

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

**DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE
METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE
EDULCORANTES POR UPLC-PDA**

Cíntia Botelho Dias

Bacharel em Ciências dos Alimentos

Profª Drª Helena Teixeira Godoy

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas

2011

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

D543d Dias, Cíntia Botelho, 1983
Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para a determinação de edulcorantes por UPLC-PDA / Cíntia Botelho Dias. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

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

1. UPLC (Cromatografia líquida de ultra performance).
2. Edulcorantes. 3. Derringer e Suich. 4. Validação de método. I. Teixeira Godoy, Helena. 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 ultra performance liquid chromatography with photo diode array detector

Palavras-chave em inglês(Keywords):

UPLC (Ultra performance liquid chromatography)

Sweeteners

Derringer and Suich.

Method validation

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Helena Teixeira Godoy [Orientador]

Adriana Meinhart Dillemburg

Severino Matias de Alencar

Data da defesa: 04/07/2011

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida em 04/07/2011 por Cíntia Botelho Dias aprovada pela comissão julgadora em 04/07/2011.

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

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar - USP
(Membro)

Dra. Adriana Dillenburg Meinhart - UNICAMP
(Membro)

Dra. Cláudia Hoffmann Kowalski Schröder - LANAGRO
(Membro)

Dra. Myrna Sabino – IAL
(Membro)

Dedico essa dissertação aos meus pais, Dalva e Batista,
ao Felipe, meu companheiro de todas as horas,
e a todos os amigos e professores
que me apoiaram e confiaram em mim.

“Não há rosas sem espinhos”, é um provérbio melancólico.

Digamos em vez disso: “Não há espinhos sem rosas”.

Chiara Lubich

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pela compreensão, amor e apoio em todas as horas. Aos meus pais Dalva e Batista pelo exemplo, a educação e o carinho que me deram durante toda a vida e o apoio especial durante este período. Aos meus irmãos Natália e Murilo, pela amizade, companheirismo e carinho. Ao avô Raul e à avó Tereza por acompanharem e contribuírem para o meu crescimento em todos os sentidos; à Avó Joana e ao avô Mauro, a todos os tios e tias que sempre se preocuparam com a minha felicidade. Ao Felipe pelo amor e companheirismo, por me agüentar nas crises de desespero que foram surgindo durante o desenvolvimento do projeto e por me dar forças para continuar. Aos pais do Felipe, Ricardo e Marlene, à avó Alaide, ao avô Joaquim e toda a família do Felipe que se tornou também a minha, pelo apoio e carinho.

Agradeço aos meus amigos por estarem sempre lá quando precisei, especialmente a Walkíria, a Raquel, a Juliana e a Merenice. Agradeço ao pessoal do Movimento dos focolares, não vou citar seus nomes, pois não quero esquecer-me de ninguém.

À minha orientadora, professora Dra Helena Teixeira Godoy, pela compreensão, paciência, profissionalismo, amizade, carinho. Ao professor Dr. Severino Matias de Alencar que me orientou nos meus primeiros passos no mundo da pesquisa. À professora Juliana Azevedo Lima Pallone pelo carinho e colaboração.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões que contribuíram para o enriquecimento do meu trabalho. Obrigada pela atenção!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

Ao senhor Dirceu, pelo exemplo de trabalho e dedicação. Muito obrigada! Sem a sua ajuda e disposição tudo seria mais difícil.

Aos meus colegas de laboratório por todo apoio, alegria, brincadeiras, ajuda,
... À Adriana, Ciça, Dani Pane, Elede, Cristiano, Carol, Pollyane, Lucíula, Paula,
Dani Ferreira, Juzinha, Suelen, Jancei, Marla, Dani Bio, Milene, Paula Becker,
Vivian, Romina, Ana Alice, Sabrina, Joyce, Natália, Grasiela, Jéssica e Francisco.

E a todos aqueles que não foram citados, mas que de alguma maneira
colaboraram para a execução deste trabalho o meu muito obrigada.

- ÍNDICE GERAL -

RESUMO GERAL	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências Bibliográficas	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. Edulcorantes	6
1.1. Tipos de Edulcorantes	8
1.1.1. Acesulfame-K	8
1.1.2. Alitame	9
1.1.3. Aspartame	10
1.1.4. Ciclamato	11
1.1.5. Glicosídeos de esteviol	12
1.1.6. Neotame	13
1.1.7. Sacarina	14
1.1.8. Sucralose	16
1.2. Poder adoçante dos edulcorantes	17
1.3. Combinação de edulcorantes	17
2. Legislação	18
2.1. Regulamentação para os edulcorantes	18
3. Métodos de determinação de edulcorantes	22
3.1. Cromatografia a gás	23
3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	23
3.2.1. Cromatografia Iônica	24
3.2.1. Fase Reversa	24

3.3. Eletroforese Capilar	27
3.4. UPLC	27
4. Planejamento estatístico	28
4.1. Função de desajustabilidade (Deringer e Suich).....	30
5. Validação	36
6. Referências Bibliográficas	37
Desenvolvimento e otimização de metodologia para separação de edulcorantes por UPLC-PDA em alimentos	53
Resumo	54
Abstract	55
Introdução	55
Materiais e métodos	58
Resultados e discussão	67
Conclusão	87
Referências bibliográficas	88
Determinação de cinco edulcorantes por UPLC-PDA em alimentos ...	93
Resumo	94
Abstract	94
Introdução	95
Materiais e métodos	97
Resultados e discussão	100
Conclusão	111
Referências bibliográficas	112
Comparação entre as técnicas de UPLC e CLAE	119
Resumo	120

Abstract	120
Introdução	121
Materiais e métodos	122
Resultados e discussão	128
Conclusão	143
Referências bibliográficas	143
CONCLUSÕES GERAIS	149

RESUMO GERAL

Um novo método rápido, eficiente e econômico para a determinação de cinco edulcorantes (acesulfame-K, sacarina sódica, ciclamato de sódio, aspartame e neotame) pela técnica de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) foi desenvolvido, validado e aplicado na análise de alguns produtos diet, light e zero recorrentemente encontrados em supermercados. Para a otimização do método foi utilizado um delineamento composto central e a otimização simultânea de respostas foi realizada por meio da função de desejabilidade de Derringer e Suich. Foi empregada uma coluna de fase reversa C18, fase móvel composta de acetonitrila e tampão fosfato de sódio 5 mM/ ácido orto-fosfórico (pH 3,0) com eluição por gradiente e vazão de 0,4mL/min, com temperatura de coluna a 56°C. Os cinco compostos responderam linearmente em diferentes faixas de concentração aplicáveis às concentrações presentes nas amostras. A precisão intra e inter dias, bem como os limites de detecção e quantificação variaram para os cinco edulcorantes. As taxas de recuperação para os edulcorantes avaliados variaram entre 70 e 115% para as diferentes matrizes analisadas. O método foi aplicado em refrigerantes, néctares e sucos, chás prontos para beber, pós para preparo de refresco, pudins e cappuccinos, achocolatados, geléias, catchup e molho tipo “barbecue”. No entanto, algumas limitações foram encontradas para a quantificação do neotame e ainda para alimentos contendo cacau em sua formulação quanto à identificação do ciclamato de sódio. Foram encontradas amostras contendo até quatro edulcorantes em combinação em um mesmo produto. Dentre os mais utilizados estavam o acesulfame e o aspartame. Algumas das amostras apresentaram ainda concentrações acima das permitidas pela legislação brasileira e, dentro dos edulcorantes estudados, nenhum edulcorante não declarado foi encontrado. O método desenvolvido por UPLC foi comparado a uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A UPLC apresentou melhor

resolução e menores limites de detecção e quantificação, tempo de análise mais curto e menor gasto de solvente. Entretanto, a HPLC ainda foi mais robusta.

ABSTRACT

A new, fast, efficient and economic method for the determination of five sweeteners (acesulfame-K, saccharin, cyclamate, aspartame and neotame) by ultra performance liquid chromatography (UPLC) has been developed, validated and applied to diet, light and zero products usually found in supermarkets. A central composite design was used and also the simultaneous optimization of the answers was carried using the Derringer's desirability function for the method optimization. A C18 reversed phase column was used and the optimized method resulted in a binary eluent consisting of acetonitrile and sodium phosphate 5 mM/ ortho-phosphoric acid buffer (pH 3.0) in gradient elution, 0.4 mL/min flow rate and 56°C column temperature. The five compounds behaved linearly in different concentration ranges applicable to the concentrations in the samples and the precision intra and inter-day, as well as the limits varied for those sweeteners. The recoveries for the evaluated sweeteners varied for the distinct sample matrices from 70 to 115%. The method was applied to the sweeteners determination in soft drinks, fruit juice beverages, ready to drink teas, powder juice, pudding, cappuccino, chocolate powder, jellies, barbecue sauce and ketchup. However, limitations were found on the quantification of neotame and on the products containing cocoa, in which it is not possible to identify the sodium cyclamate. Samples containing up to four distinct sweeteners in synergism were found. Acesulfame and aspartame were the most used sweeteners among the analyzed samples. Although, non declared sweeteners were not found among those studied, their quantities in some samples were above the allowed in the Brazilian regulation. Afterwards, the UPLC developed method was compared with a high performance liquid chromatography (HPLC) method. The UPLC method presented the best resolution, the lowest detection and quantification limits, shortest retention time and lest solvent waste. However, HPLC is more rugged than UPLC.

INTODUÇÃO GERAL

Atualmente, devido à demanda por produtos benéficos à saúde e ao cuidado com a aparência, os edulcorantes vêm ganhando um espaço cada vez maior nas prateleiras dos supermercados e nos lares brasileiros (TORLONI et al., 2007).

O uso de alimentos sem açúcar e com baixas calorias triplicou nas duas últimas décadas do século XX. Nos Estados Unidos, mais de 150 milhões de pessoas usavam estes produtos regularmente. Embora centenas de produtos com baixas calorias e de sabor agradável já fossem acessíveis em 2001, seus consumidores afirmavam que gostariam de encontrar ainda uma maior quantidade de produtos do gênero (NABORS, 2001).

Além da questão estética, alguns quadros clínicos, como o diabetes mellitus e a obesidade, cada vez mais prevalentes na população mundial, exigem a restrição definitiva ou prolongada da ingestão de sacarose e outros açúcares, o que determina a prescrição médica de adoçantes (TORLONI et al., 2007). A estimativa da World Health Organisation (WHO) em 2004 era de que existissem na época, 1,3 bilhões de pessoas acima do peso ou obesas em todo mundo (SLOAN, 2005) e estudos realizados por Wild e colaboradores (2004) estimavam que 2,8% da população mundial no ano 2000 fosse diabética e que até 2030 esse número cresceria para 4,4%.

A autorização do uso de edulcorantes é realizada após rigorosa avaliação toxicológica (BRASIL, 1997), que resulta na determinação de níveis seguros ao consumo humano, visto que algumas destas substâncias podem ter efeito tóxico em níveis muito elevados, mesmo que não haja ainda um consenso sobre tais efeitos. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação das quantidades de edulcorantes em alimentos e bebidas.

Vários métodos vêm sendo empregados para a determinação de edulcorantes. Dentre eles se destacam os métodos cromatográficos, sendo que a maioria dos métodos propostos determina até quatro edulcorantes simultaneamente. Devido ao

uso de vários tipos de edulcorantes em sinergismo, um desafio seria um método experimental que permitisse separar, identificar e quantificar uma maior variedade de edulcorantes simultaneamente.

A cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), que baseia-se nos mesmos princípios da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), é o avanço mais recente das técnicas de separação. Na UPLC empregam-se partículas menores e mais simétricas na fase estacionária, permitindo o uso de colunas mais curtas e com menores diâmetros sem perder a eficiência, o que possibilita ainda a aplicação de velocidades lineares maiores de fase móvel, resultando em aumento da resolução, da detectabilidade e da velocidade das análises (MALDANER e JARDIM, 2009).

Por ser um avanço recente, existem ainda poucos métodos desenvolvidos e validados para UPLC, e não foi encontrado na literatura um método para determinação simultânea de edulcorantes por esta técnica, o que a torna potencialmente um objeto de pesquisa. Portanto, objetiva-se, com o presente trabalho, desenvolver e validar uma metodologia para a análise de edulcorantes por UPLC e detector de arranjo de diodos, e ainda aplicá-la na análise de edulcorantes em produtos alimentícios diet, light e zero, recorrentemente encontrados em supermercados.

Em cromatografia muitas são as variáveis que podem influenciar no desempenho cromatográfico de substâncias, e ainda, tais variáveis podem ter efeitos combinados entre si. Dependendo do número de composto que se deseja separar, várias são as respostas obtidas e, portanto é necessária uma ferramenta que as correlacione eficientemente. Para tanto, o auxílio de uma técnica de planejamento experimental multivariado e análise simultânea de várias respostas, como a função de desejabilidade de Derringer e Suich, é essencial.

Outro objetivo proposto foi a comparação entre a UPLC e a HPLC, visto que a primeira técnica baseia-se nos princípios da segunda.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde. Portaria n. 540, de 27 de outubro de 1997. **Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares**. Diário Oficial da União, Brasília, 1997.

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, 553p.

SLOAN, A. E. Top 10 global foods trends. **Food Technology**, v. 59, n.4, p. 20-32, 2005.

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, 2007.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes estimates for year 2000 and projection for 2030. **Diabetes care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

Revisão Bibliográfica

Cíntia Botelho Dias, Helena Teixeira Godoy

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

1. EDULCORANTES

A percepção do sabor doce é uma das mais importantes sensações para o paladar humano. O sabor doce geralmente induz a uma resposta positiva em humanos (SALMINEN e HALLIKAINEN, 2002). A importância da sacarose deve-se não apenas a seu claro dulçor sem sabor residual, mas também a outras várias características, como agente de corpo ou conservante (KEMP et al., 2007). Um desafio há alguns anos tem sido encontrar compostos adoçantes com dulçor e funcionalidades similares às da sacarose.

Em contraposição doenças que restringem o uso de açúcares vem aumentando sua prevalência. A estimativa da World Health Organisation (WHO) em 2004 era de que existissem na época, 1,3 bilhões de pessoas acima do peso ou obesas em todo mundo (SLOAN, 2005), e ainda dados do mesmo ano apresentados pelo Ministério da Saúde brasileiro indicavam que 40% da população brasileira apresentava algum nível de excesso de peso (FERREIRA, 2006).

O número de pessoas com diabetes tem aumentado devido ao crescimento populacional, ao envelhecimento, à urbanização, ao aumento da obesidade, à inatividade física e a maior sobrevivência dos pacientes com diabetes. Estimava-se em 1985 que existissem 30 milhões de adultos com diabetes mellitus no mundo, tendo esse número aumentado para 135 milhões em 1995 e atingido 173 milhões em 2002, com projeções de chegar a 300 milhões em 2030 (WILD et al.2004; SBD, 2007). No Brasil, no final dos anos 80, a prevalência da doença na população adulta foi estimada em 7,6% (CASTRO e FRANCO, 2002), e dados de pesquisa realizada mais recentes em Ribeirão Preto (SP) apontam taxas mais elevadas, cerca de 12,1% (TORQUATO et al., 2003).

Os edulcorantes e produtos diet, light e zero vêm crescentemente ganhando espaço entre os consumidores, não apenas devido à questão estética, mas principalmente devido a alguns quadros clínicos, como o diabetes mellitus e a obesidade, cada vez mais prevalentes na população mundial. Tais quadros requerem

a restrição definitiva ou prolongada da ingestão de sacarose e outros açúcares, o que pode determinar a prescrição médica de adoçantes (TORLONI et al., 2007).

A Anvisa (1997) define os edulcorantes como substâncias diferentes dos açúcares que conferem sabor doce ao alimento (BRASIL,1997). Estes compreendem um grupo de substâncias, utilizadas em substituição à sacarose, que também apresentam a propriedade de interagir com receptores gustativos e produzir uma sensação percebida como doce (MONTIJANO et al., 1998; UMBELINO, 2005).

Segundo Fatibello-Filho (1996), um adoçante artificial ideal deve ser incolor e inodoro quando em solução, solúvel e estável em soluções aquosas, atóxico, barato, não deve deixar sabor residual e, não deve ser metabolizado ou produzir metabólitos que prejudiquem o organismo. E ainda, devem ter dulçor semelhante ao da sacarose, baixas calorias (UMBELINO, 2005) e estabilidade nas condições de processamento e armazenamento (LIPINSKI e HANGER, 2001; UMBELINO, 2005).

As substâncias edulcorantes não são metabolizadas pelo organismo ou são utilizadas em quantidades tão pequenas, que seu aporte calórico torna-se insignificante, portanto são consideradas não calóricas. Devido a estas características podem ser consideradas indispensáveis em regimes dietéticos, caracterizados pelo diabetes, ou em dietas de perda ou manutenção do peso corporal (UMBELINO, 2005). Por não serem fermentados pela microflora da placa dental também não causam cáries (ZYGLER et al., 2009).

Estas substâncias apresentam estruturas químicas muito variadas, podendo ser proteínas, como a taumatina; peptídeos como o aspartame e o alitame; carboidratos como os polióis (MONTIJANO et al., 1998). Seu poder adoçante pode variar de acordo com sua natureza química e a concentração do composto. Outras características sensoriais podem se apresentar, como os sabores associados ao gosto doce e gosto residual de diferentes naturezas (CARDELLO e DAMASIO, 1997 apud MORAES, 2008).

Existem vários edulcorantes permitidos para uso em alimentos e bebidas, mas cada um possui características específicas de intensidade e persistência do gosto doce e presença ou não de gosto residual (UMBELINO, 2005, CARDELLO et al. 2000). Essas características podem ser modificadas em função da concentração em que são usados. E todos estes fatores são determinantes na aceitação, na preferência e na escolha de um edulcorante pelos consumidores (CARDELLO et al., 2000).

1.1. TIPOS DE EDULCORANTES

1.1.1. Acessulfame-K

Descoberto acidentalmente por Claus e Jensen em 1967, o acessulfame-K, é o sal de potássio da sulfonamida cíclica 6-metil, 1, 2, 3-oxatiazina-4(3H)-ona-2,2-dióxido (Figura 1) (LIPINSKI e HANGER, 2001).

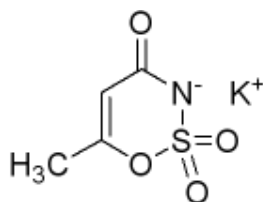


Figura 1: Estrutura química do acessulfame-K.

Seu sabor doce é rapidamente percebido e permanece por um período ligeiramente mais longo que o da sacarose, apresentando, em concentrações moderadas, pouco sabor residual (WELLS, 1989), todavia em altas concentrações pode apresentar sabor amargo. Quando utilizado em meio ácido aumenta ligeiramente sua doçura (KEMP, 2006).

A solução aquosa de acessulfame-K é estável, resistindo a pHs baixos empregados em bebidas e mantendo o dulçor em exposição prolongada a temperaturas de 30°C e, mesmo a temperatura de 40°C a pH 3 ou menor. Resiste ainda ao processo usual de pasteurização sem perder o dulçor (LIPINSKI e

HANGER, 2001). Portanto, pode ser empregado em um grande número de produtos.

O acessulfame não é metabolizado pelo organismo humano, sendo excretado intacto. É considerado não cariogênico, não tóxico e não mutagênico (KEMP, 2006).

1.1.2. Alitame

O peptídeo de ácido L-aspártico, D-alanina e 2,2,4,4-tetrametilioetanol amina (Figura 2), foi aprovado pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), após a análise de diversos trabalhos toxicológicos, em sua 56ª reunião, em 1996. É permitido seu uso 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.

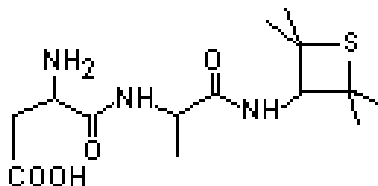


Figura 2: Estrutura química do alitame.

A 25°C, em seu ponto isoelétrico (pH 5,6), o alitame é solúvel em água, metanol, etanol, propilenoglicol, clorofórmio e n-heptano, mas é insolúvel em solventes lipofílicos. Esse não é higroscópico e tem doçura mais duradoura que a da sacarose (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996; AUERBACH et al., 2001; KEMP, 2006).

O alitame é relativamente estável em soluções aquosas, permanecendo estável por até um ano em pH de 5 a 8 a temperatura ambiente (AUERBACH et al., 2001) e sendo menos estável em pH de 2 a 4 (KEMP, 2006). Pode ser utilizado em balas moles e duras, alimentos pasteurizados e alimentos de pH neutro processados a altas temperaturas (AUERBACH et al., 2001).

Uma de suas desvantagens 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 consequentemente causando perda do dulçor (KEMP, 2006).

Este edulcorante é hidrolisado no organismo humano, uma parte é excretada nas fezes, outra parte na urina e o ácido aspártico é metabolizado. Não é cariogênico e após vários estudos foi considerado seguro ao consumo humano (KEMP, 2006).

1.1.3. Aspartame

Descoberto em 1965 por Searle e Schlatter (BUTCHKO et al., 2001), o aspartame (N-L- aspartil-L-fenilalanina-1-metil) (Figura 3), é uma molécula composta de 39,5% de ácido aspártico, 50% de fenilalanina e 10,5% de éster metílico (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996).

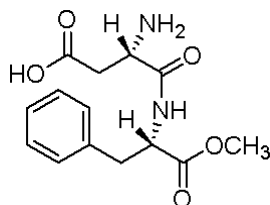


Figura 3: Estrutura química do aspartame.

Ao ser ingerido o aspartame fornece 4 Kcal/g, no entanto tendo em vista seu poder edulcorante a quantidade a ser consumida comparando-se com a sacarose é pequena, tornando o aporte calórico desprezível (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996).

À temperatura de 25°C, possui melhor estabilidade em pH 4,3, mas é estável ainda na faixa de pH de 3,0 a 5,0 (BUTCHKO et al., 2001), na qual se encontra a maioria dos alimentos e bebidas. Em solução aquosa, sua estabilidade ocorre em função do tempo, da temperatura e do pH, também a presença de luz e aditivos, como os sais tamponantes, acelera a degradação do aspartame (BELL e HAGEMAN, 1994; BELL e WETZEL, 1995; LAWRENCE e YUAN; 1996; KIM et al., 1997; WETZEL e BELL, 1998; WANG E SCHROEDER, 2000; GLIEMMO et al., 2001; BUTCHKO et al., 2001; KROGER et al., 2006; GLIEMMO et al., 2008).

O aspartame pode ser utilizado em muitos produtos, sendo mais indicado para bebidas carbonatadas, bebidas em pó, iogurte, confeitos e balas duras, no entanto tem maior estabilidade em alimentos com baixa umidade (BUTCHKO et al., 2001).

Este edulcorante também acentua o aroma e prolonga a percepção do sabor de frutas, principalmente as ácidas como laranja, limão, maracujá, goiaba e morango. Sendo a percepção mais efetiva para os sabores naturais que para os artificiais e pode, no entanto, potencializar o gosto amargo (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996).

Outra desvantagem de seu uso é o fato de ser impróprio aos fenilcetonúricos, pois quando metabolizado o aspartame forma fenilalanina. Fenilcetonúria é uma doença genética que provoca a intolerância a fenilalanina devido à falta da produção de fenilalanina hidroxilase (RANGAN et al., 2009).

1.1.4. Ciclamato

Descoberto em 1937, por Michael Sveda, o ciclamato (Figura 4) é encontrado comercialmente como ácido ciclâmico ou ácido ciclohexilsulfâmico e na forma de sais de sódio (ciclamato de sódio), cálcio (ciclamato de cálcio) (BOPP e PRICE, 2001) e potássio (ciclamato de potássio) (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996).

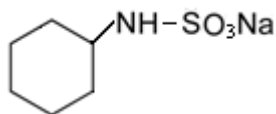


Figura 4: Estrutura química do ciclamato de sódio.

Sua forma ácida tem boa solubilidade em água, assim como seus sais de sódio e cálcio. Seus sais são eletrólitos fortes, ionizando-se fortemente em solução, mas com solubilidade limitada em óleo e solventes apolares (BOPP e PRICE, 2001). É um pó branco, cristalino e não higroscópico (KEMP, 2006).

A doçura do ciclamato demora mais para ser atingida, mas mantêm-se por um período mais longo. Este edulcorante apresenta sabor amargo residual apenas em

concentrações acima das usuais (até 75 mg/100 mL); pode ser utilizado em combinação com outros edulcorantes potencializando sua doçura, ressalta os sabores de frutas e é melhor que o açúcar em mascarar o gosto amargo. É estável a altas e baixas temperaturas, em uma ampla faixa de pH e em presença de luz, oxigênio e outros gases e outros componentes dos alimentos (BOPP e PRICE, 2001). É estável, ainda, tanto na forma seca quanto em solução aquosa e tem longa vida de prateleira. Este edulcorante é compatível com vários constituintes de alimentos, como os flavorizantes artificiais e naturais, no entanto os sais de cálcio podem causar geleificação com a pectina, e gerar precipitados de citrato de cálcio em concentrados com elevada acidez (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996).

É permitido em diversos países inclusive no Brasil, mas foi banido nos Estados Unidos devido a suspeita de toxicidade (ZYGLER et al., 2009).

1.1.5. Glicosídeos de Esteviol

Glicosídeos de esteviol são constituintes naturais da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni da família Compositae. Das folhas da planta pode-se obter 8 diferentes glicosídeos de esteviol, sendo o principal constituinte o esteviosídeo (Figura 5), quimicamente classificado como glicosídeo diterpênico. Os outros compostos são: rebaudiosídeo A, rebaudiosídeo C, e dulcosídeo A (JECFA,1999; JECFA, 2008a).

O esteviosídeo é estável a até 100°C em uma faixa de pH de 3 a 9. Já em pHs muito alcalinos, acima de 10 a temperatura de 100°C, este se degrada. O esteviosídeo é pouco solúvel em água, mas altamente solúvel em etanol, enquanto que o Rebaudiosídeo A é mais solúvel em água que este, em função da presença de uma unidade de glicose adicional em sua molécula (KINGHORN et al., 2001).

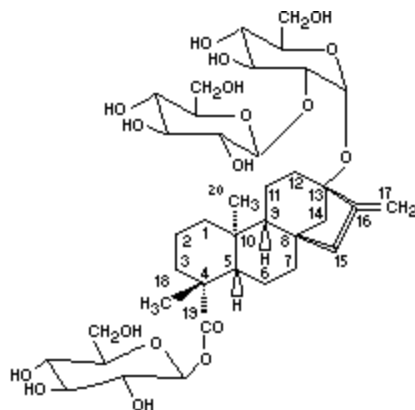


Figura 5: Estrutura química do esteviosídeo.

Seu uso é proposto em refrigerantes, pós para refresco, café e mate, sorvetes, gomas de mascar, balas, iogurtes, chocolates, produtos de panificação, conservas, molhos, cosméticos, medicamentos e como modificador de aromas (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996).

1.1.6. Neotame

O neotame (Figura 6), edulcorante derivado do aspartame, apresenta um sabor doce próximo ao da sacarose, sem residual amargo ou metálico e, em suas condições de consumo, é considerado um adoçante não calórico (NOFRE e TINTI, 2000). Sua doçura demora mais para ser atingida que a da sacarose, mas permanece por um período mais longo, funcionando ainda como realçador de sabor (KEMP, 2006).

Segundo Bannwart (2006) e Stargel colaboradores (2001), este edulcorante foi descoberto por pesquisadores franceses em projeto de pesquisa da *The Nutrasweet Co.*

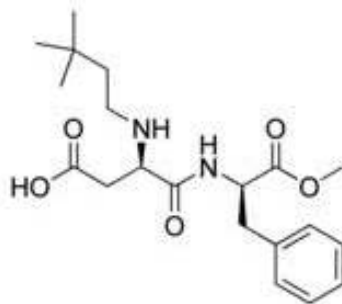


Figura 6: Estrutura molecular do neotame.

Sua solubilidade em água é de 12,6 g/l a 25°C e a estabilidade desta solução varia com o pH e a temperatura, sendo relativamente estável em pH entre 3 e 5,5, com melhor solubilidade em pH 4,5. A este pH, a meia vida de sua solução aquosa é de 30 semanas (NOFRE e TINTI, 2000). Em pH neutro, sua estabilidade é significativamente maior que a do aspartame (ZYGLER et al., 2009). O neotame é estável a preparos com utilização de calor e inerte a vários compostos dos alimentos, como os flavorizantes (WITT, 1999), sendo mais estável ao fornecimento, a agentes de sabor e a açúcares redutores que o aspartame (KEMP, 2006).

Este edulcorante é considerado seguro para o consumo humano. É incompletamente absorvido pelo organismo humano e excretado na urina e fezes, seu metabolismo produz uma pequena quantidade de metanol, mas essa é insignificante quando comparada aos níveis seguros de ingestão. Seu metabolismo produz ainda pequena quantidade de fenilalanina, entretanto esta quantidade é considerada clinicamente insignificante para fenilcetonúricos (KEMP, 2006)

1.1.7. Sacarina

Quimicamente corresponde ao 2,3 dihidro, 3-oxobenzeno iso sulfanazol (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996). Descoberta em 1978, por Ira Remsen e Constantine Fahlberg, a sacarina, é encontrada comercialmente em três formas: sacarina ácida (Figura 7A), sacarina sódica (Figura 7B) e sacarina de cálcio. (PEARSON, 2001 e SALMINEN e HALLIKAINEN, 2002).

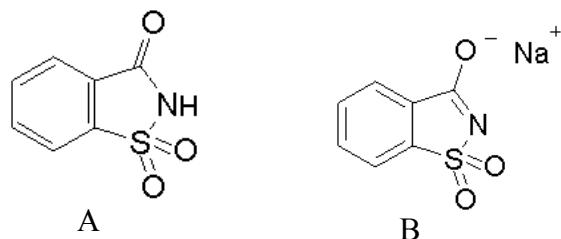


Figura 7: Estrutura molecular da sacarina.

é um ácido de força moderada e baixa solubilidade em água (3,4 g/1L a 25°C). As soluções aquosas dos três tipos de sacarina são estáveis em uma ampla faixa de pH (PEARSON, 2001), sendo estáveis também a tratamentos térmicos (150°C por 1 hora). Os sais de sacarina possuem ainda alta estabilidade, alta solubilidade em água, apresentam sinergismo com outros edulcorantes e não são higroscópicos. Apesar de possuir alto poder edulcorante, este é diverso da sacarose, apresentando um impacto edulcorante bastante lento que cresce gradativamente atingindo intensidade máxima e persistente (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996). O gosto amargo ou metálico associado ao seu dulçor tende a intensificar-se com o aumento de sua concentração (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996, LINDLEY, 1999), no entanto seu sabor residual pode ser mascarado pela utilização de ácido láctico ou uso em combinação com outro edulcorante (SALMINEN e HALLIKAINEN, 2002).

A sua versatilidade permite que seja empregada em diversos alimentos, medicamentos e cosméticos (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996 e SALMINEN e HALLIKAINEN, 2002), sendo seus usos mais recorrentes na área de alimentos nos EUA e Europa em refrigerantes, adoçantes de mesa e produtos diet (SALMINEN e HALLIKAINEN, 2002).

A sacarina não é metabolizada pelo organismo humano, sendo eliminada inalterada na urina. A possibilidade de sua indução ao câncer de bexiga é controversa, existindo estudos que indicam a indução de câncer em ratos, no entanto em estudos com humanos o mesmo efeito não foi constatado (KEMP, 2006).

1.1.8. Sucralose

A 4',1',6'-triclora-galacto-sucrose (ou 1,6-dicloro-1,6-dideoxi- β -D-frutofuranosil 4-cloro-4-deoxi- α -D-galactopiranoside) (Figura 8) (JENNER, 1989), foi desenvolvida em 1976 por pesquisadores da Tate & Lyle Specialty Sweeteners (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996).

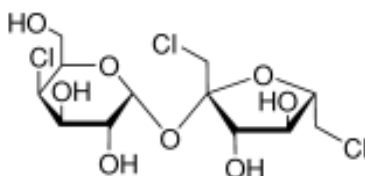


Figura 8: Estrutura molecular da sucralose.

É solúvel em água, tem alta estabilidade térmica em meio aquoso e ácido, e também ao armazenamento (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996). É solúvel ainda em etanol (JENNER, 1989) e metanol (BANNWART, 2006) e é insolúvel em óleo. Degrada-se lentamente, formando monossacarídeos, em pH baixo, em função do pH e da temperatura. Em pH elevado, o sistema básico pode catalisar a retirada de hidrogênio (H) e cloro (Cl) dos carbonos 3' e 6' formando 3',6'-anidro-4,1'diclorogalactosacarose. Seu pH de melhor estabilidade é em torno de 5,0 (JENNER, 1989). É bastante estável em refrigerantes, formulações secas (JENNER, 1989, CÂNDIDO e CAMPOS, 1996 e GOLDSMITH E MARKEL, 2001) e produtos assados (KEMP, 2006).

A sucralose 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 e CAMPOS, 1996).

A quantidade de sucralose empregada depende de seu uso e das características dos alimentos. Dependendo, portanto, do pH, da temperatura e da viscosidade do alimento ou bebida a que será incorporada (CÂNDIDO e CAMPOS,

1996 e GOLDSMITH E MARKEL, 2001). Quanto menor o pH maior a doçura relativa (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996).

Não é metabolizado pelo organismo humano, sendo totalmente excretado (KEMP, 2006).

1.2. PODER ADOÇANTE DOS EDULCORANTES

A Tabela 1 contém a intensidade de dulçor relativo referente à comparação dos edulcorantes com a solução de sacarose.

TABELA 1: Dulçor dos edulcorantes em relação à sacarose.

Edulcorante	Dulçor (quanto maior que a sacarose)	Referência
Acessulfame-K	200 vezes**	LIPINSKI e HANGER, 2001
Alitame	2000 vezes	JECFA, 2006
Aspartame	160-220 vezes	BUTCHKO et al, 2001
Ciclamato	30 vezes**	BOPP e PRICE, 2001
Estévia	200 a 300 vezes	JECFA, 2008
Neotame	7.000 a 13.000 vezes*	WITT,1999
Sacarina	200-800 vezes*	PEARSON, 2001
Sucralose	400-800 vezes*	JENNER, 1989 e CÂNDIDO e CAMPOS, 1996

* dependendo da concentração de sacarose a que é comparado

** comparado a uma solução 3% de sacarose

1.3. COMBINAÇÃO DE EDULCORANTES

Os edulcorantes podem ser usados separadamente ou em combinação com outros. O uso destas misturas ou blends vem sendo bastante aplicados com o intuito de equilibrar o sabor e mascarar o sabor residual. Preparados adequadamente, os blends podem chegar a mimetizar a textura e o sabor de produtos contendo sacarose

e ainda criar produtos com dulçor original e melhor estabilidade de sabor (ZYGLER et al., 2009). O uso de diversos edulcorantes em combinação nos alimentos permite ainda sua utilização em níveis mais baixos.

O acessulfame, por exemplo, pode ser utilizado em sinergismo com o aspartame e o ciclamato e o alitame, no entanto não é desejável seu uso com a sacarina (KEMP, 2006). O alitame, além de ser utilizado em combinação com o acessulfame, pode ainda ser combinado ao ciclamato, à sacarina entre outros edulcorantes eficientemente (AUERBACH et al., 2001). A sucralose apresenta efeito sinérgico com ciclamato e acessulfame-K (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996).

2. LEGISLAÇÃO

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

Diet: são aqueles específicos para dietas alimentares com restrição de nutrientes, como carboidratos, gorduras, proteínas e sódio. Fazem parte deste grupo ainda os alimentos para controle de peso e para dietas de ingestão controlada de açúcares.

Light: são alimentos com 25% de redução de um determinado nutriente quando comparados ao alimento convencional.

Zero: são alimentos isentos de um determinado nutriente.

2.1. REGULAMENTAÇÃO PARA EDULCORANTES

Um edulcorante ou aditivo tem seu uso em alimentos regulamentado pelo JECFA (Joint Expert Comitee on Food Additives), que avalia e fornece dados aos seus países membros. No Brasil, o órgão regulamentador é a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que se baseia em laudos fornecidos pelo JECFA e decide aceitar ou não suas recomendações (MORAES, 2008).

Os edulcorantes pertencem à classe dos aditivos alimentares e a autorização de seu uso ocorre apenas depois de adequada avaliação toxicológica, levando-se em conta entre outros aspectos, qualquer efeito cumulativo, sinérgico e de proteção, decorrente do seu uso. Este uso deve ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado (BRASIL, 1997).

Por meio de estudos toxicológicos e a partir de uma estimativa da quantidade de aditivo por peso corpóreo, é definida, pelo JECFA, a Ingestão Diária Aceitável (IDA), tomando-se como base o NOEL, dose sem efeito observável. Outro índice importante observado por este órgão para a aprovação de um aditivo é a ingestão diária estimada (EDI), determinada com base tanto na quantidade de aditivos em alimentos quanto em sua ingestão. A Tabela 2 contém a IDA segundo a Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), para alguns edulcorantes.

TABELA 2: 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 e 2006.

Desde a primeira resolução que estabeleceu os edulcorantes de uso permitido no Brasil, a resolução RDC. 3 de 01 de Janeiro de 2001, até os dias de hoje, houve a adição de novos edulcorantes bem como a alteração dos limites máximos aceitáveis para aqueles anteriormente permitidos. A Resolução – RDC n. 18 de 24 de março de 2008 estabelece os limites máximos para o uso de edulcorantes em alimentos e bebidas no Brasil (BRASIL, 2008). Estes valores são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3: Limites máximos para adição de edulcorantes em alimentos e bebidas no Brasil.

INS	Aditivo	Alimento	Limite máximo g/100g ou g/100mL
950	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
951	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
952	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⁾
954	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

		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
955	Sucralose	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
960	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
961	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 0,24 g/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, sorbita, manitol, isomalt (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).

Entre os edulcorantes autorizados pela União Européia estão: acessulfame-K, aspartame, ciclamato ácido e seus sais, sacarina e seus sais, sucralose e neoespiridina dihidrochalcona. Os Estados Unidos compartilham da mesma lista exceto pelo ciclamato e a neoespiridina e com a adição do neotame.

3. MÉTODOS DE ANÁLISE DE EDULCORANTES

Vários métodos vêm sendo empregados na determinação de edulcorantes artificiais. Dentre eles se destacam os métodos espectrométricos (YEBRA et al., 1995; FATIBELLO-FILHO et al., 1998; ARMENTA et al., 2004; TOZETTO, 2005; SOUSA et al., 2006; TOZETTO et al., 2007; KHURANA et al., 2008; CANTARELLI et al., 2008; CANTARELLI et al., 2009; NI et al. 2009; HEARN e SUBEDI, 2009), potenciométricos (CALONI-FILHO et al., 2003; MEDEIROS et al., 2008) e amperométricos (VILARTA et al., 1993; ASSUMPCÃO, 2008). Embora rápidas essas técnicas estão sujeitas a interferência de diferentes compostos e, muitas vezes, limitam-se à determinação de apenas um edulcorante específico.

No entanto, como destacado anteriormente, os edulcorantes são geralmente utilizados em combinação. Devido a este fato os métodos de separação atendem mais ao propósito da análise de edulcorante, pois permitem a determinação simultânea de diversos compostos. Dentre as técnicas de separação cromatográficas foram desenvolvidas metodologias por cromatografia gasosa (GC) (NAKAIE et al., 1999), líquida de alta eficiência (HPLC) (VEERABHADRARAO, et al., 1987; LAWRENCE e CHARBONNEAL, 1988; DI PIETRA et al., 1990; CASALS et al., 1996; CHEN et al., 1997; CHEN e WANG, 2001; AQUINO et al., 2004; ZHU et al., 2005; DEMIRALAY et al., 2006; DOSSI et al., 2006; LINO e PENA, 2010) e líquida acoplada a detector de massas (LC/MS) (HUANG et al., 2006; WASIK et al., 2007; SHERIDAN E KING, 2008; LOOS et al., 2009; YANG e CHEN, 2009; SCHEURER et al., 2009; FERRER e THURMAN, 2010).

Também a técnica de eletroforese capilar (CE) (THOMPSON et al., 1995a; THOMPSON et al., 1995b; PESEK e MATYSKA, 1997; WALKER et al., 1997; BOYCE, 1999; FRAZIER et al., 2000; HORIE et al., 2007) tem sido empregada para a separação e posterior identificação de diversos edulcorantes.

A maioria dos métodos propostos possibilita determinar até quatro tipos de edulcorantes de forma simultânea (DI PIETRA et al., 1990; CHEN et al., 1997; DEMIRALAY et al., 2006; DOSSI et al., 2006; FERRER e THURMAN, 2010), existindo poucos métodos que possibilitem a determinação de diversos edulcorantes em uma mesma análise (LAWRENCE e CHARBONNEAU, 1988; WASIK et al., 2007; YANG e CHEN, 2009 e SCHEURER et al., 2009). Dentre aqueles que permitem a determinação de até oito ou nove edulcorantes estão os métodos de separação acoplados a detectores mais sofisticados, como o detector de massas (WASIK et al., 2007 e CHEN e YANG, 2009). Estes promovem um maior custo e exigem maior especialização, sendo desinteressante sua aplicação em análises de rotina.

3.1. CROMATOGRAFIA GASOSA

Foi desenvolvido, por Nakaie e colaboradores (1999), um método para determinação simultânea de sacarina e acesulfame-K por cromatografia gasosa com detecção por nitrogênio-fósforo e confirmação dos edulcorantes por espectrometria de massas. O detector de nitrogênio-fósforo, apesar de ser bastante específico, não é comumente utilizado em laboratórios especializados em análise de alimentos.

3.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A Tabela 4 apresenta de forma resumida as condições analíticas empregadas nos métodos de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de edulcorantes.

3.2.1. Cromatografia Iônica

Alguns métodos foram desenvolvidos para a determinação de acesulfame-K, sacarina, ciclamato e aspartame por cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica para aplicação em alimentos, bebidas e fármacos (CHEN et al., 1997; CHEN e WANG, 2001; ZHU et al., 2005). O método de Chen e Wang (2001) obteve recuperação entre 85 a 104% para amostras reais de alimentos e fármacos. Zhu e colaboradores (2005) obtiveram limites de detecção menores que 1 ppm para aspartame, 0.05 ppm para ciclamato de sódio, acesulfame-K e sacarina sódica.

O método de Zhu e colaboradores (2005) empregou o detector de supressão de condutividade e o método desenvolvido pelo grupo de pesquisa de Chen (1997) empregou dois detectores (UV e condutividade) para identificar todos os quatro edulcorantes (acesulfame-K, sacarina, ciclamato e aspartame).

3.2.1. Fase reversa

Diversos métodos para análise dos edulcorantes acesulfame-K, alitame, aspartame, ciclamato, dulcin, neotame, neohesperidina dihidrochalcona, sacarina e sucralose em alimentos, bebidas e fluidos corporais por HPLC em fase reversa foram desenvolvidos (CASALS et al., 1996; AQUINO et al., 2004; DEMIRALAY et al., 2006; YANG e CHEN, 2009; WASIK et al.; 2007).

O método de Casals e colaboradores (1996) permitia analisar apenas o ciclamato em fluidos corporais e envolvia método de derivatização no preparo de amostras. Aquino e colaboradores (2004) determinaram apenas sacarina em bebidas, com recuperação entre 99-105,5%, limite de detecção (LD) de 0,20 mg/g e limite de quantificação (LQ) de 0,75mg/g. A partir do método desenvolvido pelo grupo de pesquisa de Demiralay (2006) foi possível determinar sacarina sódica, acesulfame-K e aspartame em alimentos, com recuperação de 98 a 105% para o aspartame e o acesulfame e não foi informada a recuperação para a sacarina. Dossi e

colaboradores (2006) determinaram os mesmos edulcorantes em bebidas e obtiveram limites de detecção entre 0,1 e 3,0 mg/ L e limite de quantificação entre 0,3 e 7,0 mg/L. Nos quatro métodos foi utilizado o detector de arranjo de diodos.

Chen e Yang (2009) e o grupo de pesquisa de Wasik (2007) determinaram oito (aspartame, sacarina, acesulfame-K, neotame, sucralose, ciclamato, alitame e esteviosídeo) e nove edulcorantes (acesulfame-K, alitame, aspartame, ciclamato, dulcin, neotame, neohesperidina dihidrochalcona, sacarina e sucralose) respectivamente, com LD de 0,10 $\mu\text{g/mL}$ e LQ de 0,30 $\mu\text{g/mL}$ (CHEN e YANG, 2009) e LD de 15 $\mu\text{g/g}$ e LQ de 0,30 $\mu\text{g/mL}$ (WASIK et al.; 2007). Ambos os autores utilizaram detecção por espectrometria de massas.

TABELA 4: Condições analíticas para a determinação de edulcorantes em alimentos para alguns métodos por HPLC.

Edulcorante	Amostra	Técnica*	Fase móvel	Coluna	Parâmetros analíticos	Referência
Acessulfame-K, aspartame, sacarina	Bebidas, produtos fermentados, bebidas lácteas, conservas de frutas, comprimidos.	HPIC-UV	Acetonitrila : tampão fosfato de sódio (pH 8,2)	Shim-pack IC-A3 (50x 4,6 mm x 5 µm,)	LD = 4 a 30mg/L Recuperação = 85 a 104%	CHEN e WANG, 2001
Acessulfame-K, aspartame, sacarina, ciclamato	Bebidas tipo cola, sucos de fruta e frutas em conserva	HPIC- detector de condutividade	KOH	Dionex Ionpac AS11 (250 x 2 mm)	LD = 0,019 a 0,89mg/L Recuperação = 97,96 a 102,42%	ZHU et al., 2005
Acessulfame-K, aspartame, sacarina, ciclamato	Bebidas e adoçantes de mesa em pó	HPIC- UV- detector de condutividade	Na ₂ CO ₃	Dionex Ionpac AS4A-SC (254 x 4 mm)	LD = 0,019 a 0,044mg/L Recuperação = 93 a 107%	CHEN et al., 1997
Aspartame, sacarina e impurezas	Farmacos e formulações dietéticas	HPLC-UV	Metanol : 80 mM fosfato de trietilamonio (pH 3)	Hypersil RP-18 (150 x 3,9 mm x 5 µm)		DI PIETRA et al., 1990
Acessulfame-K, aspartame, sacarina	Refrigerantes	HPLC-UV	Metanol : tampão fosfato de potássio (pH 4)	LiChrosorb C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm)	LD = 0,1 a 3mg/L Recuperação = 98,6 a 102,6%	DOSSI et al., 2006
Acessulfame-K, aspartame, sacarina	Refrigerante tipo cola e refresco instantâneo	HPLC-UV	Acetonitrila : tampão acetato de amonia	YMC-ODS Pack AM (250 x 4 mm x 5µm)	LD = 0,2 a 3,1µg/g Recuperação = 99 a 101%	DEMIRALAY et al., 2006
Acessulfame-K, aspartame, dulcin, sacarina	Bebidas, doces gelados, sorvetes e molho de tomate	HPLC-UV (254nm)	Metanol : ácido acético: água	µBondapak C18 (300 x 3,9 mm x 10 µm)	Recuperação = 91,6 a 101,8%	VEERABHADRAR AO, et al., 1987
Acessulfame-K, alitame, aspartame e seus produtos de degradação, ciclamato, dulcin, sacarina, sucralose	Sobremesas, mistura para coberturas, bebidas, refresco instantâneo e adoçantes de mesa	HPLC-UV-IR	Acetonitrila : 20 mM tampão fosfato de potássio em gradiente linear de 97:3 (pH 5) para 80:20 (pH 3,5) Derivatização pós-coluna	Supelcosil LC-18 (150 x 4,6 mm x 5 µm)	LD = 9 a 1600 ng Recuperação = 76 a 112%	LAWRENCE e CHARBONNEAL, 1988
Aspartame, sacarina, sucralose	Água e bebidas	LC-TOF-MS	Acetonitrila : água 0,1% ácido fórmico	Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm x 5 µm)	LD = 0,005 a 0,5 µg Recuperação = 53 a 90%	FERRER e THURMAN, 2010
Acessulfame-K, sacarina, ciclamato, aspartame, sucralose, alitame, neotame, esteviosídeo	Bebidas, frutas enlatadas e bolos	HPLC-ESI-MS	Metanol: acetona : tampão trietilamina fosfato (pH 4,5)	Spherogel C18 (250 x 4,5 mm x 5 µm)	LD > 0,10µg/mL Recuperação = 95 a 104,3%	YANG e CHEN, 2009
Acessulfame-K, sacarina, ciclamato, aspartame, sucralose, alitame, neotame, dulcin, neoespiridina	Bebidas não carbonatadas, frutas em Lara e iogurte	HPLC-ELSD	Metanol: acetona : tampão trietilamina fosfato (pH 4,5)	Zorbax extend C18 Purosfepher star RP-18 Nucleodur C18 Pyramid Nucleodur C8 Gravity (250 x 3 mm x 5 µm)	LD = 15µg/g Recuperação = 93 a 109%	WASIK et al., 2007

*UV (detector ultravioleta), IR (detector de índice de refração), HPIC (cromatografia iônica), MS (detector de massas), TOF (tempo de voo)

3.3. ELETROFORESE CAPILAR

Os métodos desenvolvidos para a análise por eletroforese capilar (WALKER et al., 1997; HORIE et al., 2007) permitiram determinar aspartame e ciclamato em alimentos e bebidas utilizando detecção por detector UV. O estudo de Wasik e colaboradores determinaram apenas aspartame em bebidas carbonatadas enquanto que o grupo de Horie (2007) determinou ciclamato por detecção indireta em alimentos, este grupo utilizou ainda extração em fase sólida no preparo de suas amostras e obtiveram recuperação de 93,3 a 108,3% a partir da adição de 200 μ g/g.

3.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE (UPLC)

A cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) é o avanço mais recente das técnicas de separação. Baseia-se nos mesmos princípios da cromatografia líquida de alta eficiência e utiliza fases estacionárias com partículas menores que 2 μ m. O uso destas partículas juntamente com as altas velocidades lineares das fases móveis, aumenta a resolução e a detectabilidade e diminuem o tempo das análises, bem como o gasto de solvente. Para tornar isto possível, uma vez que a atual tecnologia de instrumentação (bombas, injetores e detectores) disponível para a HPLC não é projetada para trabalhar em altas pressões, um novo equipamento que pode operar em pressões acima de 100 MPa foi introduzido e adaptado às necessidades atuais, em 2004 pela Waters Corporation, e logo outras companhias investiram na técnica surgindo outros equipamentos do gênero (NGUYEN et al., 2007; MALDANER e JARDIM, 2009).

As modificações requeridas em um sistema de UPLC quando comparado ao sistema de HPLC são: capacidade de trabalhar a pressões muito altas (100 MPa), volumes internos muito 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 (MALDANER e JARDIM, 2009).

Apesar de bastante recente, atualmente a técnica vem sendo empregada para a determinação de vários compostos tanto na área de fármacos como em alimentos (XIU-QUIN et al., 2008; HUNG e HATCHER, 2011; GRUZ et al., 2008; IRIARTE et al., 2009; BĚLÁKOVÁ et al., 2011). No entanto, não são ainda encontrados trabalhos de determinação simultânea de edulcorantes em alimentos e bebidas, apenas para a determinação de esteviol e seus glicosídeos (GARDANA e SIMONETTI, 2010) e ciclamato (SHERIDAN e KING, 2008) utilizando-se detector de massas.

4. PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

Um problema recorrente de quem faz experimentos é determinar se há efeitos de interação entre uma ou mais variáveis em seus resultados. Quando da organização de experimentos primeiramente escolhe-se os fatores a serem aplicados e os resultados desejados. Os fatores são as variáveis quantitativas ou qualitativas que o analista pode controlar. Já as respostas são as variáveis obtidas no experimento e dependem dos fatores empregados, podendo um sistema resultar em uma ou mais respostas dependendo do objetivo do analista (BARROS NETO et al., 2007).

O planejamento dos experimentos dependerá do objetivo que se deseja atingir, portanto cada objetivo deve ser analisado de maneira particular. Na maioria das vezes não é aconselhável que se utilize experimentos com estudos univariados, pois os fatores podem exercer efeitos combinados às respostas e no caso dos experimentos univariados esta interação não seria observada e a obtenção de um método otimizado seria difícil (LEWIS et al., 1999, BARROS NETO et al., 2007).

Existem algumas ferramentas de planejamento multivariado que podem ajudar à aplicação dos experimentos como, por exemplo, os fatoriais. Nesse tipo de

planejamento, primeiramente especifica-se os níveis ou valores de cada fator que será estudado, estes níveis devem ser pelo menos dois. Se um fatorial completo for escolhido, devem ser realizados experimentos com todas as combinações dos níveis dos fatores determinados. (BARROS NETO et al., 2007).

Uma grande vantagem da aplicação do planejamento fatorial é a possibilidade de diminuição do número de experimentos necessários para o processo de otimização de um método ou produto, escolhendo eficientemente experimentos que fornecerão informações coerentes e confiáveis. Cada parâmetro experimental pode ser analisado, conduzindo-se uma série de experimentos com diversos fatores que são variados simultaneamente (ZECEVIC et al., 2008).

Quando apenas uma resposta é considerada a análise do modelo pode indicar a área do delineamento em que se obtém a resposta desejada, no entanto, quando se trabalha com várias respostas é necessária uma ferramenta que possibilite o estabelecimento de uma correlação entre essas. Associadas ao planejamento estatístico, as funções de desejabilidade, podem levar em consideração diferentes tipos de respostas e estabelecer uma correlação entre essas, podendo auxiliar na otimização das mesmas. É praticamente impossível obter-se o ponto ótimo para cada resposta. A condição experimental que melhora uma resposta pode causar efeitos negativos em outra, portanto a palavra otimização deve significar um ponto em que todas as respostas apresentem valores aceitáveis ou que tenderão ao ótimo (LEWIS et al., 1999).

Tomando-se como exemplo um sistema cromatográfico constata-se que esse pode ser influenciado por diversos fatores que resultarão em um sistema de alta resolução. Estes fatores podem ser: a natureza da fase estacionária, a composição da fase móvel (uso de tampão, concentração de sal, concentração de solvente orgânico, pH), temperatura da coluna e vazão da fase móvel. Tais fatores podem ter efeitos combinados entre si na promoção de separações, sendo, portanto, praticamente impossível se otimizar um método considerando cada variável/fator separadamente.

Neste sentido o planejamento estatístico é uma ferramenta bastante útil para o auxílio no desenvolvimento de um método adequado para grupos de analitos, principalmente quando se fala de misturas complexas como os alimentos.

4.1. FUNÇÃO DE DESEJABILIDADE (DERRINGER E SUICH)

Derringer e Suich (1980), descreveram um método para otimização simultânea de várias respostas, baseado na construção de uma função de desejabilidade para cada resposta individual (função de desejabilidade parcial, d_i), estabelecendo ao final uma função de desejabilidade global (D). Cada resposta tem associado um valor de desejabilidade parcial que varia de 0 a 1, de acordo com a proximidade da resposta desejada. O valor 0 (zero) caracteriza uma resposta inaceitável, enquanto que 1 determina o valor mais aceitável (apud LEWIS et al., 1999; BARROS NETO et al., 2007; BREITKREITZ, 2007; ZECEVIC et al., 2008).

Assim como cada resposta pode ser calculada dentro da região experimental utilizando-se o modelo e os coeficientes calculados, também a desejabilidade correspondente pode ser calculada dentro daquela região por meio de equações adequadas a cada caso. Então os valores individuais de desejabilidade são combinados criando uma função de desejabilidade global (D), empregando-se a média geométrica, e foca-se então em maximizar este valor (LEWIS et al., 1999 e BREITKREITZ, 2007).

É imprescindível destacar que todo esse procedimento seja realizado baseando-se nas equações dos modelos construídos para cada uma das respostas e, portanto, é importante que esses tenham sido obtidos por meio de planejamento estatisticamente embasado e que tenham ainda sido validados (BREITKREITZ, 2007).

Antes de serem definidas as funções de desejabilidade parciais, é necessário estabelecer os valores mínimo (y_i^{\min}), máximo (y_i^{\max}) e um valor alvo (y_{alvo}) para a resposta considerada. A função de desejabilidade parcial pode ser linear ou não-

linear e ainda unilateral ou bilateral, e sua forma matemática determina a maneira de se chegar ao valor alvo (JIMIDAR et al., 1996; SAFA e HADJMOHAMMADI, 2005; DONATO et al., 2006; BREITKREITZ, 2007).

4.1.1. Funções lineares

As funções mais simples são aquelas lineares e unilaterais, utilizadas para minimizar ou maximizar uma resposta. Essas são chamadas assim, pois a desejabilidade se aproxima ou se afasta do alvo descrevendo uma função linear, apresentando sempre expoentes de grandeza 1 e são chamadas unilaterais, pois o valor alvo irá coincidir com um dos limites determinados. Ao se descrever a desejabilidade de funções que requerem maximização, assume-se que qualquer valor observado acima do valor alvo estipulado é satisfatório e que são inaceitáveis aqueles valores abaixo do limite inferior ao determinado. A Figura 9 demonstra a situação graficamente e as equações (1a a 1c) a explica (LEWIS et al., 1999 e BREITKREITZ, 2007):

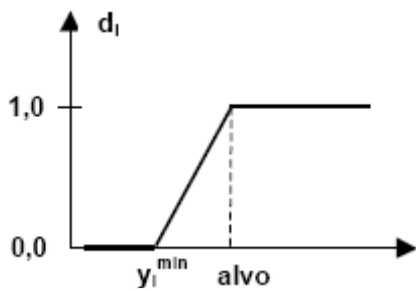


Figura 9: Função de desejabilidade linear unilateral para maximização.

Fonte: BREITKREITZ, p. 29, 2007.

$$d_i = 1 \quad \text{se } \hat{y}_i < y^{alvo} \quad (1a)$$

$$d_i = \left(\frac{\hat{y}_i - y_i^{min}}{y_{alvo} - y_i^{min}} \right) \quad \text{se } y_i^{min} \leq \hat{y}_i \leq y_{alvo} \quad (1b)$$

$$d_i = 0 \quad \text{se } \hat{y}_i > y_i^{min} \quad (1c)$$

Fonte: BREITKREITZ, p. 28, 2007.

Já para a desejabilidade de funções que requerem minimização, o valor mínimo deve coincidir com o valor alvo e valores abaixo do valor alvo estipulado serão considerados satisfatórios (Figura 10, equações 2a a 2c). Sendo ainda

inaceitáveis os valores encontrados acima do valor do limite superior. (LEWIS et al., 1999 e BREITKREITZ, 2007):

$$d_i = 0 \quad \text{se} \quad \hat{y}_i < y_i^{\max} \quad (2a)$$

$$d_i = \left(\frac{\hat{y}_i - y_i^{\max}}{y_{\text{alvo}} - y_i^{\max}} \right) \quad \text{se} \quad y_i^{\max} \leq \hat{y}_i \leq y_{\text{alvo}} \quad (2b)$$

$$d_i = 1 \quad \text{se} \quad \hat{y}_i > y_{\text{alvo}} \quad (2c)$$

Fonte: BREITKREITZ, p. 29, 2007.

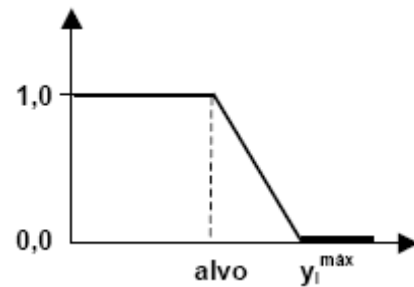


Figura 10: Função de desejabilidade linear unilateral para minimização.
Fonte: BREITKREITZ, p. 29, 2007.

No entanto, há o caso em que a resposta é satisfatória em um dado intervalo-alvo, podendo estar compreendida entre dois limites (Figura 11, equações 3a a 3c).

$$d = 0 \quad \text{se} \quad y_i < y_i^{\min} \quad (3a)$$

$$d = 1 \quad \text{se} \quad y_i^{\min} \leq y_i \leq y_i^{\max} \quad (3b)$$

$$d = 0 \quad \text{se} \quad y_i > y_i^{\max} \quad (3c)$$

Fonte: BREITKREITZ, p.30, 2007.

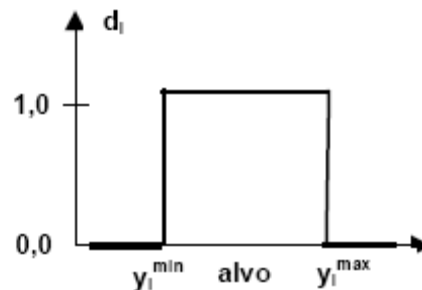


Figura 11: Função de desejabilidade linear bilateral para um intervalo-alvo.
Fonte: BREITKREITZ, p.30, 2007.

Podem ser encontradas ainda funções em que o valor de uma determinada resposta deve estar próximo a um determinado valor alvo e qualquer desvio em relação a este valor leva à perda de qualidade. No caso descrito, tanto valores superiores como inferiores ao alvo são indesejáveis, sendo pouco aceitáveis ou mesmo inaceitáveis. O alvo está, entretanto, entre dois valores limites, não necessariamente simétricos entre si (Figura 12, equações 4a a 4d) (LEWIS et al., 1999 e BREITKREITZ, 2007).

$$d_i = 0 \quad \text{se} \quad \hat{y}_i < y_i^{\min} \quad (4a)$$

$$d_i = \left(\frac{\hat{y}_i - y_i^{\min}}{y_{alvo} - y_i^{\min}} \right) \quad \text{se} \quad y_i^{\min} \leq \hat{y}_i \leq y_{alvo} \quad (4b)$$

$$d_i = \left(\frac{\hat{y}_i - y_i^{\max}}{y_{alvo} - y_i^{\max}} \right) \quad \text{se} \quad y_{alvo} \leq \hat{y}_i \leq y_i^{\max} \quad (4c)$$

$$d_i = 0 \quad \text{se} \quad \hat{y}_i > y_i^{\max} \quad (4d)$$

Fonte: BREITKREITZ, p.29, 2007.

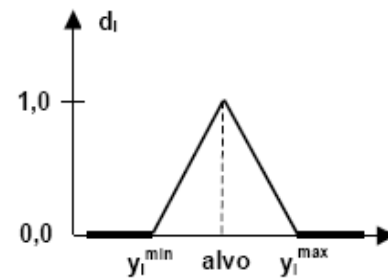


Figura 12: Função de desejabilidade linear bilateral para um valor alvo entre dois pontos.

Fonte: BREITKREITZ, p.30, 2007.

4.1.2. Funções não-lineares

As funções lineares descritas anteriormente podem ainda ser refinadas, resultando em funções não lineares. Podem ser, por exemplo, unilaterais (Figura 13) e serem dados pesos menores aos valores próximos aos limites (Figura 13, A e C) ou maiores próximos ao alvo (Figura 13, B e D). Os formatos das funções de desejabilidade dos gráficos demonstrados na figura 13 podem ser encontrados alterando-se os expoentes das funções descritas anteriormente e resultam nas equações 5a a 5c (LEWIS et al., 1999 e BREITKREITZ, 2007).

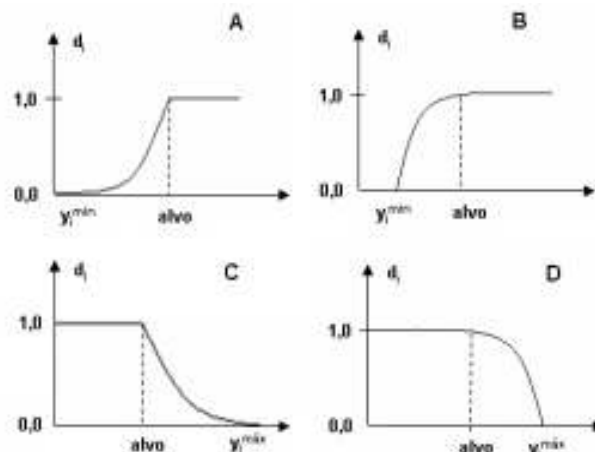


Figura 13: Funções de desejabilidade unilaterais não lineares, A e B) maximização; C e D) minimização.

Fonte: BREITKREITZ, p.31, 2007.

Também as funções bilaterais lineares podem ser transformadas em não-lineares da mesma maneira, resultando nas equações de 5a a 5c combinando as funções de maximização e minimização. Um dos lados do intervalo pode ainda ser linear se s_1 ou s_2 for igual a 1 (LEWIS et al., 1999).

$$d_i = 0 \quad \text{se } \hat{y}_i \leq y_i^{\min} \quad \text{ou} \quad \hat{y}_i \geq y_i^{\max} \quad (5a)$$

$$d_i = \left(\frac{\hat{y}_i - y_i^{\min}}{y_{alvo} - y_i^{\min}} \right)^{S_1} \quad \text{se } y_i^{\min} \leq \hat{y}_i \leq y_{alvo} \quad (5b)$$

$$d_i = \left(\frac{y_i^{\max} - \hat{y}_i}{y_i^{\max} - y_{alvo}} \right)^{S_2} \quad \text{se } y_{alvo} \leq \hat{y}_i \leq y_i^{\max} \quad (5c)$$

Fonte: LEWIS et al., 1999.

Para obter menores valores próximo aos dois limites os expoentes devem ser maiores que 1 (Figura 14 A); para obter uma faixa maior de valores aceitáveis ao redor do alvo, o expoente deve ser entre 0 e 1 (Figura 14 B) e ainda é possível combinar as duas situações (Figuras 14 C e D) (BREITKREITZ, 2007).

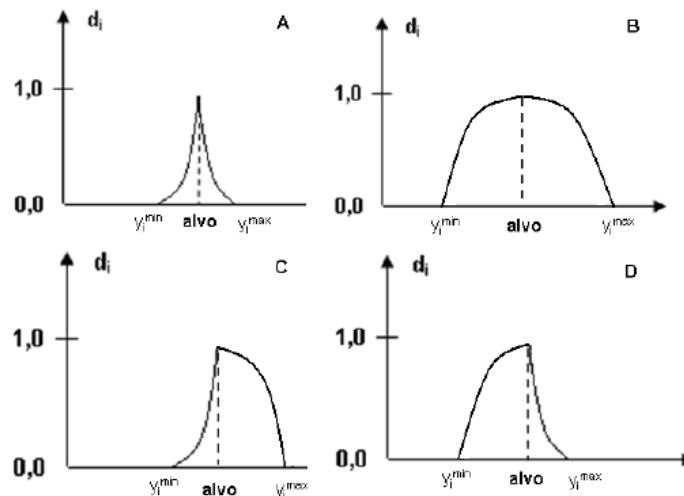


Figura 14: Funções de deseabilidade bilaterais não lineares. A, B, C e D explicados no texto anteriormente.

Fonte: BREITKREITZ, p.32, 2007.

4.1.3. Função de desejabilidade Global

A função de desejabilidade global (D) de Derringer e Suich é definida como a média geométrica em função das desejabilidades individuais e expressa da seguinte maneira:

$$D = \left(d_1^{p_1} \times d_2^{p_2} \times d_3^{p_3} \times \dots \times d_n^{p_n} \right)^{\frac{1}{n}}$$

Onde: p_1, p_2, \dots, p_n = peso das respostas (o valor de p_i pode variar de 0,1 a 1)

n = número de respostas

d_i = valor de cada função de desejabilidade individual

A escala da função de desejabilidade é adimensional, o que nos permite comparar respostas medidas em diferentes escalas. É possível ainda determinar o grau de importância das respostas combinadas.

Quando o valor de D é diferente de zero, pode-se concluir que todas as respostas individuais estão simultaneamente dentro da faixa desejável. Quando o valor de D for próximo de 1, pode-se dizer que a combinação das diferentes respostas se apresentam em seu ótimo, pois o valor encontra-se próximo ao alvo estabelecido (JIMIDAR et al., 1996; LEWIS et al., 1999; DONATO et al., 2006; ZECEVIC et al., 2008).

Uma vantagem do método desenvolvido por Derringer e Suich em relação a outras técnicas multi-critério é o fato de que quando o valor de uma desejabilidade individual é inaceitável também o produto final (desejabilidade global, D) será inaceitável, o que impede que um valor bom mascare outro ruim, não importando quão satisfatórios forem os valores das outras respostas (SAFA e HADJMOHAMMADI, 2005; BARROS NETO et al., 2007; SIVAKUMAR et al., 2007).

5. VALIDAÇÃO

A validação assegura que o método funcione adequadamente nas condições para as quais foi validado, sendo confiável nas faixas de concentração em que os analitos se encontram nas amostras. Não há um sistema único de validação que atenda a todos os órgãos de controle de qualidade em laboratórios sejam eles nacionais ou internacionais, no entanto há um consenso entre estes órgãos de que a validação é necessária. Todo sistema apresenta limitações, o importante é determinar-las durante a validação e assegurar que o sistema funcione como esperado (THOMPSON et al., 2002; LANÇAS, 2004).

Alguns parâmetros usualmente fazem parte da maioria dos processos de validação: exatidão, precisão, fidelidade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, sensibilidade, especificidade, recuperação, robustez, estabilidade e intervalo de aplicação (LANÇAS, 2004).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, M. 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, n. 7, p. 1743-1746, 2008.

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

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.

BARROS NETO, B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer Experimentos**. 3 ed, Campinas, Editora UNICAMP, 2007, 480 p.

BĚLÁKOVÁ, S.; BENEŠOVÁ, K.; MIKULÍKOVÁ, R.; SVOBODA, Z. Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance

liquid chromatography with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 126, Issue 1, 1, p. 321-325, 2011.

BELL, L. N.; HAGEMAN, M. J. Differentiating between the Effects of Water Activity and Glass Transition Dependent Mobility on a Solid State Chemical Reaction: Aspartame Degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2398-2401, 1994.

BELL, L. N.; WETZEL, C. R. Aspartame Degradation in Solution As Impacted by Buffer Type and Concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2608-2612, 1995.

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

BOYCE, M. C. Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, 847, p. 369–375, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde. Portaria n. 540, de 27 de outubro de 1997. **Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares**. Diário Oficial da União, Brasília, 1997.

BRASIL. 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 1998a.

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.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 3, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos edulcorantes, estabelecendo seus limites máximos para os alimentos.**

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.

BREITKREITZ, M. C. **Otimização simultânea de variáveis de processo e mistura em cromatografia líquida de alta eficiência.** 2007. 108 f. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas. 2007.

BUTCHKO, H. H.; STARGEL, W. W.; COMER, C. P.; MAYHEW, D. A.; ANDRESS, S. E. Aspartame. In: NABORS, L.O. **Alternative Sweeteners**, 3ed, revisado e expandido, Suíça, Marcel Dekker, 2001.

CALONI-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**, 83, p. 297–301, 2003.

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

CANTARELLI, M. A.; PELLERANO, R. G.; MARCHEVSKY, E. J.; CAMIÑA, 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**, 56, p. 9345–9349, 2008.

CANTARELLI, M. A.; PELLERANO, R. G.; MARCHEVSKY, E. J.; CAMIÑA, 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**, 115, p. 1128–1132, 2009.

CARDELLO, H. M. A. B.; DAMÁSIO, M. H. Edulcorantes e suas características. Revisão. **Boletim SBCTA**, 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**, Campinas, v. 20, n. 3, 2000. Disponível in: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612000000300008&lng=en&nrm=iso. Acessado em 25 de maio de 2011. doi: 10.1590/S0101-20612000000300008.

CASTRO, A. G. P.; FRANCO, L. J. Caracterização do Consumo de Adoçantes Alternativos e Produtos Dietéticos por Indivíduos Diabéticos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 3, p. 280-287, 2002.

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**, 750, 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**, 771, 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**, 937, p. 57–64, 2001.

DEMIRALAY, E. Ç.; ÖZKAN, G.; GUZEL-SEYDIM, Z. Isocratic Separation of Some Food Additives by Reversed Phase Liquid Chromatography. **Chromatographia**, v. 63, n. 1/2, p. 91-96, 2006.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several responses variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DI PIETRA, A. M.; CAVRINI, V.; BONAZZI, D.; BENFENATI, L. HPLC Analysis of Aspartame and Saccharin in Pharmaceutical and Dietary Formulations. **Chromatographia**, v. 30, n. 3/4, p. 215-219, 1990.

DONATO, P.; STANCANELLI, R.; CALABRO, M. L.; TOMMASINI, S.; CUTRONEO, P.; GUARDO, M.; PAGANO, B.; CHIMIRRI, A.; FICARRA, P.; FICARRA, R. Optimization of a LC method for the enantioseparation of a non-competitive glutamate receptor antagonist, by experimental design methodology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 42, p. 543–548, 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.

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

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

FERREIRA, V. A. Obesidade e Pobreza: o Aparente Paradoxo. **Revista ABESO - Associação Brasileira para o estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica**, a. 6, 2006.

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**, in press, 2010.

FRAZIER, R. A.; INNS, E. L.; DOSSI, N.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks. **Journal of Chromatography A**, 876, p. 213–220, 2000.

GARDANA, M. S.; 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, Issue 9, p.1463-1470, 2010.

GLIEMMO, M. F.; CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N. Interaction Between Potassium Sorbate and Aspartame in Aqueous Model Sugar Systems. **Journal of Food Science**, V. 66, N. 3, p. 428-431, 2001.

GLIEMMO, M. F.; CALVIN, A. M.; TAMASI, O.; GERSCHENSONA, L. N.; CAMPOS, C. A. Interactions between aspartame, glucose and xylitol in aqueous systems containing potassium sorbate. **LWT**, v. 41, p. 611–619, 2008.

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

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

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**, 22, p. 165–168, 2009.

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**, 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**, 555, 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, Issue 4, p. 1510-1516, 2011.

IRIARTE, G., GONZALEZ, O., FERREIRÓS, N., MAGUREGUI, M. I., ALONSO, R. M., JIMÉNEZ, R. M. Validation of a fast liquid chromatography–UV method for the analysis of drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. **Journal of Chromatography B**, 877, p.3045–3053, 2009.

JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Summary of Evaluations Performed, **Stevioside**, Who Food Additives series: 42, Geneva, 1999.

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

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, **Steviol Glicosides**, Monographs 5, 2008a.

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

JIMIDAR, M.; BOURGUIGNON, B.; MASSART, D. L. Application of Derringer's desirability function for the selection of optimum separation conditions in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 740, p.109-117, 1996.

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

KEMP, S.; SCHWEPPE, C.; LINDLEY, M. Developments in sweeteners. In: TAYLOR, A.; HORT, J. **Modifying flavour in food**. England, Woodhead Publishing Limited, 2007, p.186-199.

KHURANA, H. K., CHO, I. K., SHIM, J. Y., LI, Q. X., JUN, S. Application of Multibounce Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics for Determination of Aspartame in Soft Drinks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 778–783, 2008.

KIM, S. K.; JUNG, M. Y.; KIM, S. Y. Photodecomposition of aspartame in aqueous solutions. **Food Chemistry**, v. 59, v. 2, p. 273-278, 1997.

KINGHORN, A. D.; WU, C. D.; DJENDOEL, D. Stevioside. In: NABORS, L.O. **Alternative Sweeteners**, 3ed, revisado e expandido, Suíça, Marcel Dekker, 2001, p. 167-181.

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, p. 35-47, 2006.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos, editora Rima, 2004, 62p.

LAWRENCE, G. D.; YUAN, D. Benzaldehyde Formation from Aspartame in the Presence of Ascorbic Acid and Transition Metal Catalyst. **Journal of Agriculturam and Food Chemistry**, v. 44, p. 3461-3466, 1996.

LAWRENCE, J.; CHARBONEAU, C. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparation. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, n. 5, p. 934-937, 1988.

LINDLEY, M. G. New developments in low-calorie sweeteners. In: CORTI, A. **Low-calorie sweeteners: Present and Future**. World Review of Nutrition and Dietetics, Barcelona, Spain, A. P. Simopoulos, v. 85, 1999, p.44-51.

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**, 121, p.503–508, 2010.

LIPINSKI, G. R.; HANGER, L. Y. Acesulfame 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**, 1216, p. 1126–1131, 2009.

LEWIS, G. A.; MATHIEU, D.; PHAN-TAN-LUU, R. **Pharmaceutical Experimental Design**. Nova York, Marcel Dekker, 1999, 501 p.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MEDEIROS, R. A.; CARVALHO, A. E.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, 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. Propriedades tecnológicas y regulación de los edulcorantes de alta intensidad em la Unión Europea. **Food Science and Technology Internacional**, v. 4, p. 5-16, 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, 107f, Tese de doutorado em Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

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. Disponível em: <http://sciencelinks.jp/j-east/article/199917/000019991799A0632104.php>. Acesso em Abril de 2009.

NGUYEN, D. T. T.; GUILLARME, D.; HEINISCH, S.; BARRIOULET, M. P.; ROCCA, J. L.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. High throughput liquid chromatography with sub-2 μm particles at high pressure and high temperature. **Journal of Chromatography A**, 1167, p. 76-84, 2007.

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**, 113, p. 1339–1345, 2009.

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

PEARSON, R. L. Saccharin. in: NABORS, L.O. **Alternative Sweetners**, 3ed, revisado e expandido, Suíça, Marcel Dekker, 2001.

PESEK, J. J.; MATYSKA, M. T. Determination of aspartame by high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 781, p. 423-428, 1997.

RANGAN, S., BARCELOUX, D. G. Food Additives and Sensitivities. **Disease-a-Month**, v. 55, Issue 5, p. 292-311, 2009.

SAFA, F., HADJMOHAMMADI, M. R. Simultaneous optimization of the resolution and analysis time in micellar liquid chromatography of phenyl thiohydantoin amino acids using Derringer's desirability function. **Journal of Chromatography A**, 1078, p. 42–50, 2005.

SALMINEN, S.; HALLIKAINEN, A. Sweeteners. In: BRANEN, A. L.; DAVIDSON, P. M.; SALMINEN, S.; THORNGATE III, J. H. **Food Additives**. 2 ed, New York, Marcel Dekker, 2002.

SBD. Rio de Janeiro, Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, p. 8-10, 2007.

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**, 394, p. 1585–1594, 2009.

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.

SIVAKUMAR, T.; MANAVALAN, R.; VALLIAPPAN, K. Global optimization using derringer's desirability function: enantioselective determination of ketoprofen in formulations and in biological matrices. **Acta Chromatographica**, n. 19, p. 29-47, 2007.

SLOAN, A.E. Top 10 global foods trends. **Food Technology**, v. 59, n.4, p. 20-32, 2005.

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.

STARGEL, W. W.; MAYHEW, D. A.; COMER, C. P.; ANFRESS, S. E.; BUTCHKO, H. H. Neotame. In: NABORS, L.O. **Alternative Sweeteners**, 3ed, revisado e expandido, Suíça, Marcel Dekker, 2001, p. 129-145.

THOMPSON, C. O., TRENERRY, V. C., KEMMERY, B. Determination of cyclamate in low joule foods by capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, 704, p. 203-210, 1995a.

THOMPSON, C. O.; TRENERRY, V. C.; KEMMERY, B. Micellar electrokinetic capillary chromatographic determination of artificial sweeteners in low-Joule soft drinks and other foods. **Journal of Chromatography A**, 694, p. 507-514, 1995b.

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

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.

TORQUATO M. T. C. G.; MONTENEGRO JR, R. M.; VIANA L. A. L.; SOUZA, R. A. H. G.; LANNA, C. M. M.; LUCAS, J. C. B.; BIDURIN, C.; FOSS, M. C. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. **São Paulo Medical Journal (Revista Paulista de Medicina)**, v. 121, n. 6, p. 224-30, 2003.

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.

UMBELINO, D.C. **Caracterização por análise quantitativa e análise tempo-Intensidade de suco e de polpa de manga (*Manifera indica L.*) adoçados com diferentes edulcorantes**. 2005. 190f. Tese de doutorado em Alimentos e Nutrição - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

VEERABHADRARAO, M.; NARAYAN, M. S.; KAPUR, O.; SASTRY, C. S. Reverse phase liquid chromatographic of some food additives. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 70, n. 3, p. 578-582, 1987.

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

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

WANG, R.; SCHROEDER, S.A. The Effect of Caramel Coloring on the Multiple Degradation Pathways of Aspartame. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 7, p. 1100-1106, 2000.

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**, 1157, 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 Series, 1989, p.179-194.

WETZEL, C. R.; BELL, L. N. Chemical stability of encapsulated aspartame in cakes without added sugar. **Food Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 33-37, 1998.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes estimates for year 2000 and projection 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. Barcelona, Spain, A. P. Simopoulos, v. 85, 1999, p. 52-57.

XIU-QIN, L.; CHAO, J.; WEI, Y.; YUN, L.; MIN-LI, Y.; XIAO-GANG, C. UPLC-PDAD Analysis for Simultaneous Determination of Ten Synthetic Preservatives in Foodstuff. **Chromatographia**, 68, 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.

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

ZECEVIC, M.; JOCIC, B.; ZIVANOVIC, L.; PROTIC, A. Application of Multicriteria Methodology in the Development of Improved RP-LC-DAD for Determination of Rizatriptan and Its Degradation Products. **Chromatographia**, v. 68, p. 911–918, 2008.

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**, 1085, 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.

**Desenvolvimento e otimização multivariada de
metodologia para separação de edulcorantes
por UPLC-PDA em alimentos**

Cíntia Botelho Dias, Helena Teixeira Godoy

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

Artigo a ser publicado na revista Food Chemistry

Desenvolvimento e otimização multivariada de metodologia para separação de edulcorantes por UPLC-PDA em alimentos

Cíntia Botelho Dias¹, Helena Teixeira Godoy¹

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

RESUMO

Um novo método rápido, eficiente e econômico para a determinação de cinco edulcorantes (acesulfame-k, aspartame, ciclamato, neotame e sacarina) pela técnica de cromatografia líquida de ultra performance foi desenvolvido. O delineamento composto central e a otimização simultânea de respostas pela função de desejabilidade de Derringer e Suich foram utilizados para a otimização do método, sendo esse conduzido em matriz alimentícia adicionada de padrões. Os procedimentos multivariados foram eficientes para a obtenção da condição ótima de separação. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 e o método otimizado empregou fase móvel composta de acetonitrila e tampão fosfato de sódio 5 mM/ácido orto-fosfórico (pH 3,0) com eluição por gradiente e vazão de 0,4 mL/min, com temperatura da coluna de 56°C. Os cinco compostos responderam linearmente em diferentes faixas de concentração aplicáveis às concentrações presentes nas amostras, também a repetibilidade, a linearidade, os limites e a recuperação para as diferentes matrizes foram avaliados. As taxas de recuperação para os edulcorantes avaliados variaram entre 70 e 115% para as diferentes matrizes analisadas. O método foi aplicado a refrigerantes, néctares e sucos, chás prontos para consumo, pós para preparo de refresco, pudins e cappuccinos, achocolatados, geléias, molho tipo “barbecue” e catchup. No entanto, algumas limitações foram encontradas para a quantificação do neotame e ainda para alimentos contendo cacau em sua formulação quanto à identificação do ciclamato de sódio.

Palavras chave: edulcorantes, UPLC, Derringer e Suich, validação, diet e light

ABSTRACT

A new, fast, efficient and economic method for the determination of five sweeteners (acesulfame-K, saccharin, cyclamate, aspartame and neotame) by ultra performance liquid chromatography (UPLC) has been developed. A central composite design was used and simultaneous optimization of the answers was carried using the Derringer's desirability function for the method optimization. The optimization was conducted using an added standard food matrix. The multivariate statistical techniques were efficient for the achievement of the best separation. A C18 reversed phase column was used and the optimized method resulted in a binary eluent consisting of acetonitrile and sodium phosphate 5mM/ orto-phosphoric acid buffer (pH 3.0) in gradient elution, 0.4 mL/min flow rate and 56°C column temperature. The five compounds behaved linearly in different concentration ranges applicable to the concentrations in the samples and the precision intra and inter-day, as well as the limits varied for those sweeteners. The recoveries for the evaluated sweeteners varied for the distinct sample matrices from 70 to 115%. The method was applied to the sweeteners determination in soft drinks, fruit juice beverages, ready to drink teas, powder juice, pudding and cappuccino, chocolate powder, jellies, barbecue sauce and ketchup. However, limitations were found on the quantification of neotame and on the products containing cocoa, in which it is not possible to identify the sodium cyclamate.

Key words: sweeteners, UPLC, Derringer and Suich, validation, diet and light

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, pode-se destacar alguns quadros clínicos, como o *diabetes mellitus* e a obesidade, que exigem restrição definitiva ou prolongada de açúcares. Razão pela qual se torna

crecente a demanda pelos produtos diet e light, que vem aumentando seu espaço no mercado e sua aceitação entre consumidores (TORLONI et al., 2007).

Para a autorização do uso de edulcorantes é necessária sua avaliação toxicológica, que resulta correntemente na determinação de níveis seguros ao consumo, visto que algumas destas substâncias podem ter efeito tóxico em níveis muito elevados, mesmo que não haja ainda um consenso sobre tais efeitos. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação das quantidades de edulcorantes em alimentos e bebidas.

Muitos edulcorantes são utilizados em combinação, o que torna um desafio desenvolver um método experimental capaz de analisá-los simultaneamente.

Vários métodos vêm sendo empregados para a determinação de edulcorantes artificiais. Dentre eles se destacam os métodos cromatográficos (NAKAIE et al., 1999; CHEN et al., 1997; CHEN e WANG, 2001; ZHU et al., 2005; CASALS et al., 1996; AQUINO et al., 2004; DEMIRALAY et al., 2006; DOSSI et al., 2006; HUANG et al., 2006; WASIK et al., 2007; LOOS et al., 2009; YANG e CHEN; 2009; WALKER et al., 1997; HORIE et al., 2007) e espectrofotométricos (FATIBELLO-FILHO et al., 1998; CANTARELLI et al., 2008; CANTARELLI et al., 2009; NI et al. 2009). A maioria dos métodos propostos permite a determinação de até quatro edulcorantes simultaneamente. Dentre os que permitem a determinação de até oito ou nove compostos estão os métodos de separação acoplados a detectores mais sofisticados, como o detector de massas (WASIK et al.; 2007; YANG e CHEN, 2009). Esses, entretanto, apresentam maior custo e exigem maior especialização dos analistas, restringindo sua aplicação em análises de rotina.

Técnicas mais avançadas de separação e determinação de diferentes compostos vêm sendo desenvolvidas com o intuito de tornar mais rápidas e eficientes as análises. A cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), que baseia-se nos mesmos princípios da cromatografia líquida de alta eficiência, é um dos avanços mais recente em técnicas de separação. A UPLC possibilita o uso de

partículas menores e mais simétricas de fase estacionária, e conseqüentemente de colunas mais curtas e com menor diâmetro, sem diminuir o número de pratos teóricos em relação à HPLC. O uso das partículas menores que 2 μ m associado a altas velocidades lineares de fase móvel podem aumentar a resolução, a detectabilidade e a velocidade das análises (MALDANER e JARDIM, 2009). A melhora da detectabilidade permite ainda a utilização de detectores de menor custo de aquisição e de mais fácil operação devido à diminuição dos limites de detecção e quantificação para muitos analitos em relação a outras técnicas. Por ser um avanço recente, existem ainda poucos métodos desenvolvidos e validados e dentre esses nenhum para a determinação simultânea de edulcorantes com detecção por arranjo de diodos. O que torna a UPLC potencialmente um objeto de pesquisa.

Os métodos de planejamento experimental multivariado vêm ganhando espaço como uma ferramenta eficiente para a otimização de métodos cromatográficos. Um sistema cromatográfico pode ser influenciado por vários fatores que resultarão em um sistema de alta resolução ou não. Tais fatores podem ter, ainda, efeitos de interação que afetam diretamente a separação dos analitos, sendo, portanto, praticamente impossível aperfeiçoar-se um método considerando cada variável ou fator isoladamente. O planejamento experimental multivariado possibilita diminuir o número de experimentos necessários para o processo de otimização de um método, e neste sentido, pode ser considerada uma ferramenta bastante útil para a otimização de um método cromatográfico adequado para grupos de analitos, principalmente quando se fala de misturas complexas como os alimentos.

A função de desejabilidade de Derringer e Suich (1980), por sua vez permite analisar várias respostas simultaneamente, auxiliando na escolha de uma condição mais adequada à obtenção dos valores desejados para as respostas analisadas (apud BREITKREITZ, 2008; ZECEVIC et al., 2008 e LEWIS et al., 1999).

O presente trabalho objetivou utilizar o planejamento composto central e a função de deseabilidade de Derringer e Suich para otimizar a separação de cinco edulcorantes em alimentos e bebidas por cromatografia líquida de ultra performance e detector por arranjo de diodos.

MATERIAIS E MÉTODOS

REAGENTES E AMOSTRAS

Foram utilizados acetonitrila grau cromatográfico (J. T. Baker), fosfato de Sódio monobásico monoidratado (J. T. Baker e Merck), hidróxido de sódio (Carlos Herba) e ácido orto-fosfórico (Merck) todos grau analítico. A água foi purificada utilizando-se sistema Milli-Q (Millipore). Padrões de acessulfame-k (Fluka), aspartame e sacarina sódica hidratada (Sigma), ciclamato de sódio (Aldrich) foram obtidos da Sigma-Aldrich e o padrão de neotame foi doado pela empresa Sweetmix.

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), enquanto que a acetonitrila foi filtrada em membrana universal GMP de poro 0,22 μm (Pall Corporation).

Foram adquiridas amostras isentas de edulcorantes em supermercados na cidade de Campinas.

PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO E AMOSTRAS

As soluções padrão estoque foram pesadas em balança analítica (Sartorius BP221S) diretamente em balões volumétricos, diluídas com água ultra pura e deixadas em ultrassom até a total dissolução.

A partir das soluções estoque foi preparado um mix de padrões com a seguinte concentração: 20,50 $\mu\text{g/mL}$ de acessulfame-K, 1,55 $\mu\text{g/mL}$ de sacarina

sódica, 326,27 µg/mL de ciclamato de sódio, 3,24 µg/mL de aspartame e 10,41 µg/mL de neotame, para o primeiro planejamento composto central.

Para o segundo planejamento, foi selecionado um chá pronto para consumo já contendo sacarina e ciclamato. Esse foi diluído dez vezes e foram adicionadas alíquotas das soluções estoque dos padrões de acessulfame-K, aspartame e neotame. A partir dessa preparação foi obtida uma amostra contendo um mix de padrões nas seguintes concentrações: 20,5 µg/mL de acessulfame-K, 6 µg/mL de sacarina sódica, 50 µg/mL de ciclamato de sódio, 3,24 µg/mL de aspartame e 10,41 µg/mL de neotame.

As soluções utilizadas para os dois planejamentos foram então filtradas em membrana PVDF de 0,22 µm de poro (Millipore).

Para a validação, as soluções que compõem os pontos da curva de calibração, bem como as utilizadas para medir os outros parâmetros foram preparadas na matriz para que fossem considerados interferentes decorrentes dessa. Devido ao fato de terem sido analisados diversos tipos de amostra, foi escolhida a matriz geléia, a mais complexa dentre as analisadas, para a construção da curva de calibração. Os padrões foram adicionados à matriz isenta de edulcorantes. As soluções utilizadas nesta etapa foram filtradas em membrana PVDF de 0,22µm de poro (Millipore) e também em membrana VS de Éster de celulose (VSWP) de 0,025µm de poro (Millipore), assim como as amostras utilizadas para a recuperação.

Para a recuperação, as amostras isentas de edulcorantes foram adicionadas de padrões nas concentrações descritas na Tabela 14 e preparadas da seguinte maneira:

- ✓ Os chás, refrigerantes, néctares e sucos foram diluídos dez vezes com auxílio de pipeta automática e filtrados em seguida. Os refrigerantes foram colocados em banho de ultrassom por aproximadamente 5 minutos, para remoção total do gás antes da etapa de diluição. Os néctares e sucos foram centrifugados por 5 minutos a 2415 g antes da etapa de filtração.

- ✓ Os pós foram pesados em balões volumétricos, o volume foi completado com água ultra pura, foram então colocados em banho de ultrassom por 15 minutos e finalmente filtrados. Os achocolatados, cappuccinos e pudins foram centrifugados por 5 minutos a 2415 g antes da etapa de filtração. Os refrescos, achocolatados e pudins foram pesados de maneira a se obter 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.
- ✓ Os molhos e a geléia foram pesados em balão volumétrico, o volume foi completado com água ultra pura, foram então centrifugados por 5 minutos a 2415 g e finalmente filtrados. A diluição foi equivalente a cinquenta vezes (massa/volume).

INSTRUMENTAÇÃO

A separação dos edulcorantes foi realizada utilizando-se o sistema de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) Acquity Waters, modelo UPA, série J08UPA 905M, equipado com bomba binária modelo UPB, série: K08UPB 444M. Para a separação foi utilizada uma coluna Hypersil Gold (Thermo) de fase reversa C18 com 50 x 2,1 mm e 1,9 µm de tamanho de partícula. A vazão, a temperatura, a composição da fase móvel e o pH da solução tampão foram otimizados.

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

A partir de metodologias descritas na literatura para determinação de edulcorantes por cromatografia líquida de alta eficiência (LAWRENCE e CHARBONNEAU, 1988; DOSSI et al., 2006; WASIK et al., 2007; YANG E CHEN, 2009) e testes preliminares foram determinadas as condições para a realização de um planejamento composto central 2^4 com pontos centrais e axiais. Foram estudados os efeitos dos parâmetros: pH da fase móvel, temperatura da

coluna, vazão de fase móvel e porcentagem do aditivo acetonitrila na fase móvel na etapa inicial de separação (primeiros três minutos), nos níveis indicados na Tabela 1.

TABELA 1: níveis experimentais para o planejamento composto central 2⁴.

Variáveis	Níveis codificados e decodificados				
	-2	-1	0	1	2
pH	3	4	5	6	7
Vazão (mL/min)	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Acetonitrila (%)	0	1	2	3	4
Temperatura (°C)	25	30	35	40	45

Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória para a estimativa do erro experimental, sendo realizadas seis replicatas verdadeiras no ponto central. As soluções padrão utilizadas na realização do experimento foram preparadas em água.

A separação cromatográfica dos cinco compostos se deu por meio de uma eluição por gradiente que se iniciava com a porcentagem de acetonitrila indicada na tabela 1 e era mantida por 3 minutos, alterando-se bruscamente para 14% de acetonitrila, mantida por dois minutos, e finalmente alterando-se para 30% de acetonitrila, prosseguindo a corrida por mais 2 minutos. Ao final a condição inicial era restabelecida e mantida por 0,5 minutos, para que houvesse o equilíbrio para a próxima corrida. Antes de cada experimento a coluna foi condicionada por 15 minutos e em cada condição foram feitas três injeções.

O volume de injeção foi de 2 μ L (looping de 10 μ L) e o modo de preenchimento do looping foi “parcial loop needle overfill”. A limpeza da agulha foi feita com 200 μ L de solvente forte (acetonitrila) seguido de 600 μ L de solvente fraco (água).

A solução tampão utilizada foi preparada na concentração de 5 mM de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e seu pH foi ajustado em pHmetro (Bel Engineering W38) utilizando-se soluções de hidróxido de sódio e ácido orto-fosfórico 10% (v:v) para o pH desejado.

O sistema foi acoplado ao detector de arranjo de diodos Acquity (Waters) modelo UPD e série: G08UPD 124M, com capacidade para leitura em comprimentos de onda de 190 a 500 nm, resolução de 1,2 nm e faixa de amostragem de 20 pontos por segundo. 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). Constante de tempo de filtro: normal, tempo de exposição: automático. A aquisição de dados foi conduzida pelo software Empower pro (Waters).

Deslocamento

A partir dos efeitos observados no primeiro planejamento fatorial foi realizado um segundo planejamento experimental 2^2 com três replicatas verdadeiras no ponto central, resultando em 11 experimentos executados em ordem aleatória. A coluna foi condicionada entre cada experimento como no primeiro planejamento. Em cada condição foram feitas duas injeções de amostra de chá pronto para consumo adicionado de padrão, dessa forma foi possível observar os efeitos da matriz. Foram estudados, como indicado na Tabela 2, os parâmetros: pH da fase móvel e temperatura da coluna.

TABELA 2: níveis experimentais para o planejamento composto central 2².

Variáveis	Níveis codificados e decodificados				
	-1,41	-1	0	1	1,41
pH	3	3,7	5,5	7,3	8
Temperatura (°C)	30	34,4	45	55,6	60

A separação foi realizada com fase móvel binária, sob vazão de 0,4 mL/min, constituída de tampão fosfato de sódio monobásico 5 mM/ácido orto-fosfórico ou hidróxido de sódio e solvente (A) e acetonitrila (B). O gradiente foi conduzido da seguinte forma: 100% de A por 5 minutos, 14% de B por 2 minutos, 25% de B por 3 minutos. A condição inicial foi então restabelecida e o acondicionamento da coluna foi feito por 1 minuto entre cada corrida. Antes de cada experimento a coluna foi condicionada por 15 minutos. O modo de injeção, preparo da fase móvel e parâmetros de detecção seguiram-se da mesma forma que para o primeiro planejamento realizado.

Tratamento de dados para a otimização simultânea das respostas

A partir dos resultados obtidos foi calculada a média aritmética. As integrações dos picos dos padrões foram efetuadas apenas para o comprimento de onda 201 nm para o primeiro planejamento, comprimento em que os cinco picos podem ser visualizados. Já para o segundo planejamento os picos foram integrados nos três comprimentos de onda (192 nm, 201 nm e 227 nm), pois para cada composto havia um ótimo de absorção e diferentes interferentes. Utilizando-se os resultados obtidos nos planejamentos experimentais e empregando-se o programa estatístico Design Expert 6.0.10 (Minneapolis, EUA), foi realizado o processo de otimização.

Para o primeiro planejamento foram analisadas sete respostas: resolução entre os pares de compostos que coeluíam em pelo menos uma das condições estudadas (acesulfame e sacarina, sacarina e ciclamato) e a largura das bases dos picos dos cinco analitos (acesulfame, sacarina, ciclamato, aspartame, neotame).

A resolução foi calculada da seguinte maneira:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1}$$

Onde, R_s representa o valor da resolução, t_1 e t_2 representam o tempo de retenção de cada composto do par analisado e w_1 e w_2 representam a largura da base de cada composto (COLLINS, 2006).

Os modelos foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) ao nível de confiança de 95% e as condições ótimas para separação dos cinco picos e a obtenção da mínima largura das bases dos picos foram otimizadas por meio da função de desejabilidade de Derringer-Suich (BREITKREITZ et al., 2009; BALLUS et al., 2010).

A função de desejabilidade foi definida para minimizar a base dos picos dos cinco analitos e maximizar as resoluções entre os dois pares de picos. Para a minimização das bases dos picos foi utilizada a seguinte fórmula:

$$d_i = 1 \quad \text{se } b_i < b_{des} \quad (0)$$

$$d_i = \left(\frac{b_i - b_i^{max}}{b_{des} - b_i^{max}} \right) \quad \text{se } b_i^{max} \leq b_i \leq b_{des}. \quad (1)$$

$$d_i = 0 \quad \text{se } b_i > b_i^{max} \quad (2)$$

Onde: d_i = desejabilidade i entre 0 e 1

b_i = valor previsto pelo modelo estatístico para as i base do pico

b_{des} = valores desejados para a base do pico

b_i^{max} = valor máximo para a base do pico

Para a maximização das resoluções foi utilizada a seguinte fórmula:

$$d_i = 0 \quad \text{se} \quad R_i < R_i^{\min} \quad (3)$$

$$d_i = \left(\frac{R_i - R_i^{\min}}{R_{des} - R_i^{\min}} \right) \quad \text{se} \quad R_i^{\min} \leq R_i \leq R_{des}. \quad (4)$$

$$d_i = 1 \quad \text{se} \quad R_i > R_{des}. \quad (5)$$

Onde: d_i = desejabilidade i entre 0 e 1

R_i = valor previsto pelo modelo estatístico para as i resoluções

R_{des} = valores desejados para a resolução

R_i^{\min} = valor mínimo para a resolução

Determinou-se a minimização da largura da base dos picos. Os valores desejados para as bases dos picos (b_{des}) foram analisados individualmente e fixados como o menor valor possível obtido, podendo esse ser determinado fora da região experimental explicada no modelo estatístico usado.

Determinou-se a maximização das resoluções entre os dois pares de picos. O valor desejado para a resolução (R_{des}) foi analisado individualmente e fixado como o maior valor possível obtido para as resoluções dos dois pares de picos, podendo essas serem determinadas fora da região experimental observada no modelo estatístico usado.

Mesmo conhecendo-se o fato de que o modelo funcionaria bem apenas para a região experimental, não podendo prever adequadamente condições fora desta região, foi assumido o risco para constatar se haveria um melhor resultado, que seria analisado na prática.

Para o segundo planejamento foram analisadas treze respostas, baseadas na resolução entre os pares de compostos que coeluíam em pelo menos uma das condições experimentais: resolução entre sacarina e ciclamato medida no comprimento de onda de 192 nm e de 201 nm, resolução entre interferente 1 (I1) e

sacarina, entre interferente 2 (I2) e sacarina, entre interferente 3 (I3) e sacarina, entre interferente 4 (I4) e sacarina, entre sacarina e interferente 4 (I4), entre interferente 5 (I5) e sacarina, entre sacarina e interferente 5 (I5), entre acessulfame-K e interferente 4, entre acessulfame-K e interferente 5, entre acessulfame e interferente 1 e entre interferente 1 e acessulfame. Seu objetivo foi obter a separação completa entre os edulcorantes e seus interferentes.

A resolução foi calculada como descrito anteriormente.

Os modelos foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) ao nível de confiança de 95% e as condições ótimas para separação dos cinco picos foram determinadas pela utilização da função de desejabilidade Derringer-Suich.

A função de desejabilidade foi definida para maximizar a resolução entre os picos dos analitos e seus interferentes.

VALIDAÇÃO

Os parâmetros utilizados para a validação foram: linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação.

A curva de calibração foi construída na matriz geléia, estabelecendo-se a correlação entre as áreas dos analitos e suas concentrações. Para o acessulfame-K foram preparados doze níveis de concentração de 0,06 a 5,48 $\mu\text{g/mL}$, para a sacarina foram preparados nove níveis de concentração de 0,11 a 5,83 $\mu\text{g/mL}$, para o ciclamato foram preparados nove níveis de concentração de 1,95 a 32,16 $\mu\text{g/mL}$, para o aspartame foram preparados também nove níveis de concentração de 0,05 a 9,92 $\mu\text{g/mL}$ e para o neotame foram preparados sete níveis de concentração de 0,3 a 2,12 $\mu\text{g/mL}$. A análise foi feita em triplicata verdadeira, isto é, triplicata de preparação de cada solução e não apenas de injeção.

Simultaneamente foram determinados os limites de detecção e quantificação dos cinco edulcorantes. O limite de detecção foi determinado como 3 vezes a

amplitude do ruído e o limite de quantificação foi determinado como 2 vezes a amplitude no limite de detecção.

A Repetibilidade foi medida no mesmo dia e entre dias. As amostras foram analisadas por dez vezes consecutivas com a adição de padrão em um nível de concentração (1,79 µg/mL de acessulfame-K, 2,02 µg/mL de sacarina, 10,07 µg/mL de ciclamato, 4,30 µg/mL de aspartame e 1,20 µg/mL de neotame). Uma semana depois foram repetidas três injeções e três dias depois foram repetidas novamente três injeções.

A recuperação foi feita com a adição de dois níveis de concentração de solução padrão às diferentes amostras analisadas no início de seu preparo. As concentrações para cada nível de cada edulcorante encontram-se no Tabela 14.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiro Planejamento

A Tabela 3 contém os resultados para as sete respostas analisadas em cada um dos experimentos realizados, bem como os valores experimentais codificados do delineamento composto central.

TABELA 3: Resultados obtidos no planejamento 1.

Variáveis e Níveis ^a				Resolução (Rs)		Largura da base dos picos				
pH	Vazão	ACN	T	Ace-Sac	Cic-Sac	Ace	Sac	Cic	Asp	Neo
- 1	- 1	- 1	- 1	6,68	0,22	11,20	11,15	47,12	7,00	9,25
+ 1	- 1	- 1	- 1	6,56	0,24	11,20	11,53	45,30	8,23	10,28
- 1	+ 1	- 1	- 1	6,19	0,29	8,50	7,47	34,83	5,07	6,18
+ 1	+ 1	- 1	- 1	6,56	0,34	7,32	7,63	32,37	5,63	7,72
- 1	- 1	+ 1	- 1	3,60	0,38	11,75	10,20	37,63	8,52	10,82
+ 1	- 1	+ 1	- 1	3,54	0,43	11,83	10,48	32,75	7,85	10,82
- 1	+ 1	+ 1	- 1	3,27	0,45	8,08	7,77	25,38	4,60	6,70
+ 1	+ 1	+ 1	- 1	3,48	0,45	6,95	7,77	27,00	4,88	7,20
- 1	- 1	- 1	+ 1	4,98	0,69	10,78	13,75	45,70	6,75	9,70
+ 1	- 1	- 1	+ 1	4,38	0,65	13,30	15,02	47,27	7,62	10,13
- 1	+ 1	- 1	+ 1	4,44	0,77	7,88	9,82	30,68	4,63	7,27
+ 1	+ 1	- 1	+ 1	4,36	0,79	7,58	10,58	29,33	4,70	6,93
- 1	- 1	+ 1	+ 1	2,95	0,84	10,63	11,03	31,50	6,48	10,23
+ 1	- 1	+ 1	+ 1	2,60	0,82	12,27	11,80	32,22	6,45	10,48
- 1	+ 1	+ 1	+ 1	2,44	0,79	7,70	9,42	22,12	4,77	7,33
+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	2,47	0,81	7,50	9,28	22,43	4,83	7,30
0	0	0	0	3,46	0,58	10,10	11,85	29,88	6,10	8,32
0	0	0	0	3,52	0,55	10,13	11,53	33,03	6,33	8,55
0	0	0	0	3,64	0,54	9,53	11,55	33,48	6,47	8,35
0	0	0	0	3,54	0,54	9,97	11,77	33,45	6,32	9,12
0	0	0	0	3,76	0,49	9,45	11,08	36,53	5,93	8,10
0	0	0	0	3,64	0,59	9,93	10,95	30,25	6,38	8,28
-2	0	0	0	3,89	0,51	10,15	11,58	34,62	5,62	7,97
2	0	0	0	3,83	0,69	9,03	12,00	31,02	6,58	8,75
0	-2	0	0	4,03	0,52	14,65	17,07	50,22	9,18	12,52
0	2	0	0	3,39	0,57	6,75	9,07	23,82	4,37	6,63
0	0	-2	0	7,38	0,33	11,05	11,08	48,60	5,95	7,82
0	0	2	0	2,24	0,68	10,17	8,70	23,47	5,78	7,92
0	0	0	-2	6,23	0,10	8,95	5,25	32,97	6,90	9,65
0	0	0	2	3,07	0,92	10,18	9,60	32,12	5,12	8,25

a: Níveis experimentais codificados.

ACN: acetonitrila, T: temperatura, Ace: acessulfame, Sac: sacarina, Cic: ciclamato, Asp: aspartame, Neo: neotame

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da análise de variância (ANOVA) bem como a significância da regressão e do ajuste dos modelos utilizados empregando as resoluções e as bases dos picos como resposta. Foram apresentados os modelos com melhor ajuste dentre os modelos estudados (quadrático, linear e 2FI).

TABELA 4: Coeficientes dos modelos e seus erros padrão para as respostas analisadas no planejamento 1.

Respostas	Modelo	Regressão		Falta de ajuste	
		MQ_R/MQ_r	$F_{14,15,95\%}$	MQ_{fa}/MQ_{ep}	$F_{10,5,95\%}$
Res Ace-Sac	Quadrático	423,99	2,48	0,76	4,74
Res Sac-Cic	Linear	137,34		1,78	
Larg base Cic	Linear	71,03		0,98	
Larg base Sac	Quadrático	69,2		1,30	
Larg base Ace	2FI	30,98		<u>4,79^a</u>	
Larg base Asp	Linear	59,3		<u>5,13^a</u>	
Larg base Neo	Quadrático	28,25		1,39	

MQ_R : média dos quadrados da regressão; MQ_r : média dos quadrados do resíduo; MQ_{fa} : média dos quadrados da falta de ajuste; MQ_{ep} : média dos quadrados do erro puro; Res: resolução, Larg base: largura da base dos picos, Ace: acessulfame, Sac: sacarina, Cic: ciclamato, Asp: aspartame, Neo: neotame. (a) Valores para os quais houve falta de ajuste. 2FI: modelo composto que agrega apenas alguns coeficientes do modelo quadrático.

Das sete respostas analisadas, duas apresentaram falta de ajuste do modelo com 95% de confiança, as larguras das bases do acessulfame e do aspartame. Quando os modelos utilizados para a otimização dos algoritmos apresentam falta de ajuste, a função de desejabilidade de Derringer e Suich pode não estimar

corretamente a condição ótima. Todavia, ainda assim pode-se dizer que a falta de ajuste foi pequena, pois os valores de F foram bem próximos aos críticos e observando-se os gráficos de resíduos x valores preditos, constata-se que estes são aleatórios, como observado nas Figuras 1 e 2. Além disso, as regressões foram significativas já que seus valores de F calculados (média dos quadrados da regressão/ média dos quadrados do resíduo) são pelo menos 10 vezes maior que os valores críticos ($F_{14,15, 95\%}$). Por isso, todos os sete modelos foram utilizados para a predição da melhor condição pelo programa estatístico.

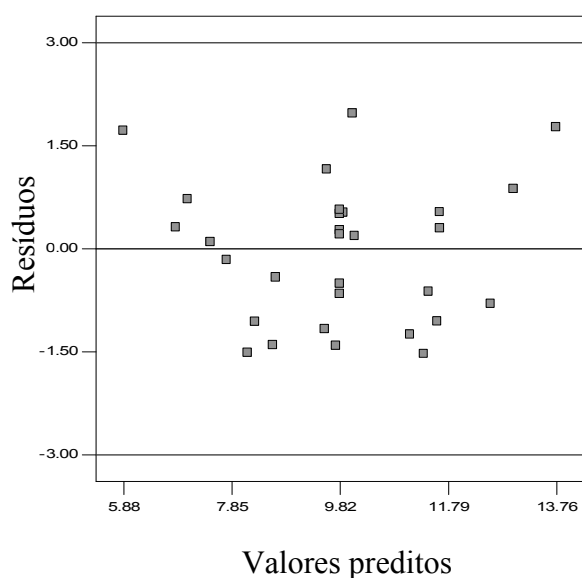


FIGURA 1: Gráfico de resíduos para a resposta “largura da base do acessulfame”.

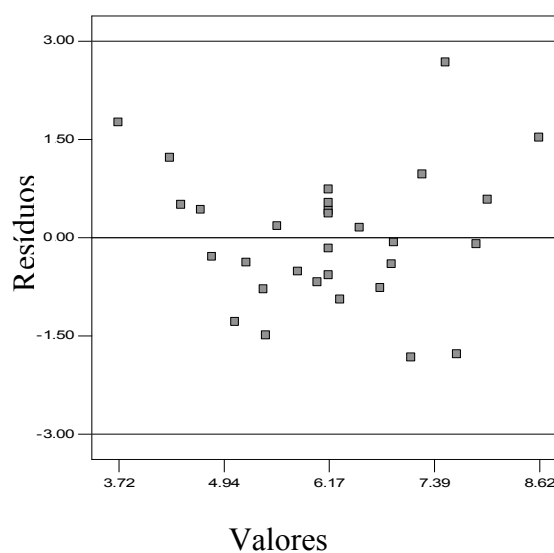


FIGURA 2: Gráfico de resíduos para a resposta “largura da base do aspartame”.

A Tabela 5 contém os coeficientes dos modelos e seus erros padrão para as respostas analisadas. Analisando os efeitos das variáveis, observa-se que para o pH aqueles mais significativos foram a resolução entre a sacarina e o ciclamato e o aumentos da largura das bases da sacarina, do aspartame e do neotame. O pH não exerce influência significativa na separação do acessulfame e da sacarina e na largura da base do ciclamato.

A vazão exerce maior influência na diminuição da largura de base do ciclamato, que dos demais compostos, provavelmente devido ao menor tempo de interação daquele com a fase estacionária quando se aplica uma vazão maior, diminuindo significativamente sua dispersão e causando diminuição de sua cauda posterior. A vazão influencia ainda negativamente na resolução entre acessulfame e sacarina, possivelmente devido também ao baixo tempo de interação em vazões maiores.

Por outro lado o efeito da interação entre o aumento da vazão e o aumento do pH resultou na melhora da separação entre acessulfame e sacarina. No entanto essa interação não foi significativa na diminuição da largura da base do ciclamato.

A concentração de aditivo (acetonitrila) na fase móvel influencia na diminuição da largura da base do ciclamato quase tanto quanto a vazão. Quando se aumenta a concentração de acetonitrila, conseqüentemente a força cromatográfica da fase móvel aumenta, causando a menor interação dos analitos com a fase estacionária, os quais são arrastados pela fase móvel. Tal característica pode ter provavelmente causado a diminuição da largura da base do ciclamato, bem como da sacarina e ainda a diminuição da resolução entre acessulfame e sacarina. A melhora da resolução entre sacarina e ciclamato pode ter sido provocada pela melhor definição de seus picos dada à diminuição da suas bases.

A temperatura da coluna foi mais significativa para a resolução entre acessulfame e sacarina, causando um efeito negativo, isto é, a diminuição da resolução. Para a resolução entre a sacarina e o ciclamato o efeito observado foi a melhora da resolução. Houve ainda influencia negativamente para a largura da base do aspartame, já a largura da base da sacarina sofreu um aumento. O aumento da temperatura ocasiona a diminuição da densidade da fase móvel tornando-a mais fluida e diminuindo a pressão do sistema o que facilita o fluxo dos analitos na extensão da coluna.

TABELA 5: Coeficientes dos modelos e seus erros padrão para as respostas analisadas no planejamento 1.

Respostas	Coeficientes (erro padrão) ^(a)														
	Intercepto	A (pH)	B (vazão)	C (ACN)	D (T)	A ²	B ²	C ²	D ²	AB	AC	AD	BC	BD	CD
Res Ace-Sac	3,59 (0,04)	-0,03 (0,02)	-0,14 ^(b) (0,02)	-1,25 ^(b) (0,02)	-0,73 ^(b) (0,02)	0,07 ^(b) (0,02)	0,03 (0,02)	0,31 ^(b) (0,02)	0,27 ^(b) (0,02)	0,10 ^(b) (0,02)	0,02 (0,02)	-0,09 ^(b) (0,02)	0,001 (0,02)	-0,02 (0,02)	0,28 ^(b) (0,02)
Res Sac-Cic	0,55 (0,01)	0,02 ^(b) (0,01)	0,02 ^(b) (0,01)	0,07 ^(b) (0,01)	0,21 ^(b) (0,01)	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Larg base Cic	33,90 (0,44)	-0,56 (0,49)	-6,17 ^(b) (0,49)	-5,49 ^(b) (0,49)	-0,95 (0,49)	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Larg base Sac	11,46 (0,16)	0,18 ^(b) (0,08)	-1,72 ^(b) (0,08)	-0,58 ^(b) (0,08)	1,06 ^(b) (0,08)	0,04 (0,08)	0,36 ^(b) (0,08)	-0,43* (0,08)	-1,05 ^(b) (0,08)	-0,12 (0,10)	-0,10 (0,10)	0,12 (0,10)	0,42 ^(b) (0,10)	0,02 (0,10)	-0,38 ^(b) (0,10)
Larg base Ace	9,82 (0,10)	-0,03 (0,12)	-1,97 ^(b) (0,12)	-0,12 (0,12)	0,14 (0,12)	**	**	**	**	-0,44 ^(b) (0,14)	-0,04 (0,14)	0,37 ^(b) (0,14)	-0,07 (0,14)	-0,07 (0,14)	-0,12 (0,14)
Larg base Asp	6,17 (0,08)	0,18 ^(b) (0,08)	-1,23 ^(b) (0,08)	-0,07 (0,08)	-0,38 ^(b) (0,08)	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Larg base Neo	8,45 (0,16)	0,21 ^(b) (0,08)	-1,54 ^(b) (0,08)	0,15 (0,08)	-0,10 (0,08)	-0,03 (0,07)	0,27 ^(b) (0,08)	-0,15 (0,08)	0,12 (0,08)	-0,003 (0,10)	-0,12 (0,10)	-0,17 (0,10)	-0,16 (0,10)	0,10 (0,10)	-0,05 (0,10)

Res: resolução, Larg base: largura da base do pico, Ace: acessulfame, Sac: sacarina, Cic: ciclamato, Asp: aspartame, Neo: neotame; ACN: acetonitrila, T: temperatura.

(a) A 95% de confiança. (b) Influencia significativa da variável. (**) Coeficientes que não expressam o modelo que melhor explica a condição.

Após a aplicação da função de Derringer e Suich, os algoritmos previram quatro condições analíticas que atenderam as desejabilidades. A Tabela 6 mostra os critérios estabelecidos para a obtenção das condições otimizadas e a condição ótima prevista pelos modelos.

As quatro condições foram testadas experimentalmente e foi escolhida a quarta condição, pois esta apresentava respostas mais próximas às desejáveis para a metodologia, como pode ser visto na Tabela 6. A vazão da fase móvel foi arredondada para 0,6 mL/min, pois a bomba não apresentaria tanta precisão para a variação de 0,01 mL/min e a alteração não prejudicou o perfil cromatográfico.

Não foi utilizada a desejabilidade das resoluções obtidas para cada uma das soluções dadas pelo programa, pois foram sugeridas poucas soluções e optou-se por testá-las e observar na prática seu comportamento. Caso muitas soluções fossem dadas, a escolha teria sido realizada com base na facilidade de execução do método e/ou preservação da coluna, optando-se por um método que oferecesse menos risco à coluna e ao sistema a longo prazo.

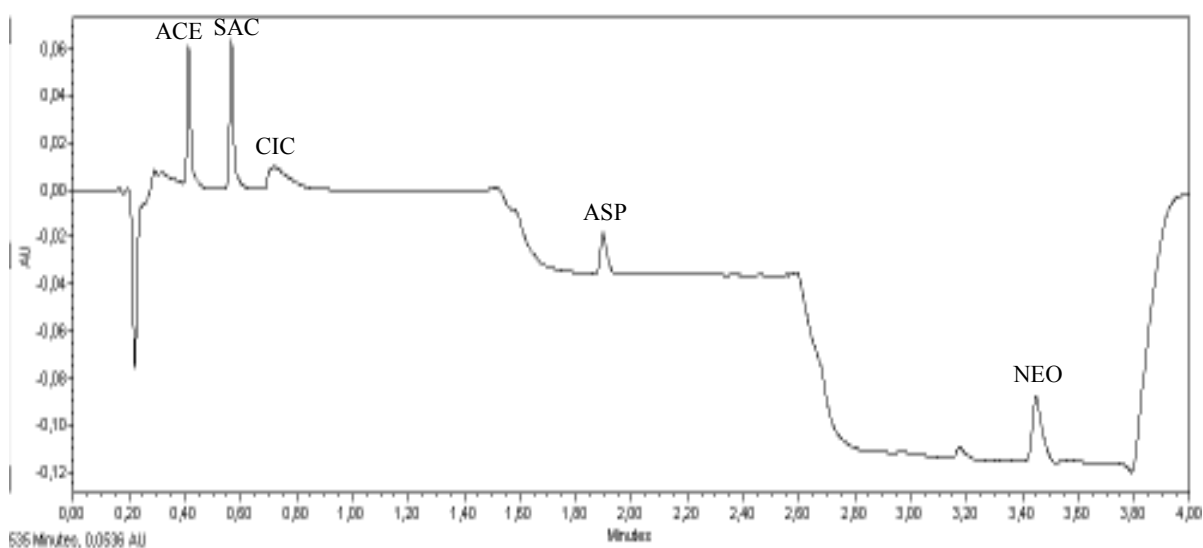
TABELA 6: Condições de desejabilidade e respostas observadas experimentalmente.

Variáveis e respostas	Critérios e desejabilidade para as variáveis e respostas				Condições previstas (decodificadas)				Respostas observadas			
	Meta	Limite mínimo	Limite máximo	Importância	1	2	3	4	1	2	3	4
pH	Entre	-2	2	3	6,77	6,8	6,9	7,0				
Vazão (mL/min)	Entre	-2	1	3	0,591	0,6	0,6	0,596				
Acetonitrila (%)	Entre	-2	4	3	6,92	4	4	6				
Temperatura (°C)	Entre	-2	2	3	30	45	40	40				
Res Ace-Sac	Maximizar	3	5	2					1,59	2,14	2,49	1,81
Res Sac-Cic	Maximizar	1	5	3					0,77	1,16	1,17	1,17
Larg base Cic	Minimizar	5	15	3					5,60	5,45	6,00	4,85
Larg base Sac	Minimizar	5	10	1					5,95	7,90	6,95	5,65
Larg base Ace	Minimizar	6	10	1					11,90	15,25	14,35	10,40
Larg base Asp	Minimizar	4	7	1					*	4,15	4,45	6,20
Larg base Neo	Minimizar	6	10	1					8,5	10,2	7,65	6,95

Res: resolução, Larg base: largura da base do pico

* O pico desapareceu do cromatograma.

A condição selecionada consistiu em uma eluição por gradiente, tendo como fase móvel a mistura de acetonitrila e solução tampão fosfato de sódio monobásico/hidróxido de sódio (pH 7,0) com início em 6% de acetonitrila, temperatura de coluna 40°C e vazão de 0,6 mL/min, utilizando-se coluna Hypersil Gold Thermo (50 x 2,1 mm x 1,9 µm). O cromatograma obtido a partir de sua aplicação a soluções padrão pode ser observado na Figura 3.

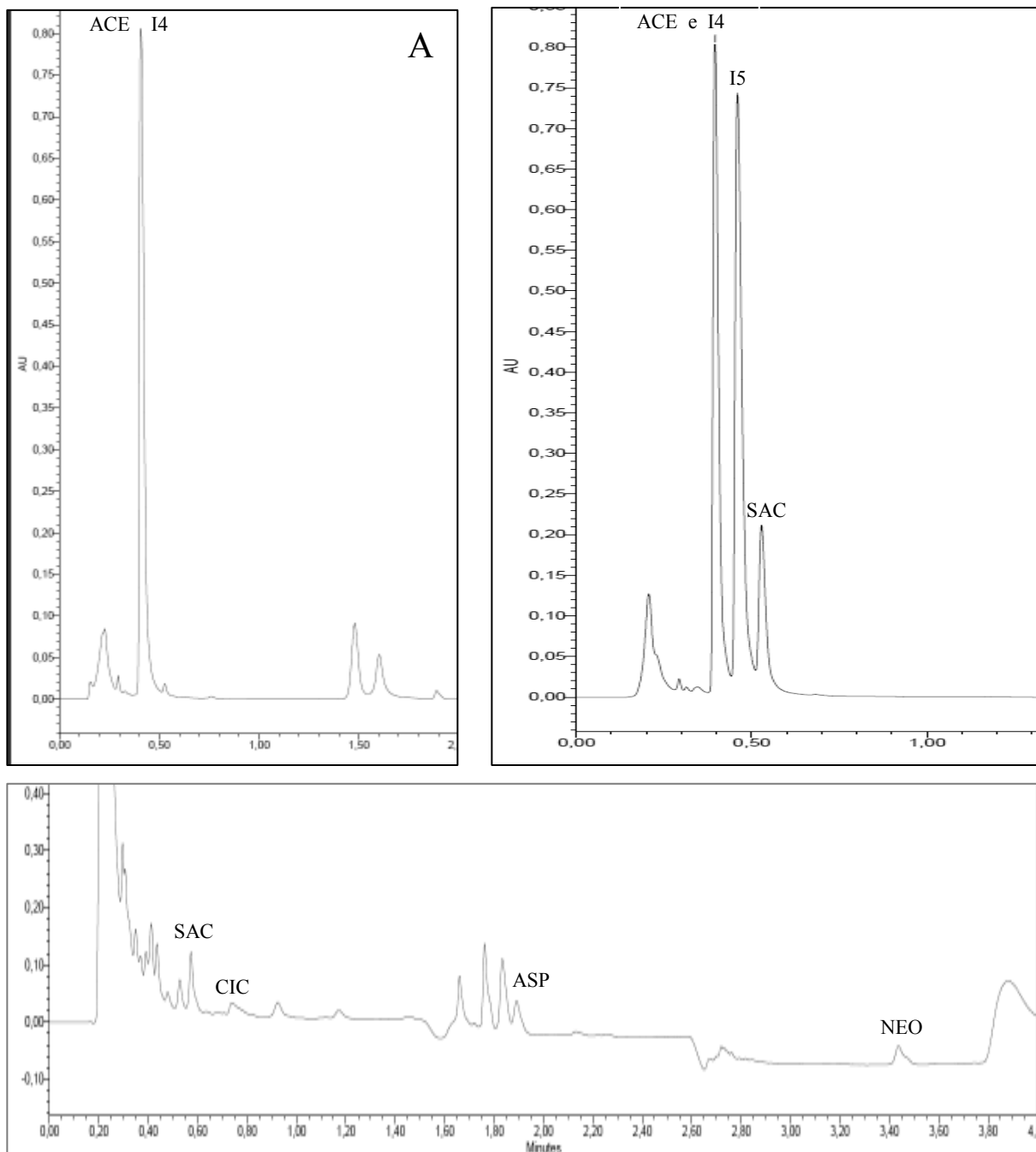


(ACE) acessulfame, (SAC) sacarina, (CIC) ciclamato, (ASP) aspartame, (NEO) neotame

FIGURA 3: Cromatograma originado da aplicação do método selecionado para separação de padrões.

No entanto, quando esta condição foi aplicada a amostras constatou-se que a matriz continha vários interferentes que coeluíam com os analitos de interesse, como pode ser observado na Figura 4. A constatação da presença de dois compostos representados em um mesmo pico, isto é, a coeluição desses, foi feita observando-se o espectro em diferentes pontos do pico.

Optou-se, então, por realizar um novo planejamento diretamente em amostra utilizando-se um número menor de variáveis.



(ACE) acessulfame, (I4) interferente 4, (I5) interferente 5; (SAC) sacarina, (CIC) ciclamato, (ASP) aspartame, (NEO) neotame.

FIGURA 4: Cromatogramas de refrigerante tipo cola obtido em comprimento de onda de 227nm (A), chá preto pronto para consumo obtido em comprimento de onda de 201nm (B) e néctar de pêssgo obtido em comprimento de onda de 192nm (C).

Para o segundo planejamento optou-se por manter fixas as variáveis porcentagem inicial de acetonitrila e vazão nos níveis 0% e 0,4 mL/min, respectivamente, determinados por meio de teste em amostras. Foi feita ainda a opção de iniciar a separação com a menor porcentagem estudada para acetonitrila, pois apesar de níveis maiores, como os utilizados no ponto central e máximo, reduzirem a dispersão dos analitos, a elevada força cromatográfica da fase móvel em níveis maiores reduziria o tempo de interação dos mesmos com a fase estacionária, dificultando a separação.

Também as vazões maiores diminuíaam o tempo de interação dos analitos com a coluna o que reduzia a separação.

Segundo planejamento

A Tabela 9 contém os resultados para as treze respostas analisadas para cada um dos experimentos realizados, bem como as condições experimentais codificadas do delineamento composto central.

TABELA 9: Respostas do planejamento composto central.

Variáveis e Níveis ^a		Resolução (Rs)												
pH	T	Sac-Cic 192nm	Sac-Cic 201nm	I1-Sac	I2-Sac	I3-Sac	I4-Sac	Sac-I4	I5-Sac	Sac-I5	Ace-I4	Ace-I5	Ace-I1	I1-ace
-1	-1	1,91	1,74	8,18	4,44	4,14	-16,73	16,73	-17,04	17,04	34,59	34,64	1,22	-1,22
1	-1	1,97	1,95	10,84	3,50	1,80	5,56	-5,56	4,55	-4,55	0,00	1,46	-1,15	1,15
-1	1	3,44	2,98	3,33	1,61	1,15	-10,86	10,86	-13,03	13,03	22,38	25,80	0,98	-0,98
1	1	5,02	4,06	6,52	1,61	0,68	3,38	-3,38	1,95	-1,95	0,55	2,06	-2,10	2,10
-1,41	0	2,88	2,81	0,98	3,56	2,79	-14,03	14,03	-15,41	15,41	26,03	20,68	5,84	-5,84
1,41	0	3,18	2,86	7,41	1,83	1,04	4,25	-4,25	2,84	-2,84	0,28	2,12	-4,50	4,50
0	-1,41	0,85	0,81	10,66	3,83	1,50	1,68	-1,68	-0,04	0,04	4,49	15,38	-1,00	1,00
0	1,41	2,74	5,97	15,43	2,38	-0,52	-0,52	0,52	-8,52	8,52	4,22	9,17	0,01	-0,01
0	0	2,81	2,75	8,24	2,27	0,00	0,27	-0,27	-13,49	13,49	4,46	13,86	-1,35	1,35
0	0	2,93	2,76	8,11	2,27	0,00	0,27	-0,27	-11,03	11,03	4,94	12,43	-1,53	1,53
0	0	2,69	2,93	9,38	2,13	0,00	0,37	-0,37	-14,21	14,21	5,26	17,66	-1,70	1,70

(a) Níveis experimentais codificados; Sac = sacarina, Cic = ciclamato, I1 = interferente 1; I2= interferente 2, I3 = interferente 3, I4 = interferente 4, I5 = interferente 5 e Ace = acessulfame; T= temperatura

Pode-se observar na Tabela 10 os coeficientes para os modelos, bem como seus erros padrão, e ainda um resumo dos resultados para a ANOVA, a significância da regressão e o ajuste dos modelos utilizados empregando as resoluções de pares de picos como resposta.

Observa-se nessa tabela que houve falta de ajuste para o modelo de diversas respostas. Houve ajuste do modelo apenas para as resoluções entre sacarina e interferente 5, entre interferente 5 e sacarina e entre acessulfame-K e interferente 5. Para realizar predições das condições ótimas foram primeiro analisados os modelos para cada resposta fornecida, aquelas com menor falta de ajuste ou sem falta de ajuste foram consideradas na análise. As respostas utilizadas foram as resoluções entre sacarina e ciclamato obtidas em cromatogramas em comprimento de onda de 192nm e 201nm, resoluções entre interferente 1 e sacarina, interferente 3 e sacarina, interferente 5 e sacarina, sacarina e interferente 5 e acessulfame e interferente 5. As resoluções entre acessulfame e interferente 1 e interferente 1 e acessulfame foram também consideradas, pois estas respostas não alteravam a predição quando adicionadas ao cálculo.

Tendo em vista os resultados experimentais para realizar a predição foi permitido o uso das variáveis temperatura e pH apenas nos níveis em que não fosse observada coeluição entre os pares de picos com falta de ajuste excessiva (interferente 2 e Sacarina, interferente 4 e sacarina, sacarina e interferente 4, acessulfame e interferente 4). Definiu-se então que, para a temperatura, os níveis utilizados seriam entre o ponto central e +1 e, para o pH, os níveis seriam entre o ponto central e o axial negativo (-1,41).

Os algoritmos previram duas condições analíticas que atenderam as desejabilidades. A Tabela 11 contém os critérios estabelecidos para a obtenção das condições otimizadas e a condição ótima prevista pelos modelos, bem como as respostas previstas. As duas condições foram avaliadas experimentalmente e suas respostas encontram-se na mesma tabela.

TABELA 10: Coeficientes dos modelos e seus erros padrão para as respostas analisadas.

Resolução	Modelo	Coeficientes ± erro padrão ^(a)						Regressão		Falta de ajuste	
		Intercepto	A - pH	B Temperatura	A.A	B.B	AB	MQ _R /MQ _r	F _{5, 5,95%}	MQ _{fá} /MQ _{ep}	F _{3,2, 95%}
Sac-Cic 192nm	Linear	2,8 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,9 ± 0,2 ^(d)	**	**	**	7,8	5,05	41,1 ^(c)	19,16
Sac-Cic 201nm	Linear	2,9 ± 0,2	0,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2 ^(d)	**	**	**	19,0		45,7 ^(c)	
I1-Sac	Quadrático	8,6 ± 1,6	1,9 ± 1,0	-0,3 ± 1,0	-2,5 ± 1,2	1,9 ± 1,2	0,1 ± 1,4	2,9 ^(b)		25,1 ^(c)	
I2-Sac	Linear	2,7 ± 0,2	-0,4 ± 0,2	-0,85 ± 0,2 ^(d)	**	**	**	11,73		198,3 ^(c)	
I3-Sac	Quadrático	0,0 ± 0,3	-0,7 ± 0,2 ^(d)	-0,9 ± 0,2 ^(d)	1,1 ± 0,2 ^(d)	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,3	13,8		(e)	
I4-Sac	Quadrático	0,3 ± 1,5	7,8 ± 0,9 ^(d)	0,1 ± 0,9	-3,2 ± 1,1 ^(d)	-0,5 ± 1,1	-2,0 ± 1,3	17,2		3584,1 ^(c)	
Sac-I4	Quadrático	-0,3 ± 1,5	-7,8 ± 0,9 ^(d)	-0,1 ± 0,9	3,2 ± 1,1 ^(d)	0,5 ± 1,1	2,0 ± 1,3	17,2		3584,1 ^(c)	
I5-Sac	Quadrático	-12,9 ± 1,7	7,8 ± 1,0 ^(d)	-1,3 ± 1,0	3,2 ± 1,2	4,2 ± 1,2 ^(d)	-1,7 ± 1,5	14,7		4,5	
Sac-I5	Quadrático	12,9 ± 1,7	-7,8 ± 1,0 ^(d)	1,3 ± 1,0	-3,2 ± 1,2	-4,2 ± 1,2 ^(d)	1,7 ± 1,5	14,7		4,5	
Ace-I4	Linear	9,8 ± 2,0	-11,6 ± 2,3 ^(d)	-1,5 ± 2,3	**	**	**	12,70		1109,0 ^(c)	
Ace-I5	Linear	14,1 ± 1,5	-10,4 ± 1,7 ^(d)	-2,1 ± 1,7	**	**	**	18,9		4,0	
Ace-I1	Linear	-0,5 ± 0,5	-2,5 ± 0,5 ^(d)	0,03 ± 0,5	**	**	**	11,4		100,6 ^(c)	
I1-Ace	Linear	0,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5 ^(d)	-0,03 ± 0,5	**	**	**	11,4		100,6 ^(c)	

MQ_R: média dos quadrados da regressão, MQ_r: média dos quadrados do resíduo, MQ_{fá}: média dos quadrados da falta de ajuste, MQ_{ep}: média dos quadrados do erro puro; Sac: sacarina, Cic: ciclamato, I1: interferente, I2: interferente 2, I3: interferente 3, I4: interferente 4, I5: interferente 5 e Ace: acessulfame. (a) A 95% de confiança. (b) modelos com regressão não significativa. (c) modelos com falta de ajuste. (d) Influencia significativa da variável. (e) Falta de ajuste não calculada devido a ausência de erro no ponto central (houve coeluição total nos três experimentos). (**) Coeficientes que não expressam o modelo que melhor explica a condição.

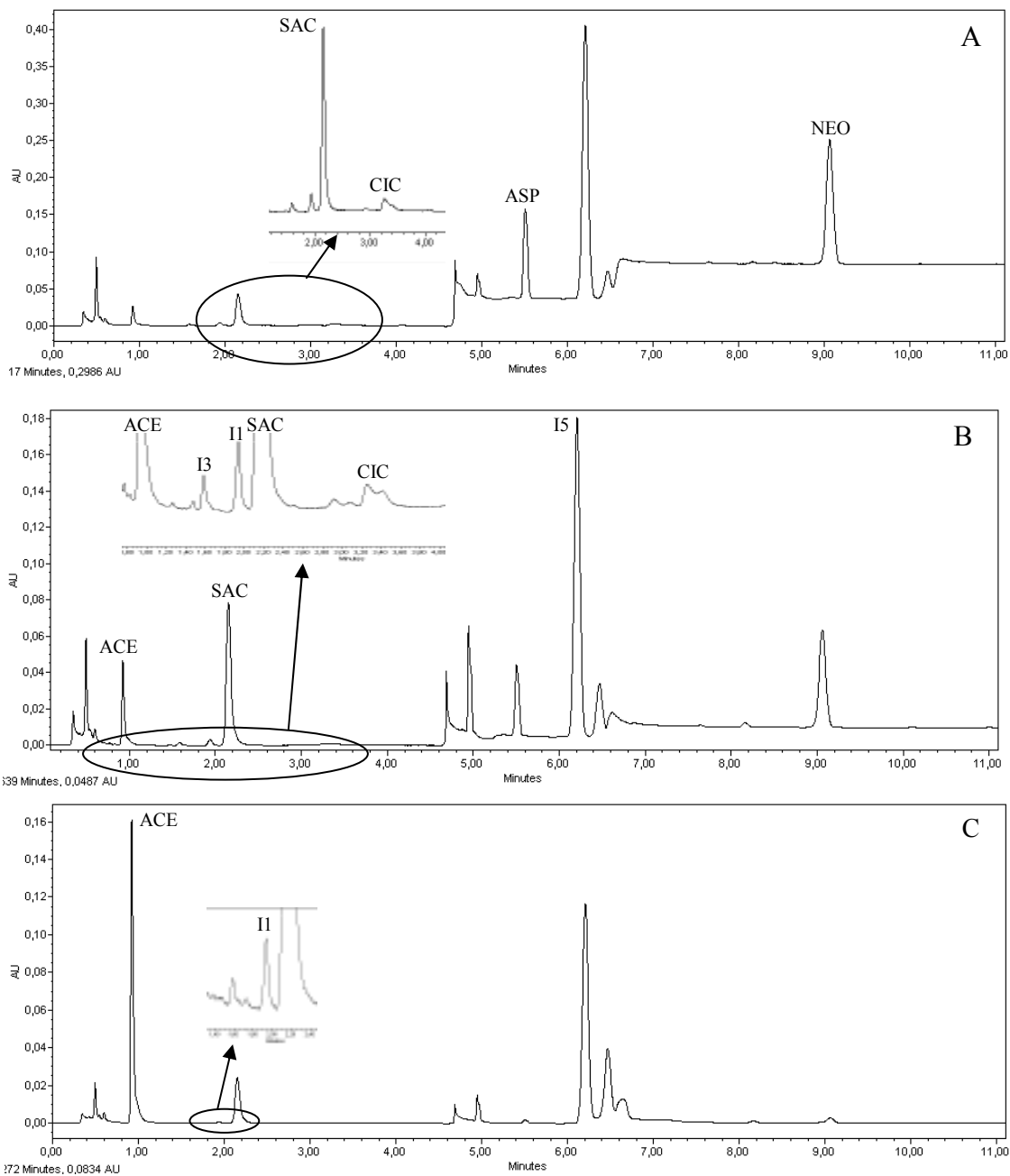
TABELA 11: Condições de desejabilidade, respostas previstas pelos modelos e respostas observadas experimentalmente.

Variáveis e respostas	Critérios e desejabilidade para as variáveis e respostas				Condições previstas (decodificada)		Respostas Previstas		Respostas observadas	
	Meta	Limite mínimo	Limite máximo	Importância	1	2	1	2	1	2
pH	Entre	-1,41	0	3	3,4	3				
Temperatura (°C)	Entre	0	1	3	45	55,6				
Res Sac-Cic 192nm	Maximizar	2	30	3			2,46	3,31	4,24	3,28
Res Sac-Cic 201nm	Maximizar	2	30	3			2,67	3,40	2,74	3,77
Res I1 – Sac	Maximizar	2	30	3			2,80	2,29	2,57	0,71
Res I3 – Sac	Maximizar	2	30	3			2,39	2,10	1,40	2,01
Res I5 – Sac	Minimizar	-30	2	3			-17,71	-12,45	-11,24	-11,03
Res Sac - I5	Maximizar	2	30	3			17,71	12,45	11,24	11,03
Res Ace - I5	Maximizar	2	30	3			26,43	26,65	18, 55	19,14
Res Ace – I1	Maximizar	2	30	3			2,49	3,09	1,40	3,51
Res I1 – Ace	Minimizar	-30	2	3			-2,49	-3,09	-1,40	-3,51

Res: resolução, Sac: sacarina, Cic: ciclamato, I1: interferente 1, I3: interferente 3, I5: interferente 5 e Ace: acessulfame

Como foram feitas apenas duas previsões, ambas foram testadas experimentalmente, pois não seria necessário um tempo longo e a escolha foi feita com base nos testes. Caso muitas soluções fossem dadas, a escolha teria sido realizada com base na facilidade de execução do método e/ou preservação da coluna, optando-se por um método que oferecesse menos risco à coluna e ao sistema em longo prazo. Os valores reais obtidos para as duas previsões encontram-se na Tabela 11. Pode-se observar que a maioria dos valores obtidos foi bastante próxima àqueles previstos pelo modelo estatístico, embora alguns modelos apresentassem falta de ajuste

Com base nesses valores e observando-se os cromatogramas optou-se pelo segundo método sugerido (destacado na Tabela 11). Para esse método o ciclamato de sódio ficou melhor resolvido enquanto que os outros quatro edulcorantes apresentaram-se de forma semelhante nos dois métodos. O ciclamato de sódio vem sendo um problema recorrente na separação dos edulcorantes neste estudo, pois apresenta um sinal analítico bastante baixo e por característica própria, tende a formar cauda posterior, como foi observado em todos os testes realizados. De fato, os resultados encontrados na literatura utilizam outros métodos de detecção, como o detector de massas (WASIK et al., 2007; YANG E CHEN, 2009), e utilizam ainda a co-cromatografia (LAWRENCE e CHARBONNEAU, 1988), entre outros artifícios, ou simplesmente não determinam esse edulcorante (DOSSI et al., 2006).



ACE: acessulfame; SAC: sacarina; CIC: ciclamato; ASP: aspartame; NEO: neotame, II: interferente 1; I3: interferente 3

FIGURA 5: Cromatogramas da condição ótima para a separação dos cinco edulcorantes em chá preto pronto para consumo, nos comprimentos de onda 192 nm (A), 201 nm (B) e 227 nm (C).

Validação

Linearidade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção e quantificação, bem como a faixa de linearidade, encontram-se na Tabela 12.

TABELA 12: Curvas de calibração, limite de detecção e quantificação para os cinco edulcorantes.

	Equação	R ²	Limite de detecção (µg/mL)	Limite de quantificação (µg/mL)
Acessulfame	$y = 66655x - 6445,1$	0,9965	0,008	0,021
Sacarina	$y = 225277x - 8707,5$	0,9974	0,011	0,022
Ciclamato	$y = 2052,3x - 2426,2$	0,9988	0,609	1,524
Aspartame	$y = 178854x - 5437,6$	0,9998	0,015	0,029
Neotame	$y = 108373x - 12384$	0,9475	0,178	0,446

Como a membrana de 0,025 µm utilizada para a filtração das amostras ora retém o neotame ora deixa que esse passe, esta membrana não deveria ser aplicada à metodologia quando se deseja determinar neotame. Quando da utilização da membrana, o primeiro “vial” filtrado apresenta recuperação para o neotame de aproximadamente 50%, no próximo a recuperação aumenta e no seguinte, aumenta ainda mais. O mesmo fenômeno não ocorre com os demais edulcorantes. Devido a este fato não foi possível construir uma curva aceitável para o neotame e não seria possível sua determinação em amostras. Como o neotame ainda não está presente em amostras comerciais, este não será um problema por enquanto para a análise de alimentos. No entanto, como o uso de neotame foi aprovado pela legislação brasileira em 2008 (BRASIL, 2008) o ideal seria desenvolver uma metodologia de preparo de amostras que permitisse analisá-lo.

Repetibilidade

Os resultados para a repetibilidade e a reprodutibilidade estão representados na Tabela 13.

TABELA 13: Repetibilidade entre dias e no mesmo dia

	Dia	Acessulfame	Sacarina	Ciclamato	Aspartame	Neotame
Mesmo dia (CV%)	1	0,198	0,183	1,815	0,111	0,910
	2	0,094	0,093	1,989	0,073	0,563
	3	0,108	0,053	0,828	0,016	0,532
Entre dias (CV%)		0,528	0,706	3,571	0,969	8,116

A baixa repetibilidade entre dias, observada para o neotame, é provavelmente um problema no preparo da solução teste, devido aos problemas com o preparo da amostra citados anteriormente. A mesma solução padrão preparada na matriz geléia foi filtrada em três diferentes “vials” e aqueles que seriam utilizados para a segunda e a terceira medidas foram congelados. Portanto, no caso do neotame, podem ter ocorrido problemas na filtragem.

Recuperação

As concentrações para cada nível de cada edulcorante adicionado às amostras encontram-se no Tabela 14, bem como as porcentagens de recuperação obtidas.

Devido ao problema observado em relação ao neotame durante o preparo de amostras, pode-se dizer que as recuperações observadas não são totalmente confiáveis, mesmo tendo apresentado níveis acima de 70% para os produtos analisados.

Foi observado que quando há cacau nas formulações não é possível detectar o ciclamato por este método devido ao aparecimento de um interferente em seu mesmo tempo de retenção. Este fato impossibilitou determinar a recuperação para o ciclamato de sódio no cappuccino e no achocolatado.

TABELA 14: Recuperação dos edulcorantes adicionados em diversas amostras

Amostra	Acessulfame		Sacarina		Ciclamato		Aspartame		Neotame	
	Níveis (µg/mL)	%	Níveis (µg/mL)	%	Níveis (µg/mL)	%	Níveis (µg/mL)	%	Níveis (µg/mL)	%
Chá pronto	6,06	99,3	5,40	102,5	30,44	98,8	15,21	100,4	5,07	96,8
	7,07	99,6	6,38	100,4	45,66	100,8	20,28	99,9	6,14	100,0
Refrigerante (Guaraná)	9,09	102,1	6,87	102,4	30,44	101,4	15,21	101,3	5,07	103,4
	10,1	102,20	7,86	101,8	70,01	101,7	20,28	101,1	6,14	103,9
Néctar	6,04	95,3	6,03	99,3	39,74	83,5	10,04	100,5	6,04	97,5
	7,06	96,1	6,97	99,0	49,93	86,3	17,07	99,4	6,01	100,5
Refresco em pó	6,05	101,8	1,14	102,1	10,19	105,2	22,09	101,4	4,85	96,8
	7,06	101,0	2,08	101,5	13,25	106,0	27,11	101,4	5,82	102,5
Pudim	6,05	96,1	4,99	95,2	29,55	97,8	6,02	92,1	1,94	95,2
	7,06	98,2	6,03	98,1	39,74	98,0	7,03	98,8	2,52	100,2
Achocolatado	6,05	97,7	4,99	102,1	29,55	ND	6,02	97,3	1,94	104,0
	7,06	97,0	6,03	99,4	39,74	ND	7,03	92,1	2,52	92,2
Cappuccino	5,04	92,2	1,98	97,2	7,11	ND	7,03	76,3	1,06	70,2
	7,05	94,3	3,02	97,8	8,13	ND	8,01	86,1	1,27	73,4
Gelatina	6,06	87,9	2,04	97,3	7,11	87,7	8,11	100,1	1,06	88,5
	8,08	90,0	3,06	96,7	8,13	104,4	10,14	100,5	1,27	73,9
Molho Barbecue	6,05	98,8	1,98	115,2	7,11	77,8	8,03	89,6	1,06	111,3
	8,06	99,6	3,02	108,7	8,13	73,9	10,04	105,9	1,27	113,5
Catchup	6,05	100,9	1,98	100,7	7,11	105,4	8,03	105,3	1,06	99,1
	8,06	101,2	3,02	101,2	8,13	103,3	10,04	103,2	1,27	99,2

(ND) não determinado devido à presença de interferente

O molho “barbecue” apresentou uma recuperação baixa (de 73,9 a 77,8%) em relação aos demais produtos. Para esse produto é necessária diluição de 50 vezes, devido a sua viscosidade, para que o produto passe pelo filtro de poro menor (0,025 μm). Neste caso provavelmente será necessário um melhor desenvolvimento da metodologia de preparo de amostra.

Ainda para o molho de barbecue observa-se que a recuperação para a sacarina foi de 115,2% para o nível mais baixo e 108,7% para o mais alto. No mesmo tempo de retenção da sacarina foi observada a presença de um interferente com sinal analítico baixo, o que pode ter causado a observação dos níveis de recuperação acima do normal. Pode ser constatado ainda que com o aumento da concentração de sacarina na amostra este interferente passa a ser menos significativo.

Observou-se que para o cappuccino a recuperação do aspartame foi de apenas 76,3% na menor concentração, o que pode ser devido à natureza da amostra (difícil de filtrar), necessitando portanto de uma maior atenção em um desenvolvimento de preparo de amostra para obter uma maior eficiência em sua quantificação.

Como o objetivo do trabalho foi desenvolver uma metodologia para a determinação de edulcorantes por UPLC e não o foco direto no preparo de amostras optou-se por utilizar a metodologia mais simples possível em seu preparo, no entanto foi observado que em alguns casos seriam necessários estudos mais profundos quanto ao preparo de amostras.

CONCLUSÃO

O delineamento composto central e a função de desejabilidade de Derringer-Suich foram utilizados para a otimização de um método de determinação de cinco edulcorantes por cromatografia líquida de ultra performance com detector de arranjo de diodos, resultando em metodologia com boa resolução entre os edulcorantes e seus interferentes. O uso da função de desejabilidade permitiu correlacionar várias

respostas para a obtenção da metodologia mais adequada, com a realização de poucos experimentos.

A condição selecionada consistiu em eluição por gradiente, tendo como fase móvel a mistura de acetonitrila e solução tampão fosfato de sódio monobásico/ácido orto-fosfórico (pH 3,0), vazão de 0,4mL/min e temperatura de coluna 56°C, utilizando-se coluna Hypersil Gold Thermo (50 x 2,1 mm x 1,9 µm).

Foram avaliadas a linearidade e a precisão, provando que o método desenvolvido é conveniente e efetivo para análise de rotina de edulcorantes em diferentes matrizes. No estudo de recuperação observou-se que para alimentos contendo cacau não é possível analisar o ciclamato de sódio devido à presença de um interferente não identificado, que se apresenta em grande quantidade nestes produtos. Observou-se ainda que o método de preparo de amostras é ineficiente para a análise do neotame.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BALLUS, C. A.; MEINHART, A. D.; BRUNS, R. E.; GODOY, H. T. Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis. **Talanta**, 11430, in press, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde. Portaria n. 540, de 27 de outubro de 1997. **Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares**. Diário Oficial da União, Brasília, 1997.

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.

BREITKREITZ, M.; JARDIM, I.; BRUNS, R. Combined column–mobile phase mixture statistical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1439–1449, 2009.

CANTARELLI, M. A.; PELLERANO, R. G.; MARCHEVSKY, E. J.; CAMIÑA, 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, p. 9345–9349, 2008.

CANTARELLI, M. A.; PELLERANO, R. G.; MARCHEVSKY, E. J.; CAMIÑA, 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, p. 1128–1132, 2009.

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, 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, 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, p. 57–64, 2001.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, editora UNICAMP, 2006, 453 p.

DEMIRALAY, E. Ç.; ÖZKAN, 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.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several responses variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

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.

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

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, 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, p. 233–237, 2006.

- LAWRENCE, J.; CHARBONEAU, C. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparation. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 71, n. 5, p. 934-937, 1988.
- LEWIS, G. A.; MATHIEU, D.; PHAN-TAN-LUU, R. **Pharmaceutical Experimental Design**. Nova York, Marcel Dekker, 1999, 501 p.
- 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, 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. Disponível em: <http://sciencelinks.jp/j-east/article/199917/000019991799A0632104.php>. Acesso em Abril de 2009.
- 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, p.1339-1345, 2009.
- 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 Obstetricia**, 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, 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, p. 187–196, 2007.

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.

ZECEVIC, M.; JOCIC, B.; ZIVANOVIC, L.; PROTIC, A. Application of Multicriteria Methodology in the Development of Improved RP-LC-DAD for Determination of Rizatriptan and Its Degradation Products. **Chromatographia**, v. 68, p. 911–918, 2008.

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, p. 143–146, 2005.

Determinação de cinco edulcorantes por UPLC-PDA em alimentos

Cíntia Botelho Dias, Helena Teixeira Godoy

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

Artigo a ser publicado da revista SBCTA

Determinação de cinco edulcorantes por UPLC-PDA em alimentos

Cíntia Botelho Dias¹, Helena Teixeira Godoy¹

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

RESUMO

A técnica de cromatografia líquida de ultra performance e detector de arranjo de diodos foi empregada na determinação de cinco edulcorantes (acesulfame, sacarina, ciclamato, aspartame e neotame) em dez tipos de amostras de alimentos e bebidas (refrigerantes, néctares e sucos, chás prontos para consumo, pós para preparo de refresco, pudim e cappuccino, achocolatado, geléia, molho “barbecue” e catchup). Foi utilizada coluna Hypersil Gold Thermo (50 x 2,1mm x 1,9µm). A fase móvel consistiu em uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato 5 mM/ácido ortofosfórico (pH 3,0) em eluição por gradiente. Foram encontradas amostras contendo até quatro edulcorantes em combinação. Dentre os mais utilizados estavam o acesulfame e o aspartame. Algumas das amostras apresentaram ainda concentrações acima das permitidas pela legislação brasileira e, dentro dos edulcorantes analisados, nenhuma das amostras apresentou edulcorantes que não foram declarados nos rótulos. O método apresentou uma limitação para alimentos contendo cacau em sua formulação quanto à identificação do ciclamato de sódio.

Palavras chave: edulcorantes, UPLC, diet e light

ABSTRACT

The ultra performance liquid chromatography technique associated to the photo diode array detector was applied in the determination of five artificial sweeteners (acesulfame, saccharin, cyclamate, aspartame and neotame) in soft

drinks, fruit juice beverages, teas ready to drink, powder juice, pudding, cappuccino and chocolate, jellies, barbecue sauce and ketchup. A Hypersil Gold Thermo (50 x 2.1mm x 1.9µm) column was used. The eluent consisted of acetonitrile and sodium phosphate 5 mM/ orto-phosphoric acid (pH 3.0) in gradient elution. Samples containing up to four distinct sweeteners in synergism have been found. Acesulfame and aspartame were the most widely used sweeteners among the analyzed samples. Although, non declared sweeteners have not been found among those studied, their quantities in some samples were above the allowed in the Brazilian regulation. However, a limitation was found on the products containing cocoa, in which it is not possible to identify the sodium cyclamate.

Key words: sweeteners, UPLC, diet and light

INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a saúde e o aumento da incidência dos casos de diabetes e da obesidade na população mundial, bem como de outras doenças causadas pelo excesso de peso, vem ampliando o mercado para os adoçantes de mesa e produtos diet e light. O uso destes produtos triplicou nas últimas décadas do século XX (NABORS, 2001; TORLONI et al., 2007).

O diabetes mellitus e a obesidade exigem a restrição definitiva ou prolongada da ingestão de sacarose e outros açúcares, o que determina a prescrição médica de edulcorante (TORLONI et al., 2007) e leva inúmeros indivíduos a buscarem alternativas para a substituição da sacarose e outros açúcares. Em 2004, a World Health Organisation (WHO) estimava que existissem 1,3 bilhões de pessoas acima do peso ou obesas em todo mundo (SLOAN, 2005) e, segundo o Ministério da saúde brasileiro, 40% de sua população apresentava excesso de peso (FERREIRA, 2006). Estudos indicavam, ainda, que 2,8% da população mundial fossem portadores de

diabetes em 2000 e que esse número aumentaria para 4,4% até 2030 (WILD et al., 2004)

A autorização do uso de edulcorantes no Brasil ocorre apenas depois de adequada avaliação toxicológica, que resulta na determinação de níveis seguros ao consumo, visto que algumas destas substâncias podem ter efeito tóxico em níveis muito elevados, mesmo que não haja ainda um consenso sobre tais efeitos. Segundo a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (BRASIL, 1997), o uso destes aditivos deve ser limitado a alimentos específicos, ao menor nível para alcançar o efeito desejado e sua presença deve vir declarada no rótulo. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação das quantidades de edulcorantes em alimentos e bebidas.

Diversos métodos vêm sendo empregados para a determinação de edulcorantes artificiais e dentre eles se destacam os métodos cromatográficos (VEERABHADRARAO, et al., 1986; LAWRENCE e CHARBONNEAL, 1988; DI PIETRA et al., 1990; THOMPSON et al., 1995a; THOMPSON et al., 1995b; CASALS et al., 1996; CHEN et al., 1997; PESEK e MATYSKA, 1997; WALKER et al., 1997; BOYCE, 1999; NAKAIE et al., 1999; FRAZIER et al., 2000; CHEN e WANG, 2001; AQUINO et al., 2004; ZHU et al., 2005; DEMIRALAY et al., 2006; DOSSI et al., 2006; HUANG et al., 2006; WASIK et al., 2007; HORIE et al., 2007; SHERIDAN E KING, 2008; LOOS et al., 2009; YANG e CHEN, 2009; SCHEURER et al., 2009; FERRER e THURMAN, 2010; LINO e PENA, 2010). A maioria dos métodos propostos permite a determinação de poucos edulcorantes simultaneamente. No entanto, é comum a utilização de edulcorantes em combinação. Dentre aqueles que permitem a determinação de até oito ou nove edulcorantes simultaneamente estão os métodos de separação acoplados a detectores mais sofisticados, como o detector de massas (WASIK et al., 2007 e YANG e CHEN, 2009), que agregam um maior custo a análise, não sendo muito utilizados em análises de rotina.

Um avanço dentre as técnicas cromatográficas foi a cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), baseada nos mesmos princípios da cromatografia líquida de alta eficiência, entretanto empregando menores partículas de fase estacionária, permitindo também o uso de colunas de comprimento e diâmetro menores e maior velocidade linear de fase móvel, resultaram no aumento da resolução, da detectabilidade e da velocidade das análises (NGUYEN et al., 2007; MALDANER e JARDIM, 2009).

Devido ao fato da técnica ser relativamente nova, existem ainda poucos métodos desenvolvidos e validados, o que torna a UPLC um potencial objeto de pesquisa. Portanto, objetivou-se, com o presente trabalho aplicar a técnica desenvolvida em trabalhos anteriores para a análise de cinco edulcorantes em dez produtos alimentícios.

MATERIAIS E MÉTODOS

REAGENTES

Foram utilizados acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker), fosfato de sódio monobásico monoidratado (Merck), hidróxido de sódio (Carlos Herba) e ácido ortofosfórico (Merck). A água foi purificada utilizando-se sistema Milli-Q (Millipore). Padrões de acesulfame-k (Fluka), aspartame e sacarina sódica hidratada (Sigma), ciclamato de sódio (Aldrich) foram obtidos da Sigma-Aldrich e o padrão de neotame foi doado pela empresa Sweetmix.

As amostras foram filtradas em membrana PVDF de 0,22 μm de poro (Millipore) e também em membrana VS de ester de celulose (VSWP) de 0,025 μm de poro (Millipore).

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) e a acetonitrila foi filtrada em membrana universal GMP de poro 0,22 μm (Pall Corporation).

PREPARO DE AMOSTRA

As amostras de produtos diet, light e zero foram adquiridas em supermercados das cidades de Campinas e São Paulo (SP). Foram analisados três diferentes lotes em triplicata de néctares e sucos, refrigerantes, chás prontos para consumo, refrescos em pó, pudins, achocolatados, cappuccinos, geléias e molhos (catchup e barbecue).

Os chás, refrigerantes, néctares e sucos foram diluídos dez vezes com auxílio de pipeta automática e filtrados. Os refrigerantes foram colocados em banho de ultrassom por aproximadamente 5 minutos, para remoção total do gás antes da etapa de diluição. Os néctares e sucos foram centrifugados por 5 minutos a 2415 g/s antes da etapa de filtração.

Os pós foram pesados em balões volumétricos, o volume foi completado com água ultra pura, foram então colocados em banho de ultrassom por 15 minutos e finalmente filtrados. Os achocolatados, cappuccinos e pudins foram centrifugados por 5 minutos a 2415 g antes da etapa de filtração. Os refrescos, achocolatados e pudins foram pesados de maneira a obter-se uma diluição de dez vezes (massa/volume) a partir do modo de preparo e os cappuccinos foram diluídos cinquenta vezes a partir do modo de preparo indicado pelo fabricante.

Os molhos e a geléia foram pesados em balão volumétrico, o volume foi completado com água ultra pura, foram então centrifugados por 5 minutos a 2415 g e finalmente filtrados. A diluição foi equivalente a cinquenta vezes (massa/volume).

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

MÉTODO

A separação dos edulcorantes foi realizada utilizando-se o sistema de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) Acquity Waters, modelo UPA,

série J08UPA 905M, equipado com bomba binária modelo UPB, série: K08UPB 444M e empregando-se coluna Hypersil Gold (Thermo) de fase reversa C18 com 50 x 2,1 mm e 1,9 μm de tamanho de partícula.

Foi empregada fase móvel binária, vazão de 0,4 mL/min e temperatura de 56°C na coluna. Solvente A: tampão fosfato de sódio monobásico 5mM/ácido ortofosfórico (pH 3,0) e solvente B: acetonitrila. O gradiente foi conduzido da seguinte forma: 100% de A por 5min, 14% de B por 2 min, 25% de B por 3 min; a condição inicial foi restabelecida e o recondicionamento da coluna foi feito por 1 min. O volume de injeção variou de 1 a 10 μL (looping de 10 μL) e o modo de preenchimento do looping foi “parcial loop needle overfill”. A limpeza da agulha foi feita com 200 μL de solvente forte (acetonitrila) seguido de 600 μL de solvente fraco (água). Para cada “vial” foi feita duplicata e de injeção.

O sistema foi acoplado ao detector de arranjo de diodos Acquity (Waters) modelo UPD e série: G08UPD 124M, com capacidade para leitura em comprimentos de onda de 190 a 500 nm, resolução de 1,2 nm e faixa de amostragem de 20 pontos por segundo. 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 227nm (para o acessulfame-K). Constante de tempo de filtro: normal e tempo de exposição: automático. A aquisição de dados foi realizada utilizando o software Empower pro (Waters).

A identificação dos compostos foi feita pela comparação dos espectros e do tempo de retenção com padrões.

QUANTIFICAÇÃO E TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A quantificação dos edulcorantes foi feita com base em curva de calibração preparadas na matriz, para que fossem considerados interferentes decorrentes dessa. Devido ao fato de terem sido analisados diversos tipos de amostra, foi escolhida a

matriz geléia, a mais complexa dentre as analisadas, para a construção da curva de calibração. Foi adquirida matriz isenta de edulcorantes e estes foram adicionados. Para o acessulfame-K, a faixa de concentração foi de 0,06 a 5,48 µg/mL, para a sacarina, de 0,11 a 5,83 µg/mL, para o ciclamato, de 1,95 a 32,16 µg/mL, para o aspartame, de 0,05 a 9,92 µg/mL e para o neotame, de 0,30 a 2,12 µg/mL.

O tratamento dos dados foi feito com o auxílio do software Statsoft Estatística v7.0.61.0 EN (EUA) e com base em Barros Neto et al. (2007).

Para efeito de comparação entre os resultados obtidos em laboratório para a amostra e as quantidades declaradas pelos fabricantes, de maneira estatisticamente confiável, foram calculados os intervalos de confiança por amostra da seguinte maneira:

$$\bar{x} - t_{gl} \frac{s}{\sqrt{N}} < \mu < \bar{x} + t_{gl} \frac{s}{\sqrt{N}}$$

Onde: \bar{x} = média dos valores calculados

N = número de valores

s = desvio padrão da média

t_{gl} = valor tabelado extraído da tabela de t-Student com 95% de confiança para os graus de liberdade do número de valores calculados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As respostas para todas as amostras analisadas segundo o método experimental descrito encontram-se nas Tabelas de 1 a 3. Dentre os produtos analisados havia referência das quantidades de edulcorantes adicionadas pelos fabricantes apenas nas embalagens dos chás prontos para consumo, refrigerantes, néctares e sucos prontos para consumo e pós para preparo de refresco. Os níveis de edulcorantes foram analisados com base no “Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais” (BRASIL, 1998) e no “Regulamento Técnico que

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

É difícil a comparação com a literatura para as quantidades de edulcorantes em alimentos, pois em geral as concentrações declaradas para os produtos estudados na literatura já são diversas das declaradas para os produtos analisados e ainda poucos trabalhos com produtos brasileiros são encontrados. Também uma comparação entre a concentração declarada pelos fabricantes e a encontrada pelos autores dos trabalhos pesquisados é difícil, pois em tais trabalhos não são encontradas análises estatísticas que correlacionem os dois valores.

O chá light do Fabricante 1 (Tabela 1) apresentou diferença significativa em suas concentrações de acesulfame e aspartame para o segundo lote analisado em relação aos demais, todavia apresentava-se em conformidade em relação à legislação. Quanto à quantidade declarada no rótulo pelo fabricante, pode-se dizer que se encontra fora dos intervalos de confiança para os valores determinados em laboratório para o acesulfame, 10,5 a 11,22 mg/100mL. O chá zero do Fabricante 2 não apresentou diferença significativa entre lotes em suas concentrações de ciclamato e sacarina. A sacarina apresenta-se de acordo com a legislação (Brasil, 2008) que prevê 15 mg/100mL, no entanto o ciclamato estava acima do valor 75 mg/100mL preconizado. Quanto ao declarado pelo fabricante, ambos os edulcorantes apresentavam-se acima.

TABELA 1. Quantidade* de edulcorante em mg/100mL de chás prontos para consumo, refrigerantes, néctares e sucos

Amostra	Lote	Acessulfame-K	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Chá Pêssego light Fabricante 1	1	10,51 ± 0,08 a	-	-	21,18 ± 0,17 a
	2	11,48 ± 0,12 b	-	-	30,40 ± 0,42 b
	3	10,60 ± 0,09 a	-	-	20,78 ± 0,75 a
	Média	10,86 ± 0,46			24,12 ± 4,60
Intervalo de confiança		10,50 - 11,22			20,47 - 27,77
Declarado no rótulo		7,2			22
Chá Pêssego Zero Fabricante 2	1	-	8,50 ± 0,06 a	112,76 ± 1,72 a	-
	2	-	8,50 ± 0,07 a	112,49 ± 5,66 a	-
	3	-	8,44 ± 0,08 a	112,22 ± 2,34 a	-
	Média		8,48 ± 0,07	112,49 ± 3,27	
Intervalo de confiança		8,42 - 8,54			110,05 - 114,93
Declarado no rótulo		6,5			45
Refrigerante de baixa caloria sabor limão Fabricante 1	1	6,03 ± 0,12 a	-	-	20,82 ± 0,33 ab
	2	6,10 ± 0,08 a	-	-	21,29 ± 0,37 a
	3	5,92 ± 0,12 a	-	-	20,12 ± 0,60 b
	Média	6,02 ± 0,12			20,74 ± 0,64
Intervalo de confiança		5,92 - 6,11			20,25 - 21,24
Declarado no rótulo		5			21
Refrigerante de baixa caloria sabor limão Fabricante 2	1	5,79 ± 0,38 a	-	-	20,94 ± 1,45 a
	2	7,15 ± 0,04 b	-	-	22,74 ± 0,11 a
	3	5,92 ± 0,02 a	-	-	20,87 ± 0,09 a
	Média	6,50 ± 0,69			21,84 ± 1,16
Intervalo de confiança		5,77 - 6,80			20,62 - 22,43
Declarado no rótulo		5			21
Guaraná Zero Fabricante 2	1	-	6,82 ± 0,16 a	38,41 ± 1,74 a	10,58 ± 0,20 a
	2	-	6,47 ± 0,89a	35,32 ± 5,04 a	11,02 ± 1,62 a
	3	-	6,88 ± 0,03a	38,66 ± 1,20 a	11,61 ± 0,09 a
	Média		6,72 ± 0,49	37,46 ± 3,17	11,07 ± 0,93
Intervalo de confiança		6,35 - 7,10			35,02 - 38,90
Declarado no rótulo		5			31
Guaraná Zero Fabricante 3	1	-	15,32 ± 0,34 a	76,86 ± 1,65 a	-
	2	-	16,54 ± 0,08 b	81,38 ± 1,06 a	-
	3	-	16,20 ± 0,19 b	80,20 ± 2,61 a	-
	Média		16,02 ± 0,58	79,48 ± 2,34	
Intervalo de confiança		15,574 - 16,466			77,472 - 81,483
Declarado no rótulo		16			69,7
Refrigerante tipo cola light Fabricante 1	1	12,85 ± 0,16 a	-	-	32,78 ± 0,57a
	2	12,58 ± 0,06 a	-	-	34,14 ± 0,14 b
	3	12,99 ± 0,25 a	-	-	35,64 ± 0,61 c
	Média	12,81 ± 0,24			34,19 ± 1,29
Intervalo de confiança		12,62 - 13,00			33,17 - 35,20
Declarado no rótulo		8,99			34,69
Refrigerante tipo cola light plus Fabricante 2	1	19,28 ± 0,25 a	-	-	26,01 ± 0,42 a
	2	18,43 ± 0,07 b	-	-	26,24 ± 0,07 a
	3	18,56 ± 0,12 b	-	-	27,97 ± 0,21 b
	Média	18,76 ± 0,41			26,74 ± 0,93
Intervalo de confiança		18,43 - 19,08			26,00 - 27,47
Declarado no rótulo		13			24

Néctar de Uva light Fabricante 4	1	-	3,61 ± 0,11 a	35,45 ± 1,88 a	-
	2	-	3,76 ± 0,01 b	35,09 ± 0,66 a	-
	3	-	3,99 ± 0,06 b	37,93 ± 0,88 a	-
	Média		3,79 ± 0,18	36,15 ± 1,73	
Intervalo de confiança			3,65 - 3,92	34,83 - 37,48	
Declarado no rótulo			4	40	
Néctar de Uva light Fabricante 2	1	3,278 ± 0,15 a	-	-	-
	2	2,880 ± 0,07 b	-	-	-
	3	2,955 ± 0,03 b	-	-	-
	Média	3,04 ± 0,20			
Intervalo de confiança			2,88 - 3,19		
Declarado no rótulo			3		
Néctar de Pêssego light Fabricante 4	1	2,45 ± 0,44 a	-	-	-
	2	3,17 ± 0,13 b	-	-	-
	3	2,57 ± 0,04 ab	-	-	-
	Média	2,73 ± 0,40			
Intervalo de confiança			2,43 - 3,04		
Declarado no rótulo			3		
Néctar de Pêssego light Fabricante 2	1	3,59 ± 0,01 a	-	-	-
	2	3,83 ± 0,01 b	-	-	-
	3	3,12 ± 0,14 c	-	-	-
	Média	3,51 ± 0,32			
Intervalo de confiança			3,26 - 3,76		
Declarado no rótulo			3		
Néctar de Goiaba light Fabricante 2	1	2,09 ± 0,31 a	-	-	-
	2	2,29 ± 0,04 a	-	-	-
	3	2,18 ± 0,03 a	-	-	-
	Média	2,18 ± 0,18			
Intervalo de confiança			2,04 - 2,32		
Declarado no rótulo			3		
Néctar de Maracujá light Fabricante 2	1	10,83 ± 0,43 a	-	-	11,96 ± 0,67 a
	2	10,17 ± 0,40 a	-	-	13,17 ± 0,86 ab
	3	10,99 ± 0,96 a	-	-	14,79 ± 0,73 b
	Média	10,66 ± 0,68			13,30 ± 1,39
Intervalo de confiança			10,14 - 11,18		12,23 - 14,38
Declarado no rótulo			10		17
Suco de Laranja light Fabricante 2	1	2,96 ± 0,09 a	-	-	-
	2	2,97 ± 0,01 a	-	-	-
	3	3,05 ± 0,07 a	-	-	-
	Média	2,99 ± 0,07			
Intervalo de confiança			2,94 - 3,050		
Declarado no rótulo			3		
Legislação (Brasil, 2008)	Diet	35	15	40	75
	Light	26	10	56	56
	Zero	35	15	75	75

(*) Média e estimativa de desvio padrão da determinação em triplicata.

As diferentes letras minúsculas indicam a equivalência entre os lotes de cada amostra. Lotes marcados com a mesma letra não apresentam diferença significativa entre si ao nível de 95% de certeza para o teste de Tukey.

(-) Não detectado.

Entre os refrigerantes analisados (Tabela 1) observou-se que o aspartame foi utilizado com mais frequência.

O refrigerante de baixa caloria sabor limão do Fabricante 1 não apresentou diferença significativa entre os lotes para a concentração de acessulfame, já para a concentração de aspartame houve diferença. Ambos os edulcorantes apresentavam-se de acordo com os limites determinados pela legislação, no entanto o acessulfame encontrava-se acima do declarado pelo fabricante. Para o refrigerante do Fabricante 2 não houve diferença significativa quanto à concentração de aspartame, todavia para a concentração de acessulfame o segundo lote apresentou-se significativamente diferente dos demais. Tanto o aspartame quanto o acessulfame estão em conformidade com a legislação para este produto e ainda, a concentração de acessulfame apresenta-se acima do declarado pelo fabricante. Pode-se observar ainda que ambos os fabricantes utilizaram os mesmos edulcorantes e ao mesmo nível de concentração.

Os refrigerantes sabor guaraná não apresentaram diferença significativa para as concentrações de sacarina, ciclamato e aspartame dos diferentes lotes. Para o produto do Fabricante 2, todos os edulcorantes estavam dentro do disposto pela legislação, no entanto a sacarina e o ciclamato apresentaram concentrações acima do declarado no rótulo e o aspartame, abaixo. Para o Fabricante 3, as concentrações de sacarina e ciclamato apresentaram-se acima do determinado pela legislação. O ciclamato apresentou-se acima do alegado pelo fabricante e a sacarina está de acordo. Os produtos dos dois fabricantes diferiram apenas na utilização do aspartame. Para o fabricante que não utilizou o aspartame foi necessário o aumento na concentração dos demais edulcorantes. Comparado ao Fabricante 2, o Fabricante 3 triplicou a concentração de sacarina e duplicou a concentração de ciclamato, o que evidencia a presença de sinergismo entre os edulcorantes permitindo a diminuição de sua quantidade quando em combinação (KEMP, 2006; ZYGLER, 2009).

Para o refrigerante tipo cola do primeiro fabricante não houve diferença significativa para a concentração de acessulfame, entretanto para o aspartame houve diferença entre os três lotes. Ambos estavam de acordo com a legislação e a concentração de acessulfame não está de acordo com o declarado. Para o refrigerante do segundo fabricante, a concentração de acessulfame do primeiro lote diferiu significativamente dos demais assim como a concentração de aspartame do terceiro lote. Ambas as concentrações apresentaram-se de acordo com a legislação e tanto para o acessulfame, quanto para o aspartame as concentrações estão acima do informado no rótulo. Os fabricantes utilizaram os mesmos edulcorantes, entretanto em concentrações distintas.

Entre os néctares e sucos houve a prevalência do acessulfame na composição, exceto pelo suco de uva do Fabricante 4. O uso deste edulcorante pode ter sido preferido devido a sua característica de aumento da doçura em meio ácido e resistência a tratamentos térmicos (LIPINSKI e HANGER, 2001; KEMP, 2006). Constata-se ainda que o mesmo fabricante (o quarto) utiliza edulcorantes diferentes em sucos de sabores diferentes, provavelmente devido à melhor combinação das características de alguns edulcorantes com as características de algumas frutas. A concentração dos edulcorantes para todas as amostras de néctar e suco apresentaram-se em concordância com a legislação brasileira.

Os néctares de uva do Fabricante 2, de pêssego de ambos os fabricantes, de goiaba e o suco de laranja continham em seu rótulo ainda a informação da presença de sucralose em sua composição, o que justifica a baixa quantidade de acessulfame encontrada nestes produtos. Entretanto não foi possível determinar a sucralose a partir do método desenvolvido devido à falta de detector adequado a suas características.

O néctar de uva do Fabricante 4 (Tabela 1) apresentou concentração de sacarina no lote 1 significativamente menor que nos demais, enquanto que a concentração de ciclamato não apresentou diferença. Ambos os edulcorantes

estavam abaixo do declarado no rótulo. O néctar de uva do Fabricante 2 apresentou concentração de acessulfame em concordância com o declarado pelo fabricante. Um dos lotes apresentou ainda diferença significativa dos demais.

Os néctares de pêssego de ambos os fabricantes apresentavam-se de acordo com o estipulado pela legislação, no entanto o produto do Fabricante 2 continha erro no rótulo em relação à concentração de edulcorante enquanto que o produto do Fabricante 4 trazia no rótulo a concentração correta.

O néctar de goiaba mostrou homogeneidade entre os lotes em relação à concentração de acessulfame, todavia a concentração declarada pelo fabricante não condizia com a obtida experimentalmente. O néctar de maracujá não apresentou diferença significativa para o acessulfame, mas foi observada diferença entre os lotes para o aspartame. Para ambos os edulcorantes, nesse produto, a concentração estava acima do declarado no rótulo. O suco de laranja apresentou-se de acordo com o declarado pelo fabricante, seus lotes estavam bastante homogêneos quanto à quantidade de acessulfame presente.

Não houve diferença significativa na concentração dos edulcorantes analisados entre os lotes dos produtos em pó (Tabela 2), exceto para o acessulfame no achocolatado do Fabricante 6, o ciclamato no pudim sabor baunilha do Fabricante 9 e o aspartame no pudim sabor chocolate do Fabricante 10. No entanto, observando-se o desvio padrão das concentrações dos edulcorantes nos produtos em pó dentro do mesmo lote constata-se uma falta de padrão no processamento, dificultando a análise estatística e podendo gerar erro. Segundo Cuq e colaboradores (2010), não há um padrão definido para o processamento de pós. Pesquisadores do projeto europeu "Food Powders" (2003) que visava o desenvolvimento de técnicas que auxiliassem no desenvolvimento de pós alimentícios, criaram um documento que a ressalta a dificuldade em se obter um método de mistura ideal e ainda a ocorrência de segregação em pós após a mistura, devido à diferença de suas densidades.

Entre os pós alimentícios analisados observa-se predominantemente o uso de acessulfame e aspartame.

TABELA 2: Quantidade* de edulcorante em mg/100mL de preparado de achocolatados, pós para preparo de refresco, cappuccino e pudim

Amostras	Lote	Acessulfame	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Refresco em pó sabor maçã Fabricante 5	1	7.94 ± 1,60 a	-	-	29.55 ± 4,62 a
	2	7.14 ± 4,49 a	-	-	26.74 ± 2,10 a
	3	4.85 ± 3,74 a	-	-	34.58 ± 1,81 a
	Média	6,66 ± 3,16			30,29 ± 4,44
Intervalo de confiança		4,14 – 9,14			26,77 – 33,80
Declarado no rótulo		4,5			28,8
Refresco em pó zero sabor maçã Fabricante 5	1	6.63 ± 0,62 a	-	-	37.16 ± 1,95 a
	2	6.62 ± 1,60 a	-	-	37.47 ± 1,69 a
	3	7.00 ± 1,71 a	-	-	39.71 ± 0,36 a
	Média	6,75 ± 1,33			38,11 ± 1,83
Intervalo de confiança		5,70 – 7,80			36,66 – 39,56
Declarado no rótulo		4,6			29,6
Refresco em pó sabor laranja Fabricante 5	1	12.24 ± 3,74 a	-	-	23.38 ± 0,66 a
	2	12.52 ± 7,93 a	-	-	23.57 ± 2,09 a
	3	6.35 ± 2,84 a	-	-	24.33 ± 1,08 a
	Média	10,37 ± 5,79			23,76 ± 1,39
Intervalo de confiança		5,78 – 14,96			22,65 – 24,85
Declarado no rótulo		9,4			21,9
Refresco em pó zero sabor laranja Fabricante 5	1	4.55 ± 0,68 a	-	-	35.08 ± 0,74 a
	2	6.09 ± 2,38 a	-	-	38.55 ± 1,50 a
	3	5.65 ± 0,65 a	-	-	41.15 ± 8,09 a
	Média	5,43 ± 1,54			38,26 ± 5,16
Intervalo de confiança		4,21 – 6,65			34,17 – 42,35
Declarado no rótulo		3,9			34,9
Achocolatado light Fabricante 6	1	4,95 ± 4,78 a	-	**	-
	2	0,87 ± 0,37 b	-	**	-
	3	6,67 ± 0,25 c	-	**	-
	Média	4,16 ± 2,55			
Achocolatado light Fabricante 1	1	6,04 ± 1,59 a	-	**	-
	2	6,48 ± 0,38 a	-	**	-
	3	5,69 ± 1,05 a	-	**	-
	Média	6,07 ± 1,11			
Pó para preparo de cappuccino light Fabricante 7	1	46,50 ± 3,87 a	-	**	7,91 ± 0,33 a
	2	33,14 ± 6,51 a	-	**	7,69 ± 0,05 a
	3	33,72 ± 12,67 a	-	**	7,47 ± 0,08 a
	Média	38,71 ± 10,09			7,69 ± 0,26
Pó para preparo de cappuccino light com canela Fabricante 8	1	36,32 ± 10,91 a	2,77 ± 2,67 a”	**	-
	2	32,18 ± 7,00 a	0,57 ± 0,07 a”	**	-
	3	31,48 ± 1,99 a	2,04 ± 2,17 a”	**	-
	Média	32,79 ± 7,62	1,79 ± 2,09		

Pó para preparo de pudim diet sabor baunilha Fabricante 9	1	-	6,50 ± 5,40 a	43,38 ± 7,21 a	6,84 ± 0,25 a
	2	-	6,85 ± 3,80 a	21,34 ± 2,52 b	5,80 ± 0,72 a
	3	-	7,60 ± 0,77a	42,83 ± 5,99a	6,42 ± 0,17a
	Média		6,94 ± 3,87	35,80 ± 11,67	6,43 ± 0,59
Pó para preparo de pudim zero sabor baunilha Fabricante 10	1	0,21 ± 0,1 a	3,63 ± 0,36 a	30,73 ± 1,78 a	13,95 ± 0,53 a
	2	1,79 ± 1,79 a	4,47 ± 0,32 a	29,18 ± 3,83 a	14,93 ± 2,31 a
	3	0,99 ± 0,26 a	4,04 ± 0,43 a	28,63 ± 2,70 a	13,55 ± 0,94 a
	Média	1,00 ± 1,19	4,00 ± 0,50	29,52 ± 2,87	14,14 ± 1,50
Pó para preparo de pudim diet sabor chocolate Fabricante 9	1	-	6,00 ± 5,45 a	**	3,71 ± 0,03 a
	2	-	8,78 ± 1,76 a	**	3,63 ± 0,05 a
	3	-	16,35 ± 13,65 a	**	3,64 ± 0,11 a
	Média		8,90 ± 7,86		3,67 ± 0,07
Pó para preparo de pudim zero sabor chocolate Fabricante 10	1	0,91 ± 0,66 a	3,71 ± 0,17 a	**	12,71 ± 0,63 a
	2	0,40 ± 0,26 a	3,92 ± 0,42 a	**	14,05 ± 0,41 b
	3	0,46 ± 0,34 a	3,89 ± 0,07a	**	11,69 ± 0,17 a
	Média	0,58 ± 0,48	3,84 ± 0,27		12,87 ± 1,08
Legislação (Brasil, 2008)	Diet	35	15	40	75
	Light	26	10	30	56
	Zero	35	15	40	75

(*) Média e estimativa de desvio padrão da determinação em triplicata.

As diferentes letras minúsculas indicam a equivalência entre os lotes de cada amostra. Lotes marcados com a mesma letra não apresentam diferença significativa entre si ao nível de 95% de certeza para o teste de Tukey. (**) Não analisado devido à presença de um interferente de mesmo tempo de retenção. (") Cálculo hipotético. (-) Não detectado.

As concentrações de edulcorantes para todos os refrescos analisados encontravam-se de acordo com o determinado pela legislação. Considerando-se a conformidade com o rótulo pode-se dizer que o refresco sabor maçã apresentava-se de acordo com o declarado pelo fabricante, enquanto que o refresco zero sabor maçã apresentava concentrações acima das declaradas. Para o refresco sabor laranja, apenas o acessulfame apresentava-se de acordo com o declarado, já para o refresco zero sabor laranja apenas o aspartame apresentava-se de acordo. Os refrescos sabor maçã e sabor laranja apresentavam concentrações próximas dos edulcorantes em relação a sua versão Zero, no entanto aqueles continham açúcar em sua composição, indicando provavelmente a agregação de sabor característico por parte dos edulcorantes ou melhora da textura do pó.

Entre os achocolatados light as concentrações de acessulfame estavam de acordo com o determinado pela legislação vigente, que é de 26 mg/100g ou mL, assim como as concentrações dos demais edulcorantes observadas para todos os pós

para preparo de pudins diet e zero analisados (ANVISA, RDC nº 18 de 24 de março de 2008). Enquanto que os cappuccinos de ambos os fabricantes apresentaram concentrações de acessulfame acima das determinadas pela legislação para produtos light e a concentração de aspartame do produto do fabricante sete encontrava-se de acordo.

Os achocolatados, o cappuccino do Fabricante 8 e os pudins sabor chocolate continham no rótulo a indicação da presença de ciclamato de sódio em sua composição, todavia não foi possível identificar e quantificá-lo devido a uma limitação do método. Quando há cacau nas formulações não é possível detectar o ciclamato por este método devido ao aparecimento de um interferente com mesmo tempo de retenção.

A concentração de sacarina no cappuccino do Fabricante 8 foi calculada hipoteticamente, pois apesar de apresentar limite quantificável sua área estava fora da curva de calibração e estando entre as últimas amostras do experimento era inviável construir uma nova curva apenas para essa amostra. A curva foi construída em uma faixa acima do limite de quantificação, pois seria a faixa em que praticamente todos os alimentos se encontrariam, no entanto foi necessária maior diluição para a análise do cappuccino devido a viscosidade de sua solução que dificultava a passagem pelo filtro de 0,025 µm de poro.

É possível observar que para as amostras de geléia (Tabela 3) das duas marcas houve diferença significativa entre os lotes analisados para os edulcorantes encontrados. Comparando-se com a legislação brasileira, pode-se dizer que a geléia do Fabricante 8 apresenta-se em conformidade com o disposto pela legislação quanto à concentração de acessulfame. Segundo declarado pelo fabricante, a geléia do Fabricante 8 continham ainda sucralose em sua formulação, o que justifica a baixa quantidade de acessulfame encontrada nesta amostra. Todavia, como citado anteriormente não foi possível determinar a sucralose.

A geléia do Fabricante 11 apresenta concentração de aspartame de acordo com a legislação. No entanto sua concentração de acessulfame apresenta-se acima do permitido pela legislação brasileira, dado que os intervalos de confiança calculados para cada lote a um nível de significância de 95% foram 40,44 a 46, 23 mg/100g, para o primeiro lote, 35,09 a 46,32 mg/100g, para o segundo e 40,00 a 46,69 mg/100g, para o terceiro, enquanto que a legislação permite até 35mg/100g.

Os molhos de catchup e “barbecue” (Tabela 3) não apresentaram diferença significativa entre os lotes analisados. A concentração de acessulfame nos dois produtos apresentou-se acima da quantidade máxima estabelecida pela legislação brasileira para produtos light.

Observa-se ainda que o edulcorante predominantemente utilizado nas geléias e molhos analisados foi o acessulfame.

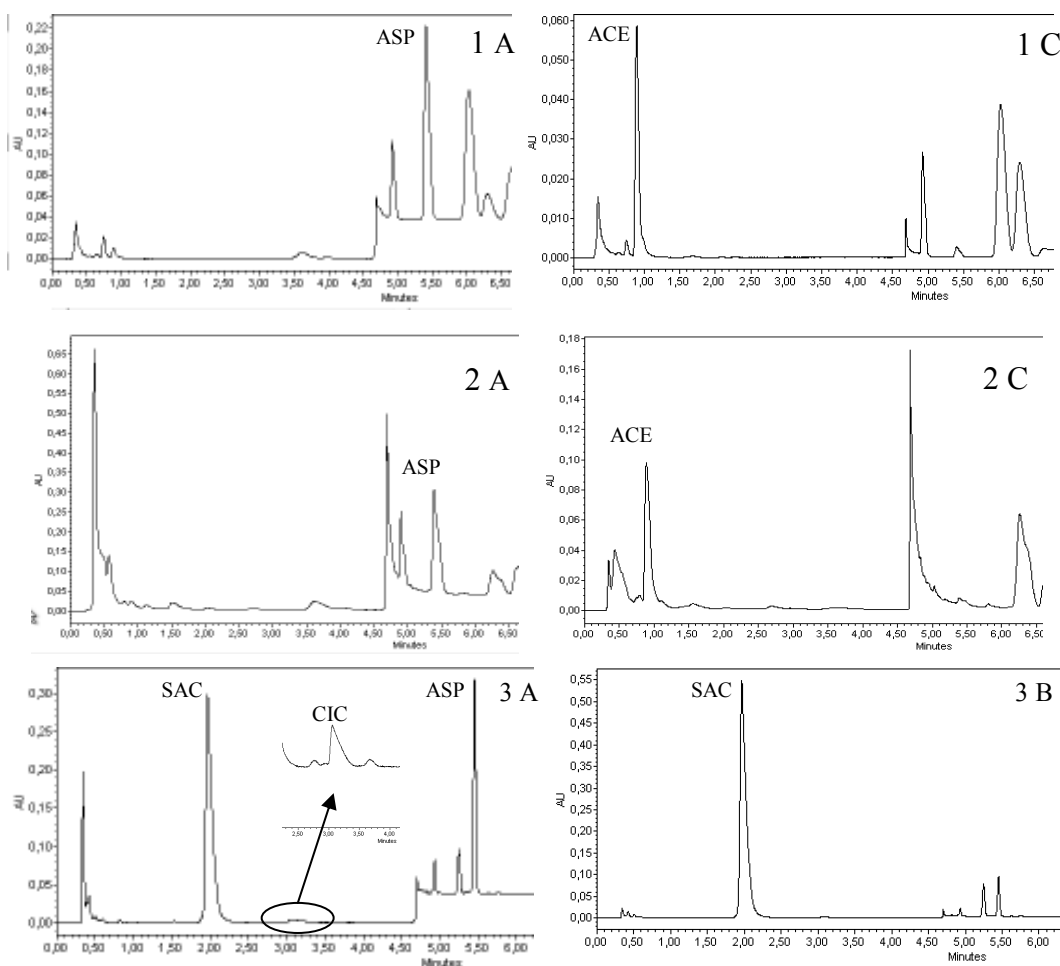
TABELA 3. Quantidade* de edulcorante em mg/100g de geléias, catchup e molho “barbecue”

Amostra	Lote	Acessulfame-K	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Geléia diet de morango Fabricante 8	1	0,52 ± 0,01 a	-	-	-
	2	0,69 ± 0,03 b	-	-	-
	3	0,67 ± 0,04 b	-	-	-
	Média	0,63 ± 0,08			
Geléia diet de morango Fabricante 11	1	43,34 ± 0,41 a	-	-	43,22 ± 0,72 a
	2	40,71 ± 0,63 b	-	-	39,95 ± 0,36 a
	3	43,35 ± 0,72 a	-	-	60,36 ± 2,62 b
	Média	42,46 ± 1,40			47,84 ± 9,32
Molho light de Catchup Fabricante 8	1	117,78 ± 1,56 a	-	-	-
	2	118,20 ± 1,47 a	-	-	-
	3	114,85 ± 0,78 a	-	-	-
	Média	116,94 ± 1,97			
Molho light de “Barbecue” Fabricante 8	1	129,73 ± 6,58 a	-	-	-
	2	132,64 ± 2,20 a	-	-	-
	3	141,97 ± 4,25 a	-	-	-
	Média	134,78 ± 6,95			
Legislação (Brasil, 2008)	Diet	35	15	40	75
	Light	26	10	30	56
	Zero	35	15	40	75

(*) Média e estimativa de desvio padrão da determinação em triplicata.

As diferentes letras minúsculas indicam a equivalência entre os lotes de cada amostra. Lotes marcados com a mesma letra não apresentam diferença significativa entre si ao nível de 95% de certeza para o teste de Tukey. (-) Não detectado.

A Figura 1 representa os cromatogramas de algumas das amostras analisadas.



ACE: acessulfame; SAC: sacarina; CIC: ciclamato; ASP: aspartame

FIGURA 1: Cromatogramas obtidos para refrigerante tipo cola do Fabricante 2 (1), geléia do Fabricante 11 (2) e pó para preparo de pudim sabor baunilha do Fabricante 9 (3) nos comprimentos de onda de 192 nm (A), 201 nm (B) e 227 nm (C).

CONCLUSÕES

Foram encontradas amostras contendo até quatro edulcorantes em combinação em um mesmo produto. Dentre os edulcorantes, o aspartame foi o mais encontrado em refrigerantes, seguido pelo acessulfame, entretanto para os pós,

néctares, molhos e geléias o acessulfame estava presente em um maior número de amostras. O neotame não foi encontrado em nenhuma das amostras analisadas.

Uma amostra de refrigerante sabor guaraná, uma amostra de chá e ambas as amostras de cappuccino apresentaram concentração acima do determinado pela legislação para pelo menos um edulcorante. Nenhuma das amostras analisadas apresentou edulcorantes que não foram declarados pelos fabricantes, dentre os edulcorantes analisados.

O método empregado mostrou-se ineficiente para a determinação de ciclamato em amostras contendo cacau, devido à presença de um interferente em seu mesmo tempo de retenção.

SUGESTÃO

Desenvolver melhor o preparo de amostra para algumas matrizes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAS

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. Campinas, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 32-38, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde. Portaria n. 540, de 27 de outubro de 1997. **Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares**. Diário Oficial da União, Brasília, 1997.

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.

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.

BOYCE, M. C. Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 847, p. 369–375, 1999.

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**, 750, 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, 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, p. 57–64, 2001.

CUQ, B.; RONDET, E.; ABECASSIS, J. Food powders engineering, between knowhow and science: Constraints, stakes and opportunities. **Powder Technology**, in press, 2010, doi:10.1016/j.powtec.2010.08.012

DEMIRALAY, E. Ç.; ÖZKAN, 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.

DI PIETRA, A. M.; CAVRINI, V.; BONAZZI, D.; BENFENATI, L. HPLC Analysis of Aspartame and Saccharin in Pharmaceutical and Dietary Formulations. **Chromatographia**, v. 30, n. 3/4, p. 215-219, 1990.

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.

FERREIRA, V. A. Obesidade e Pobreza: o Aparente Paradoxo. **Revista ABESO** - Associação Brasileira para o estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, a. 6, 2006.

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**, in press, 2010.

FRAZIER, R. A.; INNS, E. L.; DOSSI, N.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks. **Journal of Chromatography A**, v. 876, p. 213–220, 2000.

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

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, 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, p. 233–237, 2006.

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

LAWRENCE, J.; CHARBONEAU, C. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparation. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, n. 5, p. 934-937, 1988.

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, 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, p. 1126–1131, 2009.

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

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, 553 p.

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. Disponível in: <http://sciencelinks.jp/j-east/article/199917/000019991799A0632104.php>. Acesso em Abril de 2009.

NGUYEN, D. T. T.; GUILLARME, D.; HEINISCH, S.; BARRIOULET, M. P.; ROCCA, J. L.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. High throughput liquid chromatography with sub-2 μ m particles at high pressure and high temperature. **Journal of Chromatography A**, v. 1167, p. 76–84, 2007.

PESEK, J. J.; MATYSKA, M. T. Determination of aspartame by high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 781, p. 423-428, 1997.

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 Bioanalytical Chemistry**, v. 394, p.1585–1594, 2009.

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.

SLOAN, A.E. Top 10 global foods trends. **Food Technology**, v. 59, n.4, p. 20-32, 2005.

THOMPSON, C. O.; TRENERRY, V. C.; KEMMERY, B. Determination of cyclamate in low joule foods by capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 704, p.203-210, 1995a.

THOMPSON, C. O.; TRENERRY, V. C.; KEMMERY, B. Micellar electrokinetic capillary chromatographic determination of artificial sweeteners in low-Joule soft drinks and other foods. **Journal of Chromatography A**, v. 694, p. 507-514, 1995b.

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.

VEERABHADRARAO, M.; NARAYAN, M. S.; KAPUR, O.; SASTRY, C. S. Reverse phase liquid chromatographic of some food additives. **Journal Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 70, n. 3, p. 578-582, 1987.

WALKER, J. C.; ZAUGG, S. E.; WALKER, E. B. Analysis of beverages by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 781, 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, p. 187–196, 2007.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes estimates for year 2000 and projection for 2030. **Diabetes care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

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, 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, 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.

Comparação entre métodos de determinação de edulcorantes em alimentos por HPLC e UPLC

Cíntia Botelho Dias, Daniela Queiroz Pane, Helena Teixeira Godoy

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

Artigo a ser publicado no Journal of Food Composition and Analysis

Comparação entre métodos de determinação de edulcorantes em alimentos por HPLC e UPLC

Cíntia Botelho Dias¹, Daniela Queiroz Pane¹, Helena Teixeira Godoy¹

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

RESUMO

Um novo método de determinação de edulcorantes em alimentos por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) e detector de arranjo de diodos foi aplicado a diferentes tipos de produtos diet, light e zero. O método foi comparado com um método desenvolvido para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A UPLC apresentou menores gastos com solventes e tratamentos de resíduos, tempo de análise reduzido, melhor repetibilidade e reprodutibilidade, menores limites de detecção e quantificação e menores desvios padrão que a HPLC. Apesar de serem necessários ainda alguns aperfeiçoamentos para a UPLC, essa apresentou grande potencial e várias vantagens sobre a HPLC.

Palavra-chave: comparação, HPLC, UPLC, edulcorantes

ABSTRACT

A new method for sweeteners determination in food stuff by ultra performance liquid chromatography (UPLC) with photo diode array detector was applied to different types of diet and light products. The method was compared with a method developed for high performance liquid chromatography (HPLC). The UPLC method presented less use of solvents (resulting in a less expensive waste treatment), shorter analysis time, better repeatability and reproducibility and less

limit of detection, limit of quantification and standard deviation than HPLC. Although, some studies are still necessary for UPLC, this presented a great potential and lots of advantages against HPLC.

Keywords: comparison, HPLC, UPLC, sweeteners.

INTRODUÇÃO

O uso de edulcorantes vem aumentando cada vez mais, devido não apenas à estética, mas principalmente devido à preocupação com a saúde e o aumento dos casos de diabetes, da obesidade e outras doenças relacionadas com excesso de peso (NABORS, 2001; WILD et al., 2004).

Dentre os diversos métodos de determinação para edulcorantes já desenvolvidos destacam-se, atualmente, os cromatográficos, que permitem sua determinação simultânea (LAWRENCE e CHARBONEAU, 1988; CASALS et al., 1996; CHEN et al., 1997; WALKER et al., 1997; NAKAIE et al., 1999; CHEN e WANG, 2001; AQUINO et al., 2004; ZHU et al., 2005; DEMIRALAY et al., 2006; DOSSI et al., 2006; HUANG et al., 2006; HORIE et al., 2007; WASIK et al., 2007; LOOS et al., 2009; YANG e CHEN, 2009). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), dentre as técnicas de separação cromatográficas, vem sendo a mais aplicada à determinação destes aditivos. No entanto, a maioria dos métodos propostos possibilita determinar até quatro edulcorantes simultaneamente e aqueles que permitem a determinação de mais edulcorantes são os equipamentos acoplados a detectores mais sofisticados, como o detector de massas (WASIK et al., 2007; YANG e CHEN, 2009). Esses promovem um maior custo e exigem maior especialização, sendo inviável sua aplicação em análises de rotina em indústrias de alimentos.

Desde o início da cromatografia líquida, vêm se alcançando novos avanços principalmente quanto às fases estacionárias com partículas de tamanho diminuto,

melhorando-se as características de colunas e aprimorando-se a técnica. Desde a década de 40 a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) vem se difundindo e sendo empregada na análise de diferentes tipos de produtos. E associada à expansão desta técnica, na última década, o desenvolvimento da HPLC tem sido direcionado à necessidade de análises mais rápidas, porém sem o comprometimento do desempenho cromatográfico. Para tanto foi desenvolvida a cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), a qual se baseia nos mesmos princípios da cromatografia líquida de alta eficiência e utiliza fases estacionárias com tamanhos de partícula menores que 2 μm . O uso destas partículas juntamente com as altas velocidades lineares das fases móveis, aumenta a resolução e a detectabilidade e diminuem o tempo das análises. Para tornar isto possível, uma vez que a atual tecnologia de instrumentação (bombas, injetores e detectores) disponível para a HPLC não é projetada para trabalhar em altas pressões, um novo equipamento capaz de operar em pressões acima de 100 MPa foi introduzido e adaptado às necessidades atuais (NGUYEN et al., 2007; MALDANER e JARDIM, 2009).

Portanto, o presente trabalho visa comparar dois métodos para determinação de edulcorantes em alimentos, sendo um deles desenvolvido para utilização em UPLC e o outro em HPLC, ambos com detecção por arranjo de diodos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O método utilizado para a determinação de edulcorantes por HPLC em alimentos e bebidas foi desenvolvido por Pane (2011), enquanto que o método por UPLC foi desenvolvido por Dias e Godoy (2011).

REAGENTES

Foram utilizados acetonitrila grau cromatográfico (J. T. Baker), fosfato de sódio monobásico monoidratado (Merck), hidróxido de sódio (Carlos Herba) e ácido

orto-fosfórico (Merck). A água foi purificada utilizando-se sistema Mili-Q (Millipore). A água foi purificada utilizando-se sistema Milli-Q (Millipore). Padrões de acessulfame-k (Fluka), aspartame e sacarina sódica hidratada (Sigma), ciclamato de sódio (Aldrich) foram obtidos da Sigma-Aldrich e o padrão de neotame foi doado pela empresa Sweetmix.

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

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) e acetonitrila foi filtrada em membrana universal GMP de poro 0,22 µm (Pall Corporation), 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).

MÉTODO

Preparo de Amostras

As amostras de produtos diet, light e zero foram adquiridas em supermercados das cidades de Campinas e São Paulo (SP). Foram analisados três diferentes lotes em triplicata de néctares e sucos, refrigerantes, chás prontos para consumo, refrescos em pó, pudins, achocolatados, cappuccinos, geléias e molhos (catchup e barbecue).

Para o método por HPLC, todas as amostras foram diluídas dez vezes e filtradas. Os néctares, geléias e molhos foram centrifugados por 5 minutos a 2415 g após serem diluídos e antes de serem filtrados. Os refrigerantes foram colocados em ultrassom por aproximadamente 5 minutos, para a retirada do gás antes da diluição. Os pós foram pesados em balões volumétricos e o volume foi completado com água ultra pura de maneira a se obter uma diluição de dez vezes (massa/volume) a partir

do modo de preparo indicado pelo fabricante, foram então centrifugados por 5 minutos a 2415 g e finalmente filtrados.

Para o método por UPLC, os chás e refrigerantes, néctares e sucos foram diluídos dez vezes com o auxílio de um pipeta automática e posteriormente filtrados. Os refrigerantes foram colocados em banho de ultrassom por aproximadamente 5 minutos, para remoção total do gás antes da etapa de diluição. Os néctares e sucos foram centrifugados por 5 minutos a 2415 g após a diluição. Os pós foram pesados em balões volumétricos, o volume foi completado com água ultra pura, foram então colocados em banho de ultrassom por 15 minutos e filtrados. Os achocolatados, cappuccinos e pudins foram centrifugados por 5 minutos a 2415 g antes da etapa de filtração. Os refrescos, achocolatados 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. Os molhos e a geléia foram pesados em balão volumétrico, o volume foi completado com água ultra pura, foram então centrifugados por 5 minutos a 2415 g e finalmente filtrados. A diluição foi equivalente a cinquenta vezes (massa/volume).

Cada um dos exemplares das triplicatas dos lotes dos produtos foi analisada uma única vez, totalizando nove replicatas de cada mostra.

Instrumentação

Para o método por HPLC, a separação dos edulcorantes foi feita utilizando-se o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Agilent (G1313A), equipado com bomba quaternária (G1311A) e empregando-se uma coluna Restek, Pinnacle II de fase reversa C18 com 150 x 4,6 mm e 5 µm de tamanho de partícula.

A separação foi obtida com fase móvel binária, vazão de 1,0 mL/min e temperatura de 40°C na coluna. Solvente A: tampão fosfato de sódio monobásico 5 mM/hidróxido de sódio (pH 7,0) e solvente B: acetonitrila. O gradiente foi conduzido como demonstrado na Tabela 1 e o tempo de condicionamento da

coluna foi de 5 minutos. O volume de injeção foi de 10 μ L (looping de 10 μ L) e o modo de preenchimento do looping foi full looping.

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

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

O sistema foi acoplado ao detector de arranjo de diodos Hewlett Packard 1100 (G1315A), com leitura de uma faixa de comprimentos de onda de 190 a 400 nm, tempo de resposta foi menor que 0,01 minutos ou 2 segundos. 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 conduzida pelo software Agilent/HPChemStation.

Para o método por UPLC, foi utilizado o sistema de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) Acquity Waters, modelo UPA, série J08UPA 905M, equipado com bomba binária modelo UPB, série: K08UPB 444M e empregando-se coluna Hypersil Gold (Thermo) de fase reversa C18 com 50 x 2,1 mm e 1,9 μ m de tamanho de partícula.

A separação foi obtida com fase móvel binária, vazão de 0,4 mL/min e temperatura de 56°C na coluna. Solvente A: tampão fosfato de sódio monobásico 5 mM/ ácido orto-fosfórico (pH 3,0) e solvente B: acetonitrila. O gradiente foi conduzido como demonstrado na Tabela 2 e o tempo de condicionamento da

coluna foi de 1 minuto. O volume de injeção variou de 1 a 10 μL (looping de 10 μL) e o modo de preenchimento do looping foi “parcial loop needle overfill”. A limpeza da agulha foi feita com 200 μL de solvente forte (acetonitrila) seguido de 600 μL de solvente fraco (água).

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

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

O sistema foi acoplado ao detector de arranjo de diodos Acquity (Waters), modelo UPD e série: G08UPD 124M, com capacidade para leitura em comprimentos de onda de 190 a 500 nm, resolução de 1,2 nm, faixa de amostragem de 20 pontos por segundo. Constante de tempo de filtro: normal e tempo de exposição: automático. Foram monitorados os mesmo comprimentos de onda monitorados para o método por HPLC. A aquisição de dados foi conduzida pelo software Empower pro (Waters).

A identificação dos edulcorantes foi feita com base em comparação com os espectros e os tempos de retenção dos padrões.

Para o método por HPLC, a quantificação dos edulcorantes foi feita com base em curvas de calibração construídas com padrões preparados em água ultra pura. Para o acessulfame-K, a faixa de concentração foi de 0,20 a 200 $\mu\text{g/mL}$, para a

sacarina, de 0,10 a 240 µg/mL, para o ciclamato, de 18 a 1000 µg/mL, para o aspartame, de 0,14 a 600 µg/mL e para o neotame, de 0,45 a 500 µg/mL.

Para o método por UPLC, a quantificação dos edulcorantes foi feita com base em curva de calibração preparada na matriz para que fossem considerados interferentes decorrentes dessa. Devido ao fato de terem sido analisados diversos tipos de amostra foi escolhida a matriz geléia, a mais complexa dentre as analisadas, para a construção da curva de calibração. Os padrões foram adicionados à matriz isenta de edulcorantes. Para o acessulfame-K, a faixa de concentração foi de 0,06 a 5,48 µg/mL, para a sacarina, de 0,11 a 5,83 µg/mL, para o ciclamato, de 1,95 a 32,16 µg/mL, para o aspartame, de 0,05 a 9,92 µg/mL e para o neotame, de 0,30 a 2,12 µg/mL.

O tratamento dos dados foi feito com o auxílio do software Statsoft Estatística v7.0.61.0 EN (EUA) e com base em Barros neto e colaboradores (2007).

Para efeito de comparação entre os resultados obtidos em laboratório para as amostra e as quantidades declaradas pelos fabricantes, de maneira estatisticamente confiável, foram calculados os intervalos de confiança por amostra da seguinte maneira:

$$\bar{x} - t_{gl} \frac{s}{\sqrt{N}} < \mu < \bar{x} + t_{gl} \frac{s}{\sqrt{N}}$$

Onde: \bar{x} = média dos valores calculados

N = número de valores

s = desvio padrão da média

t_{gl} = valor tabelado extraído da tabela de t-Student com 95% de confiança para os graus de liberdade do número de valores calculados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CONDIÇÕES DE ANÁLISE

A Tabela 3 mostra os tempos de corrida e recondicionamento, vazão e volume total de fase móvel gasto para as duas técnicas. O tempo de corrida em UPLC foi aproximadamente 2,5 vezes menor que para HPLC, bem como o tempo de recondicionamento da coluna antes de uma nova injeção foi 5 vezes maior para a HPLC. A comparação da vazão com o tempo de corrida indica um gasto de solvente aproximadamente sete vezes menor em UPLC. Para um laboratório de pesquisa, bem como para análises de rotina, esta diminuição de tempo e gasto de solvente significa a realização de mais análises em um período mais curto de tempo, e ainda maior economia na compra de solventes e menor gasto com o tratamento de resíduos, podendo, a UPLC, ser considerada mais adequada ecologicamente.

TABELA 3: Tempos de corrida e recondicionamento, vazão e volume total de fase móvel gasto para a HPLC e a UPLC.

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

*Resultados ainda não publicados obtidos por Pane (2011).

Por outro lado, a UPLC exige o uso de reagentes de maior pureza, e ainda um maior cuidado com o preparo de amostras.

E por último, em termos de custos fica difícil uma comparação entre as técnicas visto que o gasto com solvente e tratamento de resíduos é menor em UPLC, todavia os custos com membranas de filtro e colunas são maiores.

FIGURAS DE MÉRITO

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação dos edulcorantes na matriz geléia para as técnicas de UPLC e HPLC apresentam-se na Tabela 4. O limite de detecção foi determinado como 3 vezes a amplitude do ruído e o limite de quantificação foi determinado como 2 vezes a amplitude no limite de detecção.

TABELA 4: Limites de detecção e quantificação para os cinco edulcorantes obtidos por meio das técnicas UPLC e HPLC em geléia.

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

*Resultados ainda não publicados obtidos por Pane (2011).

Observa-se que os limites para a UPLC são mais baixos que aqueles observados para a HPLC, talvez devido à melhora na resolução. Fato que pode ser explicado pelo emprego de partículas menores e mais homogêneas no recheio da coluna, resultando em uma coluna melhor empacotada. Ocorrendo assim formação de picos mais finos e bem definidos, bem como o aumento de sua amplitude, permitindo a detecção dos analitos em menor concentração.

O reduzido tamanho de partícula das colunas de UPLC permite a diminuição do comprimento e do diâmetro das colunas sem perder sua eficiência em relação às colunas para HPLC.

Repetibilidade e reprodutibilidade

A Repetibilidade foi medida no mesmo dia e a reprodutibilidade, entre dias diferentes (Tabela 5). Ambos os estudos foram conduzidos na matriz geléia para os dois métodos.

Para a HPLC e a UPLC, foram analisadas dez injeções de solução padrão, respectivamente, em um nível de concentração de 90 e 1,79 µg/mL de acessulfame-K, 100 e 2,02 µg/mL de sacarina, 450 e 10,07 µg/mL de ciclamato, 250 e 4,30 µg/mL de aspartame e 300 e 1,20 µg/mL de neotame. Para a HPLC, foram feitos três dias de injeção com espaçamento de 3 dias entre elas. Para a UPLC, o segundo dia de injeções ocorreu uma semana depois do primeiro e o terceiro, três após o segundo. Foram realizadas apenas três injeções no segundo e no terceiro dias.

TABELA 5: Coeficiente de variação (CV) em porcentagem para a repetibilidade e a reprodutibilidade das duas técnicas.

	Dia	Acessulfame	Sacarina	Ciclamato	Aspartame	Neotame	
HPLC	1	2,55	1,84	3,04	3,05	2,50	
	Repe. ^a	4	2,55	1,82	3,10	1,79	2,72
		7	2,31	2,14	3,09	2,48	3,18
	Repro. ^b		4,00	3,37	3,08	3,38	3,03
UPLC	1	0,198	0,183	1,815	0,111	0,910	
	Repe. ^a	7	0,094	0,093	1,989	0,073	0,563
		10	0,108	0,053	0,828	0,016	0,532
	Repro. ^b		0,528	0,706	3,571	0,969	8,116

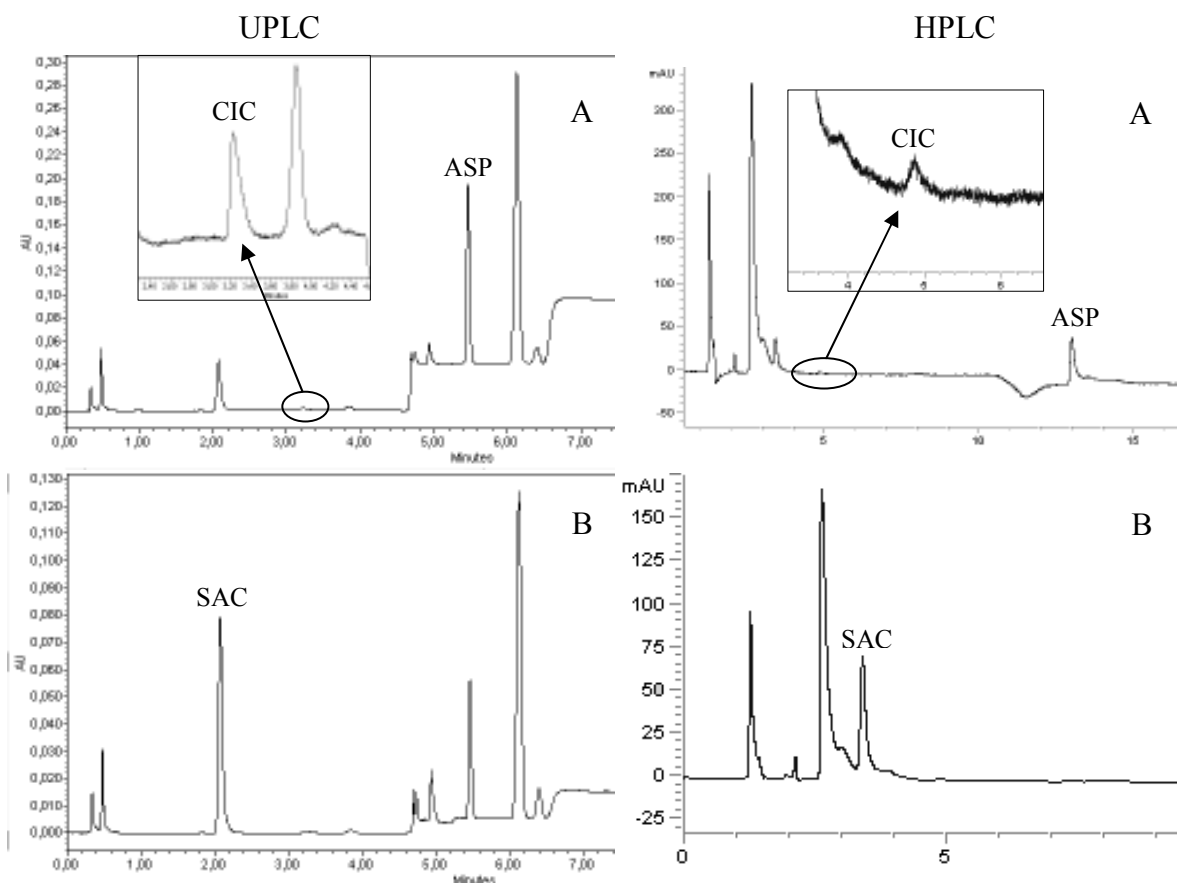
(a) Repe. = repetibilidade; (b) Repro. = Reprodutibilidade; (*) Resultados ainda não publicados obtidos por Pane (2011).

Pode-se constatar que a repetibilidade foi em geral abaixo de 5% para ambos os métodos, indicando que as duas técnicas são indicadas a serem aplicadas na determinação de edulcorantes. Para a maior parte dos valores, a repetibilidade e a reprodutibilidade foram melhores na UPLC.

A baixa repetibilidade entre dias, observada para o neotame, é provavelmente um problema no preparo da solução teste. Quando a solução é filtrada na membrana de 0,025 μm de poro apenas parte do neotame passa e sua concentração não é constante quando comparadas diferentes filtrações. Para a UPLC, a mesma solução padrão preparada em matriz foi filtrada em três diferentes “vials” e aqueles que seriam utilizados para a segunda e terceira medidas foram congelados. Portanto, no caso do neotame, podem ter ocorrido problemas na filtração. Fato que não ocorre no preparo de amostras para HPLC, pois não se utiliza um filtro de porosidade tão pequena.

AMOSTRAS

As Figuras 1 a 4 contém os cromatogramas das amostras analisadas por meio das duas técnicas.

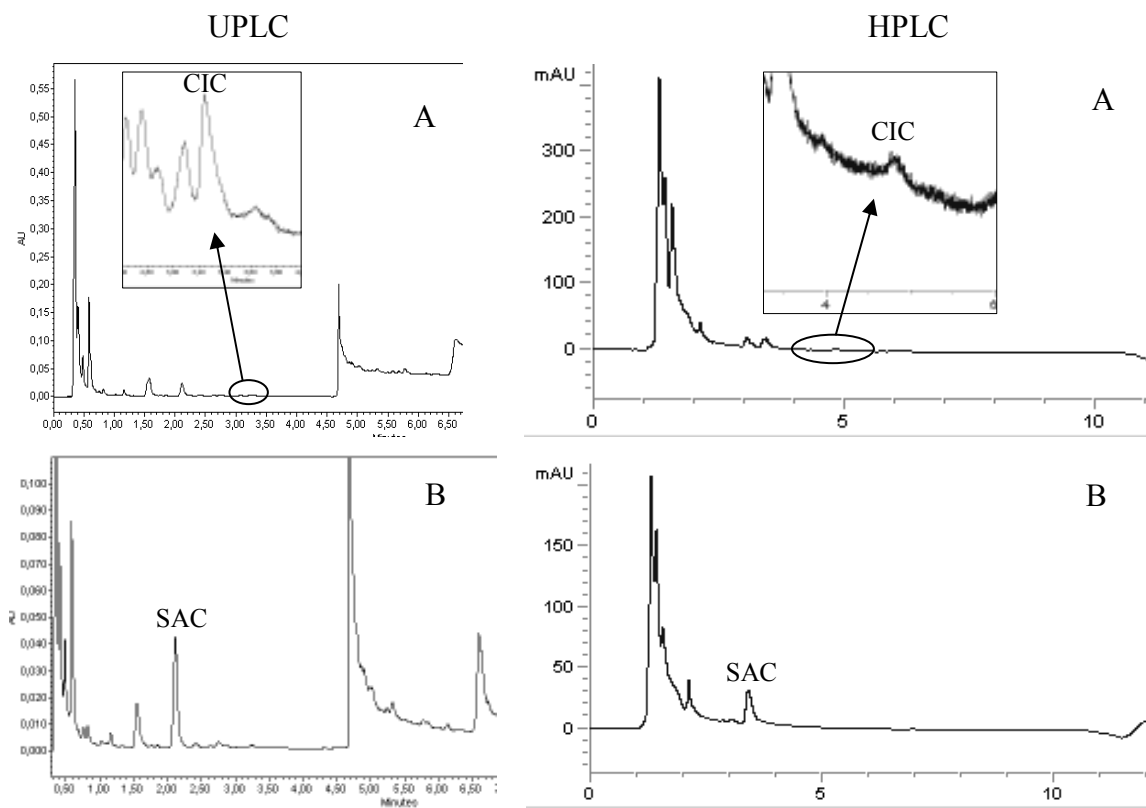


(A) 192 nm, (B) 201 nm, (SAC) Sacarina, (CIC) Ciclamato, (ASP) Aspartame

FIGURA 1: Cromatogramas obtidos para o refrigerante tipo guaraná do Fabricante 1 por HPLC e por UPLC.

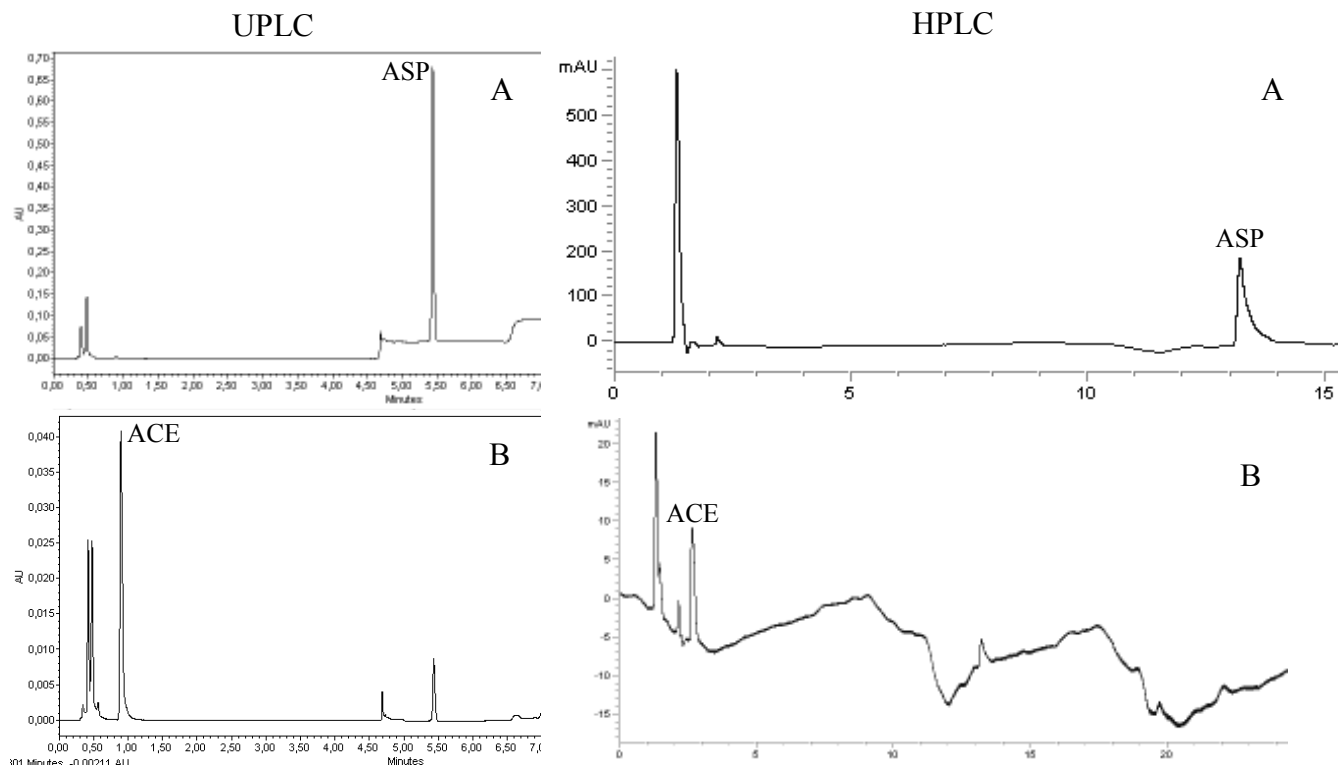
Analisando-se os cromatogramas nas Figuras 1 a 4, constata-se que o ruído observado no cromatograma obtido por HPLC é maior que aquele em UPLC, fato que pode ser constatado especialmente nos cromatogramas onde pode ser observado o sinal do edulcorante ciclamato de sódio. Pode-se observar ainda que

principalmente para o ciclamato é mais difícil a visualização do pico em HPLC que em UPLC, analisando-se a mesma concentração de analito na amostra.



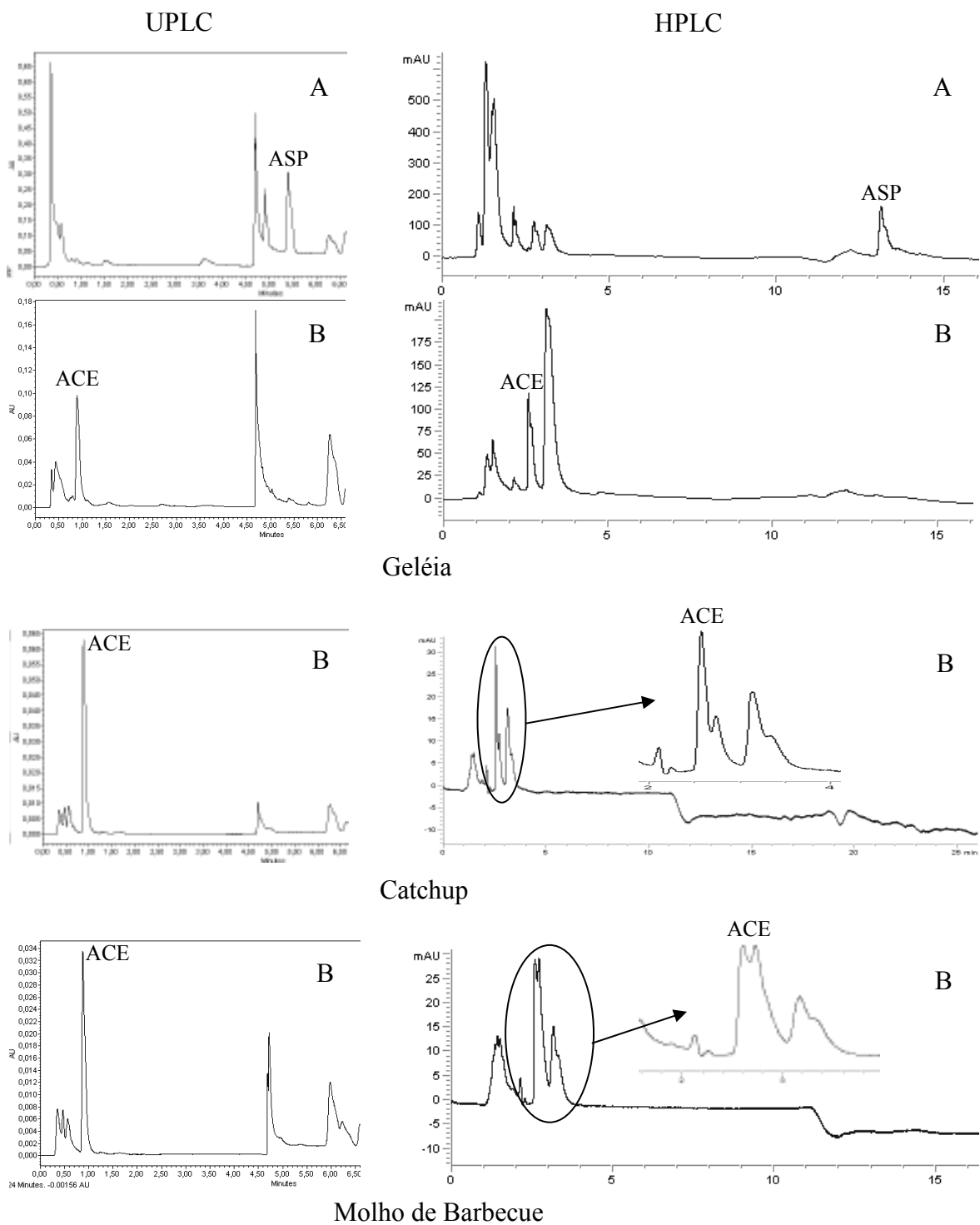
(A) 192 nm, (B) 201 nm, (SAC) Sacarina, (CIC) Ciclamato

FIGURA 2: Cromatogramas obtidos para o néctar de uva do Fabricante 4 por HPLC e por UPLC.



(A) 192 nm, (B) 227 nm, (ACE) ACESSulfame, (ASP) Aspartame

FIGURA 3: Cromatogramas obtidos para o pó para preparo de refresco sabor maçã por HPLC e por UPLC.



(A) 192 nm, (B) 227 nm, (ACE) Acesulfame, (ASP) Aspartame

FIGURA 4: Cromatogramas obtidos para a geléia do Fabricante 8, o catchup e o molho de barbecue por HPLC e por UPLC.

As respostas para as amostras analisadas segundo cada uma das técnicas estudadas apresentam-se nas Tabelas de 6 a 8. Dentre os produtos analisados havia referência das quantidades de edulcorantes adicionadas pelos fabricantes apenas nas embalagens dos refrigerantes, néctares e sucos prontos para consumo e pós para preparo de refresco. Os níveis de edulcorantes foram analisados com base no “Regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais” (BRASIL, 1998) e no “Regulamento técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos” (BRASIL, 2008).

À partir de teste estatístico constatou-se que as concentrações obtidas para os edulcorantes analisados nos refrigerantes (Tabela 6) foram estatisticamente diferentes entre as duas técnicas, exceto pelo aspartame no Refrigerante de baixa caloria sabor limão Fabricante 2 e o ciclamato do guaraná zero do Fabricante 2.

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

A concentração de acessulfame nas amostras de refrigerante de baixa caloria sabor limão do Fabricante 1 determinada por HPLC foi quase três vezes maior que a determinada por UPLC e a declarada. O que pode ser devido à presença de algum interferente evidenciado no método de HPLC.

Para o refrigerante tipo cola do Fabricante 2 observou-se que para a técnica de HPLC os resultados apresentaram-se mais próximos ao declarado pelo fabricante enquanto que para a UPLC os valores foram mais altos.

Para o refrigerante tipo Guaraná do Fabricante 3 observou-se que a média dos resultados obtidos para o ciclamato na HPLC apresenta maior desvio padrão que a quantidade determinada por UPLC, no entanto para a UPLC observou-se que os resultados estavam acima tanto do declarado pelo fabricante, quanto do disposto pela legislação. Os demais refrigerantes apresentaram-se de acordo com a legislação.

TABELA 6: Quantidade* de edulcorante em mg/100mL de refrigerantes analisados pelas técnicas de HPLC e UPLC.

Amostra	Lote	UPLC				HPLC**			
		Acessulfame	Sacarina	Ciclamato	Aspartame	Acessulfame	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Refrigerante de baixa caloria sabor limão Fabricante 1	1	6,03 ± 0,12 a	-	-	20,82 ± 0,33 ab	23,58 ± 0,50 a	-	-	15,42 ± 0,71 a
	2	6,10 ± 0,08 a	-	-	21,29 ± 0,37 a	25,27 ± 0,40 b	-	-	15,91 ± 0,18 a
	3	5,92 ± 0,12 a	-	-	20,12 ± 0,60 b	24,53 ± 0,14 b	-	-	14,87 ± 0,07 a
	Média	6,02 ± 0,12 A			20,74 ± 0,64 A	24,45 ± 0,80 B			15,40 ± 0,58 B
Intervalo de confiança		5,92 - 6,11		20,25 - 21,24		23,84 - 25,07		14,95 - 15,84	
Declarado		5		21		5		21	
Refrigerante de baixa caloria sabor limão Fabricante 2	1	5,79 ± 0,38 a	-	-	20,94 ± 1,45 a	5,06 ± 0,58 a	-	-	22,31 ± 0,56 a
	2	7,15 ± 0,04 b	-	-	22,74 ± 0,11 a	5,19 ± 0,06 a	-	-	21,92 ± 1,13 a
	3	5,92 ± 0,02 a	-	-	20,87 ± 0,09 a	5,30 ± 0,12 a	-	-	21,76 ± 0,58 a
	Média	6,50 ± 0,69 A			21,84 ± 1,16 A	5,18 ± 0,31 B			22,00 ± 0,74 A
Intervalo de confiança		5,77 - 6,80		20,62 - 22,43		4,94 - 5,42		21,43 - 22,56	
Declarado		5		21		5		21	
Guaraná Zero Fabricante 2	1	-	6,82 ± 0,16 a	38,41 ± 1,74 a	10,58 ± 0,20 a	-	6,21 ± 0,16 a	36,69 ± 1,68 a	7,61 ± 0,22 a
	2	-	6,47 ± 0,89 a	35,32 ± 5,04 a	11,02 ± 1,62 a	-	6,36 ± 0,09 a	40,17 ± 1,91 a	8,52 ± 0,28 b
	3	-	6,88 ± 0,03 a	38,66 ± 1,20 a	11,61 ± 0,09 a	-	6,33 ± 0,09 a	32,18 ± 1,28 b	8,39 ± 0,27 b
	Média		6,72 ± 0,49 A	37,46 ± 3,17 A	11,07 ± 0,93 A		6,30 ± 0,12 B	36,35 ± 3,75 A	8,17 ± 0,48 B
Intervalo de confiança			6,35 - 7,10	35,026 - 38,90	10,35 - 11,79		6,21 - 6,39	33,46 - 39,21	7,80 - 8,54
Declarado			5	31	12		5	31	12
Guaraná Zero Fabricante 3	1	-	15,32 ± 0,34 a	76,86 ± 1,65 a	-	-	14,27 ± 0,49 a	49,81 ± 0,71 a	-
	2	-	16,54 ± 0,08 b	81,38 ± 1,06 a	-	-	14,01 ± 0,40 ab	66,39 ± 0,18 b	-
	3	-	16,20 ± 0,19 b	80,20 ± 2,61 a	-	-	13,20 ± 0,14 b	79,40 ± 0,07 c	-
	Média		16,02 ± 0,58 A	79,48 ± 2,34 A			13,82 ± 0,57 B	65,20 ± 12,90 B	
Intervalo de confiança			15,57 - 16,47	77,47 - 81,48			13,39 - 14,26	55,28 - 75,12	
Declarado			16	69,7			16	69,7	

Continuação da Tabela 6

Amostra	Lote	UPLC				HPLC**			
		Acessulfame	Sacarina	Ciclamato	Aspartame	Acessulfame	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Refrigerante tipo cola light, Fabricante 1	1	12,85 ± 0,16 a	-	-	32,78 ± 0,57a	13,54 ± 0,41 a	-	-	38,59 ± 1,33 a
	2	12,58 ± 0,06 a	-	-	34,14 ± 0,14 b	13,59 ± 0,22 a	-	-	42,26 ± 0,48 b
	3	12,99 ± 0,25 a	-	-	35,64 ± 0,61 c	13,21 ± 0,05 a	-	-	41,53 ± 0,50 b
	Média	12,81 ± 0,24 A			34,19 ± 1,29 A	13,45 ± 0,29 B			40,79 ± 1,84 B
Intervalo de confiança		12,62 – 13,00		33,17 - 35,20		13,22 – 13,67		39,38 – 42,21	
Declarado		8,99		34,69		8,99		34,69	
Refrigerante tipo cola light plus, Fabricante 2	1	19,28 ± 0,25 a	-	-	26,01 ± 0,42 a	12,64 ± 0,23a	-	-	25,54 ± 0,47 a
	2	18,43 ± 0,07 b	-	-	26,24 ± 0,07 a	11,61 ± 0,52 b	-	-	25,57 ± 0,88 a
	3	18,56 ± 0,12 b	-	-	27,97 ± 0,21 b	11,49 ± 0,29 b	-	-	23,37 ± 1,19 a
	Média	18,76 ± 0,41 A			26,74 ± 0,93 A	11,91 ± 0,63 B			24,83 ± 1,34 B
Intervalo de confiança		18,43 - 19,08		26,00 - 27,47		11,42 – 12,40		23,80 – 25,86	
Declarado		13		24		13		24	
Legislação (Brasil, 2008)	Diet	35	15	40	75				
	Light	26	10	56	56				
	Zero	35	15	75	75				

(*) Média e estimativa de desvio padrão da determinação em triplicata dos diferentes lotes.

As diferentes letras minúsculas indicam a equivalência entre os lotes de cada amostra. As diferentes letras maiúsculas indicam a equivalência entre a UPLC e a HPLC. Valores marcados com a mesma letra não apresentam diferença significativa entre si ao nível de 95% de certeza para o teste de Tukey. (**) Resultados ainda não publicados obtidos por Pane (2011). (-) não detectado.

Estatisticamente as duas técnicas diferiram na concentração de edulcorantes para todos os néctares e suco (Tabela 7) do Fabricante 2, exceto pelo néctar de maracujá e não diferiram para as concentrações dos néctares do Fabricante 4.

Observa-se que para os pós para preparo de refresco (Tabela 7) o desvio padrão obtido entre as replicatas foi sempre maior para a HPLC que para a UPLC, exceto pela concentração de acessulfame no refresco sabor laranja. A variação nas concentrações das replicadas pode ser explicada pelo fato de que a adequada homogeneização de amostras de pós alimentícios deve-se a uma série de variáveis que são determinadas pelo próprio fabricantes, não havendo diretrizes para o procedimento (CUQ et al., 2010), podendo resultar em uma má homogeneização. Também no tempo decorrente da espera entre a mistura e o envase pode ocorrer segregação por diferença de densidades (Food Powders, 2003).

Todas as amostras de néctar, suco e refresco em pó apresentaram-se de acordo com a legislação.

TABELA 7. Quantidade* de edulcorantes em mg/100mL por lote de néctares e sucos prontos para consumo e para pós para preparo de refresco dados em mg de edulcorantes por 100mL de preparado analisados por HPLC e UPLC.

Amostra	Lote	UPLC		HPLC**	
		Sacarina	Ciclamato	Sacarina	Ciclamato
Néctar de Uva light Fabricante 4	1	3,61 ± 0,11 a	35,45 ± 1,88 a	3,37 ± 0,27 a	38,29 ± 1,35 a
	2	3,76 ± 0,01 b	35,09 ± 0,66 a	3,61 ± 0,05 a	36,69 ± 3,35 a
	3	3,99 ± 0,06 b	37,93 ± 0,88 a	3,78 ± 0,17 b	37,02 ± 3,78 a
	Média	3,79 ± 0,18 A	36,15 ± 1,73 A	3,72 ± 0,39 A	37,34 ± 2,72 A
Intervalo de confiança		3,65 - 3,92	34,83 - 37,48	3,42 - 4,02	35,25 - 39,42
Declarado no rótulo		4	40	4	40
Legislação (Brasil, 2008)	Diet	15	40		
	Light	10	56		
	Zero	15	75		

Amostra	Lote	UPLC		HPLC**	
		Acessulfame-K	Aspartame	Acessulfame-K	Aspartame
Néctar de Uva light Fabricante 2	1	3,278 ± 0,15 a	-	3,72 ± 0,10 a	-
	2	2,880 ± 0,07 b	-	3,41 ± 0,05 a	-
	3	2,955 ± 0,03 b	-	3,68 ± 0,33 a	-
	Média	3,04 ± 0,20 A		3,60 ± 0,22 B	
Intervalo de confiança		2,88 - 3,19		3,43 - 3,78	
Declarado no rótulo		3		3	
Néctar de Pêssego light Fabricante 4	1	2,45 ± 0,44 a	-	2,75 ± 0,18 a	-
	2	3,17 ± 0,13 b	-	2,77 ± 0,05 a	-
	3	2,57 ± 0,04 ab	-	2,31 ± 0,07 b	-
	Média	2,73 ± 0,40 A		2,62 ± 0,26 A	
Intervalo de confiança		2,43 - 3,04		2,43 - 2,82	
Declarado no rótulo		3		3	
Nectar de Pêssego light Fabricante 2	1	3,59 ± 0,01 a	-	2,63 ± 0,10 a	-
	2	3,83 ± 0,01 b	-	2,65 ± 0,06 a	-
	3	3,12 ± 0,14 c	-	2,58 ± 0,01 a	-
	Média	3,51 ± 0,32 A		2,62 ± 0,067 B	
Intervalo de confiança		3,26 - 3,76		2,57 - 2,67	
Declarado no rótulo		3		3	
Néctar de Goiaba light Fabricante 2	1	2,09 ± 0,31 a	-	1,48 ± 0,15 a	-
	2	2,29 ± 0,04 a	-	1,43 ± 0,10 a	-
	3	2,18 ± 0,03 a	-	1,50 ± 0,05 a	-
	Média	2,18 ± 0,18 A		1,47 ± 0,10 B	
Intervalo de confiança		2,04 - 2,32		1,39 - 1,54	
Declarado no rótulo		3		3	
Néctar de Maracujá light Fabricante 2	1	10,83 ± 0,43 a	11,96 ± 0,67 a	11,79 ± 0,80 a	14,03 ± 1,11 a
	2	10,17 ± 0,40 a	13,17 ± 0,86 ab	10,17 ± 0,50 b	13,62 ± 1,69 a
	3	10,99 ± 0,96 a	14,79 ± 0,73 b	9,87 ± 0,44 b	14,58 ± 0,90 a
	Média	10,66 ± 0,68 A	13,30 ± 1,39 A	10,61 ± 1,04 A	14,08 ± 1,18 A

Intervalo de confiança		10,14 - 11,18	12,23 - 14,38	9,81 - 11,41	13,17 - 15,00
Declarado no rótulo		10	17	10	17
Suco de Laranja light Fabricante 2	1	2,96 ± 0,09 a	-	1,99 ± 0,05 a	-
	2	2,97 ± 0,01 a	-	1,90 ± 0,10 a	-
	3	3,05 ± 0,07 a	-	1,88 ± 0,13 a	-
	Média	2,99 ± 0,07 A		1,92 ± 0,10 B	
Intervalo de confiança		2,94 - 3,050		1,85 - 2,00	
Declarado no rótulo		3		3	
Refresco em pó sabor maçã Fabricante 5	1	7.94 ± 1,60 a	29.55 ± 4,62 a	2,43 ± 1,18 a	33,57 ± 8,08 a
	2	7.14 ± 4,49 a	26.74 ± 2,10 a	8,56 ± 3,18 a	28,26 ± 4,24 a
	3	4.85 ± 3,74 a	34.58 ± 1,81 a	4,16 ± 3,05 a	29,46 ± 5,13a
	Média	6,66 ± 3,16 A	30,29 ± 4,44 A	5,15 ± 3,67 A	30,43 ± 5,76 A
Intervalo de confiança		4,15 - 9,14	26,77 - 33,80	2,33 - 7,98	26,00 - 34,86
Declarado no rótulo		4,5	28,8	4,5	28,8
Refresco em pó zero sabor maçã Fabricante 5	1	6.63 ± 0,62 a	37.16 ± 1,95 a	5,09 ± 2,80 a	27,08 ± 3,97 a
	2	6.62 ± 1,60 a	37.47 ± 1,69 a	3,67 ± 0,96 a	26,94 ± 1,20a
	3	7,00 ± 1,71 a	39.71 ± 0,36 a	3,60 ± 3,44 a	26,18 ± 11,58 a
	Média	6,75 ± 1,33 A	38,11 ± 1,83 A	4,12 ± 2,38 A	26,74 ± 6,16 A
Intervalo de confiança		5,70 - 7,80	36,66 - 39,56	2,29 - 5,95	22,00 - 31,47
Declarado no rótulo		4,6	29,6	4,6	29,6
Refresco em pó sabor laranja Fabricante 5	1	12.24 ± 3,74 a	23.38 ± 0,66 a	9,22 ± 0,13 a	16,80 ± 4,76 a
	2	12.52 ± 7,93 a	23.57 ± 2,09 a	8,68 ± 0,68 a	30,68 ± 8,54 a
	3	6.35 ± 2,84 a	24.33 ± 1,08 a	8,12 ± 0,45 a	24,39 ± 2,39 a
	Média	10,37 ± 5,79 A	23,76 ± 1,39 A	8,67 ± 0,63 B	23,96 ± 7,85 B
Intervalo de confiança		5,78 - 14,96	22,66 - 24,86	7,67 - 9,66	17,91 - 30,01
Declarado no rótulo		9,4	21,9	9,4	21,9
Refresco em pó zero sabor laranja Fabricante 5	1	4.55 ± 0,68 a	35.08 ± 0,74 a	1,47 ± 0,21 a	46,17 ± 20,16 a
	2	6.09 ± 2,38 a	38.55 ± 1,50 a	3,18 ± 2,40 a	45,43 ± 4,30 a
	3	5.65 ± 0,65 a	41.15 ± 8,09 a	3,33 ± 0,87 a	23,17 ± 20,73 a
	Média	5,43 ± 1,54 A	38,26 ± 5,16 A	2,67 ± 1,56 B	38,26 ± 18,49 A
Intervalo de confiança		4,21 - 6,65	34,17 - 42,35	1,47 - 3,87	24,05 - 52,47
Declarado no rótulo		3,9	34,9	3,9	34,9
Legislação (Brasil, 2008)	Diet	35	75		
	Light	26	56		
	Zero	35	75		

(*) Média e estimativa de desvio padrão da determinação em triplicata.

As diferentes letras minúsculas indicam a equivalência entre os lotes de cada amostra. . As diferentes letras maiúsculas indicam a equivalência entre a UPLC e a HPLC. Valores marcados com a mesma letra não apresentam diferença significativa entre si ao nível de 95% de certeza para o teste de Tukey. (**) Resultados ainda não publicados obtidos por Pane (2011). (-) e edulcorantes não presentes na tabela não foram detectados.

Pode-se observar que para a geléia do Fabricante 8 (Tabela 8) a concentração de acessulfame observada foi significativamente menor para a UPLC que para a HPLC. Vale ressaltar que como para a filtração das amostras em UPLC foi utilizada membrana de porosidade reduzida (0,025 µm) em relação à HPLC (0,45µm), foi necessária uma diluição maior para as amostras mais viscosas, como a geléia, possibilitando a filtração, o que pode limitar a análise de amostras com menores concentrações do analito, como no caso citado.

TABELA 8: Quantidade* de edulcorante para os pós para preparo de refresco dados em mg de edulcorantes por 100mL de preparado e para geléias e molhos dados em mg/100g analisados pelas técnicas de HPLC e UPLC.

Amostras	Lote	UPLC		HPLC**	
		Acessulfame	Aspartame	Acessulfame	Aspartame
Geléia diet de morango Fabricante 8	1	0,52 ± 0,01 a	-	1,55 ± 0,04 a	-
	2	0,69 ± 0,03 b	-	1,35 ± 0,15 ab	-
	3	0,67 ± 0,04 b	-	1,15 ± 0,13 b	-
	Média	0,63 ± 0,08 A		1,35 ± 0,20 B	
Geléia diet de morango Fabricante 11	1	43,34 ± 0,41 a	43,22 ± 0,72 a	14,26 ± 2,17 a	22,50 ± 3,14 a
	2	40,71 ± 0,63 b	39,95 ± 0,36 a	14,33 ± 2,02 a	47,31 ± 5,62 a
	3	43,35 ± 0,72 a	60,36 ± 2,62 b	16,00 ± 3,40 a	43,43 ± 19,36 a
	Média	42,46 ± 1,40 A	47,84 ± 9,32 A	14,86 ± 2,41 B	37,75 ± 15,41 B
Molho light de Catchup Fabricante 8	1	117,78 ± 1,56 a	-	110,70 ± 9,18 a	-
	2	118,20 ± 1,47 a	-	118,22 ± 10,68 a	-
	3	114,85 ± 0,78 a	-	118,41 ± 8,11 a	-
	Média	116,94 ± 1,97 A		115,77 ± 8,98 A	
Molho light de Barbecue Fabricante 8	1	129,73 ± 6,58 a	-	215,08 ± 21,25a	-
	2	132,64 ± 2,20 a	-	164,23 ± 15,94 b	-
	3	141,97 ± 4,25 a	-	217,46 ± 19,62 a	-
	Média	134,78 ± 6,95 A		198,92 ± 30,83 B	
Legislação (Brasil, 2008)	Diet	35	75		
	Light	26	56		
	Zero	35	75		

*Média e estimativa de desvio padrão da determinação em triplicata.

As diferentes letras minúsculas indicam a equivalência entre os lotes de cada amostra. As diferentes letras maiúsculas indicam a equivalência entre a UPLC e a HPLC. Valores marcados com a mesma letra não apresentam diferença significativa entre si ao nível de 95% de certeza para o teste de Tukey. **Resultados ainda não publicados obtidos por Pane (2011). (-) e edulcorantes não presentes na tabela não foram detectados.

Os resultados para a geléia do Fabricante 11 indicaram que pela técnica de UPLC foram obtidos em média concentrações maiores dos edulcorantes, que pela técnica de HPLC, sendo essas para o acessulfame acima da legislação.

Para o molho de catchup (Tabela 8), foi observado que os resultados obtidos foram equivalentes para ambas as técnicas. Entretanto, para o molho de barbecue as concentrações obtidas por HPLC foram maiores que as obtidas por UPLC, provavelmente devido à presença de algum interferente no método por HPLC, como pode ser observado no cromatograma da Figura 4.

Na análise das geléias e dos molhos observa-se que os desvios padrão foram em geral maiores em HPLC que em UPLC.

CONCLUSÃO

A partir da comparação entre as duas técnicas pode-se concluir a UPLC apresentou menores gastos com solventes e tratamentos de resíduos, tempo de análise reduzido, melhor repetibilidade e reprodutibilidade, menores limites de detecção e quantificação e menores desvios padrão para as amostras em pó e pastosas que a HPLC. A UPLC é, portanto, uma técnica promissora para a análise de edulcorantes em alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. Campinas, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 32-38, 2004.

BARROS NETO, B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer Experimentos**. 3 ed, Campinas, editora UNICAMP, 2007, 480 p.

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.

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 high-performance liquid chromatography with trinitrobenzenesulfonic acid pre-column derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 750, 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, 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, p. 57-64, 2001.

CUQ, B.; RONDET, E.; ABECASSIS, J. Food powders engineering, between knowhow and science: Constraints, stakes and opportunities. **Powder Technology**, in press, 2010, doi:10.1016/j.powtec.2010.08.012

DEMIRALAY, E. Ç., ÖZKAN, 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 e otimização multivariada de metodologia para separação de edulcorantes por UPLC-PDA em alimentos. Artigo não ainda publicado, 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.

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

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, 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, p. 233–237, 2006.

LAWRENCE, J.; CHARBONEAU, C. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparation. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, n. 5, p. 934-937, 1988.

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, 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, 553p.

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. Disponível em: <http://sciencelinks.jp/j-east/article/199917/000019991799A0632104.php>. Acesso em abril de 2009.

NGUYEN, D. T. T.; GUILLARME, D.; HEINISCH, S.; BARRIOULET, M. P.; ROCCA, J. L.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. High throughput liquid chromatography with sub-2 μ m particles at high pressure and high temperature. **Journal of Chromatography A**, v. 1167, p. 76–84, 2007.

PANE, D. Q. Tese de doutorado em Ciência de Alimentos ainda não publicada, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes estimates for year 2000 and projection for 2030. **Diabetes care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WALKER, J. C.; ZAUGG, S. E.; WALKER, E. B. Analysis of beverages by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 781, 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, p. 187–196, 2007.

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, 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, p. 143–146, 2005.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ A metodologia desenvolvida por UPLC, depois de validada e aplicada apresentou-se efetiva para a análise de rotina dos edulcorantes acessulfame, sacarina, ciclamato, aspartame e neotame em refrigerantes, sucos, néctares e chás prontos para consumo, pós para preparo de refresco, pudim e cappuccino, achocolatados, geléias, catchup e molho de “barbecue”. Entretanto é necessário um melhor desenvolvimento do método de preparo de amostra para alguns dos produtos analisados.
- ✓ Não foi possível a quantificação do neotame devido a problemas em relação ao método de preparo de amostras para este edulcorante.
- ✓ O método desenvolvido apresentou limitações para a análise de ciclamato de sódio em amostras contendo cacau.
- ✓ A UPLC mostrou-se mais rápida, econômica e eficiente que a HPLC, sendo bastante promissora para a análise de edulcorantes presentes em amostras de alimentos.