo cacau, onde não foi possível determinar o ciclamato em virtude da presença de um interferente. Até três edulcorantes utilizados em combinação foram encontrados nas amostras, sendo acesulfame-k e aspartame os mais comumente empregados. As amostras de pudim sabor chocolate, molho tipo "catchup" e molho tipo "barbecue" apresentaram concentrações de edulcorantes acima do permitido pela legislação brasileira. As amostras de refrigerante sabor limão, sabor guaraná, tipo cola e de refresco em pó, embora estivessem atendendo a legislação, apresentaram teor de edulcorantes acima do declarado no rótulo. O método desenvolvido por HPLC foi comparado a uma metodologia por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) e apresentou maior robustez e menor custo em comparação ao

desenvolvimento para UPLC. Já o método por UPLC demonstrou baixo consumo de solventes, tempo curto de análise, menores limites de detecção e de quantificação, no entanto, maior custo devido ao preparo das amostras e à coluna, solventes, reagentes e filtros envolvidos nas análises.

SUMMARY

We developed a new method, efficient and economical, for the simultaneous analysis of five sweeteners in foods (acesulfame K, saccharin, cyclamate, aspartame and neotame) technique for high performance liquid chromatography (HPLC). The method was validated and applied to different products in the "light", "diet" and "zero", and these soft drinks, nectars, powders for preparation of soft drinks, puddings, cappuccino, chocolate, jams, jelly, sauce type "barbecue", ketchup and tabletop sweeteners. To both, we used a C18 column, mobile phase consisting of aqueous phase (5 mM sodium phosphate buffer monobasic; pH 7) and organic phase (acetonitrile), gradient elution, flow of 0.4 mL.min⁻¹ and temperature of 56 ° C. The sweetener showed acceptable linearity in the range of work. The repeatability, intermediate precision and limits of detection and quantification were adequate for the five sweeteners. Recovery rates ranged between 85.2% and 101.4% for the different matrices evaluated. The method has a limitation for samples containing cocoa, which was not possible to determine cyclamate because of the presence of an interferer. Up to three sweeteners used in combination were found in the samples, with aspartame and acesulfame-k the most commonly employed. Samples of chocolate pudding flavored sauce like "ketchup" sauce like "barbecue" sweeteners showed concentrations above those permitted by Brazilian law. Samples of lemon-flavored soda, flavored guarana, cola and powdered drink mixes, although they were given the rules presented above sweeteners content declared on the label. The method developed HPLC method was compared to an ultra performance liquid chromatographic efficiency (UPLC) and showed greater robustness and lower cost compared to developing for UPLC. Have the method by UPLC demonstrated low consumption of solvents, short time of analysis, lower

limits of detection and quantification, however, higher cost due to preparation of samples and the column, solvents, reagents and filters involved in the analyzes.

INTRODUÇÃO GERAL

Os edulcorantes constituem uma classe importante de aditivos, os quais são utilizados em uma ampla gama de alimentos e bebidas (WASIK et al., 2007).

Os novos estilos de vida e consumo adotados atualmente na sociedade contribuem para o aumento da quantidade de pessoas obesas. No Brasil, dados do IBGE (2010) através da POF (Pesquisa de Orçamentos Familiares) apontam que no país, entre adultos com idade acima de 20 anos, 48,0% das mulheres e 50,1% dos homens estão com excesso de peso, enquanto 16,9% das mulheres e 12,4% dos homens são obesos.

Dessa forma, vem crescendo a demanda pelos produtos "diet", "light" e "zero", aumentando seu espaço no mercado e sua aceitação entre os consumidores (TORLONI et al., 2007). O uso de alimentos sem açúcar e com baixas calorias triplicou nas duas últimas décadas do século XX (NABORS & GELARDI, 2001).

Alguns fatores podem influenciar na percepção do gosto dos edulcorantes como a idade dos indivíduos, região geográfica e a cultura (KEMP, 2006). Além disso, a percepção do sabor doce está associada a uma grande e complexa variedade de aromas e outros sabores (REDLINGER & SETSER, 1987).

Os edulcorantes têm seu uso autorizado apenas depois de adequada avaliação toxicológica e esse uso deve ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e ao menor nível necessário para alcançar o efeito desejado (BRASIL, 1997). A segurança de um edulcorante é de extrema importância, portanto o desenvolvimento de metodologias que sejam capazes de identificar e quantificar os edulcorantes em alimentos é fundamental por permitir a fiscalização pelos órgãos regulamentadores, para o controle de

qualidade por parte das indústrias e para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas (MORAES, 2008).

A mistura de edulcorantes em um mesmo alimento é uma prática comum por parte da indústria de alimentos uma vez que essa mistura traz uma sinergia de dulçor que permite o uso de níveis mais baixos de cada um deles individualmente, geralmente levando a um custo menor e ainda melhorando o sabor doce e reduzindo sabores indesejáveis, resultando em um produto final de melhor qualidade (HUANG et al., 2006; ZYGLER et al., 2009).

Pelo fato de geralmente serem utilizados combinados, são necessários métodos de análise capazes de determinar simultaneamente os diferentes edulcorantes utilizados nos alimentos e bebidas. Os métodos de separação atendem mais a este propósito e a principal técnica utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (CASALS et al., 1996; AQUINO et al., 2004; DEMIRALAY et al., 2006; DOSSI et al., 2006; WASIK et al., 2007). Para uma rigorosa identificação, a cromatografia líquida acoplada a detector de massas (LC/MS) também tem sido empregada (HUANG et al., 2006; LOOS et al., 2009). Esse último, embora permita a determinação simultânea de diferentes edulcorantes, demanda equipamentos de maior custo e exige especialização do analista, tornando onerosa sua aplicação em análises de rotina em indústrias de alimentos.

Desta forma, este trabalho visa o desenvolvimento, a validação e a aplicação de uma metodologia por HPLC para a detecção simultânea de cinco edulcorantes freqüentemente encontrados em alimentos das categorias "diet", "light" e "zero". Visa ainda comparar os resultados obtidos com a técnica de cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC), utilizada para analisar as mesmas amostras. Os parâmetros a serem comparados são as condições de análise, os custos de cada

técnica, os limites de detecção e de quantificação, a repetibilidade e a precisão intermediária e a quantificação das amostras.

BIBLIOGRAFIA

AQUINO, F. W. B.; AMORIM, A. G. N.; PRATA, L. F.; NASCIMENTO, R. F. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.1, p. 32-38, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. **Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares**. Diário Oficial da União, Brasília, 1997.

CASALS, I.; REIXACH, M.; AMAT, J.; FUENTES, M.; SERRA-MAJEM, L. Quantification of cyclamate and cyclohexylamine in urine samples using highperformance liquid chromatography with trinitrobenzenesulfonic acid pre-column derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 750, n. 1/2, p. 397-402, 1996.

DEMIRALAY, E. C.; OZKAN, G.; GUZEL-SEYDIM, Z. Isocratic separation of some food additives by reversed phase liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 63, n. 1/2, p. 215-219, 2006.

DOSSI, N.; TONIOLO, R.; SUSMEL, S.; PIZZARIELLO, A., BONTEMPELLI, G. Simultaneous RP-LC Determination of Additives in Soft Drinks. **Chromatographia**, v. 63, n. 11/12, p. 557-562, 2006.

HUANG, Z.; MA, J.; CHEN, B.; ZHANG, Y.; YAO, S. Determination of cyclamate in foods by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, n. 2, p. 233-237, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério da Saúde. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008 - 2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

LOOS, R.; GAWLIK, B. M.; BOETTCHER, K.; LOCORO, G.; CONTINI, S.; BIDOGLIO, G. Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 7, p. 1126-1131, 2009.

MORAES, P. C. B. T. **O impacto do uso de edulcorantes em bebidas de café solúvel e café torrado/moído como substitutos da sacarose.** 107p, Tese de doutorado em Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

NABORS, L. O. & GELARDI, R. C. **Saccharin.** In: Nabors, L.O'B (ed.) *Alternative Sweeteners.* 3ed, revisado e expandido, Suíça, Marcel Dekker, 2001.

REDLINGER, P.A.; SETSER, C.S. Sensory quality of selected sweeteners: aqueous and lipid model systems. **Journal of Food Science**, v.52, n. 2, p.451-454, 1987.

REDLINGER, P.A.; SETSER, C.S. Sensory quality of selected sweeteners: aqueous and lipid model systems. **Journal of Food Science**, v.52, n. 2, p.451-454, 1987.

TORLONI, M. R.; NAKAMURA, M. U.; MEGALE, A.; SANCHEZ, V. H. S.; MANO, C.; FUSARO, A. S.; MATTAR, R. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. Rio de Janeiro, **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 5, p. 267-275, 2007.

WASIK, A.; MCCOURT, J.; BUCHGRABER, M. Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection - Development and single-laboratory validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, p. 187-196, 2007.

ZYGLER, A.; WASIK, A.; NAMIESNIK, J. Analytical Methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1082-1102, 2009.

Edulcorantes: aspectos químicos, legislação, segurança e toxicidade

Daniela de Queiroz Pane, Helena Teixeira Godoy

**Departamento de Ciência de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP**

REVISÃO DA LITERATURA

RESUMO

O uso de alimentos sem açúcar e com baixas calorias triplicou nas duas últimas décadas do século XX em virtude do aumento da prevalência de doenças como diabetes e obesidade, além da questão estética. Dentre os diferentes aditivos utilizados pela indústria de alimentos situam-se os edulcorantes, empregados para fornecer dulçor aos produtos sem acrescentar-lhes valor energético. Geralmente utilizados de forma combinada, um grande desafio está no desenvolvimento de métodos capazes de detectar simultaneamente os diferentes edulcorantes presentes em um mesmo alimento.

Diversos estudos sobre diferentes metodologias de análise estão sendo publicados na literatura, no sentido de assegurar a obtenção de dados confiáveis sobre a presença e quantidade dos edulcorantes. Este trabalho apresenta uma revisão sobre as características dos principais edulcorantes utilizados pela indústria de alimentos, acesulfame-k, alitame, aspartame, ciclamato, glicosídeos de esteviol, neotame, sacarina e sucralose, assim como os principais métodos de análise descritos na literatura.

1. INTRODUÇÃO

O uso de alimentos sem açúcar e com baixas calorias triplicou nas duas últimas décadas do século XX (NABORS & GELARDI, 2001). Além da questão estética, destacam-se ainda alguns quadros clínicos, como o diabetes *mellitus* e a obesidade, que requerem restrição definitiva ou prolongada de açúcares. Em relação à diabetes, existem no mundo 364 milhões de pessoas portadoras da doença (WHO, 2011b), apontando um

problema de saúde pública que gera custos elevados (WILD et al., 2004).

O aumento global da prevalência de sobrepeso e obesidade é atribuível a diferentes fatores, os quais incluem uma mudança global na dieta, para o aumento da ingestão de alimentos altamente energéticos que são ricos em gorduras e açúcares, porém pobres em vitaminas, minerais e outros micronutrientes e a tendência da diminuição da atividade física, devido à natureza cada vez mais sedentária de muitas formas de trabalho, mudando os modos de transporte e urbanização (WHO, 2011a). Entre os fatores relacionados ao sobrepeso e à obesidade, as mudanças no padrão de alimentação e de atividade física, ocorridas em diversas sociedades, são reconhecidamente os determinantes que mais contribuem para o aumento do excesso de peso (ENES e SLATER, 2010), uma vez que não ocorreram alterações substanciais nas características genéticas das populações nas últimas décadas (ESCRIVÃO et al., 2000).

Além das construções de novos hábitos alimentares e culturais, esses novos estilos de vida e consumo adotados pela sociedade atual contribuem para o aumento da quantidade de pessoas obesas ou com sobrepeso, tanto que em 2008 foram estimados que 1,5 bilhão de adultos estão em situação de sobrepeso no mundo (WHO, 2011a). No Brasil, a tendência secular da obesidade apresenta um grande aumento em todas as faixas etárias. Dados do IBGE (2010), através da POF (Pesquisa de Orçamentos Familiares), apontam que no país, entre adultos com idade acima de 20 anos, 48,0% das mulheres e 50,1% dos homens estão com excesso de peso, enquanto 16,9% das mulheres e 12,4% dos homens são obesos.

2. EDULCORANTES

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, edulcorantes são substâncias diferentes dos açúcares que conferem sabor doce ao alimento (BRASIL,1997). Esses compreendem um grupo de substâncias utilizadas em substituição à sacarose, que compartilham a propriedade de interagir com receptores gustativos e produzir uma sensação que percebemos e denominamos como doce (MONTIJANO et al., 1998).

Os edulcorantes constituem em uma classe importante de aditivos e são utilizados em uma ampla gama de alimentos e bebidas. Devido a quantidade em que são empregados, tornam-se mais baratos do que a sacarose, acabando por reduzir os custos dos produtos aos quais são adicionados (WASIK et al., 2007).

Podem ser divididos em dois grupos principais: calóricos ou nutritivos, e não-calóricos ou não-nutritivos. Os calóricos são aqueles que, além de adoçar o alimento, fornecem calorias ao organismo. Os não-calóricos são aqueles que, além do sabor doce, não fornecem calorias ao organismo. Ambos os grupos podem ser divididos entre os de origem natural e os de origem sintética, conforme nos mostra a Figura 1.

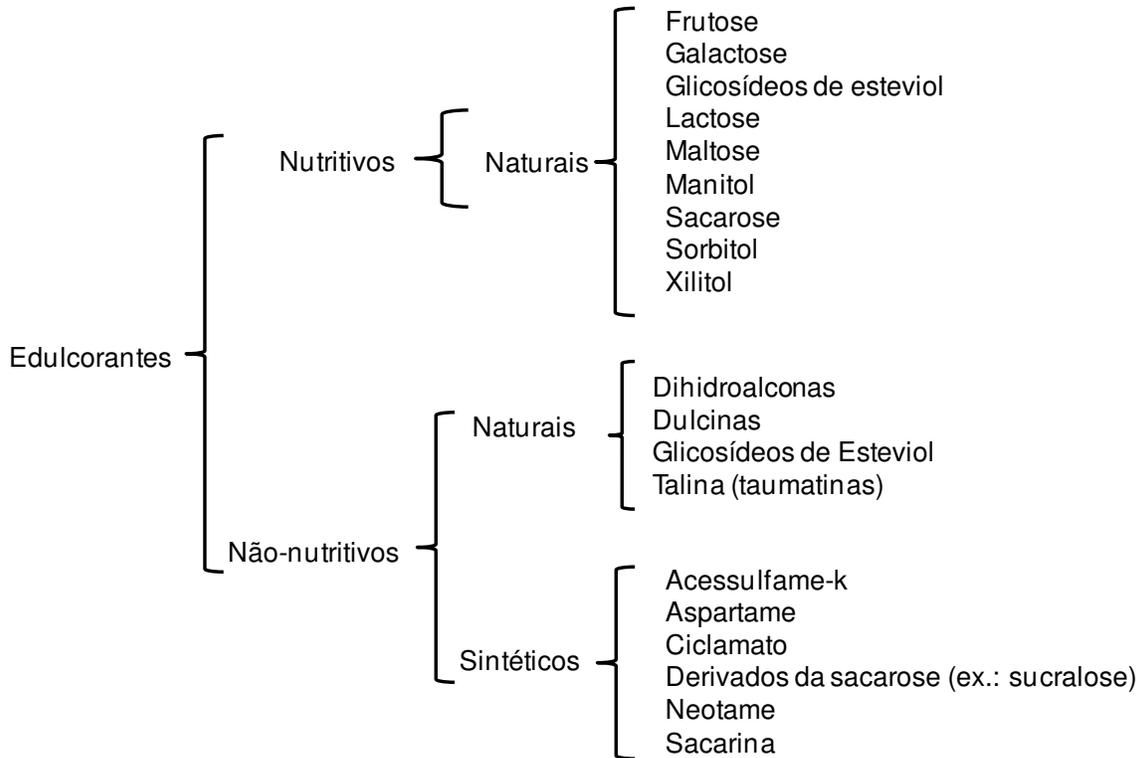


Figura 1: Classificação dos edulcorantes nutritivos e não-nutritivos (FATIBELLO-FILHO et al., 1996; CÂNDIDO & CAMPOS, 1996).

Os indivíduos que por diversas razões precisam substituir a sacarose por adoçantes não calóricos procuram por produtos que sejam dotados de gosto e características próximas às da sacarose. Sendo assim, idealmente um edulcorante artificial deve ser incolor e inodoro, estável e solúvel em soluções aquosas, atóxico, de baixo custo, compatível com outros ingredientes alimentares, não deixar sabor residual e ou não ser metabolizado ou produzir metabólitos que não prejudiquem o organismo (FURIA, 1986; CAPITÁN-VALLVEY et al., 2006).

2.1. Principais edulcorantes utilizados em alimentos

Dentre os edulcorante não-nutritivos, os mais utilizados são sacarina, estévia, ciclamato, aspartame, acessulfame-k, sucralose, alitame e neotame.

A sacarina foi descoberta acidentalmente em 1879, por J. Remsen e C. Fahlberg, dois pesquisadores da Universidade John Hopkins, durante um estudo sobre a oxidação do o-toluenosulfonamidas (CARLONI-FILHO et al., 2003). Sua utilização aumentou significativamente durante a I Guerra Mundial, devido ao racionamento e escassez do açúcar. Seu sucesso como edulcorante até os dias atuais pode ser atribuído, entre outros fatores, ao preço competitivo em relação à sacarose e a outros edulcorantes, e à ampla estabilidade em alimentos (BANNWART, 2006).

A estévia é um subarbusto conhecido pelos índios paraguaios há muito tempo utilizado para adoçar bebidas medicamentosas. A primeira menção formal da estévia data de 1899, quando o naturalista paraguaio Moisés S. Bertoni obteve referências da planta de ervateiros e índios guaranis, em uma de suas viagens às florestas do leste paraguaio, em 1887 (BERTONI, 1899 *apud* LIMA FILHO & MALAVOLTA, 1997).

O ciclamato foi descoberto em 1937 por Michael Sveda, aluno de graduação da University of Illinois, Estados Unidos, que casualmente descobriu seu sabor adocicado, 30 vezes mais doce que a sacarose, sem o sabor amargo da sacarina. Inicialmente comercializado como adoçante artificial para diabéticos no ano de 1949, foi somente em 1959 que o Food and Drug Administration (FDA), adicionou o ciclamato à lista das substâncias reconhecidas como seguras para o consumo humano (AUDREIT & SVEDA, 1944; AHMED & THOMAS, 1992).

Acidentalmente, por J. M. Schlatter em 1965, nos Estados Unidos, quando se tentava desenvolver um sedativo para úlceras, foi descoberto

o aspartame, um dipeptídeo, composto por 2 aminoácidos: L-aspártico e éster metil da L-fenilalanina (RIPPER et al., 1986; KEMP, 2006).

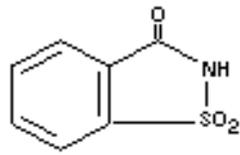
O acessulfame-K surgiu como resultado de pesquisas da empresa Hoechst, em Frankfurt, no ano de 1967. É um pó cristalino, branco e praticamente inodoro (BANNWART, 2006).

A sucralose foi desenvolvida em 1976 por pesquisadores da Tate & Lyle Specialty Sweeteners. É produzida sinteticamente a partir da sacarose (dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e uma de frutose) através da substituição de três grupos hidroxila por átomos de cloro. (LOOS et al., 2009).

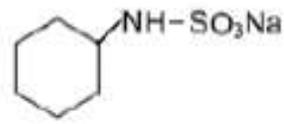
Desenvolvido por pesquisadores da Pfizer Inc. em 1980, o alitame é obtido a partir dos aminoácidos L-aspártico e D-alanina. O alitame tem seu uso permitido nos Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia (JECFA, 2006), México, China, Indonésia, Colômbia e Chile (AUERBACH et al., 2001). No Brasil, este edulcorante ainda não é permitido (BRASIL, 2008).

O neotame, o mais recente edulcorante, foi descoberto por NOFRE e TINTI, pesquisadores franceses, em projeto de pesquisa da The Nutrasweet Co, em 1990 (NOFRE & TINTI, 1990). É um derivado do aspartame, com sabor doce próximo ao da sacarose, sem residual amargo ou metálico e com dulçor que demora mais para ser atingido se comparado ao da sacarose, mas que permanece por um período mais longo, funcionando ainda como realçador de sabor (KEMP, 2006).

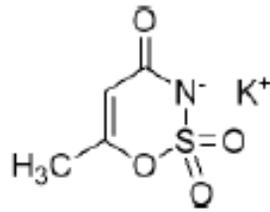
A Figura 2 ilustra a estrutura química desses edulcorantes.



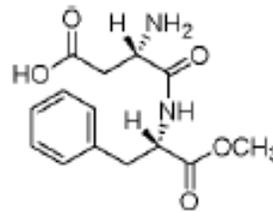
Sacarina



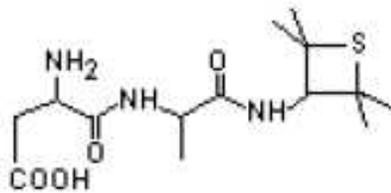
Ciclamato



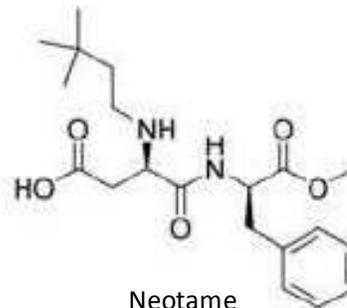
Acessulfame-k



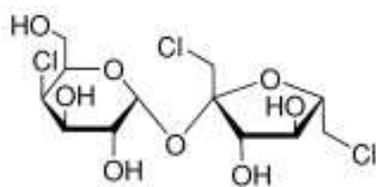
Aspartame



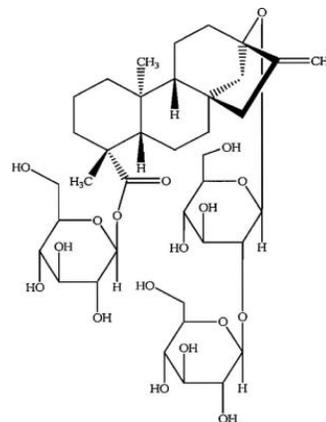
Alitame



Neotame



Sucralose



Estévia

Figura 2: Estrutura química dos edulcorantes (KEMP, 2006).

2.2. Características físico-químicas dos edulcorantes

Diversos fatores afetam o dulçor dos edulcorantes e diferentes métodos têm sido empregados na determinação do dulçor relativo. Nessas determinações, soluções de sacarose são utilizadas como padrão (dulçor igual a 1) e o dulçor dos demais edulcorantes são determinadas por testes organolépticos (FATIBELLO-FILHO et al., 1996).

A Tabela 1 apresenta o dulçor relativo de alguns edulcorantes, lembrando que esse dulçor sofre influência de diversos fatores, tais como padrão de sacarose utilizado, pH da solução e principalmente a sensibilidade de cada provador.

Tabela 1. Dulçor relativo de alguns edulcorantes.

Edulcorante	Dulçor relativo (sacarose = 1)
Acessulfame-K	180 – 200 (1)
Alitame	2000 (3)
Aspartame	180 – 200 (1)
Ciclamato	30 – 40 (1)
Estévia	300 (1, 2)
Neotame	6000 – 10000 (5)
Sacarina	400 – 500 (1)
Sucralose	600 (4)

1. FATIBELLO-FILHO et al., 1996; 2. GARDANA et al., 2010; 3. JECFA, 2006; 4. JENNER, 1989; 5. NOFRE & TINTI, 2000.

Pode-se observar que o neotame apresenta comparativamente aos demais edulcorantes o maior dulçor, seguido do alitame e sucralose, substâncias desenvolvidas com a finalidade de conferir sabor doce.

A Tabela 2 apresenta as diferentes condições de estabilidade desses edulcorantes.

Tabela 2. Diferentes condições de estabilidade dos edulcorantes.

Edulcorante	pH	Temperatura	Solubilidade em água	Solubilidade em outros solventes
Sacarina	Estável em uma ampla faixa de pH (2)	Estável em baixas e altas temperaturas, permanece inalterada após 1 hora a 150°C (2)	67g/L (25°C) (19)	Propilenoglicol, glicerol e etanol (19)
Estévia	Estável na faixa entre 2 – 10; abaixo de 1 ocorre significativa diminuição da concentração do esteviosídeo(10) Em pH alcalino se decompõe (2)	Boa estabilidade até 120°C; a 140°C decompõe-se (10)	1,25g/L (20°C) (10)	Solúvel em etanol (10)
Ciclamato	Estável em uma ampla faixa de pH (2)	Estável em altas e baixas temperaturas (2)	200g/L (20°C) (2)	Solúvel em álcool e propilenoglicol, (14); solubilidade limitada em óleos e solventes apolares (15)
Aspartame	Maior estabilidade na faixa de 3 – 5 e ótima a 4,3 (6) Acima de 6 ou abaixo de 1 sofre degradação (7)	Rápida degradação quando submetido à elevadas temperaturas (acima de 100°C, por tempo prolongado) (8)	10,2 g/L, (25°C) (5)	Solúvel em álcool e insolúvel em óleos e gorduras (9)
Acessulfame-k	Estável entre 3 -9, abaixo de 3 e acima de 9 sofre hidrólise de acordo com a temperatura (18)	Vida de prateleira quase ilimitada à T _{amb} (2) Sofre decomposição se submetido a T superiores a 200°C por muito tempo (2)	270g/L (20°C) e 1330 g/L (100°C) (3)	Parcialmente solúvel em metanol (1)
Sucralose	Estável na faixa 1,5 – 10 e ótima a 5 (12)	Estável nas temperaturas utilizadas nos processamentos de alimentos (2)	280g/L (20°C) (4)	Solúvel em etanol e metanol (16) e insolúvel em óleos (17)
Alitame	Estável entre 5 - 8 por até um ano, a T _{amb} (4) Menos estável na faixa 2- 4 (2)	Estável sob aquecimento (2)	-	Solúvel em metanol, etanol, propilenoglicol, clorofórmio e N-heptano e insolúvel em solventes lipofílicos (13)
Neotame	Maior entre 3 – 5,5 e ótima a 4,5 (11)	Estável sob aquecimento (11)	12,6 g/L (25°C) (11)	Solúvel em etanol (2)

1. LIPINSKI & HANGER, 2001; 2. KEMP, 2006; 3. NABORS & GELARDI, 2001; 4. CÂNDIDO & CAMPOS, 1996; 5. RIPPER et al., 1986; 6. FERNÁNDEZ, 1990; SABAH & SCRIBA., 1998; STARGEL et al., 2001; 7. STENBERG et al., 2001; 8. FATIBELLO-FILHO, 1996; 9. FENG et al., 1999; 10. KROYER, 1999; 11. WITT, 1999; NOFRE & TINTI, 2000; 12. GRICE & GOLDSMITH, 2000; 13. JECFA, 2006; AUERBACH et al., 2001; 14. MEDEIROS et al., 2008; SAIN & BERMAN, 1984; 15. BOPP & PRICE, 2001; 16. JENNER, 1989; 17. BANNWART, 2006; 18. ADOÇANTES CALÓRICOS E NÃO CALÓRICOS PARTE II, 2010; 19. DZIEZAK, 1986; FERNÁNDEZ, 1990; POLASA, 1995.

A sacarina é encontrada sob três diferentes formas: sacarina ácida, sacarina sódica e sacarina de cálcio, sendo a sacarina de sódio a mais freqüentemente utilizada em alimentos por apresentar melhor solubilidade do que a sacarina ácida (CANTARELLI et al., 2009). A forma cálcica pode, entretanto, ser uma opção interessante para efeito de declaração de ausência de sódio (NABORS & GELARDI, 2001). Uma das principais vantagens da sacarina é a sua estabilidade em temperaturas altas e em meio ácido, sem perda de suas propriedades (BAKAL, 1987). Somente em condições extremas de temperatura e pH, por tempos prolongados de exposição, ocorre hidrólise da molécula, produzindo os ácidos 2-sulfobenzóico e 2-sulfanoil benzóico (STAMP, 1990; MONTIJANO et al., 1998; NABORS & GELARDI, 2001). Em elevadas concentrações pode deixar um sabor residual amargo, metálico (BASTIN, 2007; GARCÍA-JIMENEZ, 2007). Atualmente é utilizada como adoçante de mesa e na formulação de geléias e recheios, gelatinas, frutas processadas, gomas de mascar, molhos, refrigerantes e sucos (GOLBERG et al., 1983; NABORS & GELARDI, 2001; KROWECH et al., 2003).

A estévia tem sua aplicação industrial limitada em alguns segmentos, devido ao seu sabor amargo residual e sua baixa solubilidade (GOTO & CLEMENTE, 1998). Entre as aplicações dos glicosídeos de esteviol, podem ser citados: refrigerantes, bebidas acidificadas em geral, balas e confeitos, gomas de mascar, sorvetes, iogurtes, gelatinas, sobremesas em geral e adoçantes de mesa (ALMEIDA-MURADIAN & PENTEADO, 1990; GIESE, 1993; CARDELLO & DAMÁSIO, 1997).

O ciclamato pode aparecer na composição dos alimentos sob três diferentes formas: ciclamato de sódio, ciclamato de cálcio e ácido ciclâmico. O ciclamato de sódio é a forma mais utilizada, embora o uso do sal de cálcio seja apropriado para produtos com restrição de sódio,

assim como ocorre no caso da sacarina (BANNWART, 2006). É muito utilizado em produtos a base de frutas uma vez que tem a propriedade de mascarar a acidez excessiva e de realçar o sabor frutal, e também em gelatinas, geléias, iogurtes, cereais matinais, sorvetes, sobremesas, confeitos, molhos, defumados e embutidos (FERNÁNDEZ, 1990; SCHIFFMAN et al., 1995; PORTMANN & KILCAST, 1998).

O perfil de sabor do aspartame é descrito como limpo e doce, assim como o da sacarose, sem sabor residual amargo ou metálico normalmente associados a certos edulcorantes como acessulfame-K, ciclamato e sacarina (MONTIJANO et al., 1998; BUTCHKO et al., 2001). Esse edulcorante apresenta também a propriedade de realçar e estender determinados sabores, especialmente os de frutas, como laranja, limão e grapefruit, sendo este efeito mais pronunciado no caso de sabores naturais do que sintéticos. Em contrapartida, alguns sabores indesejáveis podem ser também realçados pelo aspartame, como é o caso do amargor característico de certos tipos de cacau (BUTCHKO et al., 2001; NABORS & GELARDI, 2001). Sua principal desvantagem é sua rápida degradação quando submetido a elevadas temperaturas. Esse fator limita seu uso em produtos que necessitem de aquecimento acima de 100°C durante muito tempo, tais como bolos, pães, biscoitos e bolachas (FATIBELLO-FILHO, 1996). Entretanto, suporta processamento térmico a alta temperatura, por curto período de tempo, como é o caso de certos produtos lácteos e sucos. É rotineiramente utilizado em refrigerantes (geralmente de forma combinada), doces, gomas de mascar, sobremesas, iogurtes, bebidas lácteas, produtos a base de cereais e sorvetes (FENG et al., 1999).

O fato de ser um peptídeo torna o aspartame suscetível à hidrólise sob certas condições de umidade, temperatura e pH, gerando os aminoácidos fenilalanina, ácido aspártico e metanol como produtos da reação (BARRADO, et al., 2006). Por essa razão, tem seu uso

restringido para pessoas que apresentam a doença metabólica fenilcetonúria. O aspartame fornece 4Kcal/g mas, em virtude do seu poder edulcorante ser igual a 200 (a sacarose é 200 vezes menos doce) e da baixa quantidade ingerida, seu valor torna-se desprezível (WELLS, 1989).

Embora em soluções aquosas concentradas de acessulfame-k, um sabor amargo seja percebido, em baixas concentrações, como as normalmente utilizadas em alimentos, este efeito é praticamente desprezível (von RYMON LIPINSKY & HANGER, 2001). O sabor amargo é geralmente percebido quando se utiliza o acessulfame-K como único edulcorante, já que neste caso dosagens maiores são necessárias, em comparação às empregadas ao se utilizar combinações de edulcorantes (McQUILLAN et al., 1995). O acessulfame-k exibe sinergismo quando combinado com aspartame e ciclamato, mas não com a sacarina (KEMP, 2006). Esse edulcorante se apresenta estável sob as condições normalmente empregadas no processamento e estocagem de alimentos, incluindo exposição prolongada em meio ácido, pasteurização, esterilização, fermentação e forneamento (WOLFHARD & von RYMON LIPINSKI, 1985; MONTIJANO et al., 1998). É muito utilizado em adoçantes de mesa, pudins, sobremesas, produtos panificados, refrigerantes, doces e conservas, além de produtos para higiene bucal e farmacêuticos (SCHIFFMAN et al., 1995; PORTMANN & KILCAST, 1998).

Em solução, a sucralose é lentamente hidrolisada a unidades monossacarídicas, em condições extremas de temperatura e pH, geralmente não encontradas no processamento e estocagem de alimentos. Este edulcorante não sofre reação de Maillard e pode ser utilizado em produtos esterilizados, pasteurizados e forneados. É muito estável em formulações secas, como refrescos em pó, sobremesas e adoçantes de mesa, mantendo sua estabilidade por cerca de 4 anos, a 20°C (CÂNDIDO & CAMPOS, 1996). Segundo HOOD & CAMPBELL

(1990), perdas da ordem de 10 a 15% da concentração inicial de sucralose são necessárias para acarretar redução perceptível de dulçor nos alimentos que a contêm.

A sucralose apresenta efeito sinérgico positivo quando utilizada com ciclamato e acessulfame-K, não possui sabor residual amargo ou metálico, seu efeito tempo intensidade é semelhante ao da sacarose e sua doçura é de percepção rápida e ligeiramente mais prolongada que a da sacarose (CÂNDIDO & CAMPOS, 1996). A quantidade de sucralose a ser empregada nas formulações dos alimentos depende das características do próprio alimento, tais como pH e viscosidade. Quanto menor o pH maior a doçura relativa (CÂNDIDO & CAMPOS, 1996). É aplicável em uma ampla gama de alimentos, tais como bebidas em geral (incluindo café e chás), bolos, pães, enlatados, gomas de mascar, confeitos, molhos para salada, produtos lácteos, sobremesas congeladas, produtos instantâneos, frutas processadas, geléias, xaropes e adoçantes de mesa (GRICE & GOLDSMITH, 2000; GOLDSMITH & MERKEL, 2001). Por ser uma molécula extremamente estável, não reage com quaisquer componentes dos alimentos tais como ácidos, estabilizantes, aromas e corantes, o que permite seu uso em qualquer etapa do processo de fabricação do alimento (ESTELLER, 2004).

O alitame pode ser utilizado em sinergia com acessulfame-K, ciclamato, sacarina ou outros edulcorantes (AUERBACH et al., 2001) e tem doçura mais duradoura que a da sacarose, sem sabor residual (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996; KEMP, 2006). Uma das desvantagens do alitame é a susceptibilidade em reagir com outros componentes dos alimentos em sistemas líquidos ou semi-líquidos sob aquecimento, especialmente em presença de elevados níveis de açúcares redutores como a glicose e a lactose, podendo formar produtos da reação de Maillard e, conseqüentemente, causando perda do dulçor (KEMP, 2006). Tem aplicação em produtos panificados, bebidas quentes e frias, pós

para preparo de refresco, sobremesas, adoçantes de mesa, gomas de mascar, confeitos, produtos de higiene pessoal e farmacêuticos (GRENBY, 1995), além de balas moles e duras e alimentos pasteurizados (AUERBACH et al., 2001).

O neotame apresenta um sabor doce semelhante à sacarose, sem o indesejável sabor amargo ou metálico presente em outros edulcorantes artificiais. Estruturalmente similar ao aspartame, entretanto não é contra-indicado aos fenilcetonúricos porque a quantidade de fenilalanina produzida durante a digestão não afeta o organismo. Fornece 1,4 kcal/g e por ser 8000 vezes mais doce em relação à sacarose, seu uso é possível em quantidades muito diminutas, o que torna seu valor energético desprezível (NOFRE & TINTI, 2000).

É um edulcorante quimicamente inerte para açúcares redutores e aldeídos, o que permite sua utilização conjunta a esses açúcares (tais como glicose, frutose, xarope de milho com alto teor de frutose, maltose, lactose) e agentes de saborizantes baseados em constituintes aldeídicos (tais como baunilha, cereja, limão, canela, amêndoa). Algumas aplicações típicas ocorrem em adoçantes de mesa, iogurtes, pós para o preparo de bebidas, bebidas carbonatadas, bolos e gomas de mascar (NOFRE & TINTI, 2000).

Nenhuns desses edulcorantes são metabolizados pelas bactérias presentes na cavidade oral, o que os torna não-cariogênicos e possibilita seu uso também em cremes dentais e produtos de higiene bucal (ZYGLER et al., 2009).

Alguns fatores podem influenciar na percepção do gosto dos edulcorantes como a idade, o ambiente, região geográfica e a cultura (KEMP, 2006). Além disso, a percepção do sabor doce está associada a uma grande e complexa variedade de aromas e outros sabores. Deste modo, as propriedades sensoriais e físico-químicas de cada alimento como um todo influenciam diretamente no tipo e na quantidade de

edulcorantes a serem utilizados (REDLINGER & SETSER, 1987; SALMINEN & HALLIKAINEN, 1990).

2.3. Sinergismo entre edulcorantes

Uma prática comum na indústria de alimentos é a mistura de edulcorantes em um mesmo alimento, trazendo uma sinergia de dulçor que permite o uso de níveis mais baixos de cada um individualmente, geralmente levando a um custo menor e ainda melhorando o sabor doce, resultando em um produto final de melhor qualidade.

Corretamente formulados, os *blends* de edulcorantes podem reproduzir a textura e o perfil de dulçor da sacarose, além de criar novos produtos caracterizados por dulçor original e melhor estabilidade de sabor. Além disso, verificou-se que a mistura de um edulcorante com outro geralmente produz uma mistura não só de sabor mais equilibrado, mas também mais doce do que a soma algébrica dos componentes (HUANG et al., 2006; ZYGLER et al., 2009).

Este comportamento é observado para a sacarina, utilizada na forma de sal de sódio ou de cálcio, um adoçante caracterizado pelo rápido início (em relação ao sabor), persistência curta e amarga e *after-taste* metálicos. Este sabor amargo metálico se torna mais perceptível com o aumento da concentração.

Em concentrações usuais, o sabor é detectável em aproximadamente 25% da população. Um meio de reduzir ou eliminar esse sabor é a mistura de sacarina com outros edulcorantes, como por exemplo o aspartame, o ciclamato ou a sucralose, sendo possível manter a concentração de sacarina abaixo do seu limite de amargor (CAPITAN-VALLEY et al., 2006).

WELLS (1989) afirma que o ciclamato reduz o gosto amargo residual da sacarina quando associado a ela. Os edulcorantes sacarina e

ciclamato são muito utilizados associados em diferentes proporções, em função do sinergismo proporcionado. No Brasil existem diversos adoçantes de mesa com esta composição, sendo que os mais vendidos possuem a proporção de duas partes de ciclamato para uma de sacarina (CARDELLO et al, 2000; ZYGLER et al., 2009).

2.4. Segurança e toxicidade dos edulcorantes

A segurança de um edulcorante é de extrema importância, portanto são necessários rigorosos testes para que seu uso seja aprovado em alimentos (MORAES, 2008). Os edulcorantes têm seu uso autorizado apenas depois de adequada avaliação toxicológica e esse uso deve ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e ao menor nível necessário para alcançar o efeito desejado (BRASIL, 1997).

A Tabela 3 contém a Ingestão Diária Aceitável (IDA) segundo a Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), para a maioria dos edulcorantes utilizados pela indústria de alimentos.

Tabela 3 - Ingestão Diária Aceitável (IDA) para edulcorantes.

Edulcorante	IDA (mg/kg de peso corpóreo)
Acessulfame-K	0 - 15
Alitame*	0 - 1
Aspartame	0 - 40
Ciclamato	0 - 11
Glicosídeos de esteviol	0 - 4
Neotame	0 - 2
Sacarina	0 - 5
Sucralose	0 - 15

*Fonte: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 2008. *Nos países onde é permitido.*

A sacarina é absorvida de forma incompleta pelo organismo, não é metabolizada e é rapidamente excretada de forma inalterada, principalmente através da urina, tanto por seres humanos como por animais de laboratório (FERNÁNDEZ, 1990; NABORS & GELARDI, 2001). Alguns estudos associam a sacarina ao câncer de bexiga em ratos. No entanto, os resultados a partir de estudos de carcinogenicidade subsequentes não mostraram evidências consistentes de associação entre o consumo de sacarina e câncer em animais de teste (KROWECH et al., 2003) e em 2001 a sacarina foi retirada da lista de potenciais cancerígenos nos EUA (SCHEURER et al., 2009). Hoje em dia a sacarina é aprovada em mais de 90 países em todo o mundo e é amplamente utilizada na formulação de diversos produtos farmacêuticos e alimentares (CARLONI-FILHO et al., 2003).

Por causa de seu consumo crescente, a toxicologia da estévia tem sido largamente estudada. CARDOSO et al. (1996), concluiu que o esteviol é o principal metabólito do esteviosídeo e que, embora o esteviosídeo pareça não ter importância toxicológica, o esteviol poderia desempenhar um papel na mutagênese e atividades genotóxicas em diferentes sistemas (PEZZUTTO et al., 1985; MATSUI et al., 1996a, b; TERAÍ et al., 2002). Alguns autores observaram alterações histopatológicas no fígado de ratos tratados com esteviosídeo (NUNES et al., 2007); baixa toxicidade oral em camundongos, ratos, hamsters (TOSKULKAO, 1997); e lesões no DNA periférico de células sanguíneas, bem como do fígado, cérebro e baço (NUNES et al., 2007). Enquanto isso, outros estudos não encontraram atividade mutagênica (SUTTAJIT et al., 1993; KLONGPANICHPACK et al., 1997).

O ciclamato é excretado inalterado na urina e nas fezes. No entanto, desde que o ciclamato ou seus sais participam da dieta por um período de tempo longo, algumas pessoas podem metabolizar o ciclamato, transformando-o em ciclohexilamina através de um

microorganismo presente no cólon e no reto. Existem diferenças individuais em relação à capacidade das pessoas em realizar essa conversão: mais de 70% da população humana é incapaz de metabolizar o ciclamato, enquanto apenas 3 a 5% da população metaboliza mais de 20% de sua ingestão diária. Além disso, há também considerável variabilidade intra-individual relacionadas com o trânsito intestinal, dentre outros fatores. No entanto, estudos mais recentes sugerem que nem o ciclamato nem a ciclohexilamina têm exibido efeitos tóxicos em seres humanos ou animais usados em experimentos, como ratos, camundongos, macacos, cães ou hamsters (CASALS et al., 1996).

O ciclamato é proibido nos EUA desde 1970, mas espera reaprovação pela FDA (SCHEURER et al, 2009). Em 2000, a Agência Europeia de Segurança Alimentar publicou seu parecer sobre a segurança do ciclamato e da ciclohexamina, afirmando que os dados epidemiológicos disponíveis não revelaram indícios de efeitos nocivos sobre os parâmetros de reprodução humana e o ciclamato continuou sendo utilizado como aditivo alimentar (EFSA, 2000).

O aspartame é metabolizado no organismo, sendo digerido como qualquer dipeptídeo. As esterases intestinais hidrolisam o metiléster e as peptidases liberam os aminoácidos. Uma pequena quantidade do dipeptídeo desmetilado entra pelo sistema de transporte dos dipeptídeos, consegue entrar nos enterócitos e em seguida as enzimas proteolíticas das células da mucosa completam a hidrólise. Ao final, ingressam no sistema porta: L-fenilalanina, ácido aspártico e metanol. Esses compostos são utilizados pelo organismo da mesma forma de quando são oriundos de outros alimentos tais como carne, leite, frutas e vegetais (SCHOR et al., 1993 *apud* TOZETTO, 2005).

A fenilalanina resultante de seu metabolismo torna obrigatória, na rotulagem dos alimentos contendo este edulcorante, o alerta a indivíduos portadores da fenilcetonúria (NEWSOME, 1986). Esta

enfermidade é caracterizada pela deficiência de fenilhidroxilase (enzima que tranforma a fenilalanina em tirosina, como primeira etapa de sua degradação) e pode causar alterações cerebrais, caso a dieta não seja controlada (STEGINK, 1987). Outra preocupação associada ao consumo do aspartame diz respeito à liberação de metanol durante seu metabolismo, uma vez que a ingestão de quantidades elevadas deste composto pode causar uma série de efeitos adversos, incluindo acidose metabólica e cegueira. Entretanto, conforme relatado por STEGINK (1987), diversos estudos com animais de laboratório e seres humanos demonstraram que a quantidade de metanol resultante do consumo do edulcorante é muito menor que a advinda da dieta. Por exemplo, um copo de leite desnatado contém 6 vezes mais fenilalanina e 13 vezes mais ácido aspártico, e um copo de suco de tomate contém 6 vezes mais metanol que a mesma quantidade equivalente de bebida adoçada 100% com aspartame (BUTCHKO, 2001). Em seu documento de março de 2009 a Agência Européia de Segurança Alimentar não encontrou quaisquer indícios de potencial genotóxico ou carcinogênico do aspartame (EFSA, 2009; ZYGLER et al., 2009).

O acessulfame-K não é metabolizado, portanto não afeta as funções normais do organismo. É absorvido no intestino, sua concentração no sangue aumenta rapidamente após a ingestão e, uma vez que é excretado, não se acumula no organismo. Estudos farmacocinéticos mostraram que a excreção, além de rápida, é total (CANTARELLI et al., 2009). Não existem problemas associados ao consumo de acessulfame-k, apesar de seu uso extensivo em muitos países (KROGER et al., 2006).

A sucralose é permitida para utilização em mais de 60 países e tem sido consumida por milhões de pessoas em todo o mundo (FERRER & THURMAN, 2010). As questões relativas à segurança da sucralose são discutidas principalmente pela presença de três átomos de cloro em sua

molécula, o que a torna um organoclorado e muitos desses compostos são tóxicos ou cancerígenos (por exemplo, pesticidas e dioxinas). No entanto, estudos em seres humanos e animais têm mostrado que este adoçante não oferece risco carcinogênico, reprodutivo ou neurológico, uma vez que a molécula é excretada de forma inalterada (KROGER et al., 2006).

O alitame é hidrolisado no organismo humano, sendo que uma parte é excretada nas fezes, outra na urina e o ácido aspártico metabolizado (KEMP, 2006). Após vários estudos foi considerado seguro ao consumo humano pela Food And Drug Administration (FDA).

O neotame é rapidamente metabolizado pelo organismo humano, tendo como principal rota a hidrólise do grupo metil éster por esterases presentes no organismo, resultando em neotame desesterificado (principal metabólito) e quantidade insignificante de metanol, se comparada às quantidades derivadas de alimentos comuns da dieta tais como frutas e vegetais. O edulcorante é completamente eliminado na urina e nas fezes, não se acumulando no organismo. A quantidade desprezível de fenilalanina liberada no metabolismo do neotame torna desnecessária a declaração da sua presença na rotulagem dos alimentos aos quais é adicionado (THE NUTRASWEET CO, 2005). Uma extensiva série de testes efetuados com animais de laboratório, bem como ensaios clínicos com seres humanos utilizando doses de neotame muito superiores aos níveis projetados para consumo humano, demonstraram ausência de toxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade e também não foram observados efeitos farmacológicos em órgãos em geral (THE NUTRASWEET CO, 2005).

3. LEGISLAÇÃO

Segundo a legislação brasileira alguns alimentos para uso especial são classificados como diet, light e zero (BRASIL, 1998a e 1998b):

- ✓ Alimentos “diet”: são aqueles específicos para dietas alimentares com restrição de nutrientes, como carboidratos, gorduras, proteínas e sódio. Também fazem parte deste grupo os alimentos para controle de peso e para dietas de ingestão controlada de açúcares.
- ✓ Alimentos “light”: são alimentos com redução de 25% de um determinado nutriente, quando comparados ao alimento convencional.
- ✓ Alimentos “zero”: são alimentos isentos de um determinado nutriente.

Ainda segundo a legislação, adoçantes de mesa são os produtos especificamente formulados para conferir o sabor doce aos alimentos e bebidas (BRASIL, 1998) e são considerados alimentos para fins especiais, conforme define a legislação brasileira: “alimentos especialmente formulados ou processados, nos quais se introduzem modificações no conteúdo de nutrientes, adequados à utilização em dietas diferenciadas e ou opcionais, atendendo às necessidades de pessoas em condições metabólicas e fisiológicas específicas” (BRASIL, 1998a).

3.1. Regulamentação

A regulamentação do emprego dos aditivos é realizada, nos Estados Unidos, pela Food and Drug Administration (FDA) e no Brasil, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Em 1962, foi criado o Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), cujo objetivo é avaliar sistematicamente o potencial tóxico, a mutagenicidade e carcinogenicidade dos aditivos alimentares e fornecer esses dados aos países membros (MORAES, 2008).

Em 2008, a Resolução – RDC nº 18 de 24 de março de 2008 estabeleceu os limites máximos para o uso de edulcorantes em

alimentos e bebidas (BRASIL, 2008). Estes valores são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Limites máximos para adição de edulcorantes em alimentos e bebidas no Brasil.

Aditivo	Alimento	Limite máximo g/100g ou g/100mL
Acessulfame de potássio	Alimentos e bebidas para controle de peso, para dietas com ingestão controlada de açúcares, para dietas com restrição de açúcares.	0,035
	Alimentos e bebidas com informação nutricional complementar	
	Com substituição total de açúcares	0,035 (1)
	Com substituição parcial de açúcares	0,026
Aspartame	Alimentos e bebidas para controle de peso, para dietas com ingestão controlada de açúcares, para dietas com restrição de açúcares.	0,075
	Alimentos e bebidas com informação nutricional complementar	
	Com substituição total de açúcares	0,075 (2)
	Com substituição parcial de açúcares	0,056
Ácido ciclâmico e seus sais de cálcio, potássio e sódio	Alimentos e bebidas para controle de peso, para dietas com ingestão controlada de açúcares.	0,04
	Alimentos e bebidas para dietas com restrição de açúcares, com informação nutricional complementar: com substituição total de açúcares.	0,04 (3)
	Alimentos e bebidas com informação nutricional complementar: com substituição parcial de açúcares	0,03 (4)
Aditivo	Alimento	Limite máximo g/100g ou g/100mL
Sacarina e seus sais de cálcio, potássio e sódio	Alimentos e bebidas para controle de peso, para dietas com ingestão controlada de açúcares, para dietas com restrição de açúcares.	0,015
	Alimentos e bebidas com informação nutricional complementar	
	Com substituição total de açúcares	0,015 (5)
	Com substituição parcial de açúcares	0,01
Sucralose	Alimentos para controle de peso, para dietas com ingestão controlada de açúcares, para dietas com restrição de açúcares.	0,04
	Alimentos com informação nutricional complementar	

	Com substituição total de açúcares	0,04 (6)
	Com substituição parcial de açúcares	0,03
	Bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas para controle de peso, para dietas com ingestão controlada de açúcares, dietas com restrição de açúcares, com informação nutricional complementar: com substituição total de açúcares.	0,025
	Bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas com informação nutricional complementar: com substituição parcial de açúcares	0,02
Glicosídeos de esteviol	Alimentos e bebidas para controle de peso, para dietas com ingestão controlada de açúcares, para dietas com restrição de açúcares.	0,06
	Alimentos e bebidas com informação nutricional complementar	
	Com substituição total de açúcares	0,06 (7)
	Com substituição parcial de açúcares	0,045
Neotame	Alimentos e bebidas para controle de peso	0,0033
	Alimentos e bebidas para dietas com ingestão controlada de açúcares e para dietas com restrição de açúcares.	0,0065
	Alimentos e bebidas com informação nutricional complementar	
	Com substituição total de açúcares	0,0065 (8)
	Com substituição parcial de açúcares	0,0049

(1) Exceto para gomas de mascar e micro pastilhas de sabor intenso, com limites máximos de 0,5g/100g e de 0,25g/100g, respectivamente. (2) Exceto para gomas de mascar e micro pastilhas de sabor intenso, com limites máximos de 1,0g/100g e de 0,6g/100g, respectivamente. (3) Exceto para bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas, com limite máximo de 0,075g/100mL. (4) Exceto para bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas, com limite máximo de 0,056g/100mL. (5) Exceto para gomas de mascar com limite máximo de 0,12g/100g. (6) Exceto para gomas de mascar e micro pastilhas de sabor intenso, com limites máximos de 0,3g/100g e de 0,24g/100g, respectivamente. (7) Exceto para gomas de mascar, com limite máximo de 0,24g/100g. (8) Exceto para gomas de mascar e micro pastilhas de sabor intenso, ambos com limite máximo de 0,1g/100g. Exceto para gomas de mascar, com limite máximo de 0,24g/100g (Retificação de 14 de Abril de 2008).

Fonte: BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde, 2008.

São permitidos ainda, pela Anvisa (2008), sorbitol, xarope de sorbitol, manitol, isomaltitol, taumatina, maltitol, xarope de maltitol, lactitol, xilitol e eritritol. Para estes edulcorantes não há um limite de uso, sendo sua especificação "quantum satis" (BRASIL, 2008), ou seja, o quanto for suficiente para a aplicação desejada.

4. MÉTODOS DE ANÁLISE

Métodos analíticos que assegurem o controle de qualidade e a integridade dos produtos são essenciais na identificação e quantificação dos edulcorantes em alimentos, por permitirem a fiscalização dos alimentos pelos órgãos regulamentadores, garantindo assim a segurança do consumidor. Também são importantes para o desenvolvimento de pesquisas na área.

Uma grande variedade de métodos têm sido aplicados para a análise dos edulcorantes. Dentre eles encontram-se os espectrofotométricos (FATIBELLO-FILHO et al., 1998; CANTARELLI et al., 2008; CANTARELLI et al., 2009; NI et al. 2009), espectrométricos (YEBRA et al., 1995; SOUSA et al, 2006), potenciométricos (MEDEIROS et al., 2008; CARLONI-FILHO et al., 2003), bioamperométricos (ASSUMPÇÃO et al., 2008), amperométricos (VILLARTA et al., 1993) e espectroscópicos (ARMENTA et al., 2004; TOZETTO, 2005; TOZETTO et al., 2007; HEARN & SUBEDI, 2009). Essas técnicas, embora sejam rápidas, estão sujeitas a interferência de diferentes compostos e, além disso, muitas vezes limitam-se à determinação de apenas um edulcorante.

Pelo fato de geralmente serem utilizados combinados, os edulcorantes necessitam de métodos de análise capazes de determinar simultaneamente os diferentes edulcorantes utilizados nos alimentos e bebidas. Os métodos de separação atendem mais a este propósito, pois permitem a determinação simultânea de diversos compostos. A necessidade de analisar esses compostos em uma variedade tão grande de matrizes resultou no desenvolvimento de diferentes métodos cromatográficos (PIETRA et al., 1990).

Dentre as técnicas de separação foram desenvolvidas metodologias por cromatografia a gás - CG (NAKAIE et al., 1999; FARHADI et al., 2003; HASHEMI et al., 2010), cromatografia iônica

(CHEN et al., 1997; CHEN e WANG, 2001; ZHU et al., 2005), eletroforese capilar (WALKER et al., 1997; HORIE et al., 2007, BERGAMO, et al., 2011). No entanto a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (CASALS et al, 1996; AQUINO et a.l, 2004; DEMIRALAY et al., 2006; DOSSI et al., 2006; LINO e PENA, 2010; ZYGLER et al., 2010; CHENG & WU, 2011; HASHEMI et al., 2011; KRITSUNANKULA & JAKMUNEEB, 2011; WANG et al. 2011), a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) (DIAS, 2011; GARDANA & SIMONETTI, 2010; SHERIDAN & KING, 2008) e líquida acoplada a detector de massas – LC/MS (HUANG et al., 2006; LOOS et al., 2009; SCHEURER et al., 2009; FERRER & THURMAN, 2010; ZYGLER et al., 2010) são as preferidas por pesquisadores. Apenas a cromatografia líquida acoplada a detector de massas permite a determinação de até sete ou nove compostos diferentes, porém demanda equipamentos de maior custo e exige especialização do analista, tornando onerosa sua aplicação em análises de rotina em indústrias de alimentos (WASIK et al., 2007; YANG & CHEN, 2009).

Na grande maioria dos métodos desenvolvidos utiliza-se colunas de fase reversa com fases móveis aquosas acidificadas, e para os métodos de detecção simultânea, a eluição por gradiente. Uma das grandes dificuldades é o comprimento de onda utilizado para a detecção desses compostos, no qual geralmente aparecem diferentes interferentes presentes na matriz. Tanto a estévia quanto a sucralose não são detectáveis nos equipamentos mais comumente empregados (detector de UV-visível), necessitando de detectores de índice de refração (LOOS et al., 2009; FERRER & THURMAN, 2010).

Portanto, um método desenvolvido para HPLC deve ser capaz de separar, identificar e quantificar os diferentes edulcorantes presentes em um mesmo alimento para poder ser utilizado em análises de rotina.

5. BIBLIOGRAFIA

ADOÇANTES CALÓRICOS E NÃO CALÓRICOS PARTE II. Revista Food Ingredients, v. 15, p. 22-35, 2010. Autor desconhecido. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/154.pdf>. Acesso em novembro de 2011.

AHMED, F. E.; THOAS, D. B. Assessment of the carcinogenicity of the nonnutritive sweetener cyclamate. **Critical Reviews in Toxicology**, v.22, p. 81-118, 1992.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; PENTEADO, M. V. C. Edulcorantes em alimentos - uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n. 1/2, p.1-11, 1990.

AQUINO, F. W. B.; AMORIM, A. G. N.; PRATA, L. F.; NASCIMENTO, R. F. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.1, p. 32-38, 2004.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; LA GUARDIA, M. FTIR Determination of Aspartame and Acesulfame-K in Tabletop Sweeteners. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 7798-7803, 2004.

ASSUMPÇÃO, H. M. T.; MEDEIROS, R. A.; MADI, A.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um procedimento biamperométrico para determinação de sacarina em produtos dietéticos. **Química Nova**, v. 31, p. 1743 – 1746, 2008.

AUDREIT, L. F.; SVEDA, M. Preparation and properties of some N-substituted Sulphamic acids. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 9, p. 89-101, 1944.

AUERBACH, M. H.; LOCKE, G.; HENDRICK. Alitame. In: NABORS, L.O. **Alternative Sweeteners**, 3ed, revisado e expandido, Suíça, Marcel Dekker, p.31-40, 2001.

BAKAL, A. I. Saccharin functionality and safety. **Food Technology**, v. 41, n. 1, p.117-118, 1987.

BANNWART, G. C. M. C. **Aplicação de neotame em catchup: avaliação de desempenho e estimativa de ingestão**. 2006. 234 f.

Tese de doutorado em Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.

BARRADO, E.; RODRÍGUEZ, J. A.; CASTRILLEJO, Y. Renewable stationary phase liquid magnetochromatography: determining aspartame and its hydrolysis products in diet soft drinks. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 7, p. 1233-1240, 2006.

BASTIN, S. Nonnutritive sweeteners. Revista UK Cooperative extension service. University of Kentucky College of agriculture.

BERGAMO, A. B.; SILVA, J. A. F.; JESUS, D. P. Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-k in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1714-1717, 2011.

BOPP, B. A.; PRICE, P. Cyclamate. In: NABORS, L.O. Alternative Sweeteners, 3ed, revisado e expandido, Suíça, Marcel Dekker, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. **Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares**. Diário Oficial da União, Brasília, 1997.

BRASIL. Portaria nº 38, de 13 de janeiro de 1998. **Regulamento Técnico referente a Adoçantes de mesa**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 30 de março de 1998. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/38_98.htm. Acesso em outubro de 2011.

BRASIL. Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998 (Versão Republicada 30.03.1998). Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos para fins especiais**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 30 de março de 1998a. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/29_98.htm. Acesso em outubro de 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde. Portaria nº 27 de 13 de janeiro de 1998. **Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes)**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 16 de janeiro de 1998b. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/27_98.htm. Acesso em outubro de 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde. . Resolução RDC nº 18, de 24 de março de 2008. **Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos**. Diário Oficial da União, Brasília, 2008.

BUTCHKO, H. H.; STARGEL, W. W.; COMER, C. P.; MAYHEL, D. A.; ANDRESS, S.E. **Aspartame**. In: Nabors, L.O'B (ed.) *Alternative Sweeteners*, 4rd. edition, Marcel Dekker Inc., New York, 2001.

CÂNDIDO, L. M. B., CAMPOS, A. M. **Alimentos para fins especiais: Dietéticos**. Livraria Varela, São Paulo, p.170-212, 1996.

CANTARELLI, M. A.; PELLERANO, R. G.; MARCHEVSKY, E. J.; CAMINA, J. M. Simultaneous determination of saccharin and aspartame in commercial noncaloric sweeteners using the PLS-2 multivariate calibration method and validation by capillary electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9345–9349, 2009.

CANTARELLI, M. A.; PELLERANO, R. G.; MARCHEVSKY, E. J.; CAMINA, J. M. Simultaneous determination of aspartame and acesulfame-K by molecular absorption spectrophotometry using multivariate calibration and validation by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 1128–1132, 2009.

CAPITÁN-VALLVEY, L. F.; VALENCIA, M. C.; NICOLÁS, E. A.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. F. Resolution of an intense sweetener mixture by use of a flow injection sensor with on-line solid-phase extraction Application to saccharin and aspartame in sweets and drinks. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 2, p. 385 – 391, 2006.

CARDELLO, H. M. A. B.; DAMÁSIO, M. H. Edulcorantes e suas características:revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, n.2, p.241-248, 1997.

CARDELLO, H. M. A. B.; SILVA, M. A. A.P.; DAMASIO, M. H. Análise descritiva quantitativa de edulcorantes em diferentes concentrações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 318 - 328, 2000.

CARLONI-FILHO, J.; SANTINI, A. O.; NASSER, A. L. M.; PEZZA, H. R.; OLIVEIRA, J. E.; MELIOS, C. B.; PEZZA, L. Potentiometric determination of saccharin in commercial artificial sweeteners using a silver electrode. **Food Chemistry**, v. 83, n. 2, p. 297-301, 2003.

CASALS, I.; REIXACH, M.; AMAT, J.; FUENTES, M.; SERRA-MAJEM, L. Quantification of cyclamate and cyclohexylamine in urine samples using high-performance liquid chromatography with trinitrobenzenesulfonic acid pre-column derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 750, n. 1/2, p. 397-402, 1996.

CHEN, O.; MOU, S.; LIU, K.; YANG, Z.; NI, Z. Separation and determination of four artificial sweeteners and citric acid by high-performance anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 771, n. 1/2, p. 135-143, 1997.

CHEN, Q.; WANG, J. Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 937, n. 1/2, p. 57-64, 2001.

CHENG, C.; WU, S. C. Simultaneous analysis of aspartame and its hydrolysis products of Coca-Cola Zero by on-line postcolumn derivation fluorescence detection and ultraviolet detection coupled two-dimensional high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 20, p. 2976-2983, 2011.

DEMIRALAY, E. C.; OZKAN, G.; GUZEL-SEYDIM, Z. Isocratic separation of some food additives by reversed phase liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 63, n. 1/2, p. 215-219, 2006.

DIAS, C. B., GODOY, H. T. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para determinação de edulcorantes por UPLC-PDA**. 2011. 150 f. Dissertação de mestrado Ciência de Alimentos/nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2011.

DOSSI, N.; TONIOLO, R.; SUSMEL, S.; PIZZARIELLO, A., BONTEMPELLI, G. Simultaneous RP-LC determination of additives in soft drinks. **Chromatographia**, v. 63, n. 11/12, p. 557-562, 2006.

DZIEZAK, J. D. Sweeteners and product development - Alternatives to cane and beet sugar. **Food Technology**, v.40, n.1, p.116-128, 1986.

ENES, C. C.; SLATER, B. Obesidade na adolescência e seus principais fatores determinantes. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.13, n.1, p.163-171, 2010.

ESCRIVÃO M. A. M. S.; OLIVEIRA F. L. C.; TADDEI J. A. A. C.; LOPEZ F. A. Obesidade exógena na infância e na adolescência. **Jornal de Pediatria**, v. 76, n. 3, p. 305-310, 2000.

EFSA. European Food Safety Agency. European Commission, Scientific Committee on Food (SCF), Revised opinion of the Scientific Committee on Food on cyclamic acid and its sodium and calcium salts (expressed on 9 March 2000). Disponível em: http://ec.europa.eu/comm/food/fs/sc/scf/out53_en.pdf. Acesso em outubro de 2011.

EFSA. European Food Safety Agency, EFSA Journal, v. 1015, 2009.

ESTELLER, M. S. Fabricação de pães com reduzido teor calórico e modificações reológicas ocorridas durante o armazenamento. 2004. 248f. Dissertação de mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

FARHADI , A., KESHAVARZIAN, A., HOLMESB, E. W., FIELDS, J., ZHANG, L., BANAN, A. Gas chromatographic method for detection of urinary sucralose: application to the assessment of intestinal permeability. **Journal of Chromatography B**, v. 784, n. 1, p.145-154, 2003.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C.; GOUVEIA, S. T.; CALAFATTI, S. A.; GUARITÁ-SANTOS, A. J. M. Adoçantes artificiais. **Química Nova**, v. 19, n.3, p. 248-260, 1996.

FATIBELLO-FILHO, O.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; PEREIRA, A. V. Solidphase reactor with copper(II) phosphate for flow-injection spectrophotometric determination of aspartame in tabletop sweeteners. **Analytica Chimica Acta**, v. 384, n. 2, p. 167-174, 1998.

FENG Q; Qi Z. H.; LIU, K. N.; MOU, S. F. Determination of aspartame by ion chromatography with electrochemical integrated amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 850, n. 1/2, p. 277-281, 1999.

FERNÁNDEZ, L. A. R. Edulcorantes intensos en la comunidad europea. **Alimentaria**, v.216, p.17-21, 1990.

FERRER, I.; THURMAN, E. M. Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 4127–4134, 2010.

GARCÍA-JIMENÉZ, J. F.; VALENCIA, M. C.; CAPITÁN-VALLVEY, L. F. Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweetener additives in food and cosmetics by flow injection analysis coupled to a monolithic column. **Analytica Chimica Acta**, v. 594, n. 2, p. 226–233, 2007.

GARDANA, C.; SCAGLIANTI, M; SIMONETTI, P. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 9, p. 1463–1470, 2010.

GIESE, J. H. Alternative sweeteners and bulking agents. **Food Technology**, v.47, n. 1, p.114-118, 1993.

GOLBERG, L.; CONNING, D. M.; MENDELSON, M.; MOHR, U.; ROE, F.; VANRYZIN, J.; TAKAYAMA, S.; TRUHAUT, R.; WAGNER, B.. Saccharin-current status. **Food Chemistry Toxicology**, v.23, p. 543-546, 1983.

GOLDSMITH, L. A.; MARKEL, C. M. **Sucralose**. in: NABORS, L.O. *Alternative Sweeteners*, 3ed, revisado e expandido, Marcel Dekker, Suíça, 2001.

GOTO, A.; CLEMENTE, EDMAR. Influência do rebaudiosídeo A na solubilidade e no sabor do esteviosídeo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 6, p. 167 – 174, 1998.

GRENBY, T. H. **Advances in sweeteners**. New York: Kluwer Academic, Plenum, 288p, 1995.

GRICE, H.C.; GOLDSMITH, L.A. Sucralose an overview of the toxicity data. **Food Chemistry Toxicology**, v.38, suppl. 2, p.S1-S6, 2000.

HASHEMI, M.; HABIBI, A.; JAHANSHAHI, N. Determination of cyclamate in artificial sweeteners and beverages using headspace single-drop microextraction and gas chromatography flame-ionisation detection. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1258-1263, 2010.

HEARN, L. K.; SUBEDI, P.P. Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 2, p. 165–168, 2009.

HOOD, L. L.; CAMPBELL, L. A. Developing reduced calorie bakery products with sucralose. **Cereal Foods World**, v.35, n.12, p.1171-1182, 1990.

HORIE, M.; ISHIKAWA, F.; OISHI, M.; SHINDO, T.; YASUI, A.; ITO, K. Rapid determination of cyclamate in foods by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, n. 1/2, p. 423–428, 2007.

HUANG, Z.; MA, J.; CHEN, B.; ZHANG, Y.; YAO, S. Determination of cyclamate in foods by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, n. 2, p. 233–237, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério da Saúde. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008 – 2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Sixty-ninth meeting, Rome, Italy, 17-26 June 2008.

JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Food Additives Series: 50, Alitame, 2006. Disponível in: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je02.htm>. Acesso em outubro de 2011.

JENNER, M. R. **Sucralose**: Unveiling its properties and applications. In: GREMBY, T.H. Progress in sweeteners. New York: Elsevier Applied Science Series, p121-141, 1989.

KEMP, S. E. **Low-calorie sweeteners**. In: Spillane, W. J. Optimizing Sweet Taste in Food. England, Woodhead Publishing Limited, p.175-250, 2006.

KLONGPANICHPACK, S., TEMCHAROEN, P.; TOSKULKAO, C.; APIBAL, S., GLINSUKON, T. 1997. Lack of mutagenicity of stevioside and steviol in salmonella typhimurium TA98 and TA100. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 80, n. 1, p.121–128, 1997.

KRITSUNANKULA, O.; JAKMUNEEB, J. Simultaneous determination of some food additives in soft drinks and other liquid foods by flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 84, n. 5, p. 1342-1349, 2011.

KROGER, M.; MEISTER, K.; KAVA, R. Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, n. 2, p. 35-47, 2006.

KROYER, G. T. The low calorie stevioside: stability and interactions with food ingredients. **Lebensm Wiss u Technology**, v. 32, n. 8, p. 509 – 512, 1999.

KROWECH, G.; FAUST, J. B.; ENDLICH, B.; SANDY, M. S. Evidence on the carcinogenicity of sodium saccharin. Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section, Office of Environmental Health Hazard Assessment, California Environmental Protection Agency, 2003.

LINO, C. M.; PENA, A. Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p.503–508, 2010.

LIPINSKI, G. R.; HANGER, L. Y. **Acessulfame K**. In: NABORS, L.O. Alternative Sweeteners, 3ed, revisado e expandido, Suíça, Marcel Dekker, 2001.

LOOS, R.; GAWLIK, B. M.; BOETTCHER, K.; LOCORO, G.; CONTINI, S.; BIDOGLIO, G. Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry method. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 7, p. 1126–1131, 2009.

McQUILLAN, M.; HELLER, E.; CORVER, M. The development of the UK market for intense and bulk sweeteners. **British Food Journal**, v.97, n. 2, p.10-17, 1995.

MATSUI, M.; MATSUI, K.; KAWASAKI, Y.; ODA, Y.; NOGUCHI, T.; KITAGAWA, Y.; SAWADA, M.; HAYASHI, M.; NOHMI, T.; YOSHIHIRA, K.;

ISHIDATE, M.; SOFUNI, T. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. **Mutagenesis**, v. 11, n. 6, p. 573–579, 1996a.

MATSUI, M.; SOFUNI, T.; NOHMI, T., 1996b. Regionally-target mutagenesis by metabolically-activated steviol: DNA sequence analysis of steviolinduced mutants of guanine phosphoribosyltransferase (gpt) gene of salmonella typhimurium TM677. **Mutagenesis**, v. 11, n. 6, p. 565–572, 1996b.

MEDEIROS, R. A.; CARVALHO, A. E.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLOFILHO, O. Determinação voltamétrica de ciclamato de sódio em produtos dietéticos empregando um eletrodo de diamante dopado com boro. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1405-1409, 2008.

MONTIJANO, H.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; BORREGO, F. Technological properties and regulatory status of high intensity sweeteners in the European Union. **Food Science and Technology International**, v.4, n. 1, p. 4-16, 1998.

MORAES, P. C. B. T. **O impacto do uso de edulcorantes em bebidas de café solúvel e café torrado/moído como substitutos da sacarose.** 2008, 107p, Tese de doutorado em Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

NABORS, L. O.; GELARDI, R. C. **Saccharin.** In: Nabors, L.O'B (ed.) *Alternative Sweeteners*. 3ed, revisado e expandido, Suíça, Marcel Dekker, 2001.

NAKAIE, Y.; YOGI, T.; KAKEHI, K.; INOUE, D.; HIROSE H.; HASHIMOTO S.; TONOGAI Y. Simultaneous and simple determination of saccharin and acesulfame K in foods by GC–NPD. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan.**, v. 40, n. 3, p. 223–229, 1999.

NEWSOME, R. L. Sweeteners: nutritive and non-nutritive. **Food Technology**, v. 40, n. 8, p.195-206, 1986.

NI, Y.; XIAO, W.; KOKOT, S. A differential kinetic spectrophotometric method for determination of three sulphanilamide artificial sweeteners with the aid of chemometrics. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p.1339–1345, 2009.

NOFRE, C.; TINTI, J.-M. (1990). Sweetening agent derived from l-aspartic or l-glutamic acid. US Patent 5,196,540 (filed October 23, 1990; granted March 23, 1993).

NOFRE, C.; TINTI, J.-M. Neotame: discovery, properties, utility. **Food Chemistry**, v. 69, n. 3, p. 245 - 257, 2000.

NUNES, A. P. M.; FERREIRA-MACHADO, S. C.; NUNES, R. M.; DANTAS, F. J. S.; DE MATTOS, J. C. P.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 4, p. 662-666, 2007.

PEZZUTO, J .M.; COMPADRE, C.M.; SWANSON, S.M.; NANAYAKKRA D., KINGHORN, A. D. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 82, n. 8, p. 2478-2482, 1985.

PIETRA, A. M.; CAVRINI, V.; BONAZZI, D.; BENFENATI, L. Analysis of aspartame and saccharin in pharmaceutical and dietary formulations. **Chromatographia**, v. 30, n. 3/4, p. 215 - 219, 1990.

POLASA, K. Current status of saccharin - an appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v.32, n. 4, p.267-277, 1995.

PORTMANN, M.O.; KILCAST, D. Descriptive profiles of synergistic mixtures of bulk and intense sweeteners. **Food Quality and Preference**, v.9, n.4, p.221-229, 1998.

REDLINGER, P.A.; SETSER, C.S. Sensory quality of selected sweeteners: aqueous and lipid model systems. **Journal of Food Science**, v.52, n. 2, p. 451-454, 1987.

RIPPER, A.; HOMLER, B. E.; MILLER, G. A. Aspartame. In: NABORS, L. B., GELARDI, R. C. **Alternatives sweeteners**. New York: Marcel Dekker, p. 43-70, 1986.

SABAH, S.; SCRIBA, G. K. E. Determination of aspartame and its degradation and epimerization products by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, n. 6, p. 1089-1096, 1998.

SAIN, O. L.; BERMAN, J. M. Efectos adversos de edulcorantes en pediatria sacarina y ciclamato. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 82, p. 209-211, 1984.

SALMINEN, S.; HALLIKAINEN, A. Sweeteners. In: BRANEN, A.L.; DAVIDSON, P. M. e SALMINEN, S. **Food Additives**, Marcel Dekker, Inc., New York, 1990.

SCHEURER, M.; BRAUCH, HEINZ-J.; LANGE, F. T. Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 6, p. 1585–1594, 2009.

SCHIFFMAN, S.S.; BOOTH, B.J.; CARR, B.T.; LOSEE, M.L.; SATTELYMILLER, E.A.A.; GRAHAM, B.G. Investigation of synergism: in binary mixtures of sweeteners. **Brain Research Bulletin**, Lausanne, v. 38, n. 2, p.105-120, 1995.

SCHOR, I.; MAZZEI, E.; SUDERA, O. A. **A segurança do aspartame**. Atualização clínica [s.1:s.n.], 1993

SHERIDAN, R.; KING, T. Determination of cyclamate in food by ultraperformance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 5, p. 1095-1102, 2008.

STAMP, J. A. Sorting out the alternative sweeteners. **Cereal Foods World**, v.35, n. 4, p.395-400, 1990.

STEGINK, L. D. Aspartame: Review of the safety issues. **Food Technology**, v.41, n. 1, p.119-121, 1987.

STENBERG, M.; MARKO-VARGA, G.; OSTE, R. Racemization of amino acids during classical and microwave oven hydrolysis – application to aspartame and a Maillard reaction system. **Food Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 217–224, 2001.

SOUSA, R. A.; BACCAN, N.; CADORE, S. Analysis of Liquid Stevioside and Cyclamate-Saccharin Dietetic Sweeteners by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry without Sample Treatment. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 17, n. 7, p. 1393-1399, 2006.

SUTTAJIT, M.; VINITKETKAUMNUEN, U.; MEEVATEE, U.; BUDDHASUKH D., Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from stevia rebaudiana bertonii. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, n. 3, p. 53–56, 1993.

TERAI, T.; HUIFENG, R.; MORI, G.; YAMAGUCHI, Y.; HAYASHI, T. Mutagenicity of steviol and its oxidative derivatives in salmonella typhimurium TM677. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 7, p. 1007-1010, 2002.

THE NUTRASWEET CO . (2005). **Neotame**. Scientific Overview Brochure.

Disponível em: <http://www.neotame.com/about.asp>. Acesso em outubro de 2011.

TORLONI, M. R.; NAKAMURA, M. U.; MEGALE, A.; SANCHEZ, V. H. S.; MANO, C.; FUSARO, A. S.; MATTAR, R. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. Rio de Janeiro, **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 5, p. 267-275, 2007.

TOZETTO, A. **Controle de Qualidade de edulcorantes em adoçantes comerciais via espectrometria e modelos de calibração multivariada**. 2005. 144f. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2005.

TOZETTO, A.; DEMIATE, I. M.; NAGATA, N. Análise exploratória de adoçantes de mesa via espectroscopia no infravermelho (FTIR) e análise por componentes principais (ACP). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 723-728, 2007.

VILLARTA, R. L.; SULEIMAN, A. A.; GUILBAULT, G. G. Amperometric Enzyme Electrode for Determination of Aspartame in Diet Foods. **Microchemical Journal**, v. 48, n. 2, p. 60-64, 1993.

von RYMON LIPINSKI, G. W.; HANGER, L. Y. **Acesulfame K**. In: Nabors, L.O'B (ed.). *Alternative Sweeteners*, 3rd. edition. Marcel Dekker, Inc., p.13-30, 2001.

WALKER, J. C.; ZAUGG, S. E.; WALKER, E. B. Analysis of beverages by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 781, n. 1/2, p. 481-485, 1997.

WANG, Y.; XU, H. T.; XIE, Y. Y.; TIAN, Y. X.; SHEN, Y. D.; YOUNG, G.; WANG, H.; LEI, H. T.; SUN, Y. M. Development of polyclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for sodium saccharin residue in food samples. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 815-820, 2011.

WASIK, A.; MCCOURT, J.; BUCHGRABER, M. Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection - Development and single-laboratory validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, n. 1/2, p. 187-196, 2007.

WELLS, A. G. The use of intense sweeteners in soft drinks. In: GREMBY, T.H. Progress in sweeteners. New York: Elsevier Applied Science, p. 121 - 142, 1989.

WHO. World Health Organization. Obesity and overweight. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> Acesso em outubro de 2011 (a).

WHO. World Health Organization. Obesity and overweight. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> Acesso em outubro de 2011 (b).

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KIG, H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WITT, J. **Discovery and development of neotame**. In: CORTI, A. Low-calorie sweeteners: Present and future. World review of nutrition and dietetics, A. P. Simopoulos, v. 85, Barcelona, Spain, p.52-57, 1999.

WOLFHARD, G.; von RYMON LIPINSKI, G. W. The new intense sweetener acesulfame-K. **Food Chemistry**, v.16, n.3/4, p.259-269, 1985.

YEBRA, M.C.; GALLEGO, M.; VALCIIRCEL, M. Precipitation flow-injection method for the determination of saccharin in mixtures of sweeteners. **Analytica Chimica Acta**, v. 308, n. 1/3, p. 275-280, 1995.

ZHU, Y.; GUO, Y.; YE, M.; JAMES, F. S. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, n. 1, p. 143-146, 2005.

ZYGLER, A.; WASIK, A.; NAMIESNIK, J. Analytical Methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1082-1102, 2009.

ZYGLER, A.; WASIK, A.; NAMIESNIK, J. Retention behaviour of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents. **Talanta**, v. 82, n. 5, p. 1742-1748, 2010.

Validação intra-laboratorial de metodologia para separação de edulcorantes em geléia por HPLC

**Daniela de Queiroz Pane, Adriana Dillenburg Meinhart, Helena
Teixeira Godoy**

**Departamento de Ciência de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP**

Validação intra-laboratorial de metodologia para separação de edulcorantes em geléia por HPLC

Daniela de Queiroz Pane¹, Adriana Dillenburg Meinhart¹, Helena Teixeira Godoy¹

1. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil

RESUMO

Os edulcorantes constituem uma classe importante de aditivos, que são utilizados em uma ampla gama de alimentos e bebidas. Os produtos "diet/light" têm sido muito utilizados nas duas últimas décadas em virtude do aumento da prevalência de doenças como diabetes e obesidade, além da questão estética. Com isso, um método capaz de determinar os diversos edulcorantes em diferentes matrizes torna-se necessário para assegurar o controle de qualidade e a integridade dos produtos, além de permitir a fiscalização dos alimentos pelos órgãos regulamentadores. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento e validação de uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a análise simultânea de cinco edulcorantes (ciclamato de sódio, aspartame, neotame, sacarina sódica e acessulfame-K) presentes em geléias "diet". Para a determinação dos edulcorantes foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com uma coluna C18, onde os edulcorantes foram separados através de um sistema de gradiente linear, com vazão de 1 mL.min⁻¹, sendo a fase móvel composta por fase aquosa (5 mM de tampão fosfato de sódio monobásico; pH 7,0) e fase orgânica (acetonitrila). A detecção foi realizada com o detector de arranjo de diodos (DAD) operando a 192 nm (para o ciclamato de sódio, o aspartame e o neotame), a 201 nm

(para a sacarina sódica) e a 227 nm (para o acessulfame-K), sendo a quantificação feita por padronização externa. Para a validação do método foram avaliadas linearidade, limites de detecção e de quantificação, exatidão e precisão. A metodologia mostrou-se eficiente, apresentando taxas de recuperação entre 96,5 e 100,8%, boa repetitividade e limites de detecção e quantificação de 0,2 e 0,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para o acessulfame-k, de 0,1 e 0,2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para a sacarina, de 18 e 36 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para o ciclamato, de 0,142 e 0,284 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para o aspartame e de 0,45 e 0,90 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para o neotame. O método foi aplicado em geléias e os edulcorantes encontrados foram o acessulfame-k e o aspartame.

ABSTRACT

Sweeteners constitute an important class of additives, which are used in a wide range of foods and beverages. The products' diet / light "have long been used in the last two decades due to the increased prevalence of diseases such as diabetes and obesity, as well as aesthetics. Thus, a method capable of determining the different sweeteners in different matrices it is necessary to ensure quality control and product integrity, and allows the inspection of food by regulatory agencies. Therefore, the aim of this work was the development and validation of a methodology for high performance liquid chromatography (HPLC) for the simultaneous analysis of five sweeteners (sodium cyclamate, aspartame, neotame, saccharin and acesulfame-K) present in jellies "diet". For the determination sweeteners was used high performance liquid chromatography efficiency (HPLC) with a C18 column, where the sweeteners were separated through an gradient system linear, with flow of 1 mL.min⁻¹, being the mobile phase composed by aqueous phase (5 mM sodium phosphate buffer monobasic; pH 7.0) and organic phase

(acetonitrile). Detection was accomplished with the detector diode array (DAD) operating at 192 nm (for cyclamate sodium, aspartame and neotame), to 201 nm (for sodium saccharin) and 227 nm (for acesulfame-K), being the quantification made by external standardization. To validate the method were evaluated linearity, limits of detection and quantification, accuracy and precision. The methodology proved to be efficient, with recovery rates between 96.5 and 100.8%, good repeatability and limits of detection and quantification of 0.2 and 0.4 $\mu\text{g.g}^{-1}$ for acesulfame-k, 0, 1 and 0.2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ for saccharin, of 18:36 $\mu\text{g.g}^{-1}$ for cyclamate, of 0,142 and 0.284 $\mu\text{g.g}^{-1}$ for aspartame and 0.45 and 0.90 $\mu\text{g.g}^{-1}$ for neotame. The method was applied to jams and sweeteners were found acesulfame-K and aspartame.

1. INTRODUÇÃO

Aditivos são substâncias adicionadas aos alimentos para lhes conferir certas características tecnológicas, tais como cor, dulçor, textura, dentre outras. Os edulcorantes constituem uma classe importante de aditivos, os quais são utilizados em uma ampla gama de alimentos e bebidas (WASIK et al., 2007).

O uso de alimentos sem açúcar e com baixas calorias triplicou nas duas últimas décadas do século XX (NABORS, 2001). Além da questão estética, destacam-se ainda alguns quadros clínicos, como o diabetes *mellitus* e a obesidade, que requerem restrição definitiva ou prolongada de açúcares. Por esse motivo vem crescendo a demanda pelos produtos diet e light, aumentando seu espaço no mercado e sua aceitação entre os consumidores (TORLONI et al., 2007).

Uma prática comum na indústria de alimentos é a mistura de edulcorantes em um mesmo alimento, trazendo uma sinergia de dulçor que permite o uso de níveis mais baixos de cada um individualmente, geralmente levando a um custo menor, melhorando o sabor doce por reduzir os sabores indesejáveis e resultando em um produto final de melhor qualidade (HUANG et al., 2006; ZYGLER et al., 2009).

Nesse sentido, um método capaz de identificar e quantificar os diferentes edulcorantes presentes em um mesmo alimento torna-se um desafio. Este método deve apresentar alta sensibilidade, especificidade e simplicidade em comparação com os outros métodos, para poder ser usado em análises de rotina.

Diversos métodos de análise para os edulcorantes artificiais têm sido propostos, dentre metodologias por cromatografia a gás - CG (NAKAIE et al., 1999; FARHADI et al., 2003), cromatografia iônica (CHEN et al, 1997; CHEN & WANG, 2001; ZHU et al, 2005), eletroforese capilar (WALKER et al., 1997; HORIE et al., 2007, BERGAMO, et al.,

2011), cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (CASALS et al, 1996; AQUINO et al, 2004; DEMIRALAY et al, 2006; DOSSI et al, 2006; WASIK et al., 2007) e cromatografia líquida acoplada a detector de massas - LC/MS (HUANG et al., 2006; LOOS et al., 2009; YANG & CHEN, 2009).

A cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), apesar de bastante recente, vem sendo utilizada na determinação de diferentes compostos em alimentos (XIU-QUIN et al., 2008; GRUZ et al., 2008; BĚLÁKOVÁ et al., 2011; DIAS & GODOY, 2011; HUNG & HATCHER, 2011).

Desses métodos, a grande maioria permite a determinação de até quatro edulcorantes simultaneamente. Para a determinação de mais edulcorantes em uma mesma análise os métodos propostos se utilizam de equipamento mais sofisticados e caros, como o detector de massas, que também acaba por exigir maior treinamento do analista (WASIK et al.; 2007; YANG & CHEN, 2009).

Assim que um método de análise é desenvolvido, este deve ser validado de modo a garantir que os resultados obtidos sejam confiáveis. No caso dos alimentos, onde a matriz é muito complexa na maioria dos casos, as análises são dificultadas e uma validação específica do analito em seu meio torna-se necessária. O procedimento de validação de métodos deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis (PASCHOAL et al., 2008).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia simples, rápida e eficiente por HPLC (DAD) para a determinação simultânea de cinco diferentes edulcorantes presentes em geléias "diet".

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras

Após a otimização e validação da metodologia, esta foi aplicada à amostra geléia de morango “diet”, por ser esta uma matriz de grande complexidade dentre os produtos “diet/light” disponíveis no mercado.

O método foi aplicado em amostras de mercado, onde foram avaliadas geléias de duas diferentes marcas, em 3 lotes distintos de cada marca, sendo cada lote composto por três embalagens, as quais foram totalmente homogeneizadas antes da retirada da amostra para análise. As amostras foram adquiridas em supermercados da região de Campinas e grande São Paulo. As determinações foram feitas sempre em duplicata.

2.2. Reagentes

O padrão de acessulfame-k foi adquirido da Fluka (EUA), o aspartame, a sacarina sódica hidratada e o ciclamato de sódio, da Sigma-Aldrich (EUA) e o padrão de neotame foi doado pela empresa Sweetmix (Brasil). A acetonitrila grau cromatográfico foi adquirida da empresa J. T. Baker (EUA), o fosfato de sódio monobásico monoidratado e o ácido ortofosfórico da Merck (Alemanha) e o hidróxido de sódio da Carlo Erba (Itália). A água utilizada no preparo dos reagentes e da fase móvel foi purificada através do sistema Milli-Q (Millipore, EUA) e posteriormente filtradas em filtros com poros de 0,45 µm de diâmetro da Millipore (EUA).

2.3. Equipamento

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100, com injetor automático de capacidade de 1 a 100 µL, degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo

de diodos (DAD) UV-visível. O sistema foi controlado pelo software HP-Chemstation, o qual também gerenciou o sistema de aquisição dos dados. Para o processo cromatográfico foi utilizada uma coluna Pinnacle II, C18, 5 µm, 150x4,6 mm d.i. produzida pela Restek.

2.4. Desenvolvimento da metodologia

Para a determinação dos edulcorantes partiu-se da metodologia desenvolvida por DIAS e GODOY (2011), desenvolvida para UPLC onde a separação dos edulcorantes foi obtida através de um sistema de gradiente linear, temperatura de 56°C, vazão de 0,4 mL.min⁻¹, sendo a fase móvel composta por fase aquosa (5 mM de tampão fosfato de sódio monobásico; pH 3,0 acertado com ácido ortofosfórico) e fase orgânica (acetonitrila). A Tabela 2 mostra o gradiente utilizado no referido método.

Tabela 1. Gradiente utilizado para o método de separação de edulcorantes por UPLC.

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	100	0
5	100	0
5,05	86	14
7	86	14
7,05	75	25
10	75	25

Em virtude das características da coluna de HPLC empregada foram testadas diferentes condições de vazão (0,5 a 1 mL.min⁻¹), temperatura de coluna (30°, 40° e 56°C) e vários gradientes de eluição, utilizando diferentes modificadores (metanol, acetonitrila).

A detecção foi realizada em um detector de arranjo de diodos, sendo que os comprimentos de onda monitorados foram: 192 nm (para o ciclamato de sódio, o aspartame e o neotame), 201 nm (para a sacarina sódica) e 227 nm (para o acessulfame-K). A identificação foi realizada por comparação dos tempos de retenção, obtidos pela análise do padrão isoladamente, por co-cromatografia e através dos espectros obtidos pelo detector de DAD.

A quantificação foi feita por padronização externa.

A pureza dos picos foi avaliada através dos espectros de absorção obtidos nos picos e trabalhados no programa Chemstation-HP, o qual gerencia o sistema de aquisição e tratamento de dados.

2.5. Validação da metodologia

Para a validação foram levados em consideração os parâmetros de precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão (através de testes de recuperação), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), faixa de linearidade e seletividade.

A precisão foi estudada através de dez determinações consecutivas no mesmo dia (repetitividade) e entre três dias (precisão intermediária), sendo avaliada no 1º, 5º e 8º dia de análise. A precisão foi investigada em um nível de concentração adicionado à matriz geléia isenta de edulcorantes. Tomou-se 2,5g da geléia de morango "diet", transferiu-se para um balão de 25 mL, solubilizou-se com um pequeno volume de água e então adicionou-se os edulcorantes acessulfame-k, ciclamato, sacarina, aspartame e neotame. O volume do balão foi aferido com água e homogeneizado. Em seguida, centrifugou-se por 5 minutos a 5.000 rpm. Seguiu-se a filtração em filtro Millex com poros de 0,45µm de diâmetro. Deste filtrado, 10µL foram imediatamente injetados no cromatógrafo. Ao final, obteve-se uma concentração de 9 ug.mL⁻¹ para o acessulfame-k; de 10 ug.mL⁻¹ para a sacarina; de 45

ug.mL⁻¹ para o ciclamato, de 25 ug.mL⁻¹ para o aspartame e de 30 ug.mL⁻¹ para o neotame.

Para a avaliação da exatidão do método foram realizados testes de recuperação dos padrões adicionados à matriz geléia isenta de edulcorantes, em dois níveis diferentes de concentração. Os níveis de recuperação foram escolhidos de acordo com a média geral apresentada no rótulo do produto, sendo que o primeiro nível representa 85% do teor provável das amostras e o segundo nível, 110%. As determinações foram feitas em duplicata.

O limite de detecção foi estimado através de diluições sucessivas do padrão adicionado à matriz. Foi considerado como limite de detecção a menor quantidade detectável na matriz que produziu um sinal de amplitude três vezes maior que o ruído ($S/R \geq 3$). O limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o limite de detecção (CALCUTT e BRODDY, 1983).

Para o estudo da linearidade, a faixa linear de trabalho foi de 0,4 a 250 µg.mL⁻¹ para o acessulfame-K, distribuídas em 9 níveis; de 1,0 a 50 µg.mL⁻¹ para a sacarina sódica, em 7 níveis; de 36 a 100 µg.mL⁻¹ para o ciclamato de sódio, em 7 níveis; de 1,0 a 80 µg.mL⁻¹ para o aspartame, em 7 níveis e de 2,5 a 50 µg.mL⁻¹ para o neotame, distribuídas em 7 níveis. As curvas foram realizadas em triplicata verdadeira.

A faixa linear foi avaliada através do modelo matemático para a regressão linear e pela distribuição dos resíduos utilizando o programa Statistica versão 7.0.

A seletividade foi analisada através do cálculo dos fatores de retenção (k), dos fatores de separação (α) e das resoluções (Re), para cada edulcorante.

2.6. Preparo de amostras

Para a determinação dos edulcorantes tomou-se 2,5g de geléia de morango "diet" isenta de edulcorantes, previamente homogeneizada e completou-se o volume do balão de 25μL com água. Em seguida, foram centrifugados por 5 minutos a 5.000 rpm. Seguiu-se a filtração em filtro Millex com poros de 0,45μm de diâmetro. Deste filtrado, 10μL foram imediatamente injetados no cromatógrafo.

Um fluxograma para esquematizar a metodologia utilizada na determinação dos edulcorantes está representado na **Figura 1**.

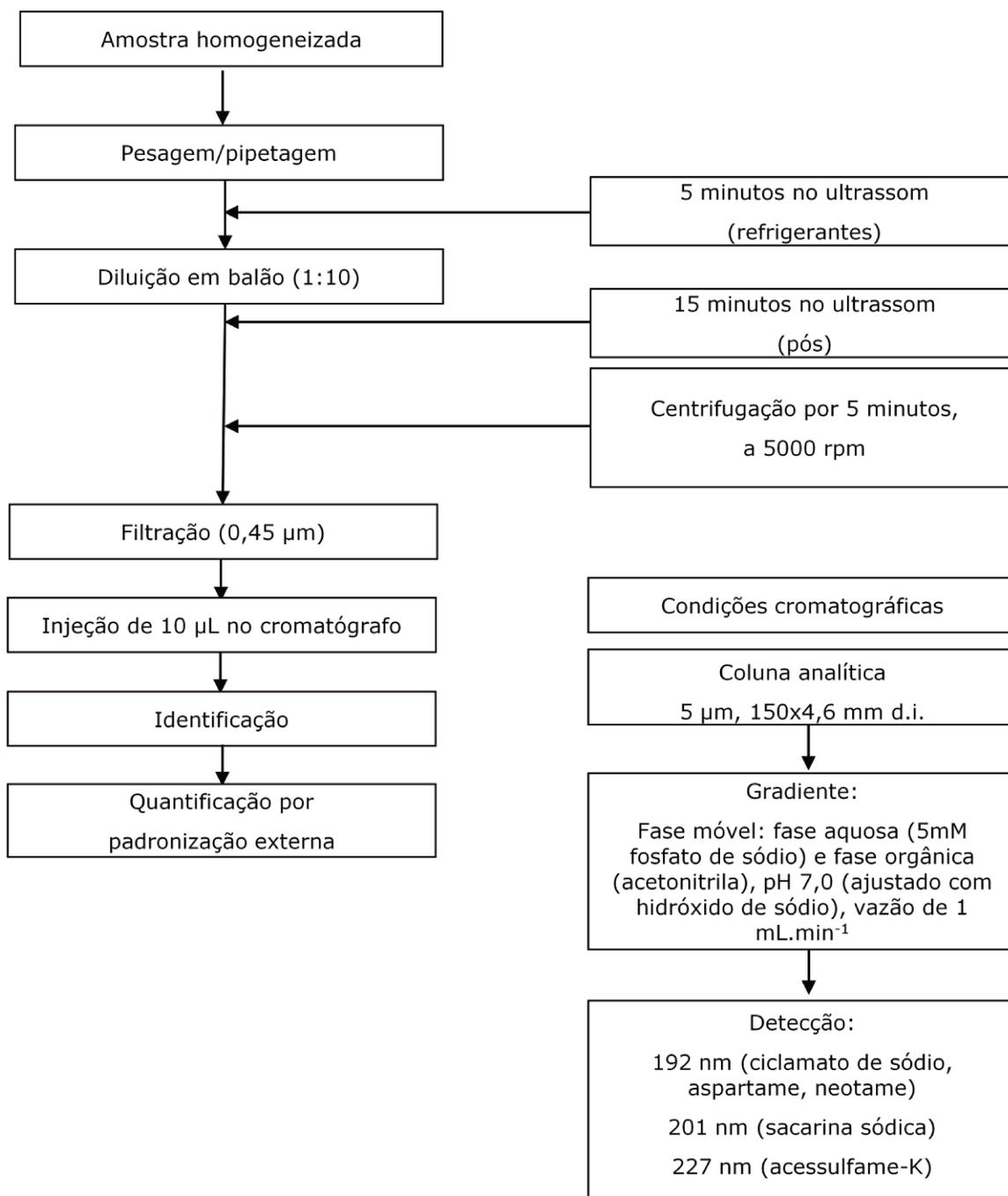


Figura 1. Fluxograma da metodologia utilizada na determinação de edulcorantes em alimentos “diet/light”.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Desenvolvimento da metodologia

O melhor sistema para a separação dos edulcorantes, com o menor tempo de eluição, condicionamento da coluna e resolução ficou estabelecido com uma vazão de 1 mL.min⁻¹, sendo a fase móvel composta por fase aquosa (A: 5 mM de tampão fosfato de sódio monobásico; pH 7,0 ajustado com hidróxido de sódio) e fase orgânica (B: acetonitrila), temperatura de coluna a 40°C e um gradiente descrito conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Gradiente utilizado para o método de separação de edulcorantes por HPLC.

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	94	6
8	94	6
9	85	15
16	85	15
17	70	30
26	70	30

A vazão estabelecida aliada ao gradiente permitiu a eluição dos compostos em 26 minutos com um tempo de recondicionamento de coluna de 5 minutos. A temperatura da coluna ficou estabelecida em 40°C, já que a 30°C os picos se alargaram e a 46°C a resolução era a mesma, optando-se então por trabalhar em uma temperatura mais baixa.

3.2. Validação da metodologia

Na **Tabela 3** estão apresentados os resultados encontrados para a precisão do método (repetitividade e precisão intermediária).

Tabela 3. Precisão do método (desvio-padrão relativo, CV%).

	Dia	acesulfame	sacarina	ciclamate	aspartame	neotame
Repetitividade (n = 10)	1	0,68	0,31	0,19	0,37	0,20
	5	0,67	0,29	0,20	0,12	0,24
	8	0,57	0,42	0,20	0,24	0,33
Precisão intermediária (n = 3)	-	1,67	1,03	0,20	0,45	0,30

Pode-se observar que os coeficientes de variação ficaram abaixo de 0,68% para a repetitividade e abaixo de 1,67% para a precisão intermediária.

A Tabela 4 apresenta as faixas de linearidade e os limites de detecção e de quantificação, para cada edulcorante.

Tabela 4. Faixas de linearidade, limites de detecção e de quantificação para os edulcorantes.

Edulcorante	Concentração (ug/mL)	Equação	LD (ug/mL)	LQ (ug/mL)
Acessulfame-k	0,4 - 250	$y = 843,92x - 886,87$	0,2	0,4
Sacarina	1,0 - 50	$y = 3118,4x - 1870,4$	0,1	0,2
Ciclamate	36 - 100	$y = 1571,5x - 1194$	18	36
Aspartame	1,0 - 80	$y = 788,68x + 8664,8$	0,142	0,284
Neotame	2,5 - 50	$y = 1068,4x + 8368,2$	0,45	0,90

A Tabela 5 apresenta os valores de F para cada edulcorante.

Tabela 5. Valores de F para cada edulcorante.

Edulcorante	Fcalculado	Ftabelado
Acessulfame-k	167,06	6,39
Sacarina	92,30	9,28
Ciclamato	88,10	19,25
Aspartame	101,45	9,28
Neotame	55,90	9,28

Os modelos matemáticos propostos para as regressões lineares mostraram-se ajustados uma vez que os valores de $F_{\text{calculado}}$ foram maiores dos que os de F_{tabelado} . Os resíduos apresentaram distribuição aleatória e a regressão linear foi significativa, indicando adequada linearidade do método.

Os fatores de retenção (k) calculados foram 1,04 para o acessulfame-k; 1,56 para a sacarina; 2,64 para o ciclamato; 8,901 para o aspartame e 16,37 para o neotame. Já os fatores de separação (α) e as resoluções (R_e) foram, respectivamente: 1,50 e 2,95 entre os picos de acessulfame-k e sacarina; 1,68 e 8,56 entre os de sacarina e ciclamato; 3,36 e 34,02 entre os de ciclamato e aspartame e 1,83 e 94,29 entre os de aspartame e neotame. Os valores encontrados demonstram a efetiva separação entre os picos, uma vez que o fator de separação deve ser maior do que 1 e a resolução mínima desejável, igual a 1,5 para que não haja sobreposição de picos (SNYDER et al., 1997).

3.3. Aplicação em amostras

O método foi aplicado em geléias de morango "diet", conforme a Tabela 6.

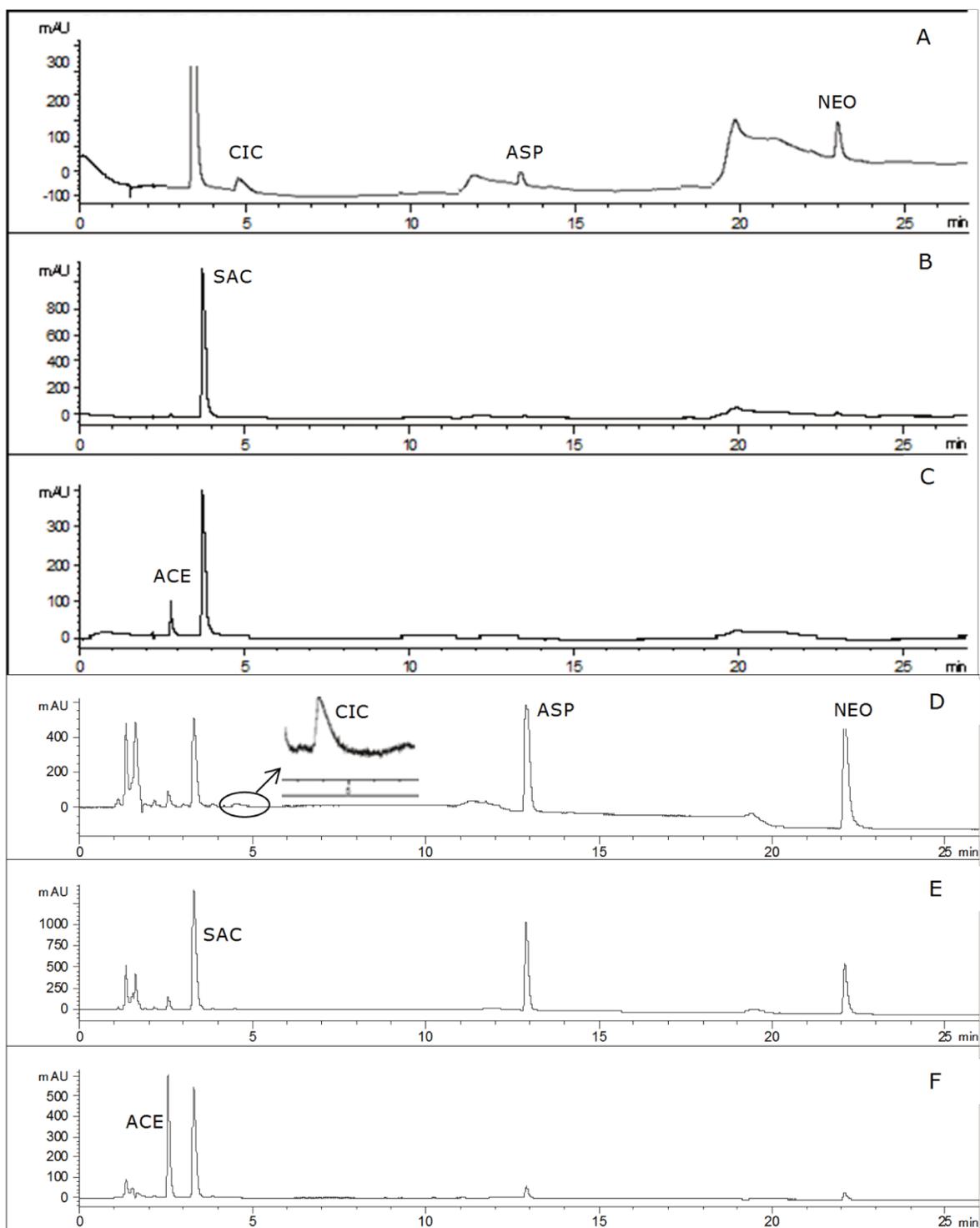
Tabela 6. Teor* de edulcorantes (mg.100mL⁻¹) presentes em geléias de morango “diet”.

Amostra	Lote	Acessulfame-k	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Geléia diet de morango Fabricante 8	1	1,6 ± 0,1 a	-	-	-
	2	1,4 ± 0,2 ab	-	-	-
	3	1,2 ± 0,1 b	-	-	-
	Média	1,4 ± 0,2			
Geléia diet de morango Fabricante 2	1	14,3 ± 2,2 a	-	-	22,5 ± 3,1 a
	2	14,3 ± 2,0 a	-	-	47,3 ± 5,6 b
	3	16,0 ± 3,4 a	-	-	43,4 ± 3,4 b
	Média	14,9 ± 2,4			37,8 ± 15,4
Legislação (BRASIL, 2008)	Diet	35	15	40	75
	Light	26	10	30	56
	Zero	35	15	40	75

*Os dados representam a média e a estimativa do desvio-padrão da determinação em triplicata.; - ND = Não detectado.; Valores assinalados com a mesma letra minúscula, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Valores assinalados com a mesma letra maiúscula, na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para as amostras de geléia diet de morango foram encontrados acessulfame-k para ambos os fabricantes, além de aspartame para a do Fabricante 11. Apresentaram diferença significativa entre os lotes o acessulfame-k do Fabricante 8 e o aspartame do Fabricante 11. A geléia do Fabricante 8 continha declarada em seu rótulo a presença de sucralose, fato que justifica a baixa concentração de acessulfame-k encontrada nessa amostra.

Um cromatograma referente aos padrões e à amostra de geléia de morango diet isenta de edulcorantes está disposto na **Figura 2**, onde os cinco edulcorantes avaliados aparecem separados, com seus respectivos tempos de retenção.



ACE: acessulfame; SAC: sacarina; CIC: ciclamato; ASP: aspartame; NEO: neotame.
Figura 2. Perfil cromatográfico obtido na determinação de edulcorantes (ACE: acessulfame - 227 nm; SAC: sacarina - 201 nm; CIC: ciclamato - 192 nm; ASP: aspartame - 192 nm; NEO: neotame - 192 nm), referentes aos padrões (A, B, C) e à amostra geléia (D, E, F). Condições cromatográficas: coluna Pinnacle II, C18, 5 μ m, 150x4,6 mm d.i. (Restek); fase móvel composta por tampão fosfato de sódio monobásico (5 mM, pH 7,0) e acetonitrila; detecção por arranjo de diodos.

4. CONCLUSÕES

A eluição por gradiente foi efetiva na separação dos cinco edulcorantes, para a matriz avaliada.

A metodologia utilizada mostrou-se eficiente através dos parâmetros de validação avaliados.

Também demonstrou ser satisfatória devido à simplicidade e rapidez das análises, fundamental para a fiscalização de produtos "diet/light/zero" e para estudos de estabilidade.

5. BIBLIOGRAFIA

AQUINO, F. W. B.; AMORIM, A. G. N.; PRATA, L. F.; NASCIMENTO, R. F. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n.1, p. 32-38, 2004.

BĚLÁKOVÁ, S.; BENEŠOVÁ, K.; MIKULIKOVÁ, R.; SVOBODA, Z. Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 321-325, 2011.

BERGAMO, A. B.; SILVA, J. A. F.; JESUS, D. P. Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1714-1717, 2011.

CALCUTT, R., BRODDY, R. **Statistic for Analytical Chemists**. 1 ed. Chapman and Hall, Londres. 1983. 1007p.

CASALS, I.; REIXACH, M.; AMAT, J.; FUENTES, M.; SERRA-MAJEM, L. Quantification of cyclamate and cyclohexylamine in urine samples using high performance liquid chromatography with trinitrobenzenesulfonic acid pre-column derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 750, n. 1/2, p. 397-402, 1996.

CHEN, O.; MOU, S.; LIU, K.; YANG, Z.; NI, Z. Separation and determination of four artificial sweeteners and citric acid by high-performance anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 771, n. 1/2, p. 135-143, 1997.

CHEN, Q.; WANG, J. Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 937, n. 1/2, p. 57-64, 2001.

DEMIRALAY, E. C.; OZKAN, G.; GUZEL-SEYDIM, Z. Isocratic Separation of Some Food Additives by Reversed Phase Liquid Chromatography. **Chromatographia**, v. 63, n. 1/2, p. 215-219, 2006.

DOSSI, N.; TONIOLO, R.; SUSMEL, S.; PIZZARIELLO, A., BONTEMPELLI, G. Simultaneous RP-LC Determination of Additives in Soft Drinks. **Chromatographia**, v. 63, n. 11/12, p. 557-562, 2006.

DIAS, C. B., GODOY, H. T. Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para determinação de edulcorantes por UPLC-PDA. 2011. 168 f. Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2011.

FARHADI, A., KESHAVARZIAN, A., HOLMESB, E. W., FIELDS, J., ZHANG, L., BANAN, A. Gas chromatographic method for detection of urinary sucralose: application to the assessment of intestinal permeability. **Journal of Chromatography B**, v. 784, n. 1, p.145-154, 2003.

GRUZ, J.; NOVAK, O.; STRNAD, M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p.789-794, 2008.

HORIE, M.; ISHIKAWA, F.; OISHI, M.; SHINDO, T.; YASUI, A.; ITO, K. Rapid determination of cyclamate in foods by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, n. 1/2, p. 423-428, 2007.

HUANG, Z.; MA, J.; CHEN, B.; ZHANG, Y.; YAO, S. Determination of cyclamate in foods by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, n. 2, p. 233-237, 2006.

HUNG, P. V., HATCHER, D. W. Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) quantification of carotenoids in durum wheat: Influence of genotype and environment in relation to the colour of yellow alkaline noodles (YAN). **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1510-1516, 2011.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. INMETRO: Rio de Janeiro, 2010.

LOOS, R.; GAWLIK, B. M.; BOETTCHER, K.; LOCORO, G.; CONTINI, S.; BIDOGLIO, G. Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 7, p. 1126-1131, 2009.

NABORS, L. O. **Alternative Sweeteners**. 3ed, revisado e expandido, Suíça, Marcel Dekker, 2001.

NAKAIE, Y.; YOGI, T.; KAKEHI, K.; INOUE, D.; HIROSE H.; HASHIMOTO S.; TONOGAI Y. Simultaneous and simple determination of saccharin and acesulfame K in foods by GC-NPD. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 40, n. 3, p. 223-229, 1999.

PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, 1190-1198, 2008.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2 ed., Wiley-Interscience, 1997, 765p.

TORLONI, M. R.; NAKAMURA, M. U.; MEGALE, A.; SANCHEZ, V. H. S.; MANO, C.; FUSARO, A. S.; MATTAR, R. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. Rio de Janeiro, **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 5, p. 267-275, 2007.

WALKER, J. C.; ZAUGG, S. E.; WALKER, E. B. Analysis of beverages by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 781, n. 1/2, p. 481-485, 1997.

WASIK, A.; MCCOURT, J.; BUCHGRABER, M. Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering

detection - Development and single-laboratory validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, n. 1/2, p. 187–196, 2007.

XIU-QIN, L.; CHAO, J.; WEI, Y.; YUN, L.; MIN-LI, Y.; XIAO-GANG, C. UPLC-DAD Analysis for simultaneous determination of ten synthetic preservatives in foodstuff. **Chromatographia**, v. 68, n. 1/2, p. 57–63, 2008.

YANG, D.; CHEN, B. Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in foods by HPLC/ESI-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 8 p. 3022–3027, 2009.

ZHU, Y; GUO, Y.; YE, M.; JAMES, F. S. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, n. 1, p. 143–146, 2005.

ZYGLER, A.; WASIK, A.; NAMIESNIK, J. Retention behaviour of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents. **Talanta**, v. 82, n. 5, p. 1742-1748, 2010.

Determinação e avaliação de cinco edulcorantes em alimentos por HPLC

Daniela de Queiroz Pane, Helena Teixeira Godoy

**Departamento de Ciência de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP**

Determinação e avaliação de cinco edulcorantes por HPLC em alimentos

Daniela de Queiroz Pane¹, Helena Teixeira Godoy¹

1. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil

RESUMO

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada na determinação de cinco edulcorantes (acesulfame-k, sacarina, ciclamato, aspartame e neotame) utilizados pela indústria de alimentos e presentes em diferentes alimentos da categoria "diet/light/zero", tais como refrigerantes, néctares e sucos, pós para preparo de refresco, pudins e cappuccinos, achocolatados, geléias, gelatina, molho tipo "barbecue", catchup e adoçantes de mesa. Para a separação foi utilizada uma coluna Pinnacle II, C18, 5 μm , 150x4,6 mm d.i., da Restek, sistema de gradiente linear, sendo a fase móvel composta por fase aquosa (5 mM de tampão fosfato de sódio monobásico; pH 7,0) e fase orgânica (acetonitrila). Foram encontradas amostras com a presença de até três edulcorantes diferentes. Dentre os produtos analisados o acesulfame-k foi o edulcorante mais empregado, seguido pelo aspartame. As concentrações dos edulcorantes nas amostras variaram entre 0,3 e 25,8 $\text{mg}\cdot 100\text{ml}^{-1}$ para o acesulfame-k; entre 1,3 e 15,8 $\text{mg}\cdot 100\text{ml}^{-1}$ para a sacarina; entre 36,7 e 79,4 $\text{mg}\cdot 100\text{ml}^{-1}$ para o ciclamato e entre 2,7 e 55,9 $\text{mg}\cdot 100\text{ml}^{-1}$ para o aspartame. Em nenhuma amostra foi encontrado neotame. Nos adoçantes de mesa as concentrações de acesulfame-k, sacarina, ciclamato e aspartame variaram, respectivamente, de 29,7 a 37,2 $\text{mg}\cdot 100\text{ml}^{-1}$; de 359,5 a 1182,2 $\text{mg}\cdot 100\text{ml}^{-1}$; de 531,8 a 1125,6 $\text{mg}\cdot 100\text{ml}^{-1}$ e de 167,6 a 817,6

mg.100ml⁻¹. As amostras de molho tipo "catchup" e molho tipo "barbecue" apresentaram concentrações de acesulfame-k acima do permitido pela legislação. Uma das amostras de pó para preparo de pudim sabor chocolate também apresentou concentração acima do permitido, porém, para sacarina. As amostras de refrigerante sabor limão, sabor guaraná, tipo cola e de refresco em pó apresentaram concentrações superiores às concentrações declaradas no rótulo e em um dos adoçantes de mesa detectou-se a presença de um edulcorante a mais do que havia declarado em seu rótulo. Para amostras contendo cacau em sua formulação o método apresentou uma limitação quanto à determinação de ciclamato devido a presença de um interferente no mesmo tempo de retenção.

ABSTRACT

The high performance liquid chromatography (HPLC) was used in the determination of five sweeteners (acesulfame K, saccharin, cyclamate, aspartame and neotame) used by the food industry and present in different foods in the "diet / light / zero", such as soft drinks, nectars and juices, powders for preparation of soft drinks, puddings and cappuccinos, chocolate, jams, jelly, sauce type "barbecue", ketchup and tabletop sweeteners. For the separation was used a column Pinnacle II, C18, 5 mm, 150x4, 6 mm di, of Restek, gradient system linear, being the mobile phase composed by aqueous phase (5 mM sodium phosphate buffer monobasic; pH 7,0) and organic phase (acetonitrile). Been found samples with the presence of up to three sweeteners different. Among the products analyzed, acesulfame-K was the most widely used sweetener, followed by aspartame. The concentrations sweeteners in

the samples varied between 0.3 and 25.8 mg.100mL⁻¹ for acesulfame-k; between 1.3 and 15.8 mg.100mL⁻¹ for the saccharin; between 36.7 and 79, 4 mg.100mL⁻¹ for cyclamate and between 2.7 and 55.9 mg.100mL⁻¹ for aspartame. In no sample was found neotame. In tabletop sweeteners the concentrations of acesulfame-k, saccharin, cyclamate and aspartame varied, respectively, from 29.7 to 37.2 mg.100mL⁻¹; 359.5 to 1182.2 mg.100mL⁻¹; of 531 , 8 to 1125.6 mg.100mL⁻¹ and 167.6 to 817.6 mg.100mL⁻¹. Samples type sauce "ketchup" sauce like "barbecue" showed concentrations of acesulfame-k above those permitted by law. A sample of powder for chocolate pudding flavor also showed concentrations above the permitted, however, to saccharin. Samples of lemon-flavored soda, flavored guarana, cola and powdered drink mixes showed higher concentrations to the concentrations stated on the label and one of tabletop sweeteners detected the presence of a sweetener more than was stated on its label. For samples containing cocoa in their formulation the method had a limitation respect to determination of cyclamate due to presence of one interferer in the same retention time.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por produtos ligados à saúde e à estética permitiu que os edulcorantes invadissem as prateleiras dos supermercados e os lares dos brasileiros. Além da questão estética, algumas condições clínicas como o diabetes *mellitus* e a obesidade, cada vez mais prevalentes na população mundial, exigem a restrição definitiva ou prolongada da ingestão de sacarose, o que determina a prescrição médica da ingestão de alimentos “diet/light”, cuja formulação contém edulcorantes (TORLONI et al., 2007).

Uma prática comum na indústria de alimentos é a mistura de edulcorantes em um mesmo alimento, o que traz uma sinergia de dulçor permitindo o uso de níveis mais baixos, mas também torna um desafio o desenvolvimento de um método capaz de detectar os diferentes edulcorantes simultaneamente (HUANG et al., 2006; ZYGLER et al., 2009).

A necessidade de analisar esses compostos em uma variedade tão grande de matrizes resultou no desenvolvimento de diferentes métodos (PIETRA et al., 1990).

Dentre as técnicas de separação cromatográficas foram desenvolvidas metodologias por cromatografia a gás - CG (NAKAIE et al., 1999; FARHADI et al., 2003), iônica (CHEN et al., 1997; CHEN & WANG, 2001; ZHU et al., 2005), líquida de alta eficiência - HPLC (CASALS et al., 1996; AQUINO et al., 2004; DEMIRALAY et al., 2006; DOSSI et al., 2006; WASIK et al., 2007; YANG & CHEN, 2009) e líquida acoplada a detector de massas - LC/MS (HUANG et al., 2006; LOOS et al., 2009). Esse último, embora permita a determinação de até sete ou nove compostos diferentes, demanda equipamentos de maior custo e exige especialização do analista, o que torna onerosa sua aplicação em análises de rotina em indústrias de alimentos.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é o método mais comumente empregado para a análise simultânea de edulcorantes (QUINLAN & JENNER, 1990; CASALS et al, 1996; AQUINO et al., 2004; DEMIRALAY et al., 2006; DOSSI et al., 2006; LINO e PENA, 2010; ZYGLER et al., 2010; CHENG & WU, 2011; HASHEMI et al., 2011; KRITSUNANKULA & JAKMUNEEB, 2011; WANG et al. 2011).

Metodologias que identifiquem e quantifiquem os edulcorantes em alimentos é importante por permitir a fiscalização dos alimentos pelos órgãos regulamentadores, para o controle de qualidade por parte das indústrias e para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas. Este trabalho objetiva a determinação de cinco edulcorantes em alimentos através da técnica de HPLC utilizando a detecção por arranjo de diodos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras

A determinação dos edulcorantes foi realizada em diferentes produtos “diet”, “light” e “zero” disponíveis no mercado, sendo eles refrigerantes (sabor cola, sabor guaraná e sabor limão), néctares (de uva, pêssego, goiaba, maracujá e laranja), pós para preparo de refresco (sabor maçã e sabor laranja), pudins (sabor chocolate e sabor baunilha) e cappuccinos (tradicional e com canela), achocolatados, geléia de morango, gelatina (sabor uva e sabor morango), molho tipo “barbecue”, molho tipo “catchup” e adoçantes de mesa. Todos os produtos foram analisados de pelo menos dois diferentes fabricantes, exceto para as amostras de néctares de goiaba, maracujá e laranja, gelatina de morango, molho tipo “barbecue” e molho tipo “catchup”, que foram encontradas disponíveis no mercado de apenas um fabricante e para os adoçantes de mesa, os quais foram analisados de seis diferentes fabricantes.

As amostras foram adquiridas em supermercados da região de Campinas e de São Paulo. Foram analisados três lotes distintos de cada produto, sendo esses diferenciados pela data de fabricação. Cada lote foi composto por três embalagens distintas, as quais foram analisadas individualmente e em duplicata, sempre dentro do prazo de validade das amostras.

2.2. Reagentes

O padrão de acesulfame-k foi adquirido da Fluka (EUA), o aspartame, a sacarina sódica hidratada e o ciclamato de sódio, da Sigma-Aldrich (EUA) e o padrão de neotame foi doado pela empresa Sweetmix (Brasil). A acetonitrila grau cromatográfico foi adquirida da empresa J. T. Baker (EUA), o fosfato de sódio monobásico monohidratado e o ácido ortofosfórico da Merck (Alemanha) e o hidróxido de sódio da Carlo Erba (Itália). A água utilizada no preparo dos reagentes e da fase móvel foi purificada através do sistema Milli-Q (Millipore, EUA) e posteriormente filtradas em filtros com poros de 0,45 µm de diâmetro da Millipore (EUA).

2.3. Equipamento

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido Agilent (EUA) série 1100, com injetor automático de capacidade de 1 a 100 µL, degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) UV-visível. O sistema foi controlado pelo software HP-Chemstation, o qual também gerenciou o sistema de aquisição dos dados. Para o processo cromatográfico foi utilizada uma coluna Pinnacle II, C18, 5 µm, 150x4,6 mm d.i., produzida pela Restek (EUA).

3. Determinação dos edulcorantes

3.1. Preparo de amostra

Os refrigerantes foram colocados no ultrassom por 5 minutos, para remoção total do gás carbônico, antes das etapas de diluição e filtração. Os adoçantes de mesa líquidos foram apenas diluídos em água. Os néctares foram inicialmente diluídos e em seguida centrifugados por 5 minutos a 5.000 rpm, para serem finalmente filtrados.

Dos alimentos em pó (para preparo de refresco, pudim, cappuccino, achocolatado, gelatina e adoçantes de mesa) foram pesados 1g e para o molho tipo "barbecue", catchup e geléia foram pesados 2,5g, diretamente em balões volumétricos de 25µL. Em seguida, completou-se o volume com água, sendo então colocados no ultrassom por 15 minutos, para total solubilização. Exceto para os adoçantes de mesa, as amostras foram então centrifugadas por 5 minutos a 5.000rpm. Para as gelatinas, adicionou-se 350 µL de ácido tricloroacético para a precipitação de proteínas e o balão foi então avolumado com água antes da etapa de centrifugação.

Todas as amostras foram diluídas em água 10 vezes e filtradas em filtro Millex (HV Millipore), com poros de 0,45µm de diâmetro. Deste filtrado, 10µl foram imediatamente injetados no cromatógrafo.

Cada lote foi formado por três embalagens que foram analisadas em duplicata.

3.2. Condições cromatográficas

A separação dos edulcorantes foi realizada através de um sistema de gradiente linear, com vazão de 1 mL.min⁻¹, sendo a fase móvel composta por fase aquosa (5 mM de tampão fosfato de sódio monobásico; pH 7,0 acertado com hidróxido de sódio) e fase orgânica (acetoneitrila), temperatura de 40°C e vazão de 1mL.min⁻¹.

A Tabela 1 ilustra o sistema de gradiente acima descrito.

As condições iniciais foram então retomadas e a coluna re-equilibrada por 5 minutos, antes da próxima injeção.

Tabela 1. Gradiente utilizado para o método de separação de edulcorantes por HPLC.

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	94	6
8	94	6
9	85	15
16	85	15
17	70	30
26	70	30

A detecção foi realizada em detector de arranjo de diodos (DAD), sendo que os comprimentos de onda monitorados foram: 192 nm (para ciclamato de sódio, aspartame e neotame), 201 nm (para sacarina sódica) e 227 nm (para acessulfame-K). A identificação foi realizada por comparação dos tempos de retenção, obtidos pela análise do padrão isoladamente, por co-cromatografia e através dos espectros obtidos pelo detector de DAD.

A quantificação foi feita por padronização externa, sendo que cada curva analítica foi construída contendo sete a nove pontos de concentração em triplicatas verdadeiras, com exceção do acessulfame-k, que pela grande variação da concentração utilizada foi acrescida a essa curva mais dois pontos. As curvas analíticas foram construídas com a matriz geléia por ser essa a mais complexa dentre as amostras analisadas. Para isso foi adquirida matriz isenta de edulcorantes e estes foram adicionados. Para o acessulfame-K a faixa de concentração foi de 0,4 a 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; para a sacarina sódica, de 1,0 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; para o

ciclamato de sódio, de 36 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; para o aspartame, de 1,0 a 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para o neotame, de 2,5 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.3. Análise estatística

Realizou-se o teste de Tukey através do programa Statistica 7.0 a fim de verificar se existiu ou não diferença significativa entre os lotes e dentro de um mesmo lote, para cada produto

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os perfis cromatográficos de algumas das amostras analisadas.

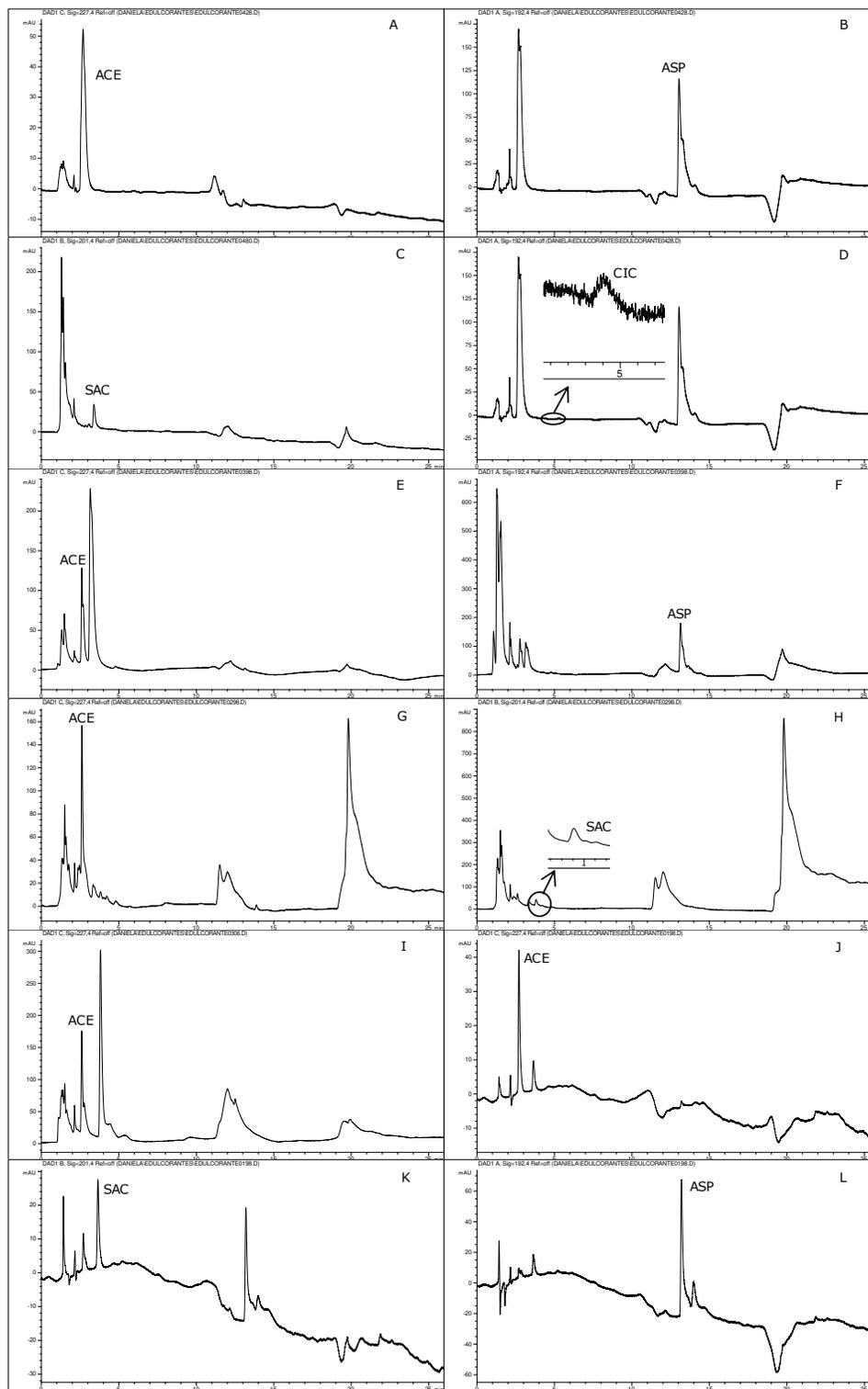


Figura 1. Perfil cromatográfico obtido na determinação de edulcorantes (ACE: acessulfame -227 nm; SAC: sacarina -201 nm; CIC: ciclamato -192 nm; ASP: aspartame - 192 nm; NEO: neotame - 192 nm), referentes às amostras de refrigerante tipo cola do Fabricante 1 (A, B), néctar de uva do Fabricante 2 (C, D), geléia do Fabricante 11 (E e F), cappuccino do Fabricante 8 (G, H), achocolatado do Fabricante 6 (I) e pó para o preparo de pudim sabor baunilha do Fabricante 10 (J, K, L). Condições cromatográficas: coluna Pinnacle II, C18, 5 µm, 150x4,6 mm d.i. (Restek); fase móvel composta por tampão fosfato de sódio monobásico (5 mM, pH 7,0) e acetonitrila; detecção por arranjo de diodos.

A Tabela 2 apresenta as taxas de recuperações de cada edulcorante, nos dois níveis de concentração analisados.

Tabela 2. Taxas de recuperação (%) dos edulcorantes nos níveis de concentração empregados.

Amostra	Acessulfame-k		Sacarina		Ciclamato		Aspartame		Neotame	
	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	%								
Refrigerante (guaraná)	15	101,1	10	100,3	50	100,7	5	100,3	10	98,5
	25	100,9	25	99,6	70	100,3	11	99,7	35	97,0
Néctar	0,8	97,4	1	98,4	36	85,2	9	99,5	10	92,1
	2,0	95,3	8	97,9	50	88,3	19	100,3	35	93,4
Refresco em pó	2	99,7	10	101,3	50	104,7	24	99,8	10	97,2
	8	101,2	30	100,7	70	100,2	35	96,5	35	98,1
Achocolatado	10	98,1	10	99,2	36	ND*	30	98,1	10	101,3
	20	94,6	30	97,3	46	ND*	50	90,2	35	94,6
Cappuccino	30	94,1	1,2	98,5	36	ND*	3	86,3	10	92,3
	45	95,3	2,0	99,8	46	ND*	11	87,6	35	88,7
Pudim	1,0	97,3	5	95,6	9	91,6	3	93,5	10	96,7
	2,0	96,1	13	97,9	20	88,8	10	95,1	35	92,1
Gelatina	62	88,6	10	97,1	50	89,0	45	99,9	10	87,3
	66	90,2	30	96,2	70	90,5	65	103,4	35	90,2
Geléia	10	98,9	10	99,3	50	98,7	30	100,8	10	98,0
	20	98,0	30	98,9	70	99,1	41	98,4	35	96,5
"Catchup"	105	100,3	10	102,4	50	102,3	30	89,7	10	99,7
	125	100,8	30	101,8	70	101,4	50	93,2	35	100,8
Molho "barbecue"	170	98,8	10	100,2	50	89,0	30	102,7	10	99,4
	225	99,7	30	103,4	70	91,4	50	100,2	35	97,8
Adoçante de mesa	1	103,7	13	101,1	80	99,8	13	100,7	10	98,7
	5	101,2	22	98,4	140	98,9	21	101,4	35	99,4

ND* = não determinado

Para todos os edulcorantes as taxas de recuperação variaram entre 85,2 – 103,7%, indicando que as taxas de extração dos edulcorantes estão dentro do aceitável.

Os níveis dos edulcorantes foram avaliados segundo o "Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos para fins especiais" (BRASIL, 1998) e o "Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos" (BRASIL, 2008).

Poucos trabalhos sobre edulcorantes em produtos brasileiros são encontrados na literatura, por isso torna-se difícil a comparação com a literatura. Além disso, as concentrações encontradas nesses estudos para os produtos avaliados são diversas, dificultando ainda mais a comparação. Dentre os produtos analisados, apenas as amostras de refrigerantes, néctares e pós para preparo de refresco apresentavam declaradas em seus rótulos as quantidades de edulcorantes adicionados pelo fabricante.

Dentre os refrigerantes analisados (Tabela 3) observou-se que o aspartame foi o edulcorante utilizado com mais frequência, seguido pelo acessulfame-k.

Tabela 3. Teor* de edulcorantes ($\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$) presentes em refrigerantes, néctares e sucos.

Amostra	Lote	Acessulfame-k	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Refrigerante de baixa caloria sabor limão	1	$23,6 \pm 0,5^a$			$15,4 \pm 0,7^a$
	2	$25,3 \pm 0,4^b$			$15,9 \pm 0,2^a$
	3	$24,5 \pm 0,1^b$			$14,9 \pm 0,1^a$
Fabricante 1	Média	$24,5 \pm 0,8$			$15,4 \pm 0,6$
Declarado no rótulo		5	-	-	21
Refrigerante de baixa caloria sabor limão	1	$5,0 \pm 0,6^a$			$22,3 \pm 0,6^a$
	2	$5,2 \pm 0,1^a$			$21,9 \pm 1,1^a$
	3	$5,3 \pm 0,1^a$			$21,8 \pm 0,6^a$
Fabricante 2	Média	$5,2 \pm 0,3$			$22,0 \pm 0,7$
Declarado no rótulo		5	-	-	21
Guaraná Zero	1		$6,2 \pm 0,1^a$	$36,69 \pm 1,81^a$	$7,61 \pm 0,22^a$
	2		$6,4 \pm 0,1^a$	$40,17 \pm 1,91^a$	$8,52 \pm 0,28^b$
	3		$6,3 \pm 0,1^a$	$37,13 \pm 0,53^a$	$8,39 \pm 0,27^b$
Fabricante 2	Média		$6,3 \pm 0,1$	$37,99 \pm 2,08$	$8,17 \pm 0,48$
Declarado no rótulo		-	5	31	12
Guaraná Zero	1		$14,3 \pm 0,5^a$	$49,8 \pm 0,7^a$	
	2		$14,0 \pm 0,4^a$	$66,4 \pm 0,2^b$	
	3		$13,2 \pm 0,1^b$	$79,4 \pm 0,1^c$	
Fabricante 3	Média		$13,8 \pm 0,6$	$65,2 \pm 12,9$	

Declarado no rótulo		-	16	69,7	-
	1	13,5 ± 0,4 ^a			38,6 ± 1,3 ^a
Refrigerante tipo cola light Fabricante 1	2	13,6 ± 0,2 ^a			42,3 ± 0,5 ^b
	3	13,2 ± 0,1 ^a			41,5 ± 0,5 ^b
	Média	13,5 ± 0,3			40,8 ± 1,8
Declarado no rótulo		8,99	-	-	34,69
	1	12,6 ± 0,2 ^a			25,5 ± 0,5 ^a
Refrigerante tipo cola light Fabricante 2	2	11,6 ± 0,5 ^b			25,6 ± 0,9 ^a
	3	11,5 ± 0,3 ^b			23,4 ± 1,2 ^a
	Média	11,9 ± 0,6			24,8 ± 1,3
Declarado no rótulo		13	-	-	24
	1		3,4 ± 0,3 ^a	38,3 ± 1,4 ^a	
Néctar de Uva light Fabricante 4	2		3,6 ± 0,1 ^a	36,7 ± 3,3 ^a	
	3		3,8 ± 0,2 ^a	37,0 ± 3,8 ^a	
	Média		3,7 ± 0,4	37,3 ± 2,8	
Declarado no rótulo		-	4	40	-
	1	3,7 ± 0,1 ^a			
Néctar de Uva light Fabricante 2	2	3,4 ± 0,1 ^a			
	3	3,7 ± 0,3 ^a			
	Média	3,6 ± 0,2			
Declarado no rótulo		3	-	-	-
	1	2,5 ± 0,4 ^a			
Néctar de Pêssego light Fabricante 4	2	3,2 ± 0,1 ^b			
	3	2,6 ± 0,1 ^a			
	Média	2,7 ± 0,4			
Declarado no rótulo		3	-	-	-
	1	2,7 ± 0,1 ^a			
Néctar de Pêssego light Fabricante 2	2	2,7 ± 0,1 ^a			
	3	2,6 ± 0,0 ^a			
	Média	2,7 ± 0,1			
Declarado no rótulo		3	-	-	-
	1	1,5 ± 0,2 ^a			
Néctar de Goiaba light Fabricante 2	2	1,4 ± 0,1 ^a			
	3	1,5 ± 0,1 ^a			
	Média	1,5 ± 0,1			
Declarado no rótulo		3	-	-	-
	1	11,8 ± 0,8 ^a			14,0 ± 1,1 ^a
Néctar de Maracujá light	2	10,2 ± 0,5 ^b			13,6 ± 1,7 ^a

Fabricante 2	3	9,9 ± 0,4 ^b			14,6 ± 0,9 ^a
	Média	10,6 ± 1,0			14,1 ± 1,2
Declarado no rótulo		10	-	-	-
	1	2,0 ± 0,1 ^a			
Néctar de Laranja light	2	1,9 ± 0,1 ^a			
Fabricante 2	3	1,9 ± 0,1 ^a			
	Média	1,9 ± 0,1			
Declarado no rótulo		3	-	-	-
	Diet	35	15	40	75
Legislação (BRASIL, 2008)	Light	26	10	56	56
	Zero	35	15	75	75

*Os dados representam a média e a estimativa do desvio-padrão da determinação em triplicata.; Valores assinalados com a mesma letra minúscula, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para o refrigerante de baixa caloria sabor limão foram encontrados apenas os edulcorantes acessulfame-k e aspartame, tanto para o Fabricante 1 quanto para o Fabricante 2. Somente o acessulfame-k do Fabricante 1 apresentou diferença significativa entre os lotes, além de sua concentração estar mais de quatro vezes acima do declarado em seu rótulo. Para o mesmo fabricante (1), a concentração de aspartame estava 29% abaixo do declarado em seu rótulo. Pode-se observar que ambos fabricantes utilizaram os mesmos edulcorantes, em diferentes concentrações para o acessulfame-k e na mesma concentração para o aspartame.

No refrigerante sabor guaraná foram encontrados sacarina e ciclamato para ambos os fabricantes e ainda aspartame para o Fabricante 2. Enquanto esse fabricante apresentou diferença significativa entre os lotes apenas para o aspartame, o Fabricante 3 apresentou para ambos edulcorantes presentes em seu produto (sacarina e ciclamato), indicando uma possível falha de homogeneização em seu processo. Além disso, a concentração de ciclamato estava 19% acima do declarado em seu rótulo. Observou-se que a não utilização do

aspartame por esse fabricante tornou necessária a adição de níveis superiores dos outros edulcorantes, se comparado ao fabricante 2 (três vezes mais sacarina e duas vezes mais ciclamato), evidenciando a presença de sinergismo entre os edulcorantes quando esses são adicionados de forma combinada, o que permite a utilização de níveis menores para se ter o mesmo efeito do dulçor (ZYGLER et al., 2009).

Para o refrigerante tipo cola foram encontrados apenas acessulfame-k e aspartame, em ambos os fabricantes. Para o Fabricante 1 as concentrações estavam acima do declarado em seu rótulo, sendo 49% para o acessulfame-k e 17% para o aspartame. Apresentaram diferença significativa entre os lotes o acessulfame-k do Fabricante 2 e o aspartame do Fabricante 1.

Dentre os néctares analisados observou-se a presença predominante do acessulfame-k na composição dos mesmos, exceto pelo néctar de uva light do fabricante 4. Esse edulcorante pode ter sido o mais usado devido à sua prolongada estabilidade em pH baixo, em solução aquosa, além de ser resistente ao tratamento térmico. (LIPINSKI & HANGER, 2001; KEMP, 2006). Esse mesmo fabricante utilizou diferentes edulcorantes em diferentes sabores de néctares.

Houve diferença significativa entre os lotes para o ciclamato do néctar de uva light do Fabricante 4, para o acessulfame-k do néctar de pêsego light do Fabricante 4 e do néctar de maracujá light do Fabricante 2.

Para os produtos em pó (Tabela 4) observa-se predominância de uso do acessulfame-k e do aspartame.

Tabela 4. Teor* de edulcorantes (mg.100mL⁻¹) presentes em preparado de achocolatados, pós para preparo de refresco, cappuccino, pudim e gelatina.

Amostra	Lote	Acessulfame-k	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Refresco em pó light sabor maçã Fabricante 5	1	2,4 ± 1,2 ^a			33,6 ± 8,1 ^a
	2	8,6 ± 3,2 ^a			28,3 ± 4,2 ^a
	3	4,2 ± 3,0 ^a			29,5 ± 5,1 ^a
	Média	5,2 ± 3,7			30,4 ± 5,9
Declarado no rótulo		4,5	-	-	-
Refresco em pó zero sabor maçã Fabricante 5	1	5,1 ± 2,8 ^a			27,1 ± 4,0 ^a
	2	3,7 ± 1,0 ^a			26,9 ± 1,2 ^a
	3	3,6 ± 3,4 ^a			26,2 ± 11,6 ^a
	Média	4,1 ± 2,4			26,7 ± 6,2
Declarado no rótulo		4,6	-	-	-
Refresco em pó light sabor laranja Fabricante 5	1	9,2 ± 0,1 ^a			16,8 ± 4,8 ^a
	2	8,7 ± 0,7 ^a			30,7 ± 8,5 ^a
	3	8,1 ± 0,5 ^a			24,4 ± 2,4 ^a
	Média	8,7 ± 0,7			24,0 ± 7,9
Declarado no rótulo		9,4	-	-	-
Refresco em pó zero sabor laranja Fabricante 5	1	1,5 ± 0,2 ^a			45,4 ± 3,3 ^a
	2	3,2 ± 2,4 ^a			47,8 ± 2,6 ^a
	3	3,3 ± 0,9 ^a			42,6 ± 2,4 ^a
	Média	2,7 ± 1,6			45,8 ± 2,6
Declarado no rótulo		3,9	-	-	-
Achocolatado light Fabricante 6	1	16,4 ± 3,3 ^a		**	
	2	15,7 ± 2,4 ^a		**	
	3	12,2 ± 0,7 ^b		**	
	Média	14,8 ± 2,8			
Declarado no rótulo		-	-	-	-
Achocolatado light Fabricante 1	1	4,1 ± 0,1 ^a		**	
	2	2,5 ± 0,5 ^b		**	
	3	5,3 ± 0,2 ^c		**	
	Média	4,0 ± 1,3			
Declarado no rótulo		-	-	-	-
Pó para preparo de cappuccino light	1	25,8 ± 6,9 ^a			51,0 ± 4,9 ^a
	2	18,3 ± 5,8 ^a			24,1 ± 3,3 ^b
	3	24,5 ± 6,4 ^a			28,9 ± 5,3 ^b

Fabricante 7	Média	22,9 ± 6,5		34,7 ± 13,0
Declarado no rótulo		-	-	-
Pó para preparo de cappuccino light com canela	1	12,8 ± 4,7 ^a	2,8 ± 0,9 ^a	
	2	13,3 ± 5,8 ^a	1,7 ± 0,2 ^b	
	3	12,0 ± 6,1 ^a	1,3 ± 0,2 ^b	
Fabricante 8	Média	12,8 ± 4,8	1,9 ± 0,8	
Declarado no rótulo		-	-	-
Pó para preparo de pudim diet sabor baunilha	1		6,7 ± 0,2 ^a	6,5 ± 0,2 ^a
	2		6,7 ± 0,3 ^a	6,0 ± 0,3 ^a
	3		7,8 ± 0,1 ^b	6,4 ± 0,2 ^a
Fabricante 9	Média		7,1 ± 0,6	6,3 ± 0,3
Declarado no rótulo		-	-	-
Pó para preparo de pudim zero sabor baunilha	1	1,0 ± 0,7 ^a	3,0 ± 0,7 ^a	13,7 ± 0,4 ^a
	2	0,6 ± 0,3 ^a	3,4 ± 0,7 ^a	14,7 ± 2,5 ^a
	3	0,3 ± 0,2 ^a	3,3 ± 0,6 ^a	13,9 ± 0,5 ^a
Fabricante 10	Média	0,6 ± 0,5	3,2 ± 0,6	14,1 ± 1,4
Declarado no rótulo		-	-	-
Pó para preparo de pudim diet sabor chocolate	1		11,8 ± 0,6 ^a	**
	2		8,4 ± 0,2 ^b	**
	3		8,3 ± 0,3 ^b	**
Fabricante 9	Média		11,1 ± 7,8	3,0 ± 0,4
Declarado no rótulo		-	-	-
Pó para preparo de pudim zero sabor chocolate	1		15,8 ± 0,5 ^a	**
	2		13,9 ± 1,5 ^a	**
	3	0,5 ± 0,2	15,8 ± 1,1 ^a	**
Fabricante 10	Média		15,1 ± 1,3	12,1 ± 0,8
Declarado no rótulo		-	-	-
Pó para preparo de gelatina zero sabor uva	1			13,9 ± 2,7 ^a
	2			11,6 ± 1,1 ^{ab}
	3			10,8 ± 0,3 ^b
Fabricante 10	Média			12,1 ± 2,2
Declarado no rótulo		-	-	-
Pó para preparo de gelatina zero sabor uva	1			45,2 ± 5,3 ^a
	2			55,9 ± 13,5 ^a
	3			48,8 ± 7,8 ^a
Fabricante 8	Média			50,0 ± 9,5
Declarado no rótulo		-	-	-

Pó para preparo de gelatina zero sabor morango Fabricante 10	1 2 3 Média				14,7 ± 1,0 ^a 17,9 ± 0,6 ^{ab} 13,1 ± 5,2 ^b 15,0 ± 3,4
Declarado no rótulo		-	-	-	-
Legislação (BRASIL, 2008)	Diet	35	15	40	75
	Light	26	10	30	56
	Zero	35	15	40	75

*Os dados representam a média e a estimativa do desvio-padrão da determinação em triplicata.; Valores assinalados com a mesma letra minúscula, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); (**) Não analisado devido à presença de um interferente.

Para o refresco em pó light sabor maçã as concentrações de ambos edulcorantes estavam acima do declarado em seu rótulo em algumas amostras/lotos, sendo em média 14% para o acessulfame-k e 5% para o aspartame. Também estavam acima do descrito em seus rótulos as concentrações de aspartame do refresco em pó light sabor laranja (9%) e do refresco em pó zero sabor laranja (31%). Embora na análise estatística não houvesse diferença significativa entre os três lotes, houve grande diferença entre as embalagens dos mesmos, o que acabou por mascarar as diferenças entre os lotes e mostrou um controle de qualidade ineficiente.

Nos achocolatados foi encontrado apenas o acessulfame-k e as concentrações diferiram significativamente entre os lotes, para ambos os fabricantes (1 e 6).

Para os cappuccinos, foram encontrados acessulfame-k para os produtos de ambos os fabricantes, além de aspartame no do Fabricante 7 e de sacarina no do Fabricante 8. Houve diferença significativa entre os lotes para a concentração de aspartame do Fabricante 7 e para a sacarina do Fabricante 8.

Nos pós para preparo de pudim foram encontrados os edulcorantes sacarina e aspartame nas amostras de ambos fabricantes,

sendo que as do Fabricante 10 apresentaram também acessulfame-k. As concentrações de sacarina do Fabricante 9 apresentaram diferenças significativas entre os lotes, tanto no sabor baunilha quanto no sabor chocolate, assim como as concentrações de acessulfame-k e aspartame também apresentaram para o sabor chocolate. A amostra de pó para o preparo de pudim sabor chocolate do Fabricante 10 apresentou concentração de sacarina ligeiramente acima do limite estabelecido pela legislação para sua categoria de produto.

Para as amostras de pós para o preparo de gelatina sabor uva e sabor morango foi encontrado apenas aspartame. Houve diferença significativa entre os lotes de ambos os sabores do Fabricante 10. Para esse fabricante havia no rótulo dos produtos a informação da presença de acessulfame-k, sacarina, ciclamato e aspartame, sendo esses três primeiros não encontrados nas amostras.

As amostras de achocolatados, o cappuccino do Fabricante 8 e os pós para preparo de pudim sabor chocolate indicavam em seus rótulos a presença de ciclamato. Entretanto, não foi possível identificá-lo devido a uma limitação do método, onde a presença de cacau na formulação desses produtos impossibilitou a determinação do ciclamato em virtude da presença de um interferente.

Nove amostras de produtos em pó apresentaram variação nas concentrações das replicatas, em que os lotes diferiram entre si, indicando ou um baixo controle de produção por parte da indústria ou mesmo problemas relacionados ao processamento de alimentos em pó.

O processamento desse tipo de alimento continua a ser regida pelo controle de custos. A maior parte dos equipamentos utilizados é relativamente antiga sendo concebida há várias décadas atrás, e as indústrias de alimentos ainda tentam melhor compreender e controlar o desempenho dos pós alimentícios. As misturas de pós geralmente contêm muitos ingredientes e se esses têm propriedades diferentes

entre si (em particular, o tamanho da partícula, a densidade e a porosidade) pode ocorrer segregação após a mistura (AHRNÉ & FITZPATRICK, 2005).

Além disso, não existe um padrão a ser seguido em relação ao processamento do pó (CUQ et al., 2010). No documento do projeto europeu "Food Powders" (2003) os pesquisadores destacaram a dificuldade de obtenção de um método de mistura ideal.

O edulcorante de maior prevalência utilizado nas geléias e molhos analisados foi o acesulfame-k (Tabela 5).

Tabela 5. Teor* de edulcorantes (mg.100mL⁻¹) presentes em geléias, catchup e molho tipo “barbecue”.

Amostra	Lote	Acessulfame-k	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Geléia diet de morango Fabricante 8	1	1,6 ± 0,1 ^a			
	2	1,4 ± 0,2 ^{ab}			
	3	1,2 ± 0,1 ^b			
	Média	1,4 ± 0,2			
Declarado no rótulo		-	-	-	-
Geléia diet de morango Fabricante 2	1	14,3 ± 2,2 ^a			22,5 ± 3,1 ^a
	2	14,3 ± 2,0 ^a			47,3 ± 5,6 ^b
	3	16,0 ± 3,4 ^a			43,4 ± 3,4 ^b
	Média	14,9 ± 2,4			37,8 ± 15,4
Declarado no rótulo		-	-	-	-
Molho light “catchup” Fabricante 8	1	110,7 ± 9,2 ^a			
	2	118,2 ± 10,7 ^a			
	3	118,4 ± 8,1 ^a			
	Média	115,8 ± 9,0			
Declarado no rótulo		-	-	-	-
Molho light “barbecue” Fabricante 8	1	215,1 ± 21,3 ^a			
	2	164,2 ± 15,9 ^b			
	3	217,5 ± 19,6 ^a			
	Média	198,9 ± 30,8			
Declarado no rótulo		-	-	-	-
Legislação (BRASIL, 2008)	Diet	35	15	40	75
	Light	26	10	30	56
	Zero	35	15	40	75

*Os dados representam a média e a estimativa do desvio-padrão da determinação em triplicata.; Valores assinalados com a mesma letra minúscula, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para as amostras de geléia diet de morango foram encontrados acessulfame-k para ambos os fabricantes, além de aspartame para a do Fabricante 11. Apresentaram diferença significativa entre os lotes o acessulfame-k do Fabricante 8 e o aspartame do Fabricante 11. A geléia do Fabricante 8 continha declarada em seu rótulo a presença de

sucralose, fato que justifica a baixa concentração de acessulfame-k encontrada nessa amostra.

Tanto no molho tipo "catchup" quanto no tipo "barbecue" foi encontrado apenas acessulfame-k e houve diferença significativa entre os lotes do molho tipo "barbecue". Ambos os produtos apresentavam concentrações de acessulfame-k superiores à permitida pela legislação, sendo de 4 vezes para o molho tipo "catchup" e de 7 vezes para o molho tipo "barbecue".

Entre os adoçantes de mesa observou-se diferentes combinações e proporções de edulcorantes, sendo as combinações de sacarina com ciclamato as mais frequentes.

Tabela 6. Teor* de edulcorantes (mg.100mL^{-1} ou mL.100mL^{-1}) presentes em adoçantes de mesa.

Amostra	Lote	Acessulfame-k	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Adoçante de mesa, em pó, Fabricante 1	1		$1882,2 \pm 0,4^a$	$1122,3 \pm 1,6^a$	
	2		$1882,3 \pm 1,4^a$	$1125,3 \pm 2,2^a$	
	3		$1881,9 \pm 1,4^a$	$1125,6 \pm 1,9^a$	
	Média				
Adoçante de mesa, em pó, Fabricante 2	1	$34,5 \pm 2,04^a$			$169,0 \pm 2,1^a$
	2	$36,3 \pm 3,02^a$			$167,6 \pm 1,9^a$
	3	$35,7 \pm 2,20^a$			$170,7 \pm 2,9^a$
	Média	$36,15 \pm 2,50$			$169,1 \pm 2,6$
Adoçante de mesa, em pó, Fabricante 3	1	$37,2 \pm 1,9^a$			$170,3 \pm 1,9^a$
	2	$36,1 \pm 3,2^a$			$167,7 \pm 1,4^a$
	3	$35,7 \pm 1,4^a$			$169,3 \pm 4,7^a$
	Média	$36,3 \pm 1,9$			$169,1 \pm 2,9$
Adoçante de mesa, em pó, Fabricante 4	1				$483,9 \pm 1,8^a$
	2				$483,4 \pm 2,0^a$
	3				$486,0 \pm 3,2^a$
	Média				$484,4 \pm 2,4$
Adoçante de mesa, em pó,	1				$632,6 \pm 0,9^a$
	2				$631,8 \pm 0,6^a$

Fabricante 5	3			632,9 ± 2,1 ^a
	Média			632,4 ± 1,3
Adoçante de mesa, líquido, Fabricante 3	1		929,4 ± 2,2 ^a	637,2 ± 4,4 ^a
	2		926,3 ± 2,6 ^a	639,2 ± 1,8 ^a
	3		929,7 ± 2,7 ^a	637,3 ± 1,5 ^a
	Média		928,5 ± 2,7	637,9 ± 2,8
Adoçante de mesa, líquido, Fabricante 1	1		727,5 ± 3,7 ^a	603,45 ± 2,1 ^a
	2		725,6 ± 3,3 ^a	603,72 ± 2,4 ^a
	3		724,7 ± 2,8 ^a	602,54 ± 0,6 ^a
	Média		725,9 ± 3,1	603,24 ± 1,7
Adoçante de mesa, cristal líquido, Fabricante 5	1		947,3 ± 1,1 ^a	640,6 ± 1,3 ^a
	2		947,2 ± 1,0 ^a	641,9 ± 1,6 ^a
	3		947,1 ± 1,4 ^a	641,2 ± 1,5 ^a
	Média		947,2 ± 1,0	641,3 ± 1,4
Adoçante de mesa, líquido, Fabricante 6	1	29,7 ± 1,1 ^a	360,6 ± 1,5 ^a	531,8 ± 2,0 ^a
	2	30,6 ± 2,0 ^a	360,6 ± 2,8 ^a	533,5 ± 2,5 ^a
	3	30,5 ± 3,0 ^a	359,5 ± 1,5 ^a	534,9 ± 1,5 ^a
	Média	30,2 ± 2,2	360,2 ± 2,0	533,4 ± 2,0
Adoçante de mesa, aspartame, líquido, Fabricante 5	1			815,9 ± 2,0 ^a
	2			817,6 ± 1,8 ^a
	3			816,4 ± 2,1 ^a
	Média			816,7 ± 1,7

*Os dados representam a média e a estimativa do desvio-padrão da determinação em triplicata.; Valores assinalados com a mesma letra minúscula, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Todas as amostras mostraram-se homogêneas, fato possivelmente explicado pelo fato de serem quase soluções puras. O adoçante de mesa em pó do Fabricante 3 apresentou acessulfame-k e aspartame, sendo que seu rótulo declarava a presença apenas do aspartame.

5. CONCLUSÕES

Os edulcorantes foram utilizados de forma combinada em grande parte das amostras, ocorrendo a presença de até três edulcorantes em um mesmo produto.

Dentre os refrigerantes, observou-se que o aspartame foi o edulcorante mais utilizado, seguido pelo acessulfame-k. Para os néctares e produtos em pó, houve também a predominância de uso do acessulfame-k, seguido pelo aspartame.

Não foi encontrado o edulcorante não permitido pela legislação brasileira, o neotame, e em algumas amostras o teor de edulcorante estava acima do permitido pela legislação ou diferenciado do rótulo do produto, o que evidencia a necessidade de maior controle pelos órgãos de fiscalização.

6. BIBLIOGRAFIA

AHRNÉ, L.; FITZPATRICK, J. J. Food powder handling and processing: Industry problems, knowledge barriers and research opportunities. **Chemical Engineering and Processing**, v. 44, n. 2, p. 209–214, 2005.

AQUINO, F. W. B.; AMORIM, A. G. N.; PRATA, L. F.; NASCIMENTO, R. F. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.1, p. 32-38, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde. . Resolução RDC nº 18, de 24 de março de 2008. **Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos**. Diário Oficial da União, Brasília, 2008.

CASALS, I.; REIXACH, M.; AMAT, J.; FUENTES, M.; SERRA-MAJEM, L. Quantification of cyclamate and cyclohexylamine in urine samples using highperformance liquid chromatography with trinitrobenzenesulfonic acid pre-column derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 750, n. 1/2, p. 397-402, 1996.

CHEN, O.; MOU, S.; LIU, K.; YANG, Z.; NI, Z. Separation and determination of four artificial sweeteners and citric acid by high-performance anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 771, n. 1/2, p. 135-143, 1997.

CHEN, Q.; WANG, J. Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 937, n. 1/2, p. 57-64, 2001.

CHENG, C.; WU, S. C. Simultaneous analysis of aspartame and its hydrolysis products of Coca-Cola Zero by on-line postcolumn derivation fluorescence detection and ultraviolet detection coupled two-dimensional high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Volume 1218, n. 20, p. 2976-2983, 2011.

CUQ, B.; RONDET, E.; ABECASSIS, J. Food powders engineering, between knowhow and science: Constraints, stakes and opportunities. **Powder Technology**, v. 208, n. 2, p. 244-251, 2010.

DEMIRALAY, E. C.; OZKAN, G.; GUZEL-SEYDIM, Z. Isocratic separation of some food additives by reversed phase liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 63, n. 1/2, p. 215-219, 2006.

DOSSI, N.; TONIOLO, R.; SUSMEL, S.; PIZZARIELLO, A., BONTEMPELLI, G. Simultaneous RP-LC Determination of Additives in Soft Drinks. **Chromatographia**, v. 63, n. 11/12, p. 557-562, 2006.

FARHADI , A., KESHAVARZIAN, A., HOLMESB, E. W., FIELDS, J., ZHANG, L., BANAN, A. Gas chromatographic method for detection of urinary sucralose: application to the assessment of intestinal permeability. **Journal of Chromatography B**, v. 784, n. 1, p.145-154, 2003.

FOOD POWDERS, Documento Estratégico para Pesquisa em Pós Alimentícios, 2003. Disponível em: <http://www.foodpowders.net/strategic.htm>, acesso em outubro de 2011.

HASHEMI, M.; HABIBI, A.; JAHANSHAHI, N. Determination of cyclamate in artificial sweeteners and beverages using headspace single-drop microextraction and gas chromatography flame-ionisation detection. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1258-1263, 2011.

KEMP, S. E. **Low-calorie sweeteners**. In: Spillane, W. J. Optimizing Sweet Taste in Food. England, Woodhead Publishing Limited, p.175-250, 2006.

KRITSUNANKULA, O.; JAKMUNEEB, J. Simultaneous determination of some food additives in soft drinks and other liquid foods by flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 84, n. 5, p. 1342-1349, 2011.

HUANG, Z.; MA, J.; CHEN, B.; ZHANG, Y.; YAO, S. Determination of cyclamate in foods by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, n. 2, p. 233-237, 2006.

LINO, C. M.; PENA, A. Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p.503-508, 2010.

LIPINSKI, G. R.; HANGER, L. Y. **Acessulfame K**. In: NABORS, L.O. Alternative Sweeteners, 3ed, revisado e expandido, Suíça, Marcel Dekker, 2001, p. 13-30.

LOOS, R.; GAWLIK, B. M.; BOETTCHER, K.; LOCORO, G.; CONTINI, S.; BIDOGLIO, G. Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 7, p. 1126-1131, 2009.

NAKAIE, Y.; YOGI, T.; KAKEHI, K.; INOUE, D.; HIROSE H.; HASHIMOTO S.; TONOGAI Y. Simultaneous and simple determination of saccharin and acesulfame K in foods by GC-NPD. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 40, n. 3, p. 223-229, 1999.

PIETRA, A. M.; CAVRINI, V.; BONAZZI, D.; BENFENATI, L. Analysis of aspartame and saccharin in pharmaceutical and dietary formulations. **Chromatographia**, v. 30, n. 3/4, p. 215 - 219, 1990.

QUINLAN, M. E.; JENNER, M. F. Analysis and Stability of the Sweetener Sucralose in Beverages. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 1, p. 244-246, 1990.

TORLONI, M. R.; NAKAMURA, M. U.; MEGALE, A.; SANCHEZ, V. H. S.; MANO, C.; FUSARO, A. S.; MATTAR, R. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. Rio de Janeiro, **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 5, p. 267-275, 2007.

WANG, Y.; XU, H. T.; XIE, Y. Y.; TIAN, Y. X.; SHEN, Y. D.; YOUNG, G.; WANG, H.; LEI, H. T.; SUN, Y. M. Development of polyclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for sodium saccharin residue in food samples. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 815-820, 2011.

WASIK, A.; MCCOURT, J.; BUCHGRABER, M. Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection - Development and single-laboratory validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, n. 1/2, p. 187-196, 2007.

YANG, D. J.; CHEN, B. Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in foods by HPLC/ESI-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 8, p. 3022-3027, 2009.

ZHU, Y.; GUO, Y.; YE, M.; JAMES, F. S. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, n. 1, p. 143-146, 2005.

ZYGLER, A.; WASIK, A.; NAMIESNIK, J. Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1082-1102, 2009.

ZYGLER, A.; WASIK, A.; NAMIESNIK, J. Retention behaviour of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents. **Talanta**, v. 82, n. 5, p. 1742-1748, 2010.

Comparação entre as metodologias por HPLC e
UPLC na determinação de edulcorantes em
alimentos

**Daniela de Queiroz Pane, Cíntia Botelho Dias,
Helena Teixeira Godoy**

**Departamento de Ciência de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP**

Comparação entre as técnicas HPLC e UPLC na determinação de edulcorantes em alimentos

Daniela de Queiroz Pane¹, Helena Teixeira Godoy¹, Cíntia Botelho Dias¹

1. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil

RESUMO

Um novo método desenvolvido para a determinação simultânea de edulcorantes por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi aplicado às diferentes amostras de alimentos da categoria “diet”, “light” e “zero”. Esse método foi comparado a outro, desenvolvido para a análise dos mesmos edulcorantes nos mesmos produtos, por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC). Comparando-se as duas metodologias observou-se que embora o método por HPLC utilize maior quantidade de solvente e apresente um maior tempo de corrida, permite a realização do mesmo número de análises com um menor custo, além de ser um equipamento mais comumente encontrado em laboratórios de análises de alimentos. A técnica por UPLC demonstra ser uma técnica “verde”, uma vez que gera menos resíduo ambiental se comparada à HPLC. Ambas as metodologias tiveram alguns parâmetros de validação avaliados e embora no UPLC tenham sido obtidos limites de detecção menores, melhor repetitividade e precisão intermediária e corridas mais curtas, o método por HPLC atende às necessidades da determinação de edulcorantes nos alimentos aqui analisados. Entretanto, o UPLC apresenta limitação quanto ao preparo das amostras, que exigem um maior cuidado, e aos custos, mais elevados em relação à coluna, solventes, reagentes e filtros.

ABSTRACT

A new method developed for the simultaneous determination of sweeteners by high performance liquid chromatography (HPLC) was applied to different food samples in the "diet", "light" and "zero". This method was compared to another, developed for the analysis of these sweeteners in such products by ultra performance liquid chromatography (UPLC). Comparing the two methodologies it was observed that although the method by HPLC uses a greater amount of solvent and presents a greater running time, allowing the realization of the same number of analyzes with a lower cost, besides being an equipment more commonly found in laboratories for food analyzes. The UPLC technique proves to be a "green" since it generates less environmental waste compared to HPLC. Both methods have some validation parameters and although the UPLC has obtained lower detection limits, better repeatability and intermediate precision and shorter runs, the HPLC method meets the needs of the determination of sweeteners in foods analyzed here. However, the UPLC has a limitation as to the preparation of the samples, which require greater care, and cost, higher compared to the column, solvents, reagents and filters.

1. INTRODUÇÃO

O uso de alimentos sem açúcar e com baixas calorias triplicou nas duas últimas décadas do século XX (NABORS, 2001). Além da questão estética, destacam-se alguns quadros clínicos, como o *diabetes mellitus* e a obesidade, que vêm aumentando em todas as faixas etárias (IBGE, 2010). Por esses motivos vem crescendo a demanda pelos produtos que levam edulcorantes em sua composição, o que aumenta seu espaço no mercado e sua aceitação entre consumidores (TORLONI et al., 2007).

Uma grande variedade de métodos têm sido aplicados para a análise dos edulcorantes. Dentre eles destacam-se os de separação, uma vez que permitem a detecção simultânea dos diferentes edulcorantes. Foram desenvolvidas metodologias por cromatografia a gás (NAKAIE et al, 1999; FARHADI et al, 2003), cromatografia iônica (CHEN et al, 1997; CHEN e WANG, 2001; ZHU et al, 2005), eletroforese capilar (WALKER et al., 1997; HORIE et al., 2007, BERGAMO, et al., 2011), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia líquida acoplada a detector de massas – LC/MS (HUANG et al, 2006; LOOS et al, 2009).

A análise simultânea de edulcorantes é mais comumente realizada por HPLC (QUINLAN & JENNER, 1990; CASALS et al., 1996; AQUINO et al., 2004; DEMIRALAY et al., 2006; DOSSI et al., 2006; WASIK et al., 2007; LINO & PENA, 2010; ZYGLER et al., 2010; CHENG & WU, 2011; HASHEMI et al., 2011; KRITSUNANKULA & JAKMUNEEB, 2011; WANG et al., 2011). Os desenvolvimentos significativos alcançados na última década pela HPLC foram consequência de seu uso intenso no mundo todo, como uma técnica de análise de rotina em laboratórios e, dessa forma, a busca por análises mais rápidas e com bom desempenho cromatográfico tornou-se evidente e necessária. Para tanto, surgiu a cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), a qual segue os mesmos princípios cromatográficos da HPLC, porém com algumas

modificações: fase estacionária com tamanhos de partícula menores do que 2 μm , capacidade de trabalhar a pressões mais altas, volumes internos menores (conexões, alça de amostragem, cela do detector, bombas), cela do detector sem dispersão e com alta taxa de aquisição, melhoramento no sistema de controle e de dados, colunas resistentes ao trabalho a altas pressões e com baixo volume morto, injetores com precisão na faixa de volumes pequenos (GUILLARME et al., 2009; MALDANER & JARDIM, 2009).

Desta forma, este trabalho visou comparar a determinação de cinco edulcorantes em alimentos através das técnicas de HPLC e de UPLC, ambas utilizando a detecção por arranjo de diodos. Os parâmetros comparados foram as condições de análise, os custos de cada técnica, os limites de detecção e de quantificação, a repetitividade e a precisão intermediária.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O método utilizado para a determinação de edulcorantes por UPLC em alimentos e bebidas foi desenvolvido por Dias e Godoy (2011), enquanto o método por HPLC foi desenvolvido por Pane e Godoy (2011), conforme descrito no capítulo 2 desta tese.

2.1. Amostras

As amostras avaliadas para ambas as técnicas foram refrigerantes (sabor cola, sabor guaraná e sabor limão), néctares (de uva, pêssigo, goiaba, maracujá e laranja), pós para preparo de refresco (sabor maçã e sabor laranja), pudins (sabor chocolate e sabor baunilha) e cappuccinos (tradicional e com canela), achocolatados, geléia de morango, gelatina (sabor uva e sabor morango), molho tipo "barbecue" e molho tipo "catchup". Todos os produtos foram analisados de pelo

menos dois diferentes fabricantes, exceto para as amostras de néctares de goiaba, maracujá e laranja, gelatina de morango, molho tipo “barbecue” e molho tipo “catchup”, que foram encontradas disponíveis no mercado de apenas um fabricante. As amostras foram adquiridas em supermercados da região de Campinas e grande São Paulo.

Foram analisados três lotes distintos de cada produto, sendo esses diferenciados pela data de fabricação. Cada lote foi composto por três embalagens distintas, as quais foram analisadas individualmente e em duplicata, totalizando dezoito análises de cada amostra. As análises foram realizadas sempre dentro do prazo de validade das amostras.

2.2. Reagentes

O padrão de acessulfame-k foi adquirido da Fluka (EUA), o aspartame, a sacarina sódica hidratada e o ciclamato de sódio, da Sigma-Aldrich (EUA) e o padrão de neotame foi doado pela empresa Sweetmix (Brasil). A acetonitrila grau cromatográfico foi adquirida da empresa J. T. Baker (EUA), o fosfato de sódio monobásico monoidratado e o ácido ortofosfórico da Merck (Alemanha) e o hidróxido de sódio da Carlo Erba (Itália). A água utilizada no preparo dos reagentes e da fase móvel foi purificada através do sistema Milli-Q (Millipore, EUA) e posteriormente filtradas em filtros com poros de 0,45 µm de diâmetro da Millipore (EUA).

As amostras foram filtradas em membrana PVDF de 0,22 µm de poro e também em membrana VS de ester de celulose (VSWP) de 0,025 µm de poro para a análise por UPLC e em membrana PVDF de 0,45 µm de poro para a análise por HPLC, sendo todas da Millipore (EUA).

A solução tampão de fosfato de sódio 5 mM que constitui a fase móvel foi filtrada em membrana PVDF de 0,22 µm de poro (Millipore, EUA) e acetonitrila foi filtrada em membrana universal GMP de poro 0,22 µm (Pall Corporation, EUA), para a análise por UPLC. Para a HPLC

tanto as soluções aquosas quanto a acetonitrila foram filtrados em membrana LCR em PTFE modificada de 0,45 μm (Millipore, EUA).

2.3. Equipamentos

Para o método por HPLC utilizou-se um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent série 1100 (EUA), com injetor automático de capacidade de 1 a 100 μL , degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) UV-visível. O sistema foi controlado pelo software HP-Chemstation, o qual também gerenciou o sistema de aquisição dos dados. Para o processo cromatográfico foi utilizada uma coluna Pinnacle II, C18, 5 μm , 150x4,6 mm d.i. produzida pela Restek (EUA).

Para o método por UPLC utilizou-se um cromatógrafo a líquido de ultra performance Acquity Waters, modelo UPA, série J08UPA 905M (EUA), com injetor automático de capacidade de 1 a 10 μL , bomba binária, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) UV-visível. O sistema foi controlado pelo software Empower Pro (Waters), o qual também gerenciou o sistema de aquisição dos dados. Para o processo cromatográfico foi utilizada uma coluna Hypersil Gold (Thermo Scientific, EUA), C18, 1,9 μm e 50x2,1 mm d.i..

2.4. Avaliação das figuras de mérito

A precisão foi estudada através de dez determinações consecutivas no mesmo dia (repetitividade) e entre três dias (precisão intermediária), sendo avaliada no 1º, 5º e 8º dia de análise. A precisão intermediária foi investigada em um nível de concentração adicionado à matriz geléia isenta de edulcorantes.

Para a HPLC e a UPLC, foram analisadas dez injeções, respectivamente, em um nível de concentração de 90 e 1,79 $\mu\text{g/mL}$ de acessulfame-K, 100 e 2,02 $\mu\text{g/mL}$ de sacarina, 450 e 10,07 $\mu\text{g/mL}$ de

ciclamato, 250 e 4,30 µg/mL de aspartame e 300 e 1,20 µg/mL de neotame. Para o HPLC, foram feitos três dias de injeção com espaçamento de 3 dias entre elas. Para o UPLC, o segundo dia de injeções ocorreu uma semana depois do primeiro e o terceiro, três dias após o segundo, foram realizadas apenas três injeções no segundo e no terceiro dias.

3. DETERMINAÇÃO DOS EDULCORANTES

3.1. Preparo de amostras

Para a determinação por HPLC os refrigerantes foram colocados no ultrassom por 5 minutos, para remoção total do gás carbônico, antes das etapas de diluição e filtração. Os néctares foram inicialmente diluídos e em seguida centrifugados por 5 minutos a 5.000 rpm, para serem finalmente filtrados. Para os alimentos em pó (para preparo de refresco, pudim, cappuccino e achocolatado) foram pesados 1g e para o molho tipo "barbecue", molho tipo "catchup" e geléia foram pesados 2,5g, diretamente em balões volumétricos de 25µL. Em seguida, completou-se o volume com água, sendo em seguida colocados no ultrassom por 15 minutos, para total solubilização. As amostras foram então centrifugadas por 5 minutos a 5.000rpm. Todas as amostras foram diluídas em água 10 vezes e filtradas em filtro Millex (HV Millipore), com poros de 0,45µm de diâmetro. Deste filtrado, 10µl foram imediatamente injetados no cromatógrafo.

Cada triplicata dos lotes dos produtos foi analisado em duplicata, totalizando dezoito análises de cada amostra.

Para a determinação por UPLC, as amostras de refrigerantes e néctares foram preparadas da mesma forma descrita para o HPLC. Os achocolatados, cappuccinos e pudins foram pesados de maneira a obter-se uma diluição de dez vezes (massa/volume) a partir do modo de

preparo indicado pelo fabricante e os cappuccinos foram diluídos cinquenta vezes a partir do modo de preparo. Esses pós foram pesados em balões volumétricos, onde em seguida completou-se o volume com água ultra, colocou-se em ultrassom por 15 minutos e seguiu-se a filtração. As amostras foram primeiramente filtradas em membrana PVDF de 0,22 µm de poro e em seguida em membrana VS de éster de celulose (VSWP) de 0,025 µm de poro, ambas da Millipore (EUA).

Cada um dos exemplares das triplicatas dos lotes dos produtos foi analisado uma única vez, totalizando nove análises de cada amostra.

3.2. Condições cromatográficas

A separação dos edulcorantes por HPLC foi realizada através de um sistema de gradiente linear, temperatura de 40°C, vazão de 1 mL.min⁻¹, sendo a fase móvel composta por fase aquosa (5 mM de tampão fosfato de sódio monobásico; pH 7,0 acertado com hidróxido de sódio) e fase orgânica (acetonitrila).

A Tabela 1 ilustra o sistema de gradiente acima descrito.

TABELA 1. Gradiente utilizado para o método de separação de edulcorantes por HPLC.

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	94	6
8	94	6
9	85	15
16	85	15
17	70	30
26	70	30

As condições iniciais foram então retomadas e a coluna re-equilibrada por 5 minutos, antes da próxima injeção.

A detecção foi realizada em um detector de arranjo de diodos, sendo que os comprimentos de onda monitorados foram: 192 nm (para o ciclamato de sódio, o aspartame e o neotame), 201 nm (para a sacarina sódica) e 227 nm (para o acessulfame-K). A aquisição de dados foi gerenciada pelo software HP-Chemstation.

A separação dos edulcorantes por UPLC foi obtida através de um sistema de gradiente linear, temperatura de 56°C, vazão de 0,4 mL.min⁻¹, sendo a fase móvel composta por fase aquosa (5 mM de tampão fosfato de sódio monobásico; pH 3,0 acertado com ácido ortofosfórico) e fase orgânica (acetonitrila).

A Tabela 2 ilustra o sistema de gradiente acima descrito.

TABELA 2. Gradiente utilizado para o método de separação de edulcorantes por UPLC.

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	100	0
5	100	0
5,05	86	14
7	86	14
7,05	75	25
10	75	25

As condições iniciais foram então retomadas e a coluna re-equilibrada por 1 minuto, antes da próxima injeção.

A detecção foi realizada em um detector de arranjo de diodos, e os comprimentos monitorados foram os mesmos descritos para o método por HPLC. A aquisição de dados foi gerenciada pelo software Empower Pro (Waters).

A identificação foi realizada por comparação dos tempos de retenção e através dos espectros obtidos pelo detector de DAD.

Para ambos os métodos a quantificação foi feita por padronização externa, sendo as curvas de calibração preparadas na geléia de morango. Para isso foi adquirida matriz isenta de edulcorantes e estes foram adicionados. No método por HPLC as concentrações foram de 0,4 a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o acessulfame-k; de 1,0 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a sacarina sódica; de 36 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o ciclamato de sódio; de 1,0 a 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o aspartame e de 2,5 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o neotame. Para o método por UPLC as concentrações foram de 0,06 a 5,48 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o acessulfame-k; de 0,11 a 5,83 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a sacarina sódica; de 1,95 a 32,16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o ciclamato de sódio; de 0,05 a 9,92 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o aspartame e de 0,30 a 2,12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o neotame.

Realizou-se o teste de Tukey através do programa Statistica 7.0 a fim de verificar se existiu ou não diferença significativa entre os lotes de cada produto e as metodologias empregadas.

Para a comparação dos custos envolvidos em ambas as técnicas foi considerado o mesmo fornecedor para as colunas analíticas, reagentes, solventes e membranas de filtração. A queima de acetonitrila foi calculada em relação aos volumes enviados ao mesmo incinerador.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Condições de análise

A Tabela 3 mostra um comparativo entre as duas técnicas em relação aos tempos de corrida e acondicionamento, vazão e volume total de fase móvel empregado.

TABELA 3. Comparação entre os tempos de corrida e recondicionamento, vazão e volume de fase móvel empregados nas técnicas por HPLC e UPLC.

	HPLC	UPLC*
Tempo de corrida (em min)	26	10
Tempo de recondicionamento (em min)	5	1
Vazão (em mL/min)	1,0	0,4
Volume de fase móvel (em mL)	31	4,4

*Resultados obtidos por Dias & Godoy, 2011.

O tempo de corrida do HPLC foi aproximadamente 2,5 vezes maior em relação do UPLC, assim como o tempo de recondicionamento da coluna, que foi 5 vezes maior para o HPLC. Em relação à vazão e, conseqüentemente, ao gasto de solventes, o HPLC apresentou um gasto em termos de volume aproximadamente 7 vezes maior, quando comparado ao UPLC.

Para laboratórios de pesquisa, bem como para análises de rotina, esta diminuição de tempo e gasto de solventes pode representar a realização de mais análises devido ao menor tempo de análise, e ainda maior economia de solventes, além de menor gasto com o tratamento de resíduos. Entretanto, o UPLC exige o uso de reagentes de maior pureza e um maior cuidado com o preparo de amostras, onde além das membranas serem mais caras, podem ainda reter determinados compostos de interesse na análise.

Para uma análise comparativa considerou-se o uso de fosfato de sódio para análise (P. A.) no método por HPLC e o mesmo sal com alto grau de pureza, no método por UPLC. As colunas e membranas envolvidas no cálculo foram as descritas em materiais e métodos. A acetonitrila considerada foi a de grau cromatográfico, em ambos os casos. Foi levado em conta ainda o valor referente à queima de

acetonitrila, resíduo presente nas duas técnicas, porém em volumes diferentes.

A Tabela 4 mostra os custos aproximados envolvidos em cada análise.

TABELA 4. Comparativo de custos entre os métodos por HPLC e UPLC, para 100 análises.

Variável	HPLC	UPLC
	US\$**	US\$**
Coluna analítica	606,14	1050,83
Fosfato de sódio monobásico*	0,077	0,078
Membranas para* filtração de amostra	1,75	6,35
Acetonitrila	53,90	7,65
Queima de acetoneitrila*	155	22
Total	661,86	1064,90

*calculados para a realização de 100 análises; **valores calculados a partir da cotação do dólar comercial, onde US\$ 1,00 = R\$ 1,79 (em 05 de dezembro de 2011).

Comparando-se os custos nota-se que o maior impacto no orçamento refere-se à compra inicial da coluna, sendo a de HPLC 60% do preço em relação à de UPLC.

A metodologia por HPLC permitiu a realização de maior número de análises quando comparada ao método utilizando UPLC. A coluna utilizada na metodologia por UPLC precisou ser trocada a cada 200 injeções e a de HPLC, mesmo após 600 injeções ainda continuava em uso.

Atualmente o equipamento de HPLC é mais facilmente encontrado em laboratórios de análises de alimentos do que o de UPLC.

4.2. Figuras de mérito

4.2.1. Limites de detecção e de quantificação

A Tabela 5 apresenta os limites de detecção e de quantificação dos edulcorantes, na matriz geléia, para os dois métodos desenvolvidos. Foi considerado como limite de detecção a menor quantidade detectável na matriz que produziu um sinal de amplitude três vezes maior que o ruído, e o limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o limite de detecção (CALCUTT & BRODDY, 1983).

TABELA 5. Limites de detecção e de quantificação obtidos pelas técnicas de HPLC e de UPLC, para a matriz geléia.

	HPLC		UPLC*	
	Limite de detecção (µg/mL)	Limite de quantificação (µg/mL)	Limite de detecção (µg/mL)	Limite de quantificação (µg/mL)
Acessulfame-k	0,20	0,40	0,008	0,02
Sacarina sódica	0,10	0,20	0,011	0,02
Ciclamato de sódio	18,0	36,0	0,609	1,52
Aspartame	0,142	0,28	0,015	0,03
Neotame	0,45	0,90	0,178	0,45

*Resultados obtidos por Dias & Godoy, 2011.

Como já esperado, os limites mostraram-se mais baixos para o método de UPLC, cerca de dez vezes menor para o acessulfame-k, sacarina e ciclamato, provavelmente devido à melhora na resolução dos picos em virtude do tamanho da partícula da coluna ser menor. O emprego de partículas menores resulta em um melhor empacotamento da coluna, gerando picos mais finos e bem definidos, o que também permite a detecção de concentrações menores (MALDANER & JARDIM, 2009). No entanto, os limites determinados por HPLC atendem de forma satisfatória a determinação dos edulcorantes em alimentos.

4.2.2. Repetitividade e precisão intermediária

A repetitividade e a precisão intermediária de ambos os métodos estão mostradas na Tabela 6.

TABELA 6. Precisão dos métodos por HPLC e UPLC (desvio-padrão relativo, CV%).

		Dia	acesulfame	sacarina	ciclamato	aspartame	neotame	
HPLC		n=10	1	0,6833	0,3130	0,1951	0,3709	0,2077
	Repetitividade	n=10	5	0,6720	0,2987	0,2035	0,1298	0,2461
		n=10	8	0,5703	0,4215	0,2021	0,2480	0,3362
	Precisão intermediária	n=3	-	1,6752	1,0322	0,2006	0,4588	0,3052
UPLC		n=10	1	0,198	0,183	1,815	0,111	0,910
	Repetitividade	n=3	8	0,094	0,093	1,989	0,073	0,563
		n=3	11	0,108	0,053	0,828	0,016	0,532
	Precisão intermediária	n=3	-	0,528	0,706	3,571	0,969	0,116

Avaliando a repetitividade e a precisão intermediária, ambos os métodos demonstram ser adequados a análise de edulcorantes, apresentando coeficientes de variação menores do que 4% para todos os edulcorantes.

Os perfis cromatográficos das amostras analisadas pelos dois métodos são apresentados no Anexo 1.

O teor dos edulcorantes analisados pelos dois métodos para as diversas matrizes alimentícias está apresentado nas Tabelas 7 a 10. Os níveis dos edulcorantes foram avaliados segundo o "Regulamento Técnico referente a Alimentos para fins especiais" (BRASIL, 1998) e o

“Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos” (BRASIL, 2008).

TABELA 7. Teor* de edulcorantes presentes em achocolatados, cappuccinos e pós para o preparo de pudim, em mg.100mL⁻¹, pelas metodologias por HPLC e por UPLC.

Amostra	Lote	HPLC				UPLC			
		Acessulfame-k	Sacarina	Ciclamato	Aspartame	Acessulfame-	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Achocolatado light Fabricante 6	1	16,36 ± 3,30 a		**		4,95 ± 4,78 a		**	
	2	15,65 ± 2,41 a		**		0,87 ± 0,37 b		**	
	3	12,24 ± 0,71 b		**		6,67 ± 0,25 c		**	
	Média	14,75 ± 2,82 A				4,26 ± 2,55 B			
Achocolatado light Fabricante 1	1	4,14 ± 0,12 a		**		6,04 ± 1,59 a		**	
	2	2,50 ± 0,51 b		**		6,4 ± 0,38 a		**	
	3	5,33 ± 0,21 c		**		5,69 ± 1,05 a		**	
	Média	3,99 ± 1,27 A				6,07 ± 1,11 A			
Pó para preparo de cappuccino light Fabricante 7	1	25,83 ± 6,86 a			50,95 ± 4,89 a	46,50 ± 3,87 a			7,91 ± 0,33 a
	2	18,26 ± 5,75 a			24,13 ± 3,30 b	33,14 ± 6,51 a			7,69 ± 0,05 a
	3	24,53 ± 6,36 a			28,89 ± 5,31 b	33,72 ± 12,67 a			7,47 ± 0,08 a
	Média	22,87 ± 6,51 A			34,65 ± 13,01 A	38,71 ± 10,09 A			7,69 ± 0,26 B
Pó para preparo de cappuccino light com canela Fabricante 8	1	12,79 ± 4,69 a	2,81 ± 0,86 a			36,32 ± 10,91 a	2,77 ± 2,67 a		
	2	13,28 ± 5,83 a	1,71 ± 0,20 b			32,18 ± 7,00 a	0,57 ± 0,07 a		
	3	12,03 ± 6,07 a	1,34 ± 0,19 b			31,48 ± 1,99 a	2,04 ± 2,17 a		
	Média	12,70 ± 4,78 A	1,95 ± 0,80 A			32,79 ± 7,62 B	1,79 ± 2,09 A		
Pó para preparo de pudim diet sabor baunilha Fabricante 9	1		6,73 ± 0,22 a		6,51 ± 0,21 a		6,50 ± 5,40 a	43,38 ± 7,21 a	6,84 ± 0,25 a
	2		6,66 ± 0,28 a		6,04 ± 0,29 a		6,85 ± 3,80 a	21,34 ± 2,52 b	5,80 ± 0,72 a
	3		7,83 ± 0,06 b		6,44 ± 0,17 a		7,60 ± 0,77 a	42,83 ± 5,99 a	6,42 ± 0,17 a
	Média		7,08 ± 0,59 A		6,33 ± 0,29 A		6,94 ± 3,87 A	35,80 ± 11,67	6,43 ± 0,59 A
Pó para preparo de pudim zero sabor baunilha Fabricante 10	1	1,00 ± 0,65 a	2,95 ± 0,69 a		13,65 ± 0,38 a	0,21 ± 0,1 a	3,63 ± 0,33 a	30,73 ± 1,78 a	13,95 ± 0,53 a
	2	0,56 ± 0,31 a	3,35 ± 0,72 a		14,72 ± 2,54 a	1,79 ± 1,79 a	4,47 ± 0,32 a	29,18 ± 3,83 a	14,93 ± 2,31 a
	3	0,31 ± 0,17 a	3,33 ± 0,57 a		13,99 ± 0,47 a	0,99 ± 0,26 a	4,04 ± 0,43 a	28,63 ± 3,70 a	13,55 ± 0,94 a
	Média	0,64 ± 0,51 A	3,21 ± 0,61 A		14,12 ± 1,39 A	1,00 ± 1,19 A	4,0 ± 0,50 A	29,52 ± 2,87	14,14 ± 1,50 A
Pó para preparo de pudim diet sabor chocolate Fabricante 9	1		11,80 ± 0,60 a	**	2,70 ± 0,58 a		6,00 ± 5,45 a	**	3,71 ± 0,03 a
	2		8,42 ± 0,16 b	**	3,13 ± 0,29 a		8,78 ± 1,76 a	**	3,63 ± 0,05 a
	3		8,34 ± 0,29 b	**	3,04 ± 0,21 a		16,35 ± 13,65 a	**	3,64 ± 0,11 a
	Média		11,14 ± 7,79 A		2,96 ± 0,39 A		8,90 ± 7,86 A		3,67 ± 0,07 B
Pó para preparo de pudim zero sabor chocolate Fabricante 10	1		15,75 ± 0,53 a	**	11,56 ± 0,10 a	0,91 ± 0,66 a	3,71 ± 0,17	**	12,71 ± 0,63 a
	2		13,91 ± 1,45 a	**	12,05 ± 0,55 a	0,40 ± 0,26 a	3,92 ± 0,42 a	**	14,05 ± 0,41 b
	3	0,47 ± 0,22	15,80 ± 1,04 a	**	12,92 ± 0,92 b	0,46 ± 0,34 a	3,89 ± 0,07 a	**	11,69 ± 0,17 a
	Média		15,15 ± 1,33 A		12,18 ± 0,80 A	0,58 ± 0,48	3,84 ± 0,27 B		12,87 ± 1,08 A
	Diet	35	15	40	75				
	Light	26	10	30	56				
	Zero	35	15	40	75				

*Os dados representam a média e a estimativa do desvio-padrão da determinação em triplicata.; Valores assinalados com a mesma letra minúscula, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05); Valores assinalados com a mesma letra maiúscula indicam equivalência entre a técnica de HPLC e de UPLC; (**) Não analisado devido a presença de um interferente.

TABELA 8. Teor* de edulcorantes presentes em refrigerantes, em mg.100mL⁻¹, pelas metodologias por HPLC e por UPLC.

Amostra	Lote	HPLC				UPLC			
		Acessulfame	Sacarina	Ciclamato	Aspartame	Acessulfame	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Refrigerante de baixa caloria sabor limão Fabricante 1	1	23,58 ± 0,50 a			15,42 ± 0,71 a	6,03 ± 0,12 a			20,82 ± 0,33 ab
	2	25,27 ± 0,40 b			15,91 ± 0,18 a	6,10 ± 0,08 a			21,29 ± 0,37 a
	3	24,53 ± 0,14 b			14,87 ± 0,07 a	5,92 ± 0,12 a			20,12 ± 0,60 b
	Média	24,45 ± 0,80 A			15,40 ± 0,58 A	6,02 ± 0,12 B			20,74 ± 0,64 B
Declarado no rótulo		5		21		5		21	
Refrigerante de baixa caloria sabor limão Fabricante 2	1	5,06 ± 0,58 a			22,31 ± 0,56 a	5,79 ± 0,38 a			20,94 ± 1,45 a
	2	5,19 ± 0,06 a			21,92 ± 1,13 a	7,15 ± 0,04 b			22,74 ± 0,11 a
	3	5,30 ± 0,12 a			21,76 ± 0,58 a	5,92 ± 0,02 a			20,87 ± 0,09 a
	Média	5,18 ± 0,31 A			22,00 ± 0,74 A	6,50 ± 0,69 B			21,84 ± 1,16 A
Declarado no rótulo		5		21		5		21	
Guaraná Zero Fabricante 2	1		6,21 ± 0,16 a	36,69 ± 1,68 a	7,61 ± 0,22 a		6,82 ± 0,16 a	38,41 ± 1,74 a	10,58 ± 0,20 a
	2		6,36 ± 0,09 a	40,17 ± 1,91 a	8,52 ± 0,28 b		6,47 ± 0,89 a	35,32 ± 5,04 a	11,02 ± 1,62 a
	3		6,33 ± 0,09 a	32,18 ± 1,28 b	8,39 ± 0,27 b		6,88 ± 0,03 a	38,66 ± 1,20 a	11,61 ± 0,09 a
	Média		6,30 ± 0,12 A	36,35 ± 3,75 A	8,17 ± 0,48 A		6,72 ± 0,49 B	37,46 ± 3,17 A	11,07 ± 0,93 B
Declarado no rótulo		5		31		5		31	
Guaraná Zero Fabricante 3	1		14,27 ± 0,49 a	49,81 ± 0,71 a			15,32 ± 0,34 a	76,86 ± 1,65 a	
	2		14,01 ± 0,40 ab	66,39 ± 0,18 b			16,54 ± 0,08 b	81,38 ± 1,06 a	
	3		13,20 ± 0,14 b	79,40 ± 0,07 c			16,20 ± 0,19 b	80,20 ± 2,61 a	
	Média		13,82 ± 0,57 A	65,20 ± 12,90 A			16,02 ± 0,58 B	79,48 ± 2,34 A	
Declarado no rótulo		16		69,7		16		69,7	
Refrigerante tipo cola light, Fabricante 1	1	13,54 ± 0,41 a			38,59 ± 1,33 a	12,85 ± 0,16 a			32,78 ± 0,57a
	2	13,59 ± 0,22 a			42,26 ± 0,48 b	12,58 ± 0,06 a			34,14 ± 0,14 b
	3	13,21 ± 0,05 a			41,53 ± 0,50 b	12,99 ± 0,25 a			35,64 ± 0,61 c
	Média	13,45 ± 0,29 A			40,79 ± 1,84 A	12,81 ± 0,24 B			34,19 ± 1,29 B
Declarado no rótulo		8,99		34,69		8,99		34,69	
Refrigerante tipo cola light plus, Fabricante 2	1	12,64 ± 0,23a			25,54 ± 0,47 a	19,28 ± 0,25 a			26,01 ± 0,42 a
	2	11,61 ± 0,52 b			25,57 ± 0,88 a	18,43 ± 0,07 b			26,24 ± 0,07 a
	3	11,49 ± 0,29 b			23,37 ± 1,19 a	18,56 ± 0,12 b			27,97 ± 0,21 b
	Média	11,91 ± 0,63 A			24,83 ± 1,34 A	18,76 ± 0,41 B			26,74 ± 0,93 B
Declarado no rótulo		13		24		13		24	

*Os dados representam a média e a estimativa do desvio-padrão da determinação em triplicata.; Valores assinalados com a mesma letra minúscula, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05); Valores assinalados com a mesma letra maiúscula indicam equivalência entre a técnica de HPLC e de UPLC.

TABELA 9. Teor* de edulcorantes presentes em néctares e pós para o preparo de refresco, em mg.100mL⁻¹, pelas metodologias por HPLC e por UPLC.

Amostra	Lote	HPLC		UPLC	
		Sacarina	Ciclamato	Sacarina	Ciclamato
Néctar de Uva light Fabricante 4	1	3,37 ± 0,27 a	38,29 ± 1,35 a	3,61 ± 0,11 a	35,45 ± 1,88 a
	2	3,61 ± 0,05 a	36,69 ± 3,35 a	3,76 ± 0,01 b	35,09 ± 0,66 a
	3	3,78 ± 0,17 b	37,02 ± 3,78 a	3,99 ± 0,06 b	37,93 ± 0,88 a
	Média	3,72 ± 0,39 A	37,34 ± 2,72 A	3,79 ± 0,18 A	36,15 ± 1,73 A
Declarado no rótulo		4	40	4	40
Néctar de Uva light Fabricante 2	1	3,72 ± 0,10 a		3,278 ± 0,15 a	
	2	3,41 ± 0,05 a		2,880 ± 0,07 b	
	3	3,68 ± 0,33 a		2,955 ± 0,03 b	
	Média	3,60 ± 0,22 A		3,04 ± 0,20 B	
Declarado no rótulo		3	-	3	-
Néctar de Pêssego light Fabricante 4	1	2,75 ± 0,18 a		2,45 ± 0,44 a	
	2	2,77 ± 0,05 a		3,17 ± 0,13 b	
	3	2,31 ± 0,07 b		2,57 ± 0,04 ab	
	Média	2,62 ± 0,26 A		2,73 ± 0,40 A	
Declarado no rótulo		3	-	3	-
Néctar de Pêssego light Fabricante 2	1	2,63 ± 0,10 a		3,59 ± 0,01 a	
	2	2,65 ± 0,06 a		3,83 ± 0,01 b	
	3	2,58 ± 0,01 a		3,12 ± 0,14 c	
	Média	2,62 ± 0,067 A		3,51 ± 0,32 B	
Declarado no rótulo		3	-	3	-
Néctar de Goiaba light Fabricante 2	1	1,48 ± 0,15 a		2,09 ± 0,31 a	
	2	1,43 ± 0,10 a		2,29 ± 0,04 a	
	3	1,50 ± 0,05 a		2,18 ± 0,03 a	
	Média	1,47 ± 0,10 A		2,18 ± 0,18 B	
Declarado no rótulo		3	-	3	-
Néctar de Maracujá light Fabricante 2	1	11,79 ± 0,80 a	14,03 ± 1,11 a	10,83 ± 0,43 a	11,96 ± 0,67 a
	2	10,17 ± 0,50 b	13,62 ± 1,69 a	10,17 ± 0,40 a	13,17 ± 0,86 ab
	3	9,87 ± 0,44 b	14,58 ± 0,90 a	10,99 ± 0,96 a	14,79 ± 0,73 b
	Média	10,61 ± 1,04 A	14,08 ± 1,18 A	10,66 ± 0,68 A	13,30 ± 1,39 A
Declarado no rótulo		10	17	10	17
Suco de Laranja light Fabricante 2	1	1,99 ± 0,05 a		2,96 ± 0,09 a	
	2	1,90 ± 0,10 a		2,97 ± 0,01 a	
	3	1,88 ± 0,13 a		3,05 ± 0,07 a	
	Média	1,92 ± 0,10 A		2,99 ± 0,07 B	
Declarado no rótulo		3	-	-	-
Refresco em pó sabor maçã Fabricante 5	1	2,43 ± 1,18 a	33,57 ± 8,08 a	7,94 ± 1,60 a	29,55 ± 4,62 a
	2	8,56 ± 3,18 a	28,26 ± 4,24 a	7,14 ± 4,49 a	26,74 ± 2,10 a
	3	4,16 ± 3,05 a	29,46 ± 5,13a	4,85 ± 3,74 a	34,58 ± 1,81 a
	Média	5,15 ± 3,67 A	30,43 ± 5,76 A	6,66 ± 3,16 A	30,29 ± 4,44 A
Declarado no rótulo		4,5	28,8	4,5	28,8
Refresco em pó zero	1	5,09 ± 2,80 a	27,08 ± 3,97 a	6,63 ± 0,62 a	37,16 ± 1,95 a

sabor maçã Fabricante 5	2	3,67 ± 0,96 a	26,94 ± 1,20a	6.62 ± 1,60 a	37.47 ± 1,69 a
	3	3,60 ± 3,44 a	26,18 ± 11,58 a	7,00 ± 1,71 a	39.71 ± 0,36 a
	Média	4,12 ± 2,38 A	26,74 ± 6,16 A	6,75 ± 1,33 A	38,11 ± 1,83 A
Declarado no rótulo		4,6	29,6	4,6	29,6
Refresco em pó sabor laranja Fabricante 5	1	9,22 ± 0,13 a	16,80 ± 4,76 a	12.24 ± 3,74 a	23.38 ± 0,66 a
	2	8,68 ± 0,68 a	30,68 ± 8,54 a	12.52 ± 7,93 a	23.57 ± 2,09 a
	3	8,12 ± 0,45 a	24,39 ± 2,39 a	6.35 ± 2,84 a	24.33 ± 1,08 a
	Média	8,67 ± 0,63 A	23,96 ± 7,85 A	10,37 ± 5,79 A	23,76 ± 1,39 A
Declarado no rótulo		9,4	21,9	9,4	21,9
Refresco em pó zero sabor laranja Fabricante 5	1	1,47 ± 0,21 a	46,17 ± 20,16 a	4.55 ± 0,68 a	35.08 ± 0,74 a
	2	3,18 ± 2,40 a	45,43 ± 4,30 a	6.09 ± 2,38 a	38.55 ± 1,50 a
	3	3,33 ± 0,87 a	23,17 ± 20,73 a	5.65 ± 0,65 a	41.15 ± 8,09 a
	Média	2,67 ± 1,56 A	38,26 ± 18,49 A	5,43 ± 1,54 A	38,26 ± 5,16 A
Declarado no rótulo		3,9	34,9	3,9	34,9

*Os dados representam a média e a estimativa do desvio-padrão da determinação em triplicata.; Valores assinalados com a mesma letra minúscula, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Valores assinalados com a mesma letra maiúscula indicam equivalência entre a técnica de HPLC e de UPLC.

TABELA 10. Teor* de edulcorantes presentes em geléias e molhos, em mg.100mg⁻¹, pelas metodologias por HPLC e por UPLC.

Amostras	Lote	HPLC		UPLC	
		Acessulfame	Aspartame	Acessulfame	Aspartame
Geléia diet de morango Fabricante 8	1	1,55 ± 0,05 a		0,52 ± 0,01 a	
	2	1,35 ± 0,15 ab		0,69 ± 0,03 b	
	3	1,15 ± 0,13 b		0,67 ± 0,04 b	
	Média	1,35 ± 0,20 A		0,63 ± 0,08 B	
Declarado no rótulo		-	-	-	-
Geléia diet de morango Fabricante 2	1	14,26 ± 2,17 a	22,50 ± 3,14 a	43,34 ± 0,41 a	43,22 ± 0,72 a
	2	14,33 ± 2,02 a	47,31 ± 5,62 a	40,71 ± 0,63 b	39,95 ± 0,36 a
	3	16,00 ± 3,40 a	43,43 ± 19,36 a	43,35 ± 0,72 a	60,36 ± 2,62 b
	Média	14,86 ± 2,41 A	37,75 ± 15,41 A	42,46 ± 1,40 B	47,84 ± 9,32 A
Declarado no rótulo		-	-	-	-
Molho light de Catchup Fabricante 8	1	110,70 ± 9,18 a		117,78 ± 1,56 a	
	2	118,22 ± 10,68 a		118,20 ± 1,47 a	
	3	118,41 ± 8,11 a		114,85 ± 0,78 a	
	Média	115,77 ± 8,98 A		116,94 ± 1,97 A	
Declarado no rótulo		-	-	-	-
Molho light de Barbecue Fabricante 8	1	215,08 ± 21,25a		129,73 ± 6,58 a	
	2	164,23 ± 15,94 b		132,64 ± 2,20 a	
	3	217,46 ± 19,62 a		141,97 ± 4,25 a	
	Média	198,92 ± 30,83 A		134,78 ± 6,95 B	
Declarado no rótulo		-	-	-	-

*Os dados representam a média e a estimativa do desvio-padrão da determinação em triplicata.; Valores assinalados com a mesma letra minúscula, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05); Valores assinalados com a mesma letra maiúscula indicam equivalência entre a técnica de HPLC e de UPLC.

Para as amostras apresentadas na Tabela 7 o teor de edulcorantes estava de acordo com a legislação em vigor.

Na amostra de achocolatado do Fabricante 6 as concentrações encontradas por HPLC foram significativamente maiores para as encontradas por UPLC.

Na amostra de cappuccino do Fabricante 7 os teores de aspartame diferiram significativamente, onde as concentrações foram superiores no método por HPLC. Já para o Fabricante 8, as metodologias diferiram em

relação às concentrações de acessulfame-k. Nas determinações realizadas por UPLC ambas as amostras de cappuccino apresentaram teores de acessulfame acima do permitido pela legislação brasileira.

Para os Fabricantes 9 e 10 de pudim diet sabor baunilha o método por UPLC permitiu a detecção de ciclamato, o que não ocorreu no método por HPLC pois as concentrações estavam abaixo do limite de detecção. Na amostra de pudim diet sabor chocolate do Fabricante 9 as concentrações de aspartame mostraram-se diferentes, sendo superiores na determinação por UPLC. Para a mesma amostra do Fabricante 10 as concentrações diferiram entre as duas metodologias, sendo que a por HPLC encontrou níveis superiores de sacarina em relação à de UPLC. A amostra de pó para o preparo de pudim sabor chocolate do Fabricante 10 apresentou concentração de sacarina acima do permitido pela legislação.

Em relação à Tabela 8 observou-se que as concentrações obtidas para os edulcorantes analisados nos refrigerantes foram estatisticamente diferentes entre as duas metodologias, exceto pelo aspartame no refrigerante de baixa caloria sabor limão do Fabricante 2 e o ciclamato do guaraná zero dos Fabricantes 2 e 3.

Em geral, as concentrações encontradas por UPLC foram mais próximas às declaradas pelos fabricantes do que as determinadas por HPLC.

Para o refrigerante tipo cola do Fabricante 2 observou-se que para a metodologia por HPLC os resultados apresentaram-se mais próximos ao declarado pelo fabricante enquanto que para a UPLC os valores foram mais altos. No refrigerante tipo Guaraná do Fabricante 3 observou-se que os resultados estavam acima, tanto do declarado pelo fabricante, quanto do disposto pela legislação, para ambas as metodologias.

Na Tabela 9, para o Fabricante 2 as duas metodologias diferiram na concentração de edulcorantes para todas as amostras de néctares, exceto pelo néctar de maracujá.

Na Tabela 10 todas as amostras apresentaram diferença significativa entre os métodos, exceto para a geléia diet de morango do Fabricante 2 e para o molho tipo "catchup" do Fabricante 8.

As amostras de molho tipo "catchup" e molho tipo "barbecue" apresentaram concentrações de acessulfame superiores às permitidas pela legislação brasileira.

Os resultados para a geléia do Fabricante 2 indicaram que pela metodologia por UPLC foram obtidos em média concentrações maiores dos edulcorantes, do que pelo HPLC, sendo essas para o acessulfame acima da legislação.

Uma das amostras de pó para preparo de pudim sabor chocolate também apresentou concentração acima do permitido, porém, para sacarina.

Para essas amostras que apresentaram variação nas concentrações das replicatas, onde os lotes diferiram entre si, é possível correlacionar com uma homogeneização inadequada. As misturas de pós geralmente contêm muitos ingredientes e se esses têm propriedades diferentes entre si (em particular, o tamanho da partícula, a densidade e a porosidade) pode ocorrer segregação após a mistura (AHRNÉ & FITZPATRICK, 2005). No documento do projeto europeu "Food Powders" (2003) os pesquisadores destacam a dificuldade de obtenção de um método de mistura ideal. Além disso, não existe um padrão a ser seguido em relação ao processamento do pó (CUQ et al., 2010).

5. CONCLUSÕES

Apesar da limitação na determinação de ciclamato nas amostras contendo cacau, a metodologia por HPLC demonstrou-se simples, rápida

e versátil, tendo a possibilidade de ser empregada como análise de rotina em indústrias e órgãos de fiscalização, para as amostras analisadas.

Para a grande maioria das amostras líquidas os métodos de determinação por ambas as técnicas apresentaram uma equivalência de performance. Já para as amostras sólidas não houve essa equivalência, havendo portanto a necessidade de mais estudos, principalmente em relação a essas amostras.

6. BIBLIOGRAFIA

AQUINO, F. W. B.; AMORIM, A. G. N.; PRATA, L. F.; NASCIMENTO, R. F. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.1, p. 32-38, 2004.

AHRNÉ, L.; FITZPATRICK, J. J. Food powder handling and processing: Industry problems, knowledge barriers and research opportunities. **Chemical Engineering and Processing**, v. 44, n. 2, p. 209-214, 2005.

BERGAMO, A. B.; SILVA, J. A. F.; JESUS, D. P. Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-k in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1714-1717, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde. . Resolução RDC nº 18, de 24 de março de 2008. **Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos**. Diário Oficial da União, Brasília, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde. Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998 (Versão Republicada - 30.03.1998). **Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 30 de março de 1998.

CALCUTT, R., BRODDY, R. *Statistic for Analytical Chemists*. 1 ed. Chapman and Hall, Londres. 1983. 1007p.

CASALS, I.; REIXACH, M.; AMAT, J.; FUENTES, M.; SERRA-MAJEM, L. Quantification of cyclamate and cyclohexylamine in urine samples using highperformance liquid chromatography with trinitrobenzenesulfonic acid pre-column derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 750, n. 1/2, p. 397-402, 1996.

CHEN, O.; MOU, S.; LIU, K.; YANG, Z.; NI, Z. Separation and determination of four artificial sweeteners and citric acid by high-performance anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 771, n. 1/2, p. 135-143, 1997.

CHEN, Q.; WANG, J. Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 937, n. 1/2, p. 57-64, 2001.

CHENG, C.; WU, S. C. Simultaneous analysis of aspartame and its hydrolysis products of Coca-Cola Zero by on-line postcolumn derivation fluorescence detection and ultraviolet detection coupled two-dimensional high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Volume 1218, n. 20, p. 2976-2983, 2011.

CUQ, B.; RONDET, E.; ABECASSIS, J. Food powders engineering, between knowhow and science: Constraints, stakes and opportunities. **Powder Technology**, v. 208, n. 2, p. 244-251, 2010.

DEMIRALAY, E. C.; OZKAN, G.; GUZEL-SEYDIM, Z. Isocratic Separation of Some Food Additives by Reversed Phase Liquid Chromatography. **Chromatographia**, v. 63, n. 1/2, p. 215-219, 2006.

DIAS, C. B., GODOY, H. T. Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para determinação de edulcorantes por UPLC-PDA. 2011. 168 f. Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2011.

DOSSI, N.; TONIOLO, R.; SUSMEL, S.; PIZZARIELLO, A., BONTEMPELLI, G. Simultaneous RP-LC Determination of Additives in Soft Drinks. **Chromatographia**, v. 63, n. 11/12, p. 557-562, 2006.

FARHADI , A., KESHAVARZIAN, A., HOLMESB, E. W., FIELDS, J., ZHANG, L., BANAN, A. Gas chromatographic method for detection of urinary sucralose: application to the assessment of intestinal permeability. **Journal of Chromatography B**, v. 784, n. 1, p.145–154, 2003.

FOOD POWDERS, Documento Estratégico para Pesquisa em Pós Alimentícios, 2003. Disponível em: <http://www.foodpowders.net/strategic.htm>, acesso em outubro de 2011.

GUILLARME, D.; GRATA, E.; GLAUSER, G.; WOLFENDER, J. L.; VEUTHEY, J. L.; RUDAZ, S. Some solutions to obtain very efficient separations in isocratic and gradient modes using small particles size and ultra-high pressure. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 15, p. 3232 – 3243, 2009.

HASHEMI, M.; HABIBI, A.; JAHANSHAHI, N. Determination of cyclamate in artificial sweeteners and beverages using headspace single-drop microextraction and gas chromatography flame-ionisation detection. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1258-1263, 2011.

HORIE, M.; ISHIKAWA, F.; OISHI, M.; SHINDO, T.; YASUI, A.; ITO, K. Rapid determination of cyclamate in foods by solid-phase extraction and n. 1/2, capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 423–428, 2007.

HUANG, Z.; MA, J.; CHEN, B.; ZHANG, Y.; YAO, S. Determination of cyclamate in foods by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, n. 2, p. 233–237, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério da Saúde. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008 – 2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

KRITSUNANKULA, O.; JAKMUNEEB, J. Simultaneous determination of some food additives in soft drinks and other liquid foods by flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 84, n. 5, p. 1342-1349, 2011.

LINO, C. M.; PENA, A. Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p. 503–508, 2010.

LOOS, R.; GAWLIK, B. M.; BOETTCHER, K.; LOCORO, G.; CONTINI, S.; BIDOGLIO, G. Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry method. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 7, p. 1126–1131, 2009.

MALDANER, L.; JARDIM, C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.

NABORS, L. O. **Alternative Sweeteners**. 3ed, revisado e expandido, Suíça, Marcel Dekker, 2001.

NAKAIE, Y.; YOGI, T.; KAKEHI, K.; INOUE, D.; HIROSE H.; HASHIMOTO S.; TONOGAI Y. Simultaneous and simple determination of saccharin and acesulfame K in foods by GC–NPD. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 40, n. 3, p. 223–229, 1999.

PANE, D. Q., MEINHART, A. D., GODOY, H. T. **Desenvolvimento e validação de metodologia para separação de edulcorantes por HPLC em alimentos**. Artigo ainda não publicado, 2011. Capítulo 2 desta tese.

QUINLAN, M. E.; JENNER, M. F. Analysis and Stability of the Sweetener Sucralose in Beverages. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 1, p. 244–246, 1990.

TORLONI, M. R.; NAKAMURA, M. U.; MEGALE, A.; SANCHEZ, V. H. S.; MANO, C.; FUSARO, A. S.; MATTAR, R. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. Rio de Janeiro, **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 5, p. 267–275, 2007.

WALKER, J. C.; ZAUGG, S. E.; WALKER, E. B. Analysis of beverages by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 781, n. 1/2, p. 481–485, 1997.

WANG, Y.; XU, H. T.; XIE, Y. Y.; TIAN, Y. X.; SHEN, Y. D.; YOUNG, G.; WANG, H.; LEI, H. T.; SUN, Y. M. Development of polyclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for sodium saccharin residue in food samples. *Food Chemistry*, v. 126, n. 1, p. 815-820, 2011.

WASIK, A.; MCCOURT, J.; BUCHGRABER, M. Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection - Development and single-laboratory validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, n. 1/2, p. 187-196, 2007.

ZHU, Y.; GUO, Y.; YE, M.; JAMES, F. S. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, n. 1, p. 143-146, 2005.

ZYGLER, A.; WASIK, A.; NAMIESNIK, J. Retention behaviour of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents. **Talanta**, v. 82, n. 5, p. 1742-1748, 2010.

CONCLUSÕES GERAIS

Conclusões gerais

- ✓ A metodologia desenvolvida por HPLC, devidamente validada e aplicada às amostras de refrigerantes, néctares, pós para preparo de refresco, pudins e cappuccinos, achocolatados, geléias, gelatina, molho tipo "barbecue", catchup e adoçantes de mesa mostrou-se efetiva para a análise de rotina dos edulcorantes acessulfame-k, sacarina, ciclamato, aspartame e neotame.
- ✓ Não foi encontrado neotame, edulcorante não permitido pela legislação brasileira.
- ✓ A comparação entre as duas metodologias demonstrou que mais estudos devem ser realizados já que os resultados quantitativos foram discrepantes para algumas amostras.
- ✓ Uma limitação do método desenvolvido por HPLC e por UPLC foi a análise de ciclamato em formulações contendo cacau.

ANEXOS

ANEXO 1 - Perfis cromatográficos obtidos na determinação de edulcorantes (ACE: acessulfame -227 nm; SAC: sacarina -201 nm; CIC: ciclamato -192 nm; ASP: aspartame - 192 nm; NEO: neotame - 192 nm) por HPLC e por UPLC. Condições cromatográficas descritas no Capítulo 4.

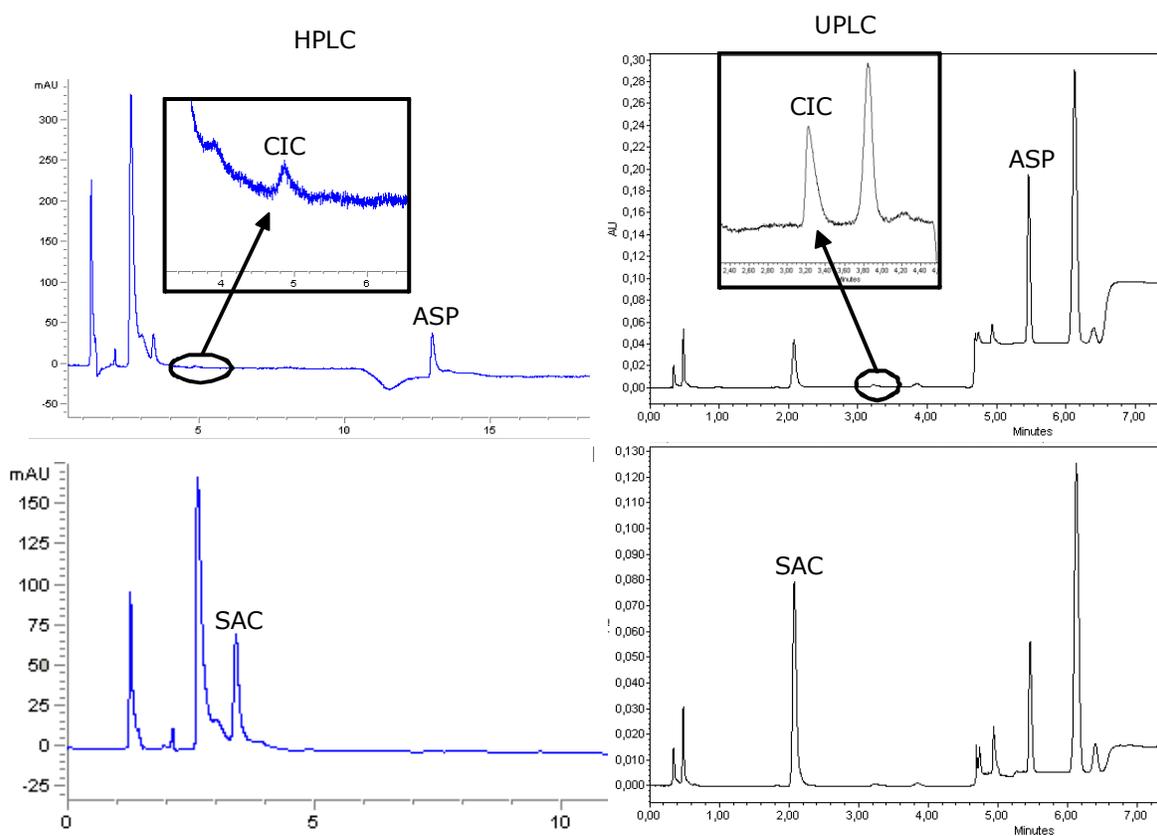


FIGURA 1: Perfis cromatográficos obtidos para amostra de refrigerante tipo guaraná do Fabricante 1, por HPLC e por UPLC.

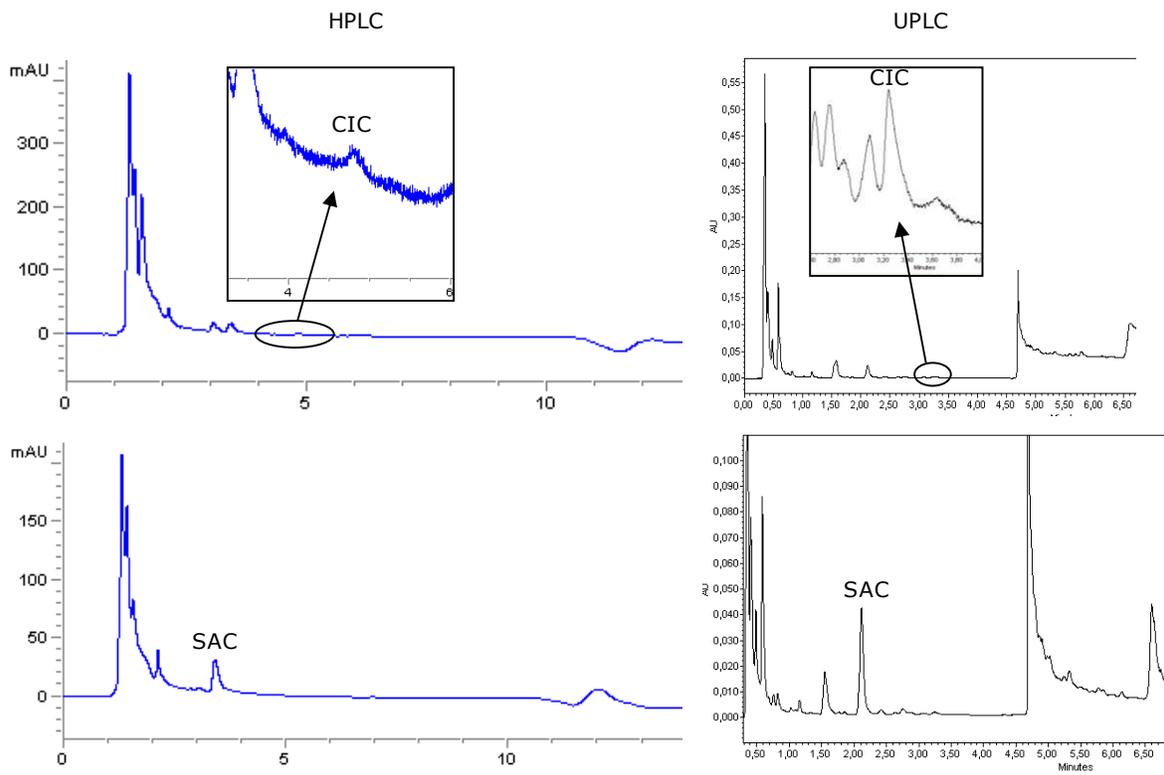


FIGURA 2: Perfis cromatográficos obtidos para amostra de néctar de uva do Fabricante 4, por HPLC e por UPLC.

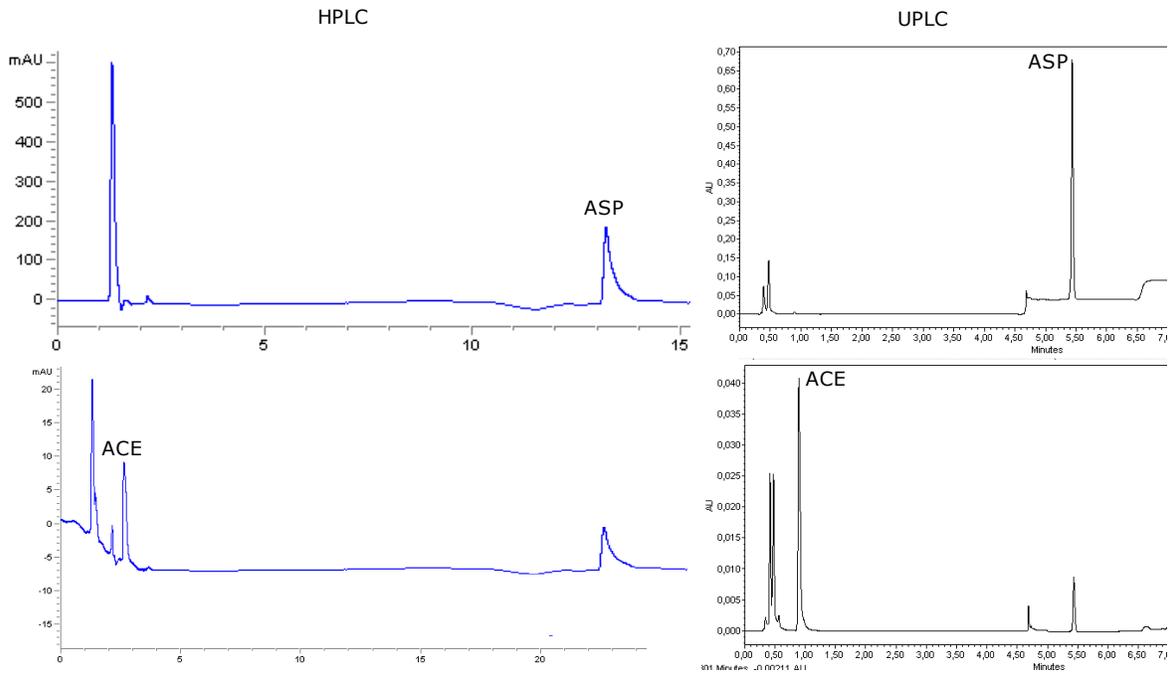


FIGURA 3: Perfis cromatográficos obtidos para amostra de pó para o preparo de refresco sabor maçã do Fabricante 5, por HPLC e por UPLC.

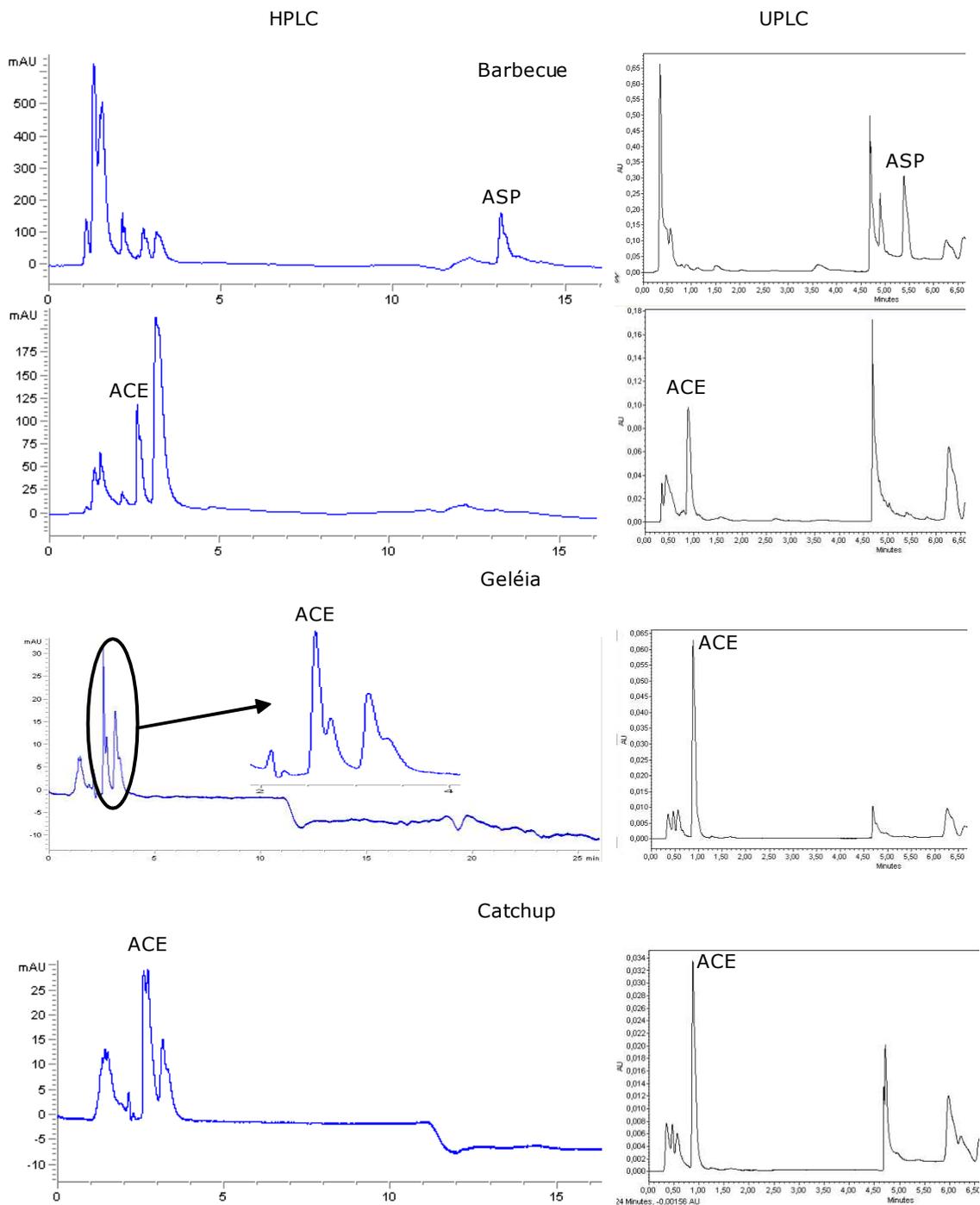


FIGURA 4: Perfis cromatográficos obtidos para amostra de molho tipo “barbecue”, geléia e molho tipo “catchup” do Fabricante 8.

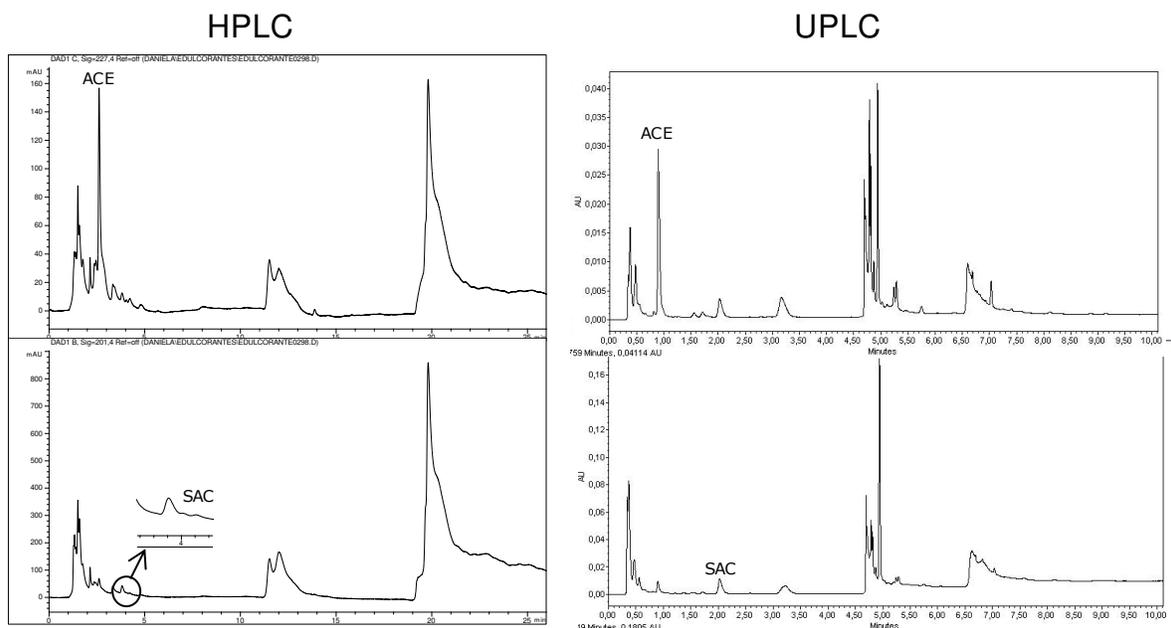


FIGURA 5: Perfis cromatográficos obtidos para amostra de cappuccino do Fabricante 8.

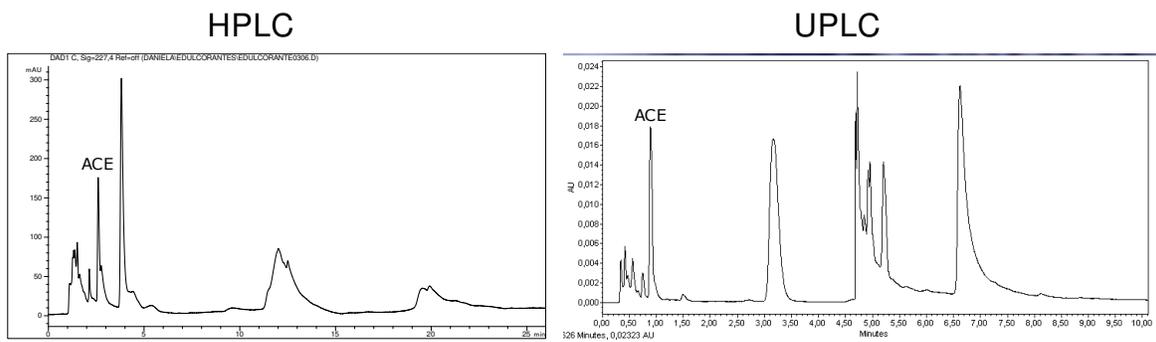


FIGURA 6: Perfis cromatográficos obtidos para amostra de achocolatado do Fabricante 6.

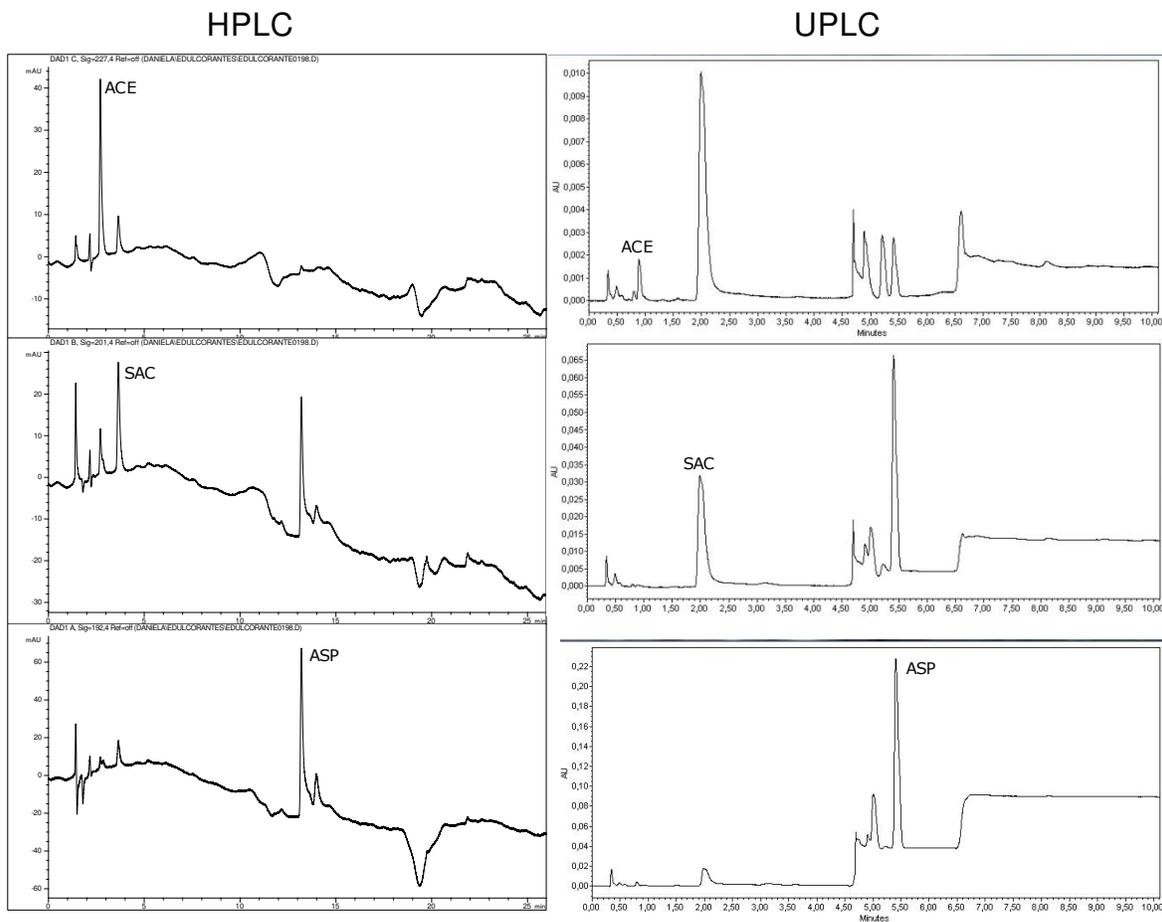


FIGURA 7: Perfis cromatográficos obtidos para amostra de pó para o preparo de pudim sabor baunilha do Fabricante 10.