

DETERMINAÇÃO DE EDULCORANTES EM ALIMENTOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA: UMA REVISÃO

**Roberto Cesar Santos de Sousa¹
Maria Beatriz Abreu Gloria²**

RESUMO

Nas últimas décadas, os edulcorantes ganharam importância na indústria de alimentos. Esse movimento se apoia em aspectos econômicos, sensoriais e sanitários. Os edulcorantes são substâncias de diferentes origens e propriedades físico-químicas que apresentam, como característica comum, a função de mimetizar o sabor doce nos alimentos acrescentando pouca ou nenhuma caloria. Devido à alta disponibilidade de produtos adoçados com edulcorantes no mercado consumidor, eleva-se o risco de consumo em excesso de edulcorantes, o que pode causar danos à saúde. Com isso, se torna necessário o desenvolvimento de métodos capazes de monitorar e quantificar os edulcorantes em matrizes alimentícias. A análise de vários edulcorantes de forma simultânea é uma tarefa difícil porque os edulcorantes reúnem poucas características físico-químicas em comum. Nesse sentido, técnicas baseadas em separação por cromatografia líquida são o método de escolha pela facilidade de aplicação e a possibilidade de acoplar uma gama de detectores, como ultravioleta ou espectrometria de massas. Esse último tem se destacado pela alta sensibilidade e capacidade multi-analítica, mas ainda se caracteriza como uma técnica de custo elevado para uma rotina analítica. Entretanto, a maioria dos métodos disponíveis analisa apenas um grupo de edulcorantes. Mais estudos são necessários para desenvolver métodos multi-analíticos para identificar e quantificar todos os edulcorantes permitidos na legislação brasileira, simultaneamente.

PALAVRAS-CHAVE: Adoçantes. CLAE. Métodos analíticos. EM.

¹ Doutorando em Ciências de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (2021). E-mail: desousaroberto@bol.com.br

² Docente PPGCA, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (2021). E-mail: mbeatriz.gloria@gmail.com

INTRODUÇÃO

A obesidade e o diabetes constituem grande problema em todo o mundo e o aumento de suas ocorrências despertou o interesse das pessoas por hábitos saudáveis (BUKHAMSEEN; NOVOTNY, 2014; CAVAGNARI, 2019). A relação entre a saúde e a dieta gerou um aumento considerável na demanda por produtos alimentícios com baixo teor calórico (COELHO; DE JESUS, 2016). Esse fenômeno está ocorrendo mundialmente acompanhado de mudanças rápidas em hábitos alimentares (GARCIA-ALMEIDA; CASADO FDEZ; GARCIA ALEMAN, 2013). E com a prevalência de tais problemas diretamente relacionados ao consumo excessivo de açúcar, se fez necessária a diminuição do conteúdo destes componentes na dieta (MURRAY et al., 2016; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2017; MOORADIAN et al., 2017; CENA; CALDER, 2020).

Edulcorantes, ou adoçantes, são uma classe de aditivos alimentares composta por substâncias de origem natural ou sintética que desempenham um papel relevante na produção de alimentos ao serem utilizados como substituintes de açúcar para fornecer um sabor doce com poucas ou nenhuma caloria (GARCIA-ALMEIDA; CASADO FDEZ; GARCIA ALEMAN, 2013; SHAH; JAGER, 2017; SAMANIEGO-VAESKEN; PARTEARROYO; VARELA-MOREIRAS; 2020). Atualmente, os edulcorantes podem ser encontrados em praticamente todo tipo de produto alimentício, incluindo, refrigerantes, sucos, misturas de bebidas em pó, bebidas alcoólicas, adoçantes de mesa, doces, gomas de mascar, geleias, pudins, assados, conservas de frutas e legumes e produtos lácteos. Como resultado da grande variedade de alimentos disponíveis contendo edulcorantes, o consumo desses compostos pelas pessoas está aumentando. Existe, portanto, o risco de consumo elevado de um produto contendo uma mistura de edulcorantes ou de muitos edulcorantes distribuídos em vários tipos de produtos, o que pode levar os consumidores, principalmente crianças, a excederem a ingestão diária aceitável (IDA) (ZYGLER et al., 2011; 2012; SAKAI et al., 2015; SAMANIEGO-VAESKEN; PARTEARROYO; VARELA-MOREIRAS; 2020).

Há uma controvérsia considerável em torno dos efeitos adversos para a saúde dos edulcorantes. Consumidores em todo o mundo têm relatado efeitos colaterais ligados ao consumo de edulcorantes, incluindo influencia no sistema de saciedade do cérebro e levar à compensação pelo baixo consumo de energia, aumentando assim a ingestão de energia subsequente; mudanças de humor e comportamento; irritações de pele; dores de cabeça; alergias; dificuldades respiratórias; e câncer (DOS SANTOS FIGUEIREDO et al., 2017; SHAH; JAGER, 2017).

Além disto, os consumidores exigem alimentos de melhor qualidade e se informam mais sobre as declarações nutricionais publicadas no rótulo da embalagem. Os rótulos dos alimentos precisam fornecer informações precisas sobre todos os ingredientes e aditivos alimentares. As rotulagens e as listas de ingredientes permitem a identificação da presença, mas não da quantidade, e dos tipos de edulcorantes adicionados. Desta forma, os consumidores são, por vezes, expostos à adulteração intencional e/ou à má rotulagem de produtos alimentícios (ZYGLER et al., 2012; DOS SANTOS FIGUEIREDO et al., 2017). A fim de garantir a segurança e a qualidade dos alimentos, o controle da qualidade destes é de extrema importância durante e após a produção de alimentos. O controle adequado dos alimentos processados exige métodos analíticos apropriados, capazes de fornecer resultados confiáveis ao analisar amostras de alimentos, geralmente caracterizadas por sua complexidade (KUBICA; NAMIEŚNIK; ANDRZEJ WASIK, 2015; LE et al., 2017). Neste contexto, métodos confiáveis, capazes de cobrir a quantificação de diversos edulcorantes simultaneamente, são necessários. A maioria dos métodos disponíveis foi desenvolvida para análise de cada tipo de edulcorante individualmente. No entanto, edulcorantes são comumente utilizados em combinação para redução de custo e melhoria das características sensoriais (ZYGLER et al., 2012; CHANG; YEH, 2014; SAKAI et al., 2015). Com isso, a conformidade dos alimentos com as regulamentações vigentes necessita de ser monitorada por métodos quantitativos robustos para a determinação, em uma única análise, de vários edulcorantes comumente utilizados (JAGER, 2017; FERREIRA; YUSTY; CARRO DÍAZ, 2018; SHAH; JAGER, 2017).

Neste cenário, o objetivo do presente estudo é realizar um levantamento bibliográfico sobre os métodos analíticos publicados na literatura com o propósito de analisar quantitativamente em laboratório edulcorantes em amostras alimentares.

METODOLOGIA

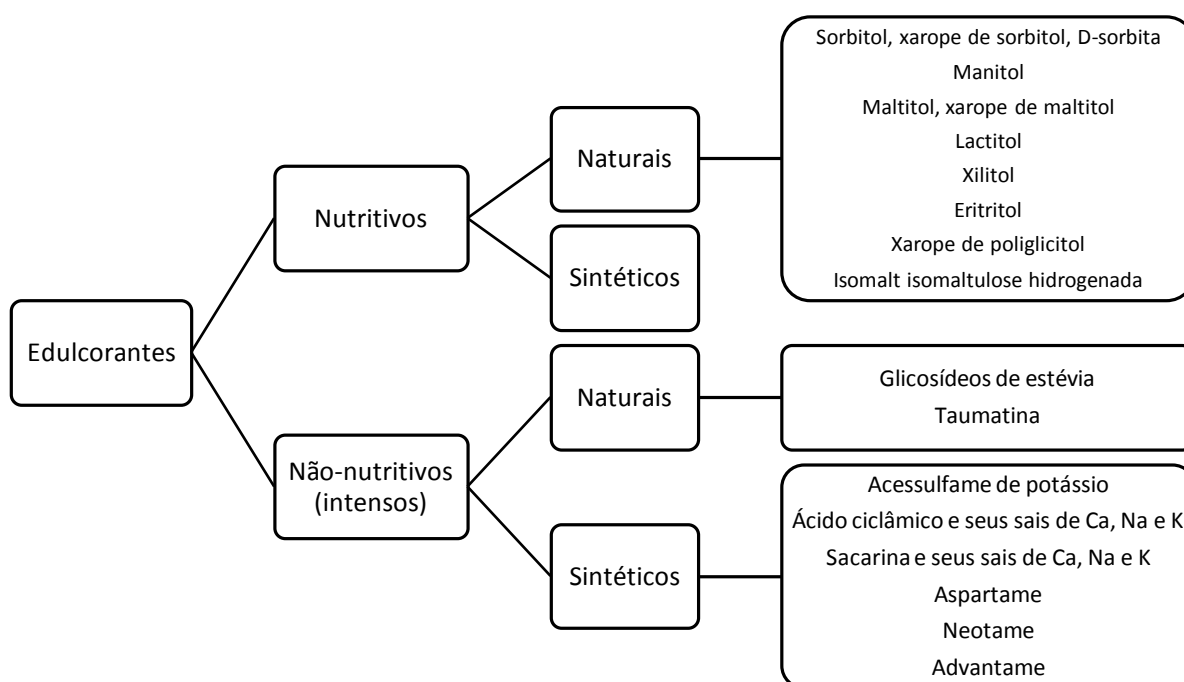
Este estudo corresponde a uma revisão narrativa exploratória para delineamento do cenário em torno das análises laboratoriais de alimentos com o propósito de quantificar edulcorantes em amostras alimentares. As buscas de estudos foram realizadas em bases de dados consideradas significativas para o contexto da análise de alimentos, ou seja, Food Science and Technology Abstracts (FSTA - via EBSCO host), Latin American and Caribbean Health Sciences (LILACS), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE/PubMED), Scientific Electronic Library Online (SciELO) e Web of Science. Os termos descritores aplicados nas buscas foram “Edulcorantes”, “Sweeteners”, “Artificial Sweeteners”, “Non-caloric Sweeteners”, “Determinação”, “Quantificação”, “Determination”, “Quantitation” e “Food analysis”. Assim, os termos descritores permitiram buscas de estudos em português ou inglês sobre a temática proposta. Tais buscas foram realizadas entre os meses de Junho e Novembro de 2020. Os estudos foram selecionados a partir de duas etapas. A primeira correspondendo a leitura prévia de títulos e resumos, enquanto a segunda se tratava da leitura completa dos estudos selecionados. Os estudos selecionados foram aqueles que apresentaram a lista de edulcorantes analisados, as matrizes alimentares pesquisadas e o método de análise proposto, incluindo a descrição dos equipamentos de separação e detecção dos analitos de interesse.

1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS EDULCORANTES

No Brasil, segundo a Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997 do Ministério da Saúde, “edulcorantes são substâncias diferentes dos açúcares que conferem

sabor doce aos alimentos” (BRASIL, 1997). No que diz respeito à classificação geral, dada a grande variedade de tipos existentes, os edulcorantes podem ser agrupados de acordo com o teor calórico (nutritivos ou não-nutritivos), a origem (natural ou artificial) ou mesmo a estrutura química (GARCIA-ALMEIDA; CASADO FDEZ; GARCIA ALEMAN, 2013) (**Figura 1**).

Figura 1. Classificação dos edulcorantes com uso autorizado pela Legislação brasileira.



Fonte: ANVISA, 2008 e 2019; JAIN; GROVER, 2015; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2017.

É possível identificar, entre os edulcorantes, substâncias como sulfonamidas, derivados da sacarose, álcoois ou peptídeos em um conjunto que não pertence a nenhum grupo químico específico e que apresentam propriedades físico-químicas distintas. Devido as diferenças químicas dos edulcorantes, é possível encontrá-los como agentes adoçantes estáveis em uma grande variedade de alimentos (BELLOIR; NEIERS; BRIAND, 2017; DHARTIBEN & APARNATHI, 2017).

A possibilidade de substâncias com características químicas tão distintas promoverem no organismo humano a sensação de doçura ocorre devido aos

receptores heterodiméricos dos tipos T1R2 e T1R3. Esses receptores possuem sítios de ativação bem distintos que podem se interligar a substâncias de diferentes classes (BELLOIR; NEIERS; BRIAND, 2017).

Existem vários métodos para determinar os edulcorantes em alimentos como eletroforese capilar, cromatografia de camada delgada e espectroscopia do UV, sendo o método de CLAE a escolha mais comum. E devido a diferenças nas propriedades relacionadas à estrutura de cada um dos edulcorantes, há menos opções analíticas disponíveis quando vários edulcorantes devem ser analisados simultaneamente (YANG; CHEN, 2009; DE QUEIROZ PANE et al., 2015; JANVIER et al., 2015; DIVIŠ, 2020; ZYGLER et al., 2011; 2012).

2 LEGISLAÇÕES VIGENTES

A legislação para edulcorantes como aditivos alimentares varia, de país para país, quanto aos tipos e os respectivos limites máximos permitidos (SAKAI et al., 2015). Em território brasileiro, a regulamentação e fiscalização dos edulcorantes são realizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Atualmente em vigência, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 18 de 24 de março de 2008 da ANVISA estabelece que os edulcorantes permitidos são sorbitol (SOR); manitol (MAN); acessulfame de potássio (ACE-K); aspartame (ASM); ácido ciclâmico e seus sais de cálcio, potássio e sódio (CIC); isomaltitol (ISM); sacarina e seus sais de cálcio, potássio e sódio (SAC); sucralose (SUC); taumatina (TAU); glicosídeos de esteviol (EST); neotame (NEO); maltitol (MAL); lactitol (LAT); xilitol (XIL); e eritritol (ERI) (ANVISA, 2008; DE QUEIROZ PANE et al., 2015; DOS SANTOS FIGUEIREDO et al., 2017). A legislação vigente limita o teor de aditivos alimentares utilizados em alimentos para fins especiais tendo em vista a preocupação com a saúde do consumidor, especificando o nível máximo de utilização de cada edulcorante intenso (ZYGLER et al., 2011). No caso dos álcoois de açúcares, mesmo à luz do conhecimento de efeitos adversos como efeito laxante e outros sintomas gastrointestinais (flatulência, inchaço e desconforto abdominal) quando consumido

em excesso, esses edulcorantes ainda não possuem IDA especificada (GREMBECKA, 2015). Ainda há a RDC nº 239 de 26 de julho de 2018 que estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares (ANVISA, 2018). A última adição à lista de edulcorantes permitidos para uso em alimentos em território nacional foi o advantame (ADV), derivado do aspartame, e o neotame, cuja permissão foi regulada pela ANVISA pela Resolução da Diretoria Colegiada Nº 281, de 29 de abril de 2019 (ANVISA, 2019). Por causa dessas diferenças entre regulamentações, as agências governamentais estão alertas quanto a análise de alimentos importados (SAKAI et al., 2015). Na União Europeia (UE), os Regulamentos nº 1129/2011 e nº 497/2014 da Comissão da UE autorizam adoçantes em alimentos e bebidas prontos para o consumo além dos permitidos pela legislação brasileira, incluindo a neohesperidina DC e o sal de aspartame-acessulfame. Já nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA), permite todos os citados para a legislação europeia com exceção do ciclamato e da neohesperidina DC, além da permissão de uso do extrato de frutas Luo Han Guo (FDA, 2018; FAO, 2021)

3. ANÁLISE DE EDULCORANTES POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA

O consumidor tem a sua disposição uma enorme variedade de alimentos contendo edulcorantes, além de bebidas e suplementos alimentares. As diferenças físico-químicas, eletroquímicas e espectrais dos edulcorantes são significativas, com isso a determinação simultânea dessas substâncias se encontra limitada pela capacidade dos métodos mais usuais em separação e detecção. Além das diferentes propriedades, os edulcorantes não-nutritivos apresentam poder edulcorante intensos e, por isso, se encontram em pequenas concentrações nos alimentos (YANG; CHEN, 2009). Além disso, alimentos comerciais podem apresentar polióis substituindo a sacarose, muitas vezes em combinação com edulcorantes artificiais de alta intensidade para contrapor a baixa doçura (GODSWILL, 2017). Com isso, a sensibilidade do método precisa ser alta (YANG; CHEN, 2009). Nesse contexto, a

técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se destaca devido à simplicidade, precisão e fácil preparo da amostra (HADJIKINOVA et al., 2017).

3.1 Preparo de amostra

Os processos de preparo e purificação de amostras objetivam extrair os analitos alvo de matrizes de alimentos antes da análise instrumental, isolando-as de possíveis interferentes (SHAH; JAGER, 2017). Geralmente, o preparo de amostras de alimentos compreende homogeneização, extração, purificação e concentração do analito. O objetivo é maximizar a recuperação dos analitos e minimizar a interferência na análise (FERREIRA; YUSTY; CARRO DÍAZ, 2018).

Os alimentos são matrizes complexas devido à alta variabilidade na composição quanto a presença de macronutrientes, micronutrientes e aditivos (FERREIRA; YUSTY; SHAH; JAGER, 2017; CARRO DÍAZ, 2018). Algumas amostras como bebidas carbonatadas, depois de desgaseificadas, são mais fáceis de trabalhar, sendo possível apenas diluições até que as concentrações do analito cheguem à faixa de trabalho. No entanto, extratos de amostras mais complexas devem ser purificados podendo ser utilizados métodos como extrações líquido-líquido, sólido-líquido ou extrações em fase sólida (SHAH; JAGER, 2017; FERREIRA; YUSTY; CARRO DÍAZ, 2018).

A extração em fase sólida é uma técnica reprodutível para isolar edulcorantes com base em sua afinidade com uma fase estacionária. Esta se destaca pela possibilidade de pré-concentração e purificação de compostos alvo de amostras aquosas, além de apresentar vantagem de adaptar a vários sistemas cromatográficos. Os sorventes são à base de sílica ou polímeros modificados com grupos funcionais polares ou apolares. Existem vários tipos de cartuchos de extração em fase sólida comercialmente disponíveis, nos quais, os analitos alvo são transferidos da matriz para um sorvente sólido onde são retidos e posteriormente eluídos para um solvente de escolha. Para o isolamento de edulcorantes de

alimentos, os cartuchos mais bem-sucedidos são aqueles de fase reversa, como C8 ou C18 (SHAH; JAGER, 2017; FERREIRA; YUSTY; CARRO DÍAZ, 2018).

Para execução da análise, é essencial ter um material de referência padrão contendo valores certificados de edulcorantes em uma matriz alimentar. Este material é analisado para confirmar que o método é válido e preciso para o propósito projetado. Há também a possibilidade de utilização de um padrão interno, importante para a quantificação, minimizando a possível supressão de íons de interferentes de matrizes complexas de alimentos. Alguns métodos na literatura aplicam varfarina sódica como padrão interno (SHAH; JAGER, 2017; LIM et al., 2013).

3.2 Detectores aplicáveis

As várias diferenças físico-químicas dos edulcorantes tornam muito desafiador desenvolver um único método para sua separação e isolamento de interferências da matriz (SHAH; JAGER, 2017). A ampla gama de colunas de separação disponíveis como sistemas de fase reversa, par iônico e hidrofílica, associado com a variabilidade de detectores disponíveis, torna a CLAE uma técnica aplicável a análise simultânea de múltiplos edulcorantes (SHAH; JAGER, 2017). Já para edulcorantes naturais como os polióis, há uma escassez de técnicas analíticas capazes de múltiplas análises (COELHO; DE JESUS, 2016).

Há, na literatura, exemplos de métodos CLAE acoplados a detectores ultravioleta (UV) ou arranjo de diodos (DAD) para ciclamato, sacarina, aspartame e acessulfame-K. No entanto, estes detectores são mais difíceis de serem aplicados já que a maioria dos edulcorantes, naturais e sintéticos, têm poucas propriedades cromóforas e muitos nutrientes presentes em alimentos podem interferir na especificidade do método (COELHO; DE JESUS, 2016; HADJIKINOVA et al., 2017; SHAH; JAGER, 2017). Assim, os métodos de CLAE para determinação simultânea de vários edulcorantes baseiam-se principalmente na espectrometria de massas (EM) (YANG; CHEN, 2009; PANE, 2012; ZYGLER et al., 2012), que permite a detecção

direta de edulcorantes sem a necessidade de derivação do analito antes das análises instrumentais (SHAH; JAGER, 2017).

Para o controle de qualidade de alimentos, está cada vez mais rotineira a escolha da CLAE acoplada a EM (CLAE-EM) (YANG; CHEN, 2009; PANE, 2012; ZYGLER et al., 2012; FERREIRA; YUSTY; CARRO DÍAZ, 2018). Essa técnica apresenta alta especificidade e sensibilidade (SHAH; JAGER, 2017). Enquanto técnicas baseadas em detectores de UV e DAD são capazes de detectar em torno de 3 a 4 edulcorantes, técnicas de CLAE-EM quantificam até 14 edulcorantes simultaneamente (CHANG; YEH, 2014; SHAH et al., 2015) (**Tabela 1**).

Os sistemas de CLAE-EM são geralmente aplicados em fase reversa com colunas C18 ou C8. Normalmente, a fase móvel combina uma solução aquosa de acetato de amônio, ácido acético ou ácido fórmico e um modificador orgânico (metanol e acetonitrila) usado para otimizar a relação entre separação cromatográfica e a sensibilidade da ionização por eletrospray (IES) (KOKOTOU; ASIMAKOPOULOS; THOMAIDIS, 2012).

No entanto, é preciso destacar que os métodos de CLAE-EM fornecem uma alternativa rápida e altamente específica, mas cuja preparação da amostra é frequentemente laboriosa e às vezes tem um custo elevado (PHIPPS et al., 2020).

Tabela 1. Sistemas de extração e determinação de edulcorantes em CLAE

Analitos	Amostras	Solvente de extração	Coluna Cromatográfica	Fase móvel	Detector	Referência
ACE-K, CIC, SAC, ASM, ALI, NEO, SUC, EST	Doces duros, bebidas não alcoólicas e bolos	H ₂ O / MeOH (50:50 v/v)	Johnson 5 µm C18 sílica (250 x 4,5 mm i.d.)	Metanol com solução tampão e acetona (69:24:7, v/v/v) / metanol com solução tampão e acetona (11:82:7, v/v/v) Tampão = (0,8 mL ácido fórmico e 1,5 mL trietilamina / L água)	Micromass ZQ 2000	YANG; CHEN, 2009
ACE-K, SAC, CIC, ASM	Bebidas não alcoólicas e alimentos para fins especiais	Água	Supelco C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	15% acetonitrila e 75% tampão fosfato (0,0125 mol/L de KH ₂ PO ₄ , pH 3,5)	DAD	SERDAR; KNEŽEVIĆ, 2011
ACE-K, CIC, SAC, ASM, NEO, SUC, EST, Dulcin, Ác. glicérrico, neoesperidina dihidrocalcona	Bebidas alcoólicas e não alcoólicas, conservas de frutas e de vegetais	Água	Luna Phenyl Hexyl Phenomenex (150 x 4,6 mm, 5 µm)	água deionizada + acetato de amônio 10 mM / metanol + acetato de amônio 10 mM no canal B	AB Sciex QTRAP 4000	CHANG; YEH, 2014
NEO	Bebidas não alcoólicas, bolos e conservas de frutas	Extração em fase sólida Oasis HLB	Diamonsil™ C18 (5 µm, 4,6 x 150 mm I.D.; Dikma, Beijing, China) e Whatman Partisil 5 ODS-3 (4,6 x 100 mm, 5 µm)	ácido fosfórico / água ultrapura / acetonitrila (3,5:700:300 v/v/v)	2996 PDA (DAD) Waters	YANG; CHEN, 2010
ACE-K, CIC, SAC, ASM, NEO, SUC, EST, Dulcin, ALI, Neoesperidina dihidrocalcona	Bebidas alcoólicas e não alcoólicas, bebidas em pó	H ₂ O + MeOH + acetona (75+20+5) 0,1% v/v de ác. acético	Ascentis Express C18 (Supelco, Bellefonte, PA, 100 x 4,6 mm, 2,7 µm)	H ₂ O + MeOH + acetona (75+20+5) 0,1% v/v ác. acético / ACN + acetona (95+5) 0,1% v/v ác. acético	Shimadzu LCMS-8050	KUBICA; NAMIEŚNIK; ANDRZEJ WASIK, 2015

Tabela 1. Sistemas de extração e determinação de edulcorantes em CLAE (*continuação*)

Analitos	Amostras	Solvente de extração	Coluna Cromatográfica	Fase móvel	Detector	Referência
ACE-K, CIC, SAC, ASM, NEO, SUC, EST, ALI, Neoesperidina dihidrocalcona	Bebidas alcoólicas e não alcoólicas, bebidas em pó	ACN 0,01% v/v Ác. acético	Ascentis Express C18 (Supelco, Bellefonte, PA, 100 x 4,6 mm, 2,7 µm) Acclaim™ Trinity™ P2 (100 x 2,1 mm, 3 µm Thermo Fisher Scientific)	RP mode - MeOH+H ₂ O+ACTN (20+75+5) 0.1% v/v ác. acético e ACN+ACTN (95+5) 0.1% v/v ác. acético HILIC mode - 40 mM NH ₄ Ac pH 6,8 / ACN 0,01% v/v ácido acético	Shimadzu LCMS-8050	KUBICA; NAMIEŚNIK; ANDRZEJ WASIK, 2016
ACE-K, CIC, SAC, ASM, NEO, SUC, Neoesperidina dihidrocalcona	Refrigerantes, sucos em pó, chás, bebidas à base de soja, bebidas lácteas, cervejas e bebidas alcoólicas	MeOH – H ₂ O (8:92, v/v)	50 x 2,1 mm Kinetex C18 (1,7 µm) (Phenomenex) Zorbax Eclipse C8 (4,6 x 150 mm, 5 µm)	ACN / tampão fosfato pH 6 (1 mmol/L) H ₂ O e 20 mmol/L acetato de amônio e MeOH e 20 mmol/L acetato de amônio	PDA (DAD) / API 4000 LCMS	LORENZO et al., 2015
ACE-K, CIC, SAC, ASM, NEO, SUC, Ác. glicirrónico	Leite, bebidas lácteas e iogurte	Quechers	Thermo Accucore C-18 aQ, 100 x 2,1 mm, 2,6 µm	0,1% ácido fórmico e formato de amônio 4 mM em água:metanol com ácido fórmico 0,1% e formato de amônio 4 mM	Q Exactive MS	JIA et al., 2014
ERI, XIL, SOR, MAN, MAL, LAT, Inositol, ISM	Doces, geleias, gomas de mascar, chocolates, chocolates processados e snacks	Água / etanol	Acquity BEH Amide 1,7µm, 2,1 x 150 mm	Acetonitrila e água contendo 0,05% (v / v) de etanolamina e trietilamina	Detector evaporativo de espalhamento de luz	KOH et al., 2017
ERI, XIL, SOR, MAN, MAL	Sucos de frutas, néctares, bebidas de frutas, suplementos dietéticos	Água : acetonitrila (1:3 v/v)	Shodex Asahipak, NH2P-50 4E 5µm (4,6 x 250 mm)	Água e acetonitrila	Corona CAD (Detector de aerossol carregado)	GREMBECKA; LEBIEDZIŃSKA; SZEFER, 2014

Tabela 1. Sistemas de extração e determinação de edulcorantes em CLAE (*continuação*)

Analitos	Amostras	Solvente de extração	Coluna Cromatográfica	Fase móvel	Detector	Referência
ACE-K, CIC, SAC, ASM, NEO, SUC, Neoesperidina dihidrocalcona	iogurtes, bebidas não alcoólicas, doces duros adoçantes de mesa e suplementos	Solução de sulfadimidina + água-metanol	Acquity UPLC® BEH C18 100 × 2,1 mm e 1,7 µm na partícula	Água com 20 mM de acetato de amônio / metanol, com 20 mM e acetato de amônio	Xevo TQ-S MS	JANVIER et al., 2015
SAC, XIL, ERI, SUC, MAL, Neoesperidina dihidrocalcona e ACE-K	Doces duros, bebidas não alcoólicas e iogurtes	Água Água + ác. fórmico pH 4,5 + N, N-diisopropiletilamina + SPE C18 cartridge + metanol (iogurtes)	Acquity UPLC® BEH C18 100 × 2,1 mm e 1,7 µm	NH ₄ OAc 10 mM em H ₂ O/MeOH (98/2, v/v) : NH ₄ OAc 10 mM em H ₂ O/MeOH (1/99, v/v)	Applied Biosystems Sciex Q-trap 4000 LCMS	SHAH et al., 2015
ACE-K, CIC, SAC, ASM, NEO, SUC, ALI, EST, Dulcin, Ác. Glicirrítico, Ácido 5-benzil-3,6-dioxo-2-piperazina acético	bebidas carbonatadas, café, isotônicos, bebidas de frutas, coquetéis não alcoólicos e à base de shochu não alcoólico e coquetéis e bebidas à base de shochu	0,1% ácido fórmico aquoso / SPE Oasis HLB + 0,1% ácido fórmico aquoso e metanol (lácteos)	Acquity UPLC® BEH C18 100 × 2,1 mm e 1,7 µm	0,1% ácido fórmico aquoso e 0,1% ácido fórmico em acetonitrila	MS/MS model LCMS-8040	SAKAI et al., 2015
ACE-K, CIC, SAC, ASM, NEO, SUC, ALI, EST, Neoesperidina dihidrocalcona	Refrigerantes, sucos, cerveja, néctares, lácteos	Água	Shodex ETRP1 150 × 3,0 mm e 4 µm	Água com acetato de amônio 5 mM e etanol	Varian 320 triple quadrupole	ORDOÑEZ et al., 2015

Tabela 1. Sistemas de extração e determinação de edulcorantes em CLAE (*continuação*)

Analitos	Amostras	Solvente de extração	Coluna Cromatográfica	Fase móvel	Detector	Referência
ACE-K, CIC, SAC, ASM, NEO, SUC, ALI, EST, Dulcin, Neoesperidina, dihidrocalcona	Bebidas sem açúcar, sucos, iogurtes e marinadas de peixe	Solução tampão de ácido fórmico-N, N-diisopropiletilamina (FA-DIPEA) (pH 4,5) SPE Strata-X 33 µm Polymeric RP	Nucleodur C18 Pyramid (250 x 3 mm, 5 µm)	metanol com tampão formato pH 4,5 e acetona (69+24+7 v/v/v) e (11+82+7 v/v/v)	G1313A DAD G1315B MSD	ZYGLER et al., 2011
ERI, XIL, SOR, MAN, ISM	Sobremesas prontas	Água + NaOH:ZnSO ₄	Shodex® Sugar SP0810 (300 mm x 8,0 mm i.d.)	Água	Detector de índice de refração	HADJIKINOVA et al., 2017
ACE-K, CIC, SAC, ASM, NEO, SUC, ALI, Dulcin, Neoesperidina, dihidrocalcona	Refrigerantes, sucos, iogurtes, geléias, marmeladas, compotas, saladas prontas, conservas e produtos de peixe	Solução tampão de ácido fórmico-N, N-diisopropiletilamina (FA-DIPEA) (pH 4,5) SPE Strata-X 33 µm Polymeric RP	Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	metanol com solução tampão (ácido fórmico-tampão de amônia pH 4,5) e acetona (componente A: 71/24/5, componente B: 5/90/5 v / v / v).	G1313A DAD G1315B MSD	ZYGLER et al., 2012

Fonte: os autores

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maior oferta de alimentos processados contendo edulcorantes faz necessário o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis e robustos. A diversidade de propriedades físico-químicas do grupo de edulcorantes e a presença de misturas destes compostos exige métodos capazes de analisar simultaneamente vários analitos. Nesse cenário, as técnicas de cromatografia líquida se mostram a escolha mais eficiente para a aplicação de um método multi-analítico de edulcorantes.

A limitação de propriedades físico-químicas coincidentes dentre os compostos edulcorantes aplicados a alimentos se comporta como um limitante para detectores mais simples como UV e fluorescência, dando espaço ao espectrômetro de massas como principal detector para edulcorantes. Os métodos de CLAE-EM são capazes de analisar mais edulcorantes simultaneamente e abranger uma gama maior de matrizes alimentícias líquidas e sólidas devido a elevada especificidade e sensibilidade. Tais características permitem superar dificuldades relativas a análise de matrizes complexas como alimentos e auxiliam nas perspectivas de métodos que serão úteis nas rotinas industriais e fiscalizatórias de alimentos

ANALYTICAL TECHNIQUES BASED ON LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR DETERMINATION OF SWEETENERS IN FOODS: A REVIEW

ABSTRACT

In the past few decades, sweeteners have gained importance in the food industry. This tendency is based on economic, sensory and health aspects. Sweeteners are substances of different origins and physico-chemical properties with a common feature of mimicking the sweet taste in foods by adding little or no calories. Due to the high availability of products with sweeteners, the risk of excessive consumption of sweeteners is increased, which can cause adverse effects to human health. Thus, it is necessary to develop methods capable of monitoring and quantifying sweeteners in food matrices. The analysis of several sweeteners simultaneously is a difficult task

because sweeteners have few common physico-chemical characteristics. In this sense, techniques based on liquid chromatography are the method of choice due to the ease of application and the possibility of coupling a range of detectors such as ultraviolet or mass spectrometry. The latter stands out for its high sensitivity and multi-analytical capacity, but it is still a high-cost technique for analytical routine. However, most of the available methods analyze only one group of sweeteners. Further studies are needed to develop multi-analytical methods for all sweeteners permitted under Brazilian law.

KEYWORDS: Sweeteners; HPLC; Food; MS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLOIR, Christine; NEIERS, Fabrice; BRIAND, Loïc. Sweeteners and sweetness enhancers. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 20, n. 4, p. 279-285, 2017.

BUKHAMSEEN, Fatima; NOVOTNY, Ladislav. Artificial sweeteners and sugar substitutes - some properties and potential health benefits and risks. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v.5, n.1, p. 638-649, 2014.

CHANG, Chui-Shiang; YEH, Tai Sheng. Detection of 10 sweeteners in various foods by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 3, p. 318-328, 2014.

CAROCHO, Márcio. MORALES, Patricia. FERREIRA, Isabel CFR. Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 302-317, 2017.

CAVAGNARI, Brian M. Edulcorantes no calóricos y peso corporal. **Medicina** (B Aires), v. 79, p. 115-22, 2019.

CENA, Hellas; CALDER, Philip C. Defining a healthy diet: evidence for the role of contemporary dietary patterns in health and disease. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 334, 2020.

COELHO, Aline Guadalupe; DE JESUS, Dosil Pereira. A simple method for determination of erythritol, maltitol, xylitol, and sorbitol in sugar-free chocolates by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 37, n. 22, p. 2986-2991, 2016.

DE QUEIROZ PANE, Daniela et al. Evaluation of the sweetener content in diet/light/zero foods and drinks by HPLC-DAD. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 11, p. 6900-6913, 2015.

DIVIŠ, Pavel; JUREČKOVÁ, Zuzana; VESPALCOVÁ, Milena; POŘÍZKA, Jaromír; PUNČOCHÁŘOVÁ, Lenka. Simultaneous determination of sweeteners and preservatives in beverages by HPLC-DAD-ELSD. **Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences**, v. 14, p. 881-886, 2020.

DOS SANTOS FIGUEIREDO, Luiza; SCAPIN, Tailane; FERNANDES, Ana Carolina; PROENÇA, Rossana Pacheco da Costa. Where are the low-calorie sweeteners? An analysis of the presence and types of low-calorie sweeteners in packaged foods sold in Brazil from food labelling. **Public Health Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 447-453, 2018.

FAO (Food and Agriculture Organization). FAOLEX Database, European Union; Disponível em <http://www.fao.org/faolex/results/details/en/c/LEX-FAOC108192/>; Acessado em 4 de janeiro de 2021.

FDA (Food and Drug Administration). **Additional information about high-intensity sweeteners permitted for use in food in the united states**, 2018. Disponível em <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/additional-information-about-high-intensity-sweeteners-permitted-use-food-united-states>; acessado em 4 de janeiro de 2021.

FERREIRA, Rosa A. Lorenzo; YUSTY María Asunción Lage; CARRO DÍAZ, Analytical Strategies to Determine Artificial Sweeteners by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. In: RAMAWAT, Kishan Gopal. **Sweeteners Pharmacology, Biotechnology, and Applications**. Springer International Publishing AG, 2018.

GARCIA-ALMEIDA, José Manuel; CASADO FDEZ, Gracia M.; ALEMAN, J. Garcia. A current and global review of sweeteners. Regulatory aspects. **Nutrición Hospitalaria**, v. 28, n. Suppl 4, p. 17-31, 2013.

GREMBECKA, Małgorzata; LEBIEDZIŃSKA, Anna; SZEFER, Piotr. Simultaneous separation and determination of erythritol, xylitol, sorbitol, mannitol, maltitol, fructose, glucose, sucrose and maltose in food products by high performance liquid chromatography coupled to charged aerosol detector. **Microchemical Journal**, v. 117, p. 77-82, 2014.

GREMBECKA, Małgorzata. Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. **European Food Research and Technology**, v. 241, n. 1, p. 1-14, 2015.

HADJIKINOVA, Raina et al. Development and Validation of HPLC-RID method for Determination of Sugars and Polyols. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 8, p. 1263-1269, 2017.

JAIN, Tanu; GROVER, Kiran. Sweeteners in human nutrition. **International Journal of Health Sciences and Research**, v. 5, n. 5, p. 439-451, 2015.

JANVIER, Steven et al. Low-calorie sweeteners in food and food supplements on the Italian market. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 8, n. 4, p. 298-308, 2015.

JIA, Wei et al. Analysis of additives in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1336, p. 67-75, 2014.

LIM, Ho-Soo et al. HPLC-MS/MS analysis of 9 artificial sweeteners in imported foods. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 233-240, 2013.

LORENZO, Rosa Antonia. et al. Artificial sweeteners in beverages by ultra performance liquid chromatography with photodiode array and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Control**, v. 47, p. 43-52, 2015.

KOH, Dong-wan et al. A rapid method for simultaneous quantification of 13 sugars and sugar alcohols in food products by UPLC-ELSD. **Food Chemistry**, v. 240, p. 694-700, 2018.

KOKOTOU, Maroula G.; ASIMAKOPOULOS, Alexandros G.; THOMAIDIS, Nikolaos S. Artificial sweeteners as emerging pollutants in the environment: analytical methodologies and environmental impact. **Analytical Methods**, v. 4, n. 10, p. 3057-3070, 2012.

KUBICA, Paweł; NAMIEŚNIK, Jacek; WASIK, Andrzej. Determination of eight artificial sweeteners and common *Stevia rebaudiana* glycosides in non-alcoholic and alcoholic beverages by reversed-phase liquid chromatography coupled with tandem mass

spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 5, p. 1505-1512, 2015.

KUBICA, Paweł; NAMIEŚNIK, Jacek; WASIK, Andrzej. Comparison of hydrophilic interaction and reversed phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for the determination of eight artificial sweeteners and common steviol glycosides in popular beverages. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis**, v. 127, p. 184-192, 2016.

MURRAY, Susan et al. Recent studies of the effects of sugars on brain systems involved in energy balance and reward: Relevance to low calorie sweeteners. **Physiology & Behavior**, v. 164, p. 504-508, 2016.

ORDOÑEZ, Edgar Y. et al. Determination of artificial sweeteners in beverages with green mobile phases and high temperature liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 169, p. 162-168, 2015.

PHIPPS, William S. et al. Quantitative amino acid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using low cost derivatization and an automated liquid handler. **JIMD reports**, v. 51, n. 1, p. 62-69, 2020.

SAKAI, Hiroaki et al. Simultaneous determination of sweeteners in beverages by LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 6, p. 808-816, 2015.

SAMANIEGO-VAESKEN, Maria de Lourdes; PARTEARROYO, Teresa; VARELA-MOREIRAS, Gregorio. Edulcorantes bajos en calorías o sin calorías, dieta y salud: una visión actual. **Nutrición Hospitalaria**, v. 37, n. SPE2, p. 24-27, 2020.

SERDAR, Maja; KNEŽEVIĆ, Zorka. Determination of artificial sweeteners in beverages and special nutritional products using high performance liquid chromatography. **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, v. 62, n. 2, p. 169-172, 2011.

SHAH, Romina et al. A novel method for the simultaneous determination of 14 sweeteners of regulatory interest using UHPLC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 2, p. 141-151, 2015.

SHAH, Romina; DE JAGER, Lowri S. Recent analytical methods for the analysis of sweeteners in food: A regulatory perspective. **Food and Drug Administration Papers**, v. 5, p. 13-31, 2017.

ZYGLER, Agata et al. Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 7, p. 2159-2172, 2011.

ZYGLER, Agata et al. The content of high-intensity sweeteners in different categories of foods available on the Polish market. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 29, n. 9, p. 1391-1401, 2012.

YANG, Da-jin; CHEN, Bo. 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.

YANG, Dajing; CHEN, Bo. Determination of neotame in beverages, cakes and preserved fruits by column-switching high-performance liquid chromatography. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 9, p. 1221-1225, 2010.